

Anno 4 - Numero 2 - 2017

Ematologia **Oncologica**.it

**Lesioni genetiche
ed evoluzione clonale**

Organo Ufficiale
della **Fondazione Matarrelli** - Milano

Con il supporto non condizionato di



Lesioni genetiche ed evoluzione clonale

Aspetti biologici e metodologici 7

Alessandra Santoro

Neoplasie mieloproliferative croniche 17

Daniela Barraco, Francesco Passamonti

Leucemia linfatica cronica 25

Gian Matteo Rigolin, Antonio Cuneo

Sindromi mielodisplastiche 37

Matteo G Della Porta, Marianna Rossi, Elisabetta Todisco,

Lucio Morabito, Chiara Milanese, Elena Saba

Mieloma multiplo 45

Carolina Terragna

Leucemia acuta mieloide 57

Cristina Mecucci, Caterina Matteucci

Ematologia Oncologica.it

Vol 4 - n.2 - 2017

Direttore Responsabile

Giorgio Maggiani

Direttore Scientifico

Giorgio Lambertenghi Deliliers

Fondazione Matarrelli, Milano

Comitato Editoriale

Sergio Amadori

Università degli Studi Tor Vergata, Roma

Mario Boccardo

Università degli Studi, Torino

Alberto Bosi

Università degli Studi, Firenze

Michele Cavo

Università degli Studi, Bologna

Antonio Cuneo

Università degli Studi, Ferrara

Marco Gobbi

Università degli Studi, Genova

Cristina Mecucci

Università degli Studi, Perugia

Fabrizio Pane

Università degli Studi, Napoli

Francesco Passamonti

Università degli Studi, Varese

Gianni Pizzolo

Università degli Studi, Verona

Giorgina Specchia

Università degli Studi, Bari

Ematologia Oncologica.it

È una rivista quadrimestrale monotematica, di aggiornamento in lingua italiana, che ha essenzialmente lo scopo educativo di rendere disponibili le informazioni più aggiornate su argomenti pertinenti le malattie del sangue, in particolare quelle neoplastiche. Per raggiungere questo obiettivo la rivista desidera coinvolgere gli specialisti italiani più qualificati e informare il lettore sui più recenti progressi nel campo della ricerca di base, della clinica e della terapia.

La rivista si attiene alle raccomandazioni indicate dal World Association of Medical Editors (WAME) riguardante l'etica delle pubblicazioni in ambito sanitario.

Registrazione Tribunale di Milano

n. 348 del 19/11/2013

Progetto grafico

Dynamicom srl

Sito Internet

www.ematologiaoncologica.it

Coordinamento editoriale

Dynamicom - Milano

Tel. (+39)0289693750 - Fax (+39)02201176

Editore

Fondazione Matarrelli

Periodicità

Quadrimestrale

Avvertenze ai lettori

L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni eventualmente citati negli articoli, ed invita il lettore a controllare personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

Norme per gli Autori

- L'accettazione dei testi inviati è comunque subordinata al parere del Comitato Editoriale che deve verificare la loro compatibilità con le norme redazionali.

- Gli Autori dei testi sono gli unici responsabili del loro contenuto, e della riproduzione delle immagini allegate.

- Il primo Autore è tenuto ad ottenere l'autorizzazione di "Copyright" qualora utilizzi figure e/o tabelle già pubblicate altrove.

- La proprietà dell'articolo, una volta pubblicato, appartiene alla Fondazione Matarrelli, (Largo Crocetta, 2 - 20122 MI) che ha depositato il nome della rivista presso il Tribunale di Milano in data 19/11/2013

- Il manoscritto deve essere inviato a Dynamicom Edizioni (segreteria@ematologiaoncologica.it) che, dopo averlo controllato ed impaginato, lo invierà al Direttore Scientifico (giorgio.lambertenghi@unimi.it) per la revisione e il controllo della stesura secondo le norme redazionali. Le bozze di stampa verranno quindi rinviate all'Autore per le opportune correzioni, che dovrà provvedere entro cinque giorni lavorativi a rinviarle a: segreteria@ematologiaoncologica.it

Norme redazionali

Il contenuto dell'articolo, redatto utilizzando il programma Microsoft Word per Windows o Macintosh, non deve superare le 30-35 cartelle dattiloscritte (2000 battute cad.) compresa la bibliografia, e corredato delle illustrazioni (tabelle, grafici, figure) nel numero che l'Autore ritiene necessario, in file ad alta risoluzione (salvate in formato pdf, jpg o eps).

Lo stile del manoscritto, le citazioni bibliografiche e il loro riferimento nel testo del manoscritto devono seguire le raccomandazioni dell'International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Per le relative informazioni, gli Autori sono pregati di consultare il sito <http://www.icmje.org>.

L'articolo deve essere così strutturato:

- **Titolo conciso** e pertinente con il tema della rivista;
- **Prima pagina** con nome e cognome degli Autori, istituzione di appartenenza, foto tessera a colori del primo Autore;
- **Introduzione iniziale** che esponga in maniera chiara lo scopo dell'articolo;
- **Corpo del testo** suddiviso in sottocapitoli a contenuto omogeneo;

Pagina finale:

- 1) nome e cognome del primo autore, con telefono, fax, e-mail al quale andrà indirizzata la corrispondenza;
- 2) eventuali **ringraziamenti** a persone e/o associazioni;
- 3) 3-5 parole chiave.

Bibliografia

Per lo stile nella stesura seguire le seguenti indicazioni o consultare il sito "International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals Sample References". Le **voci bibliografiche** non devono superare il numero massimo di 150, numerate secondo l'ordine di comparsa nel testo, citate tra parentesi con il testo in apice e con i numeri arabi, tenendo presente gli esempi sottostanti.

Articoli con 1-6 autori

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 2000;30(1):100-1.

Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, Miliani E. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 2000;30(1):100-1.

Articoli con più di 6 autori

Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, Miliani E, De Giglio I, Baldoni A, et al. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 2000;30(1):100-1.

Abstract e Congressi

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2000;100(10):1000.

Capitoli di libri

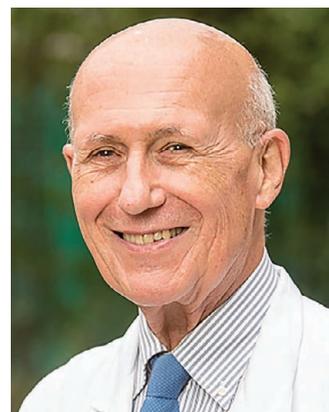
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. In: Spagnoletti M. ed. *The Hemoglobin*, Vol 10. London: Raven Livingstone. 1980:10-15.

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 1980:10-15.

Editoriale

Giorgio Lambertenghi Delilieri

Fondazione Matarrelli - Milano



Ematologia Oncologica.it dedica questo numero alle più recenti tecnologie che hanno permesso di ottenere il sequenziamento genomico di una singola popolazione tumorale, fornendo così informazioni utili per classificare i pazienti in categorie ben definite e sviluppare nuove terapie personalizzate. In pratica oggi si ha la possibilità di definire il processo evolutivo di una neoplasia che, con il progressivo accumularsi di mutazioni, conduce ad una eterogeneità genetica clonale. Nelle neoplasie croniche mieloproliferative, le tre mutazioni che hanno un ruolo primario in termini diagnostici sono responsabili dell'iperproliferazione midollare. In questo ambito, le tecniche di sequenziamento genico hanno permesso di identificare sia il profilo che l'ordine temporale di acquisizione degli eventi genetici, alcuni precedenti alla mutazione V617F di JAK2, altri invece successivi. In particolare i pazienti con mielofibrosi primaria sono caratterizzati da un numero elevato di mutazioni somatiche, rilevanti in termini di trasformazione leucemica e ridotta sopravvivenza. Analogamente si è scoperto che anche nella leucemia linfatica cronica esiste un notevole grado di eterogeneità genetica ed epigenetica che può aiutare a comprendere meglio la storia naturale della malattia e il variabile comportamento clinico. Numerose infatti sono le mutazioni geniche ricorrenti, variabili in rapporto allo stato mutato o non mutato dei geni IGHV e ai diversi subset cellulari relativamente alla stereotipia del B-cell receptor. Lo studio della composizione clonale ha una rilevanza prognostica anche nella linfocitosi B monoclonale, consentendo quindi l'identificazione di quei pazienti che progrediranno verso la malattia conclamata.

È noto che nelle sindromi mielodisplastiche le anomalie cromosomiche clonali, molto importanti per la diagnosi e l'inquadramento prognostico, sono identificabili in meno della metà dei pazienti, utilizzando tecniche di citogenetica convenzionale. Viceversa con i metodi di sequenziamento ad alta

sensibilità le mutazioni somatiche sono visibili nella maggior parte dei pazienti e interessano differenti geni coinvolti in varie fasi della proliferazione clonale. Recenti evidenze indicano che alcune di queste mutazioni hanno un valore prognostico sulla sopravvivenza e il rischio di evoluzione leucemica, con i relativi riflessi sullo sviluppo clinico di programmi di medicina personalizzata.

Anche il concetto che il mieloma multiplo sia una malattia monoclonale è stato completamente rivisitato dagli studi genomici della plasmacellula neoplastica. Oggi infatti sappiamo che il clone di mieloma è genotipicamente e fenotipicamente eterogeneo, virtualmente cioè non esiste un paziente uguale all'altro. Tale eterogeneità è presente già nel paziente con MGUS che presenta un catalogo di mutazioni sovrapponibile alla fase conclamata di malattia. Dal momento che la progressione a mieloma multiplo non si associa alla comparsa di nuove alterazioni genomiche, ciò che distingue le due fasi è la percentuale di plasmacellule aberranti, cioè le dimensioni del clone neoplastico. Tutte queste recenti osservazioni sono essenziali per la definizione di schemi terapeutici personalizzati che tengano conto del dinamismo del clone tumorale.

Anche la leucemia acuta mieloide è un vero e proprio paradigma di malattia clonale evolutiva. Si ritiene che poche mutazioni siano all'origine necessarie per scatenare la malattia, e che eventi epigenetici concomitanti contribuiscano in maniera rilevante allo sviluppo della leucemia. La coesistenza di più cloni, diversi sia per dimensione che per caratteristiche di malignità, non sembra sia correlata necessariamente all'instabilità genetica, ma potrebbe anche rappresentare la risposta a stimoli ambientali, compresi i trattamenti chemioterapici. Diventa pertanto importante, al fine di un monitoraggio clinico, capire il significato di questi subcloni ed il loro potenziale ruolo nell'induzione della recidiva.

Aspetti biologici e metodologici



Alessandra Santoro

Ematologia con UTMO, Dipartimento di Oncologia, Ospedali Riuniti Villa Sofia-Cervello, Palermo

Introduzione

La crescita neoplastica è un processo evolutivo in cui una popolazione cellulare clona e accumula mutazioni nel tempo e nel corso delle divisioni cellulari ed evolve in massa tumorale costituita da sottopopolazioni cellulari geneticamente distinte denominate cloni. La caratterizzazione del genoma delle cellule tumorali ha aumentato notevolmente la nostra comprensione dei meccanismi molecolari che stanno alla base dell'insorgenza del tumore, della sua progressione ed evoluzione clonale, dell'insorgenza di resistenza alle terapie. L'eterogeneità intratumorale è sicuramente uno degli aspetti più interessanti e complessi della biologia del tumore; la neoplasia infatti è caratterizzata da sottopopolazioni di cellule tumorali generate dall'evoluzione clonale con precisa gerarchia. Nell'evoluzione clonale neoplastica il genoma delle cellule tumorali, nel corso dei numerosi cicli di divisione cellulare, acquisisce nuove varianti che possono essere selezionate e portare ad espansione clonale. Ogni sottopopolazione clonale (sub-clone) origina da una popolazione parentale ed emerge con l'acquisizione di una nuova mutazione somatica conservata dalla successiva espansione clonale. Una potente strategia per lo studio di questa complessa architettura tumorale è il confronto dello studio del genoma tumorale di campioni indipendenti tra loro che possono derivare da siti differenti della neoplasia o da tempi differenti della progressione tumorale (esordio, recidiva). Con questa strategia e avvalendosi dei risultati del sequenziamento dell'intero genoma (*Whole Genome Sequencing*, WGS) è stato dimostrato che il genoma di una leucemia mieloide acuta (LMA) all'esordio mostra un'evoluzione clonale tra l'esordio e la recidiva^(1,2); risultati analoghi sono stati ottenuti comparando i dati WGS di un campione di mielofibrosi primaria (MFP) con il campione dell'evoluzione in leucemia acuta⁽³⁾ e quelli del sito primario del tumore rispetto alle metastasi nel carcinoma mammario⁽⁴⁾. Inoltre lo studio delle regioni codificanti del DNA (*Whole Exome Sequencing*, WES) delle cellule tumorali del tumore primario prelevate da siti differenti ha mostrato eterogeneità intratumorale ed evoluzione clonale in differenti tumori⁽⁵⁻⁷⁾. L'architettura clonale delle neoplasie può essere definita utilizzando la fre-

quenza allelica di tutte le varianti somatiche (VAFs) evidenziate dall'analisi WGS^(1,8). La maggior parte di queste varianti somatiche presenti in questi genomi è acquisita casualmente durante le divisioni cellulari (mutazioni passeggera) e viene selezionata e trasmessa durante l'espansione clonale (catturata) se aumenta la patogenicità del clone generato. Sebbene le varianti passeggera non siano patogenetiche, possono comunque offrire una caratterizzazione genetica utile per identificare i subcloni cellulari. Un clone fondatore contenente centinaia di varianti è presente nella neoplasia primaria, persiste durante la progressione della malattia e genera subcloni che contengono le stesse mutazioni patogenetiche insieme all'acquisizione di nuove varianti⁽⁸⁾. Le mutazioni patogenetiche ricorrenti in un determinato processo neoplastico possono essere riscontrate sia nel clone fondatore che nei subcloni e non è ancora del tutto chiaro se specifiche mutazioni avvengono nel clone fondatore rispetto ai subcloni e ancora se la distribuzione delle mutazioni fra i diversi cloni possa avere un importante significato clinico e biologico⁽⁹⁾. L'analisi genetica delle cellule in toto di una massa tumorale può nascondere l'eterogeneità del tumore. Cellule derivanti dallo stesso sito neoplastico possono differire l'una dall'altra per la presenza di varianti somatiche, per l'espressione genica e la regolazione epigenetica. L'analisi della singola cellula neoplastica garantisce la comprensione dell'eterogeneità di una popolazione cellulare neoplastica⁽¹⁰⁾ (Figura 1).

Next Generation Sequencing

Dopo il grande successo del progetto di sequenziamento del genoma umano, degli anni 2002-2003, piattaforme di sequenziamento massivo parallelo denominate anche *Next Generation Sequencing* (NGS) sono state acquisite dai centri di ricerca traslazionale in giro per il mondo. Negli anni 2005-2008 si affacciano sul mercato le tre principali tecnologie 454, SOLiD e Solexa: tutti e tre i sistemi mostrano caratteristiche comparabili in termini di elevata processività ed accuratezza. Attualmente le piattaforme maggiormente presenti nei centri di ricerca sono Illumina e Ion Torrent, che hanno acquisito le precedenti versioni di tecnologia NGS. La

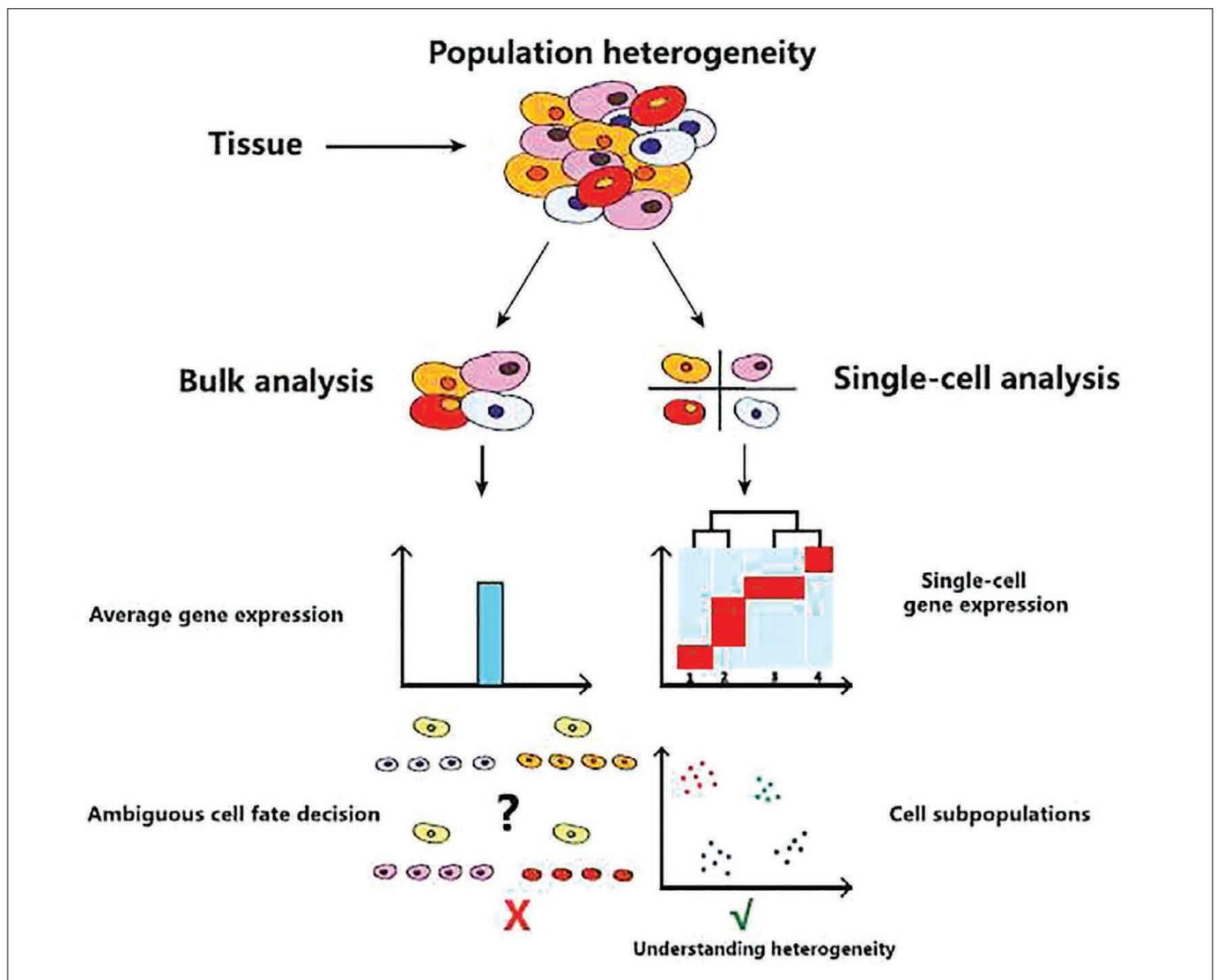


Figura 1 - Analisi della singola cellula. Le analisi condotte sulla singola cellula svelano l'eterogeneità tissutale. Gli esperimenti tradizionali condotti su campioni pluricellulari possono mascherare le differenze tra le singole cellule, in termini di varianti del genoma ma anche di espressione genica, di un tessuto o di un processo neoplastico⁽¹⁰⁾.

tecnologia NGS è in grado di ottenere una completa raffigurazione del genoma cellulare (*Whole Genome Sequencing*, WGS), della parte codificante del genoma (*Whole Exome Sequencing*, WES) o dell'intero trascrittoma (RNA seq) cellulare. Per far fronte alla richiesta di applicazione della tecnologia NGS in diagnostica, sono stati sviluppate anche piattaforme più compatte con un inferiore capacità di processamento che le rende fruibili ai fini diagnostici con costi contenuti. Queste piattaforme con ridotta processività (*throughput*) sono facilmente utilizzabili ai fini diagnostici (*benchtop*, NGS) per effettuare il sequenziamento di pannelli comprendenti 25-150 geni patologia-correlati⁽¹¹⁻¹²⁾. La tecnologia NGS WGS o WES permette di caratterizzare l'eterogeneità genetica intratumorale fornendo informazioni necessarie per l'applicazione della medicina personalizzata. La tecnologia NGS, grazie alla sua strategia operativa, basata sul sequenziamento massivo in parallelo di milioni di piccoli fram-

menti di DNA, è in grado di offrire sulla singola posizione nucleotidica dei valori di ripetitività (*coverage*) che si traducono in elevata sensibilità e accuratezza non raggiungibile con la precedente tecnica Sanger di sequenziamento. Si possono, infatti, generare centinaia di milioni di corte sequenze (35bp-250bp) in una sola corsa in un tempo breve con un basso prezzo per base sequenziata. Entrambe le tecnologie prevalentemente utilizzate si compongono di quattro passaggi di base:

- **la preparazione della libreria**, che può essere realizzata mediante amplificazione (libreria di ampliconi, utilizzata prevalentemente per i pannelli genici) o mediante frammentazione del DNA o del cDNA e "cattura" con oligo specifici (arricchimento di regioni specifiche o applicazioni WES) oppure il legame di adattatori a tutti i frammenti generati e successiva amplificazione (per le applicazioni di WGS);

- **la generazione dei cluster clonali** che si ottiene con modalità differenti nei due sistemi, per PCR in emulsione (Ion Torrent) e per PCR su supporto solido (*bridge* PCR Illumina);
- **la fase di sequenziamento** in cui il sistema di rilevazione dell'incorporazione dei nucleotidi è basato su emissione di fluorescenza (Illumina) o variazioni del pH (Ion Torrent). La differenza cruciale della fase di sequenziamento rispetto alla tecnica tradizionale è che la tecnologia NGS consente il sequenziamento parallelo, separato e massivo di migliaia o milioni di frammenti;
- **l'analisi dei dati** che prevede il conteggio di tutte le sequenze per i diversi frammenti della libreria (*read counting*), l'allineamento alle sequenze di riferimento e il riconoscimento delle varianti (*Variant Caller*) ed altre specifiche analisi in relazione alla domanda dell'operatore. Attualmente la sfida principale, per i centri che applicano la tecnologia NGS, è rappresentata dall'analisi bioinformatica dell'enorme quantità di dati generati da

NGS. L'analisi dei dati, infatti, ha una serie di criticità ed ostacoli di seguito riassunti: i file di testo da analizzare sono molto estesi (migliaia di milioni di righe) e necessitano di potenti computer con enorme utilizzo di memoria per gestire, analizzare, accumulare, trasferire ed archiviare i file; vi è la necessità di nuovi algoritmi e software che utilizzano il linguaggio *Unix/Linux based* e la necessità di una stretta collaborazione tra chi sviluppa la tecnologia, i bioinformatici e i biologi. L'analisi dei dati e il riconoscimento delle varianti richiedono un processo *multistep* ed un algoritmo bioinformatico che tengano conto, a partire dal dato grezzo del sequenziamento, di parametri di qualità della sequenza singola variante, di probabili errori introdotti dalle reazioni di sequenziamento e dal sistema di lettura delle sequenze, della validazione ed interpretazione funzionale dei dati (uno schema rappresentativo dell'algoritmo generale di analisi dei dati è riportato in Figura 2).

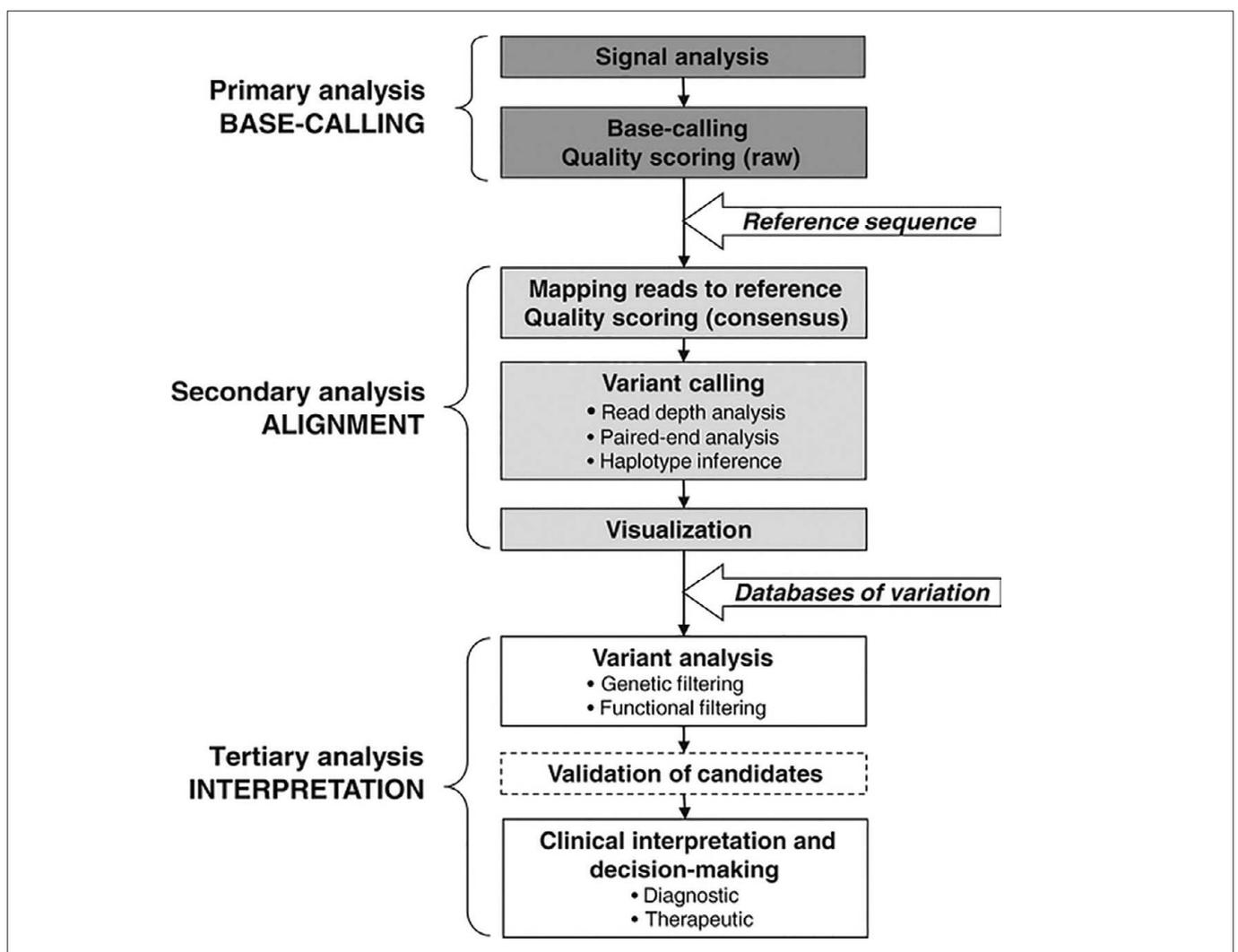


Figura 2 - Schema dell'analisi dei dati NGS. L'analisi dei dati e il riconoscimento delle varianti richiedono un processo multistep ed un algoritmo bioinformatico che tengano conto, a partire dal dato grezzo del sequenziamento (analisi primaria), di parametri di qualità della sequenza della singola variante, di probabili "errori" introdotti dalle reazioni di sequenziamento e dal sistema di lettura delle sequenze (analisi secondaria), della validazione ed interpretazione funzionale dei dati (analisi terziaria)⁽¹²⁾.

Infine, si riportano degli esempi di terminologia specifica della tecnologia NGS che potranno essere di ausilio al lettore di pubblicazioni scientifiche che utilizzano questa tecnologia:

- **Coverage (depth):** il numero di sequenze ottenute che mappano in una determinate posizione;
- **Quality Score:** a ciascuna base rilevata dalla sequenza è assegnato dal software di analisi uno score di qualità che permette di individuare gli errori tecnici;
- **Paired-End Sequencing:** i frammenti di DNA vengono sequenziati in entrambe le direzioni (*forward* e *reverse*) per permettere maggiore accuratezza nell'allineamento;
- **Multiplex Sequencing:** in una singola reazione di sequenziamento possono essere miscelati campioni diversi: questo è possibile grazie al legame di sequenze barcode ad ogni campione nella fase di costruzione della libreria; il software di analisi riconoscerà i singoli barcode;
- **Mapping:** la fase di allineamento delle sequenze generate alla sequenza di riferimento (*reference*);
- **Mixed or polyclonal reads:** sequenze miste causate da artefatti della fase di generazione dei cluster clonali (le sequenze miste verranno scartate dal software di analisi);
- **Multi-reads:** sequenze che possono allinearsi con più di una sequenza di riferimento e pertanto la loro assegnazione rimane dubbia (verranno scartate dal software di analisi).

Eterogeneità ed evoluzione clonale delle neoplasie

La capacità di individuare, mediante NGS, mutazioni somatiche

con bassa frazione allelica nelle cellule tumorali ha consentito di ottenere nuove informazioni sui modelli di evoluzione dei tumori.

L'evoluzione clonale dei tumori può essere indagata mediante la strategia della valutazione della frazione allelica della singola variante, sfruttando la capacità della tecnologia NGS di ottenere dati con elevatissima sensibilità (*deep sequencing*)⁽¹³⁻¹⁶⁾. Questo approccio utilizza la frazione di sequenze che individuano una determinata variante somatica (frazione allelica della variante, VAF) per calcolare la frequenza di questa variante nella neoplasia primitiva e nei subcloni. Questo approccio ci permette di ottenere informazioni sulle correlazioni fra le differenti varianti presenti nel campione neoplastico non frazionato: la composizione genetica di ogni clone, la frequenza di ciascun clone (proporzionale alle media delle VAF che costituiscono il clone), il modello di come si è evoluta l'architettura clonale tumorale (i cloni a minore frequenza discendono da quelli a frequenza più elevata) (Figura 3). La caratterizzazione dei modelli di evoluzione clonale tumorale è sicuramente più completa quando è possibile sequenziare siti multipli del tumore; inoltre dal sequenziamento di campioni tumorali multipli raccolti durante la progressione tumorale si ottengono informazioni sulle lesioni primarie e su quelle legate alla progressione o alla resistenza ai regimi terapeutici (Figura 4). I modelli di evoluzione clonale dei tumori tengono in considerazione l'acquisizione nel tempo di varianti aggiuntive a partire dallo stesso subclone: attualmente i metodi di classificazione gerarchica dei subcloni tumorali mettono in connessione l'ordine temporale degli eventi con la frequenza stimata delle singole varianti acquisite dai subcloni tumorali. L'ordine temporale degli

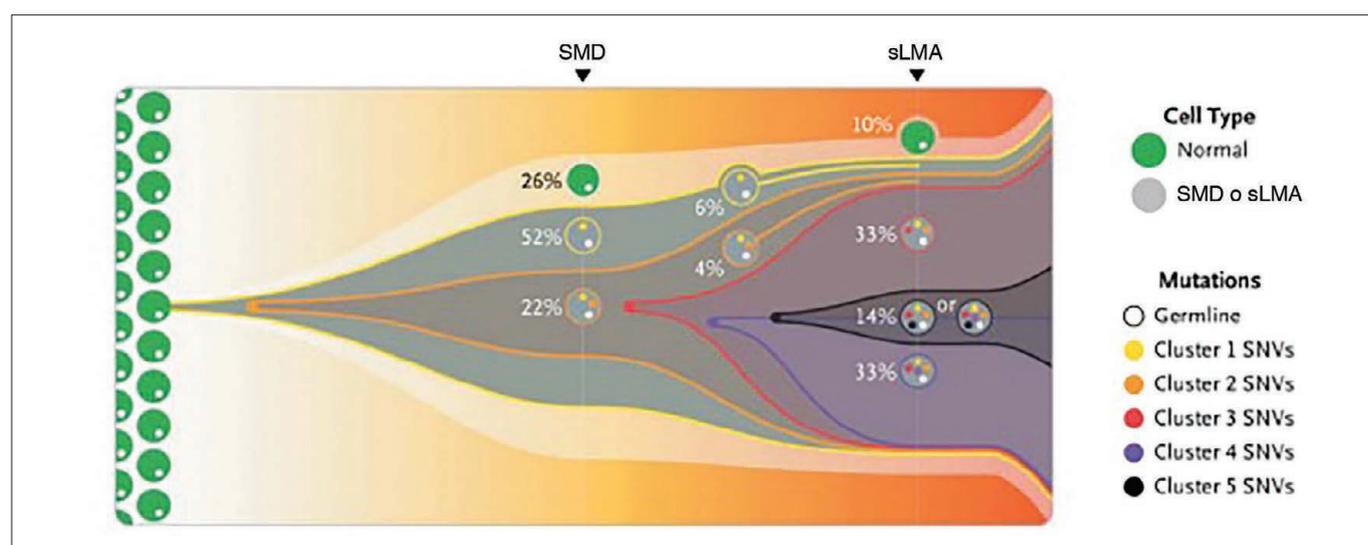


Figura 3 - Progressione clonale da Sindrome Mielodisplastica (SMD) a leucemia acuta mieloide secondaria (sLMA). L'immagine mostra il modello che riassume l'evoluzione clonale dallo stadio di SMD a quello di sLMA nel soggetto UPN461282. Il clone 1, delimitato in giallo, è caratterizzato da 323 singole varianti nucleotidiche (SNs) che rappresentano circa il 74% delle cellule midollari. Le cellule del clone 2 (arancione) derivano da una cellula del clone 1 e quindi contengono tutte le varianti del clone 1 e 2; questo clone diventa dominante nella sLMA ed evolve in tre ulteriori subcloni che acquisiscono varianti aggiuntive. L'ultimo clone ad emergere (nero) è rappresentato dal 14% delle cellule e contiene le varianti di tutti i cloni⁽⁸⁾.

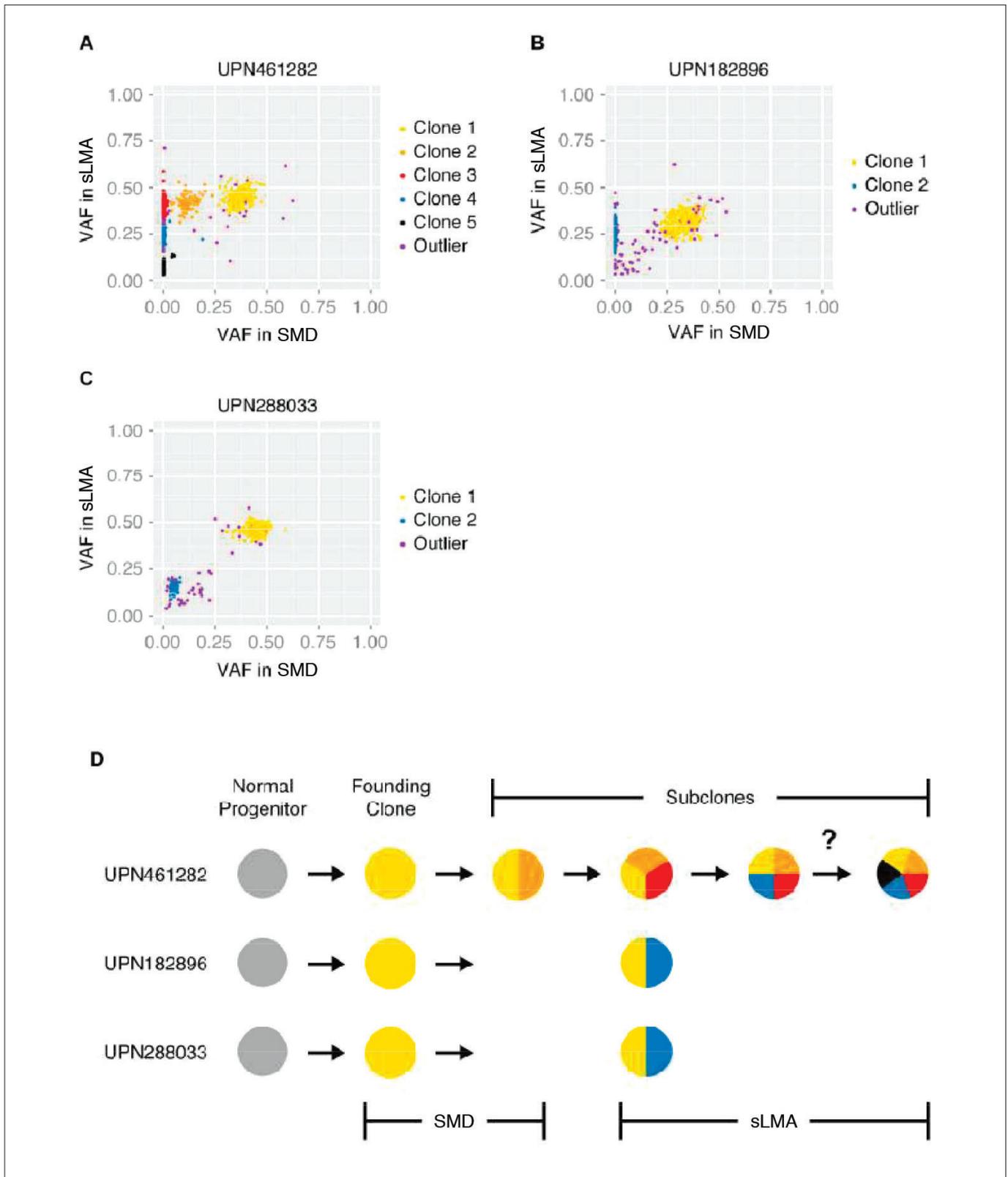


Figura 4 - Modello di predizione di architettura clonale da un campione tumorale non frazionato. Assegnazione ai differenti cloni delle mutazioni somatiche, precedentemente validate, in campioni non frazionati di SMD e sLMA. La frazione allelica delle differenti varianti (VAF) in SMD e in LMA descrive la sub struttura clonale della neoplasia e l'evoluzione nel tempo. A) Alla diagnosi di LMA, il campione UPN461282 comprendeva il 10% di cellule non tumorali in aggiunta a 5 differenti cloni neoplastici. Il clone 1 è rappresentato dal 6% delle cellule che presentano le varianti del cluster 1; il clone 2 rappresentato dal 4% di cellule con varianti del cluster 1 e 2; il clone 3 rappresentato dal 33% delle cellule con varianti del cluster 1,2 e 3; il clone 4 rappresentato dal 53,3% di cellule con varianti dei cluster 1,2,3 e 4; ed il clone 5 rappresentato dal 14% delle cellule che aggiungono al clone precedente la variante del cluster 5. B-C) Esempi analoghi di due ulteriori campioni UPN182896 ed UPN288033. D) Schema riassuntivo del modello di evoluzione clonale ottenuto con l'analisi SciClone che rimarca l'ambiguità dell'origine del clone 5 nel campione UPN461282⁽¹³⁾.

eventi, con analisi di campioni multipli, è stato utilizzato dal modello di Engle (2015) ⁽³⁾ per raffigurare l'evoluzione clonale nella trasformazione da mielofibrosi a leucemia mieloide acuta (Figura 5). La strategia dei campioni multipli, applicata per lo studio della progressione ed evoluzione tumorale, può essere utilizzata per studiare l'eterogeneità tumorale valutando campioni multipli dello stesso stadio del tumore prelevati da siti differenti ⁽¹⁷⁾. I metodi recentemente utilizzati per caratterizzare l'evoluzione clonale dei tumori sono di due tipi: la ricostruzione dell'albero genealogico del tumore e la ricostruzione dell'albero di interrelazione fra i subcloni. Il primo metodo costruisce un modello di evoluzione clonale del singolo tumore con un approccio filogenetico in cui ogni subclone si distanzia dal tumore primario per acquisizione di varianti ⁽¹⁸⁻²⁰⁾, il secondo approccio ricostruisce la storia del tumore analizzando le relazioni, similitudini e divergenze fra i diversi subcloni cellulari ⁽²¹⁻²³⁾. Per generare i modelli della storia dell'evoluzione del tumore, sono stati utilizzati numerosi e differenti algoritmi bioinformatici che analizzano la grande mole di dati sulle varianti del singolo nucleotide (SNVs) provenienti dalle applicazioni WGS o WES ⁽²⁴⁻³³⁾. Alcuni metodi, come ad esempio PyClone ⁽¹⁸⁾ e SciClone ⁽³⁴⁾ utilizzano il valore della frazione di cellule neoplastiche che presentano ogni singola variante avvalendosi dei risultati in termini di numero di sequenze individuate in NGS; altri più recenti, come PhySuB ⁽¹⁷⁾ e OncoNEM ⁽³⁵⁾, hanno sviluppato complesse *pipeline* specifiche per la ricostruzione dei modelli di evoluzione clonale neoplastica che tengono conto sia dei classici algoritmi filogenetici che della frequenza delle singole SNVs.

Il sequenziamento della singola cellula

Molti metodi di studio della composizione clonale del tumore utilizzano dati provenienti da campioni non frazionati della massa tumorale: questi approcci richiedono algoritmi bioinformatici capaci di distinguere e separare i segnali misti generati dall'eterogeneità della popolazione cellulare e possono dare risultati ambigui. L'analisi genetica delle cellule in toto di una massa tumorale può nascondere l'eterogeneità del tumore. Cellule derivanti dallo stesso sito neoplastico possono differire l'una dall'altra per la presenza di varianti somatiche, per l'espressione genica e la regolazione epigenetica. Le recenti acquisizioni tecnologiche hanno permesso di ottenere il sequenziamento genomico della singola cellula. Infatti sono state sviluppate delle tecniche per l'amplificazione dell'intero genoma (*Whole Genome Amplification*, WGA) della singola cellula che consentono di avere una quantità di acidi nucleici sufficienti per le successive tecniche di indagine. Svariati sistemi di WGA che prevedono approcci differenti sono stati sviluppati ed utilizzati per ottenere un'adeguata quantità di acidi nucleici per le applicazioni analitiche ⁽³⁶⁻⁴⁰⁾. La strategia principale per lo studio dell'ete-

rogeneità e dell'architettura tumorale è il confronto dello studio del genoma tumorale di campioni multipli indipendenti tra loro; la risoluzione sicuramente più estrema della strategia di campionamento multiplo è rappresentata dalla analisi dell'intero genoma (WGS) o dell'intero esoma (WES) delle singole cellule neoplastiche. L'analisi di singole cellule neoplastiche derivate dallo stesso tumore garantisce la comprensione dell'eterogeneità di una popolazione cellulare neoplastica ⁽³⁶⁾. Dal punto di vista teorico, i dati del sequenziamento della singola cellula possono dare l'opportunità di studiare la genealogia delle singole cellule tumorali fornendo il quadro complessivo dell'evoluzione clonale del tumore che a partire dai primi eventi mutazionali arriva sino all'accumularsi di mutazioni che portano i cloni a divergere per formare un quadro eterogeneo. Con questo approccio Hou et al. (2012) ⁽³⁷⁾ hanno utilizzato i dati del sequenziamento di 58 cellule distinte provenienti da un campione di trombocitemia essenziale (TE) che hanno permesso di ricostruire un albero genealogico basato sul numero di cellule delle sottopopolazioni clonali e sugli eventi mutazionali che spiegano l'evoluzione clonale del tumore. Lo stesso approccio è stato utilizzato da Hughes et al (2014) ⁽¹³⁾ per caratterizzare l'eterogeneità clonale e l'albero filogenetico di una leucemia LMA secondaria a MFP (Figura 6).

Lo sviluppo di tecnologie applicate alla singola cellula introduce una nuova frontiera per la diagnostica in campo oncologico: la *Single-Cell Diagnosis*. L'analisi genetica della singola cellula può offrire diversi vantaggi e dare accurate informazioni sull'evoluzione clonale del tumore, sui meccanismi molecolari della cancerogenesi e non ultimo sulla caratterizzazione delle cellule staminali tumorali. Ciò nonostante, il sequenziamento del genoma della singola cellula mostra alcuni problemi prevalentemente di ordine tecnico ⁽³⁷⁾. La prima problematica riguarda l'individuazione di varianti, false positive ma anche di false negative e ancora la perdita di informazioni. Il numero di falsi positivi può essere ridotto con l'analisi bioinformatica che seleziona esclusivamente varianti osservate in più cellule, ma questo fa aumentare il numero di cellule singole che devono essere utilizzate per la ricostruzione del modello evolutivo. I falsi negativi sono dovuti al problema tecnico di *allele drop out* che può verificarsi nella fase di preamplificazione (WGA); lo stesso artefatto tecnico può riguardare un intero locus che non viene amplificato dalla WGA e determina perdita di informazioni. La seconda problematica è rappresentata dalle popolazioni cellulari potenzialmente non osservate per un difetto di campionatura che generano una visione parziale dell'eterogeneità clonale del tumore. Recenti acquisizioni tecniche hanno reso possibile sequenziare oltre al genoma della singola cellula anche il trascrittoma ^(41,42). In futuro questo permetterà quindi di combinare i modelli di evoluzione clonale filogenetici con l'espressione genica dei singoli cloni per comprendere come cambia l'espressione genica durante l'evoluzione tumorale.

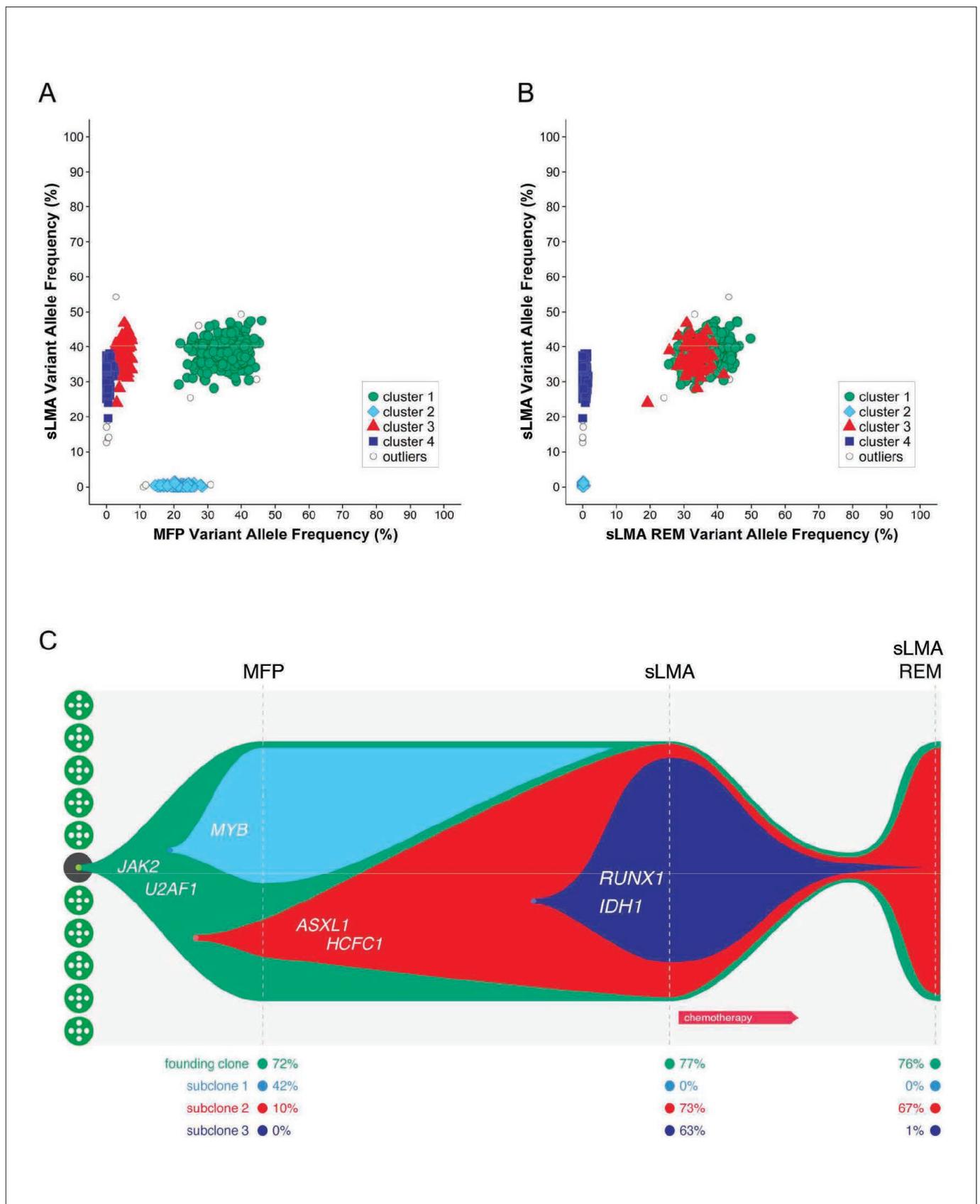


Figura 5 - Evoluzione clonale nella progressione di malattia. Il modello "unsupervised" di clusterizzazione di 649 singole varianti nucleotidiche (SNVs) identifica cluster di mutazioni con simile frequenza allelica che corrispondono al clone iniziale (verde) e ai tre subcloni (azzurro, rosso e blu). A) Frequenza delle mutazioni allo stadio di mielofibrosi (MFP) verso l'evoluzione in leucemia acuta (sLMA), B) Frequenza delle varianti presenti nella remissione di sLMA (sLMA REM) verso la sLMA. C) Il modello di evoluzione clonale della progressione leucemica basato sui valori di VAFs in ciascuno dei quattro cloni identificati ad ogni stadio della malattia⁽³⁾.

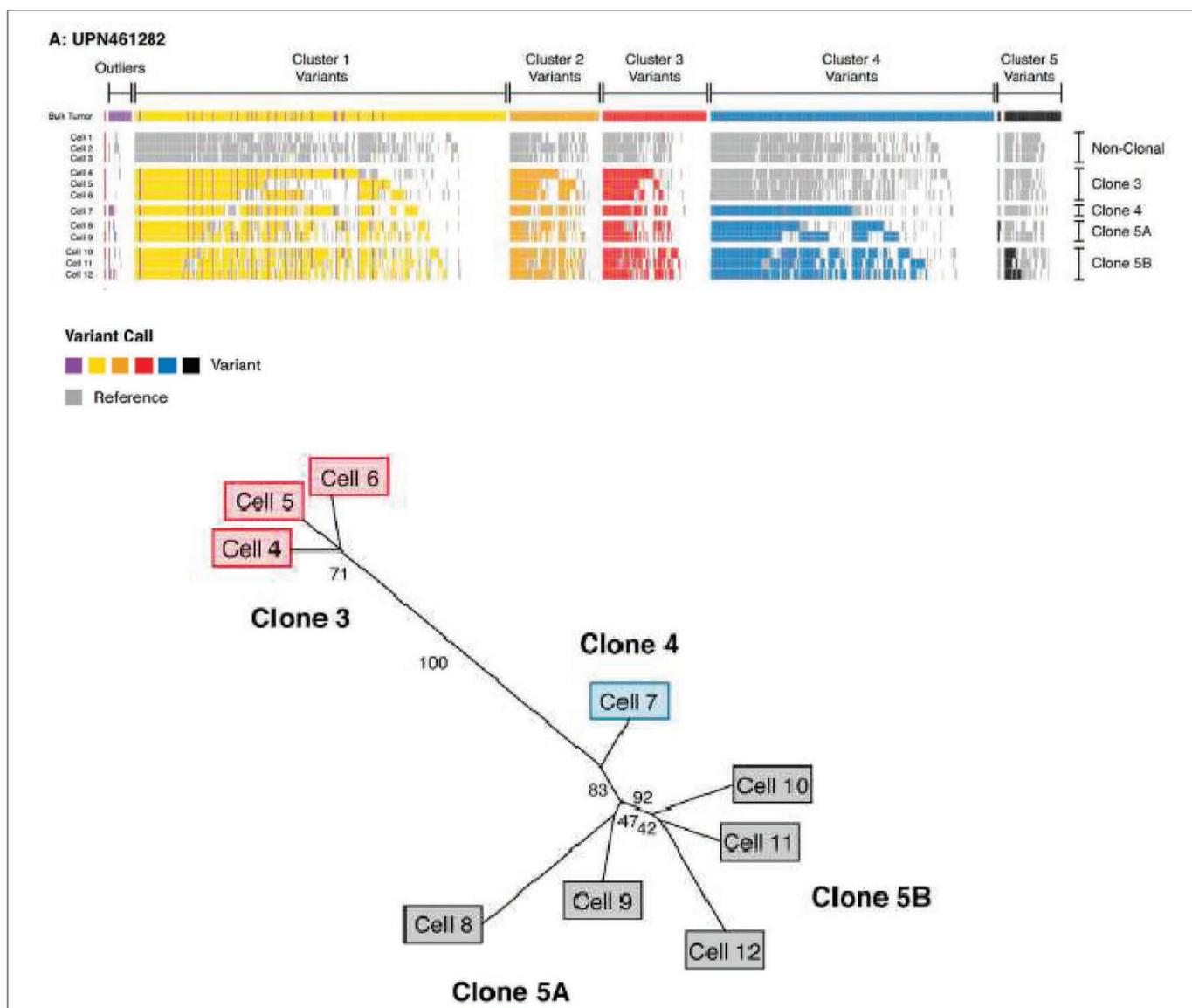


Figura 6 - Profilo mutazionale della singola cellula neoplastica. Analisi del profilo mutazionale ottenuto mediante "Whole Exome Sequencing" in 12 cellule isolate da un campione UPN461282 di sangue midollare di leucemia acuta mieloide secondaria (sLMA). I colori individuano i cluster di varianti genetiche che contraddistinguono i differenti cloni neoplastici ed ogni cellula corrisponde a uno dei quattro cloni identificati. Il genotipo delle singole cellule è utilizzato per la predizione dell'albero rappresentativo dell'evoluzione clonale della leucemia. I valori riportati nei ponti di connessione rappresentano il livello di supporto statistico della connessione: i valori superiori a 75% sono considerati altamente significativi⁽¹³⁾.

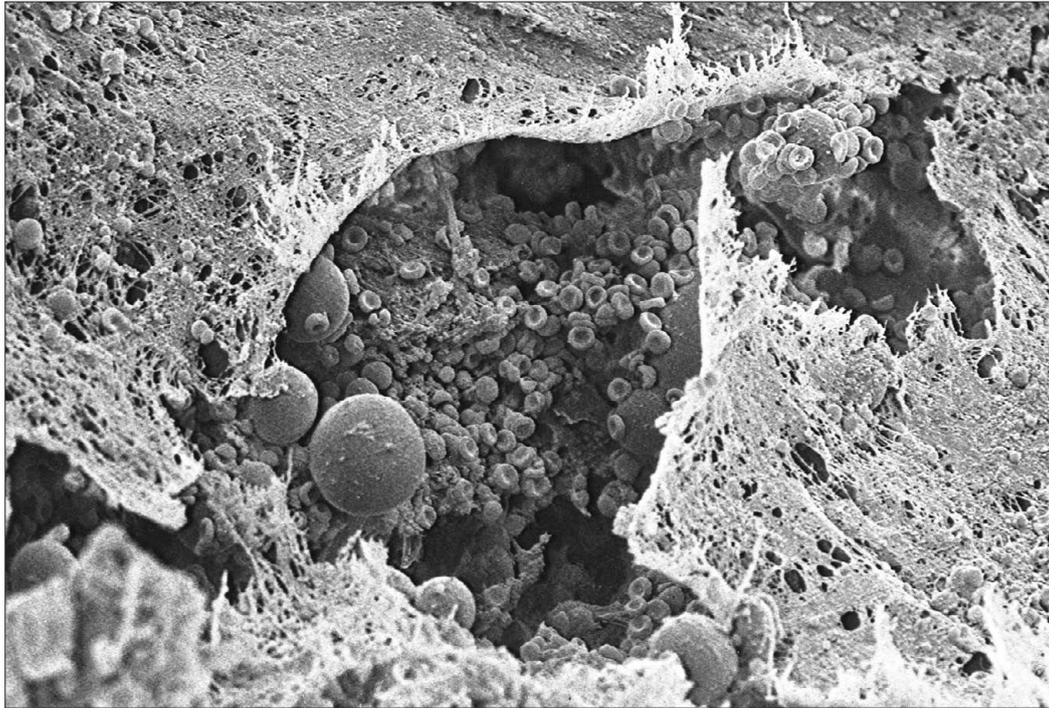
Conclusioni

L'applicazione della *next generation sequencing* è sicuramente un potente strumento per la ricerca oncologica, e grazie a questa applicazione sono state raggiunte importanti informazioni sui profili genomici delle neoplasie e sulla loro architettura gerarchica multiclonale. Sebbene l'intero genoma tumorale generi informazioni complete, è pur vero che questa applicazione è molto costosa e l'abnorme numero di informazioni generate pone alcuni problemi interpretativi. Il sequenziamento della regione codificante offre un'alternativa valida, contenuta nei costi e di maggiore fruibilità per la ricerca oncologica. L'eterogeneità genetica clonale intratumorale che evolve

durante la progressione e la crescita tumorale è sicuramente uno degli aspetti che contribuiscono alla complessità biologica della neoplasia e la sua comprensione potrà avere importanti riscontri per la medicina di precisione, laddove maggiore efficacia si potrà ottenere utilizzando come target le mutazioni del clone fondatore piuttosto che quelle dei subcloni. I metodi di comprensione della storia evolutiva delle neoplasie sono molto importanti per la ricerca oncologica poiché possono dare informazioni sullo stadio iniziale del tumore, sulle mutazioni fondatrici della neoplasia, sull'evoluzione clinica e sulla prognosi. Inoltre, la storia dell'evoluzione clonale neoplastica apre la strada per la scoperta delle mutazioni responsabili della resistenza alle terapie e lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Bibliografia

1. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. 2012;150(2):264-78.
2. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;481(7382):506-10.
3. Englel EK, Fisher DAC, Miller CA, McLellan MD, Fulton RS, Moore DM. Clonal Evolution Revealed by Whole Genome Sequencing in a Case of Primary Myelofibrosis Transformed to Secondary Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia*. 2015;29(4):869-876.
4. Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature* 2010;464(7291):999-1005.
5. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*. 2010;467(7319):1114-7.
6. Tao Y, Ruan J, Yeh SH, Lu X, Wang Y, Zhai W, et al. Rapid growth of a hepatocellular carcinoma and the driving mutations revealed by cell-population genetic analysis of whole-genome data. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(29):12042-7.
7. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366(10):883-92.
8. Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012; 366(12):1090-8.
9. Walter MJ, Shen D, Shao J, Ding L, White BS, Kandoth C et al. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013;27(6):1275-82.
10. Ye F, Huang W, Guo G. Studying hematopoiesis using single-cell technologies. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):27.
11. Wu W, Choudhry H (Eds.). *Next Generation Sequencing in Cancer Research. From Basepairs to Bedsides*. Springer Int Publ. 2015:1-493.
12. Jain KK. *Applications of Biotechnology in Oncology*. Ed. Humana Press 2014;1-894.
13. Hughes AE, Magrini V, Demeter R, Miller CA, Fulton R, Fulton LL, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia defined by single-cell sequencing. *PLoS Genet*. 2014;10(7):1-12.
14. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. 2012;150(2):264-78.
15. Walter MJ1, Shen D, Shao J, Ding L, White BS, Kandoth C, et al. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013;27(6):1275-82.
16. Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1090-8.
17. Niknafs N, Beleva-Guthrie V, Naiman DQ, Karchin R. SubClonal Hierarchy Inference from Somatic Mutations: Automatic Reconstruction of Cancer Evolutionary Trees from Multi-region Next Generation Sequencing. *PLoS Comput Biol* 2015;11(10):e1004416.
18. Roth A, Khattra J, Yap D, Wan A, Laks E, Biele J, et al. PyClone: statistical inference of clonal population structure in cancer. *Nat Methods*. 2014;11(4):396-8.
19. Yu C, Yu J, Yao X, Wu WK, Lu Y, Tang S, et al. Discovery of biclonal origin and a novel oncogene SLC12A5 in colon cancer by single-cell sequencing. *Cell Res*. 2014;24(6):701-12.
20. Kostadinov RL, Kuhner MK, Li X, Sanchez CA, Galipeau PC, Paulson TG et al. NSAIDs modulate clonal evolution in Barrett's esophagus. *PLoS Genet*. 2013;9(6):e1003553.
21. Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet*. 2014;46(3):225-33.
22. Johnson BE, Mazar T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, et al. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science*. 2014;343(6167):189-193.
23. Jiao W, Vembu S, Deshwar AG, Stein L, Morris Q. Inferring clonal evolution of tumors from single nucleotide somatic mutations. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:35.
24. Hajirasouliha I, Mahmoody A, Raphael BJ. A combinatorial approach for analyzing intra-tumor heterogeneity from high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2014;30(12):78-86.
25. Strino F, Parisi F, Micsinai M, Kluger Y. TrAp: a tree approach for fingerprinting subclonal tumor composition. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(17):e165.
26. Qiao Y, Quinlan AR, Jazaeri AA, Verhaak RG, Wheeler DA, Marth GT. SubcloneSeeker: a computational framework for reconstructing tumor clone structure for cancer variant interpretation and prioritization. *Genome Biol*. 2014;15(8):443.
27. Eirew P, Steif A, Khattra J, Ha G, Yap D, Farahani H, et al. Dynamics of genomic clones in breast cancer patient xenografts at single-cell resolution. *Nature*. 2015;518(7539):422-6.
28. Gawad C, Koh W, Quake SR. Dissecting the clonal origins of childhood acute lymphoblastic leukemia by single-cell genomics. *PNAS*. 2014;111(50):17947-52.
29. Yuan K, Sakoparnig T, Markowitz F, Beerenwinkel N. BitPhylogeny: a probabilistic framework for reconstructing intra-tumor phylogenies. *Genome Biol*. 2015;16(1):36.
30. Wang Y, Waters J, Leung ML, Unruh A, Roh W, Shi X, et al. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature*. 2014;512(7513):155-60.
31. Kim KI, Simon R. Using single cell sequencing data to model the evolutionary history of a tumor. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:27.
32. Melchor L, Brioli A, Wardell CP, Murison A, Potter NE, Kaiser MF, et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia*. 2014;28(8):1705-15.
33. Potter NE, Ermini L, Papaemmanuil E, Cazzaniga G, Vijayaraghavan G, Tittley I, et al. Single-cell mutational profiling and clonal phylogeny in cancer. *Genome Res*. 2013;23(12):2115-25.
34. Miller CA, White BS, Dees ND, Griffith M, Welch JS, Griffith OL, et al. SciClone: Inferring clonal architecture and tracking the spatial and temporal patterns of tumor evolution. *PLoS Computational Biology* 2014;10(8):e1003665.
35. Ross EM, Markowitz F. OncoNEM: inferring tumor evolution from single-cell sequencing data. *Genome Biology* 2016;17:69.
36. Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*. 2011;472(7341):90-4.
37. Hou Y, Song L, Zhu P, Zhang B, Tao Y, Xu X, et al. Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm. *Cell*. 2012;148(5):873-85.
38. Xu X, Hou Y, Yin X, Bao L, Tang A, Song L, et al. Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor. *Cell*. 2012;148(5):886-95.
39. Zong C, Lu S, Chapman AR, Xie XS. Genome-wide detection of single nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*. 2012;338(6114):1622-6.
40. Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*. 2012;486(7403):395-9.
41. Dey SS, Kester L, Spanjaard B, Bienko M, van Oudenaarden A. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell. *Nat Biotechnol*. 2015;33(3):285-9.
42. Macaulay IC, Haerty W, Kumar P, Li YI, Hu TX, Teng MJ, et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods*. 2015;12(6):519-22.



Biopsia osteomidollare: lacuna emopoietica al ME a scansione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).

Parole Chiave

Sequenziamento genico, evoluzione clonale, mutazioni geniche.

Indirizzi per la corrispondenza

Alessandra Santoro

Laboratorio di Oncoematologia e Manipolazione Cellulare
Divisione di Ematologia con UTMO - Dipartimento di Oncologia
Ospedali Riuniti Villa Sofia-Cervello
Via Trabucco 180, 90146 Palermo
E-mail: a.santoro@villasofia.it
Tel. 091.6802638
Fax 091.6886834

Neoplasie mieloproliferative croniche



Daniela Barraco¹, Francesco Passamonti^{1,2}

¹ Divisione di Ematologia, ASST Sottalago, Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

² Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università dell'Insubria, Varese

Introduzione

Le neoplasie mieloproliferative croniche (NMC) sono un gruppo di disordini clonali della cellula staminale caratterizzati da un'aberrante proliferazione cellulare e da una propensione alla trasformazione in mielofibrosi secondaria e leucemia acuta. Il termine NMC raggruppa neoplasie mieloidi croniche e include la leucemia mieloide cronica *BCR-ABL+* (LMC), la leucemia neutrofila cronica, la policitemia vera (PV), la mielofibrosi primaria (MFP), ulteriormente classificata come MFP prefibrotica e MFP conclamata, la trombocitemia essenziale (TE), la leucemia eosinofila cronica non altrimenti specificata e le neoplasie mieloproliferative non classificabili (Tabella 1)⁽¹⁾. In questa trattazione ci concentreremo su PV, TE, MFP, che sono classicamente definite NMC Ph1-negative per sottolineare il diverso meccanismo patogenetico che le differenzia dalla LMC. Le NMC Ph1 negative classiche sono raggruppate per somiglianze fenotipiche e per comuni meccanismi biologici. La scoperta di anomalie molecolari ricorrenti coinvolgenti i geni *JAK2*, *MPL* e *CALR* ha inoltre rafforzato l'originaria visione di Dameshek del 1951 secondo la quale queste malattie hanno un comune meccanismo patogenetico e presumibilmente appartengono a un unico disordine.

| |
|--|
| Leucemia mieloide cronica (LMC), <i>BCR-ABL</i> positiva |
| Leucemia neutrofila cronica (LNC) |
| Policitemia Vera (PV) |
| Mielofibrosi primaria (MFP) <ul style="list-style-type: none">• MFP prefibrotica/ stadio precoce• MFP fibrotica |
| Trombocitemia Essenziale (TE) |
| Leucemia eosinofila cronica, non altrimenti specificata |
| Neoplasie mieloproliferative non classificabili |

Tabella 1 - Classificazione WHO delle neoplasie mieloproliferative croniche.

Studi epidemiologici su larghe popolazioni hanno calcolato che l'incidenza annua di PV e TE è di 2-3 casi/100.000 abitanti, con frequenze più elevate nelle famiglie di discendenza ebraica. In Italia è stato condotto uno studio trasversale (*cross sectional*) nella città di Vicenza ed è stato accertato che la prevalenza di TE e PV è circa di 40 e 30 casi per 100.000 persone, rispettivamente, ma lo studio è stato effettuato in era precedente la scoperta delle basi molecolari delle NMC. La PV è estremamente rara nei bambini e adolescenti (2 nuovi casi ogni 10 milioni di abitanti). Pochi studi epidemiologici sono disponibili nella MF. L'incidenza annua nella città di Göteborg, in Svezia, misurata durante il periodo dal 1983-1992, è stata calcolata in 0,4 casi per 100.000 persone. Un'incidenza simile (0,37 casi per 100.000 persone) è stata riportata dal Registro Tumori del Tamigi (UK) che ha raccolto le neoplasie mieloidi negli adulti nel periodo 1999-2000. Una sintesi degli studi epidemiologici pubblicati in Europa, Australia, e Nord America rileva un'incidenza di MF variabile da 0,5 a 1,3 casi per 100.000 persone. In Giappone, la MF è considerata malattia molto rara, con una prevalenza di solo 84 casi per 100.000 persone. Una più alta incidenza di MF è stata riportata sia negli ebrei ashkenaziti che negli arabi che vivono nel Nord di Israele.

Le NMC condividono specifiche caratteristiche morfologiche e cliniche quali l'iper cellularità midollare e le complicanze vascolari. Da un punto di vista clinico, si distinguono per il tipo di linea cellulare coinvolta con espressione dominante delle piastrine nella TE, trilineare nella PV e molto eterogenea nella MFP.

La clonalità di queste neoplasie venne dapprima dimostrata mediante studi di inattivazione del cromosoma X in soggetti femminili⁽²⁾ e successivamente, nel 2005, con l'identificazione di mutazioni somatiche acquisite del gene *JAK2*⁽³⁻⁶⁾ individuate nella maggior parte dei pazienti con NMC ed in particolare in oltre il 95% di pazienti con PV e nel 50-60% dei pazienti con TE e MFP⁽³⁻⁶⁾. Negli anni successivi, le conoscenze relative alla patogenesi delle NMC sono notevolmente progredite. Nel 2006 la scoperta di mutazioni a carico del gene *MPL*, codificante il recettore della trombopoietina,

sono state documentate in circa il 3%-5% dei casi di TE *JAK2*-negative e nell'8%-11% dei casi di MFP *JAK2*-negativi.^(7, 8) Più recentemente nel 2013, grazie all'utilizzo di tecniche di sequenziamento genico, le mutazioni a carico del gene *CALR* sono state identificate nel 20-25% di pazienti affetti da TE e MFP^(9, 10). Circa il 10-15% di pazienti affetti da MFP o TE che non esprimono alcuna delle suddette mutazioni sono definiti tripli negativi⁽¹¹⁾. Studi riguardanti il meccanismo attraverso cui mutazioni a carico di *JAK2* e *MPL* portano ad una mieloproliferazione hanno consentito di identificare il coinvolgimento della via di trasduzione del segnale JAK-STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) nella patogenesi delle NMC^(3, 7, 12). Il meccanismo patogenetico indotto dalle mutazioni di *CALR* risulta ancora poco chiaro sebbene studi eseguiti su modelli animali hanno suggerito un effetto sulla produzione piastrinica^(10, 13, 14). Le tre mutazioni, mutualmente esclusive⁽¹⁵⁾, sono ad oggi definite *driver mutations*: sono infatti responsabili dell'iperproliferazione delle cellule staminali emopoietiche mediante attivazione della *pathway* di JAK/STAT e del fenotipo clinico. Hanno inoltre un ruolo primario in termini diagnostici, come recentemente evidenziato nella classificazione delle neoplasie mieloidi dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO)⁽¹⁾, e in termini prognostici⁽¹¹⁾. Tuttavia, in aggiunta alle *driver mutations*, esistono mutazioni somatiche non specifiche per NMC, la cui fre-

quenza è più elevata nei pazienti affetti da MFP piuttosto che da PV e TE, che non hanno né un ruolo primario nel meccanismo patogenetico di proliferazione caratteristico di queste malattie né sul fenotipo di malattia, ma contribuiscono alla biologia della malattia soprattutto in termini di prognosi. Queste mutazioni, identificabili anche in altre neoplasie mieloidi⁽¹⁶⁻¹⁹⁾, appartengono a differenti categorie di geni con funzioni diverse, come regolatori epigenetici (*ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*), RNA *splicing* (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*) o regolatori trascrizionali (*TP53*, *IKZF1*, *CBL*). La Tabella 2 mostra la frequenza di distribuzione di suddette mutazioni nelle tre sindromi mieloproliferative *BCR-ABL1* negative in fase cronica e in fase blastica.

Driver mutations

Gene *JAK2*

JAK2, localizzato sul cromosoma 9p24, è un gene appartenente alla famiglia delle Janus chinasi, codificante una tirosinchinasi citoplasmatica necessaria per la trasduzione del segnale che si attiva in risposta al legame di diverse molecole della famiglia delle citochine di tipo I, quali l'eritropoietina, la trombopoietina e il fattore stimolante le colonie granulocitarie (G-CSF). La mutazione puntiforme V617F, identificata nel 2005, origina da una sostituzione G>T al nucleotide 1849 dell'esone 14, causando la sostituzione della valina con la fe-

| MUTAZIONE | LOCALIZZAZIONE CROMOSOMICA | PV | TE | MFP | LA POST-NMC |
|--|----------------------------|------|-------|-------|-------------|
| Driver mutations | | | | | |
| <i>JAK2</i> | | | | | |
| - Mutazione <i>JAK2V617F</i> | 9p24 | 95 | 50-60 | 50-60 | 40 |
| - Mutazioni esone 12 | 9p24 | 3 | rara | rara | rara |
| <i>CALR</i> | 19p13.2 | rara | 20-25 | 20-25 | 25 |
| <i>MPL</i> | 1p34 | rara | 3 | 7 | 8 |
| Mutazioni non specifiche per NMC | | | | | |
| Regolatori epigenetici: | | | | | |
| <i>ASXL1</i> | 20q11.1 | 2-5 | 5-10 | 20 | 18 |
| <i>EZH2</i> | 7q36.1 | 3 | rara | 13 | rara |
| <i>TET2</i> | 4q24 | 16 | 5 | 17 | 17 |
| <i>IDH1/IDH2</i> | 2q33.3/15q26.1 | 2 | 1 | 4 | 22 |
| Geni coinvolti nell'RNA splicing: | | | | | |
| <i>SF3B1</i> | 2q33.1 | rara | rara | 7 | 4 |
| <i>SRSF2</i> | 17q25.1 | rara | rara | 17 | 19 |
| <i>U2AF1</i> | 21q22 | rara | rara | 16 | 6 |
| Regolatori trascrizionali: | | | | | |
| <i>Tp53</i> | 17p13.1 | rara | rara | 4 | 11 |
| <i>IKZF1</i> | 7p12 | rara | rara | rara | 21 |
| <i>CBL</i> | 11q23.3 | rara | rara | 6 | rara |

Tabella 2 - Mutazione nelle neoplasie mieloproliferative croniche (NMC).

nilalanina alla posizione 617 della proteina JAK2. È la mutazione più frequente nei pazienti affetti da NMC, essendo presente in oltre il 95% di pazienti con PV e in circa il 50%-60% dei pazienti affetti da TE e MFP. La proteina si compone di 7 domini, di cui JH1 è il dominio di attività kinasica effettiva, mentre JH2 è una pseudokinasi ad attività inibitoria su JH1. La mutazione V617F riduce la funzione autoinibitoria del dominio JH2 modificando la conformazione in JH1-JH2 e, di conseguenza, l'enzima JAK2 diviene costitutivamente attivo⁽²⁰⁾ con un incremento dell'attività di segnale di JAK2 e quindi del segnale derivante dai recettori chinasi "mieloidi", determinando un incremento dell'attività di specifici *pathway* quali STAT, MAPK e PI3K^(3,4,21). In alcuni casi di PV *JAK2V617F* negativa, sono state identificate mutazioni (per lo più inserzioni e delezioni) a carico dell'esone 12 del gene *JAK2*⁽²²⁾. Sebbene tali mutazioni non siano localizzate sul dominio pseudochinasico di *JAK2*, sono in grado di modificare la struttura del dominio JH2 similmente alla V617F. Tuttavia a differenza della mutazione *JAK2V617F*, le mutazioni dell'esone 12 non sono presenti in pazienti affetti da TE e MFP⁽²³⁾. Studi su modelli animali hanno dimostrato come la presenza della mutazione *JAK2V617F*, induca una malattia simile alla PV, con eritrocitosi, bassi livelli di EPO, splenomegalia ed iperplasia midollare⁽²⁴⁾. Inoltre l'intensità di segnale mediato da *JAK2V617F*, inteso come numero di copie di tale mutazione, è responsabile dell'eterogeneità fenotipica che si riflette in termini clinici in quadri di TE caratterizzati da una singola mutazione di *JAK2V617F*, mentre nella maggior parte dei casi di PV sono presenti due copie di *JAK2V617F* a causa della disomia uniparentale.^(25,26)

Recentemente, sono state descritte mutazioni germinali di *JAK2* in sindromi familiari caratterizzate nella maggior parte dei casi da un fenotipo piastrinosico⁽²⁷⁻²⁹⁾.

La presenza della mutazione *JAK2V617F* o un'augmentata carica allelica non sembrano avere effetto sulla sopravvivenza e trasformazione leucemica in pazienti affetti da PV e TE⁽³⁰⁻³²⁾. In particolare, nelle TE, la presenza di *JAK2V617F* è stata associata con un aumentato rischio di trombosi arteriosa e un più basso rischio di evoluzione in mielofibrosi⁽³²⁾. Nella PV, la presenza di un'alta carica allelica di *JAK2V617F* è associata a prurito e trasformazione fibrotica⁽³¹⁾, così come la presenza della mutazione a carico dell'esone 12⁽²³⁾. In generale pazienti affetti da NMC-*JAK2* mutati sono generalmente più anziani, presentano più alti livelli di emoglobina, leucocitosi, conta piastrinica più bassa ed un aumentato rischio trombotico⁽³⁰⁾.

Gene *MPL*

Mutazioni a carico del gene *MPL* (*myeloproliferative leukemia virus oncogene*), localizzato sul cromosoma 1p34, codificante per il recettore della trombopoietina, possono essere riscontrate sia come mutazioni germinali in rari casi di trombocitosi familiari (in particolare *MPL-S505N*)⁽³³⁾ o come mutazioni somatiche presenti nel 3%-8% di pazienti affetti da MFP o TE (*MPL-W515*)^(7,8). Si tratta di mu-

tazioni *missense* a carico dell'esone 10, e conseguente sostituzione di un triptofano in posizione 515 con una leucina, lisina o arginina. La sequenza amminoacidica sede della mutazione gioca un ruolo principe nella conformazione citosolica di *MPL* e ne previene l'attivazione spontanea del recettore^(34,35) e pertanto la sostituzione del triptofano con un altro amminoacido porta alla perdita dell'attività inibitoria e risulta in un gene *MPL* costitutivamente attivo. Mutazioni a carico di *MPL* sono associate con un incremento dei segnali mediati da STAT3, STAT5, ERK e AKT e una crescita cellulare citochino-indipendente^(7,8). Recentemente, due nuove mutazioni S204P e Y591N sono state descritte in una coorte di pazienti affetti da TE e MFP; altrimenti definiti tripli negativi. Queste mutazioni sono caratterizzate da un effetto attivante più debole, sia in termini di grado di crescita trombopoietina-indipendente sia di ipersensibilità alla stessa. Studi su modelli murini hanno dimostrato che, mentre la presenza della mutazione *JAK2V617F* è associata ad un fenotipo di malattia tipo TE o PV o MFP⁽³⁶⁾, la presenza di mutazioni a carico di *MPL* è associata ad un fenotipo caratterizzato da marcata trombocitosi con caratteristiche simili a TE e MFP⁽³⁵⁾.

Gene *CALR*

Le mutazioni a carico di *CALR*, localizzato sul cromosoma 19p32.2, sono esclusivamente inserzioni o delezioni della sequenza terminale dell'esone 9 e le due principali mutazioni costituenti circa l'85% di tutti i casi mutati sono delezioni di 52 paia di basi (tipo 1: 1099_1150del; L367fs*46; 44%-53% dei casi) oppure inserzioni di 5 paia di basi (tipo 2; c.1154_1155insTTGTC; K385fs*47; 32%-42% dei casi); le varianti delle mutazioni di tipo 1 e di tipo 2 di *CALR* sono classificate come "tipo 1-like" e "tipo 2-like" sulla base della loro analogie strutturali rispettivamente alle varianti di *CALR* di tipo 1 e tipo 2⁽³⁷⁾. *CALR* codifica per la proteina calreticulina, una proteina multicomportamentale e multifunzionale, coinvolta nella sintesi di glicoproteine, nella omeostasi del calcio e nella morte cellulare programmata^(38,39). Differenze nella mobilizzazione del calcio citosolico sono state riportate nei casi con delezione di 52 paia di basi⁽⁴⁰⁾, suggerendo come questo possa essere uno dei meccanismi attraverso cui *CALR* mutato esprime il suo effetto e l'espressione della proteina mutata sembra essere ristretta alla filiera megacariocitaria⁽⁴¹⁾. Più recentemente, è stato dimostrato che le mutazioni di *CALR* causano una indipendenza dalla trombopoietina mimando l'effetto attivante delle mutazioni di *MPL*⁽⁴²⁻⁴⁵⁾. Fenotipicamente, nelle TE i pazienti *CALR* positivi (vs *JAK2*) sono più giovani, maschi, con una più alta conta piastrinica, più bassi livelli di emoglobina e leucociti e più bassa incidenza di eventi trombotici⁽⁴⁶⁾. Nelle MFP, invece, i pazienti-*CALR* positivi sono più giovani, con una più alta conta piastrinica, più anemici, con leucocitosi e mutazioni dello spli-co-soma⁽⁴⁷⁾ e hanno una sopravvivenza complessivamente migliore rispetto a quelli *JAK2V617F* e *MPLW515* positivi⁽¹⁰⁾. Questa affermazione è stata dimostrata essere indipendente dall'età e dallo score

prognostico DIPSS-plus⁽⁴⁸⁾. Inoltre numerosi studi clinici hanno dimostrato i differenti effetti fenotipici delle diverse mutazioni di *CALR*: nelle MFP, il tipo 1 è di più frequente riscontro e il tipo 2 è associato ad una ridotta sopravvivenza. Nelle TE, non sembrano esserci differenze in termini di decorso clinico tra le due mutazioni più comuni di *CALR*: tuttavia il tipo 2 parrebbe essere associato ad una più alta conta piastrinica alla diagnosi⁽⁴⁹⁾.

Regolatori epigenetici

ASXL1 (*additional sex combs like-1*, localizzato sul cromosoma 20q11.1) è un importante mediatore del *polycomb repressive complex* 1 e 2 (PRC1 e PRC2), complessi proteici coinvolti in vari processi cellulari inclusi proliferazione, differenziazione, mantenimento dell'identità e plasticità cellulare^(50, 51) e inoltre interagisce con BAP1, un enzima deubiquitinizzante nucleare⁽⁵²⁾. Le mutazioni di *ASXL1*, riscontrabili anche in altre neoplasie mieloidi e localizzate a livello dell'esone 12, sono nella maggior parte casi di tipo *frameshift* o di stop, e generalmente coinvolgono solo una copia del gene risultando nella perdita del dominio PHD carbossiterminale^(53, 54).

Studi su modelli cellulari e animali hanno dimostrato che mutazioni di *ASXL1* promuovono la trasformazione mieloide attraverso la perdita dell'inibizione del gene mediata da PRC2⁽⁵⁵⁾. Nei pazienti affetti da NMC, tali mutazioni sono riscontrabili in circa il 10% dei casi⁽⁵³⁾ e in particolare nel 2%-5% di PV, 5%-10% di TE e circa un quarto dei casi di MFP o secondaria a PV e TE^(53, 56, 57). La presenza della mutazione si associa a una prognosi sfavorevole in termini di sopravvivenza^(58, 59).

EZH2 (*enhancer of zeste homologue*), localizzato sul cromosoma 7q36.1, codifica per una delle due possibili subunità catalitiche di PRC2⁽⁵⁰⁾. Mutazioni a carico di *EZH2* possono essere riscontrate sia in neoplasie linfoidi,⁽⁶⁰⁾ in genere caratterizzate da un'overespressione di *EZH2*, che in neoplasie mieloidi, associate ad una perdita di eterozigosi^(19, 61, 62). Le mutazioni possono interessare qualsiasi sequenza amminoacidica del gene ed includono mutazioni missense, nonsense e codoni di stop; inoltre sono state descritte sia mutazioni monoalliche che bialliche e soggetti con stato mutazionale omozigote hanno mostrato un trend di sopravvivenza inferiore rispetto ai pazienti eterozigoti⁽¹⁹⁾. Mutazioni a carico di *EZH2* sono identificabili nel 3% dei pazienti affetti da PV e nel 13% dei pazienti con MFP, ma non nei pazienti affetti da TE⁽¹⁹⁾.

TET2 (*Ten-Eleven-Translocation2*), localizzato sul cromosoma 4q24, gioca un ruolo fondamentale nella normale ematopoiesi e modelli murini mutati per questo gene mostrano un'espansione del compartimento delle cellule staminali, proliferazione mielomonocitica con caratteristiche simili alla leucemia mielomonocitica cronica⁽⁶³⁾. Le mutazioni a carico del gene *TET2* sono ampiamente diffuse nell'ambito delle neoplasie mieloidi^(17, 64, 65) e sono per la maggior parte piccole inserzioni, delezioni e mutazioni nonsense che comportano

la perdita di funzione della proteina. Le mutazioni di *TET2* sono state identificate in circa il 14% delle NMC^(17, 66). In circa il 20% dei pazienti sono state osservate due mutazioni, suggerendo che l'inattivazione di una singola copia di *TET2* è sufficiente per il processo di trasformazione⁽⁶⁷⁾.

IDH1 e *IDH2*, (*isocitrate dehydrogenase*), localizzati rispettivamente sul cromosoma 2q33.3 e 15q26.1, codificano enzimi che catalizzano la decarbossilazione dell'isocitrato ad α -chetoglutarato. *IDH1* e *IDH2* usano NADP⁺ come cofattore per generare NADPH, importante nella produzione del glutatione intracellulare. *IDH* è quindi fondamentale nella protezione cellulare dallo stress ossidativo. *IDH1* e *IDH2* sono stati descritti per la prima volta in casi di glioma a basso grado/glioblastoma secondario⁽⁶⁸⁾ e successivamente in leucemie acute mieloidi⁽⁶⁹⁾. L'incidenza nei casi di NMC in fase cronica è tuttavia bassa (0.8% in TE, 1.9% in PV e 4.2% in MFP) versus un'incidenza del 21.6% in fase blastica⁽⁷⁰⁾.

RNA splicing

Mutazioni a carico dei componenti dello spliceosoma, *SF3B1* (*splicing factor 3B subunit 1*, localizzato sul cromosoma 2q33.1), *SRSF2* (*serine/arginine-rich splicing factor*, localizzato sul cromosoma 17q25.1) e *U2AF1* (*U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1*, localizzato sul cromosoma 21q22.3) sono descritte nelle neoplasie mieloidi e sono riscontrabili in circa il 5% dei pazienti affetti da NMC⁽¹⁰⁾. Mutazioni *hotspot* più frequentemente descritte a carico dei suddetti geni sono di tipo missense^(16, 71). I dati attuali suggeriscono che le mutazioni dello *spliceosoma* interessano il sito di riconoscimento dello *splice* e la funzione del snRNP2 producendo verosimilmente una nuova proteina isoforme capace di determinare una dominanza clonale di cellule emopoietiche staminali mutate⁽⁷²⁾. Le mutazioni dello *spliceosoma* sono più frequenti nei pazienti affetti da MFP rispetto a quelli affetti da TE, mentre sono molto rare nei casi di PV. Recenti studi su pazienti affetti da MFP suggeriscono che la presenza di *SRSF2* conferisca una prognosi sfavorevole in termini di sopravvivenza globale e libera da leucemia⁽⁵⁸⁾.

Regolatori trascrizionali

Tp53 (*tumor protein p53*), localizzato sul cromosoma 17p13.1, codifica per la proteina p53, un fattore trascrizionale coinvolto in numerose attività biologiche incluse il ciclo cellulare e l'apoptosi come soppressore tumorale. Mutazioni germinali o somatiche di tale gene predispongono il paziente al cancro e le forme acquisite sono riscontrabili in circa il 10% dei pazienti affetti da leucemia acuta mieloide⁽⁷³⁾. La mutazione di p53 allo stato omozigote non è associata alla fase cronica delle NMC, mentre è documentabile in circa il 20% di casi di leucemia acuta mieloide secondaria a NMC^(74, 75).

IKZF1 (*IKAROS family zinc finger*), localizzato sul cromosoma 7p12, codifica per il fattore trascrizionale Ikaros, coinvolto nella regolazione

dello sviluppo delle cellule B e T⁽⁷⁶⁾. Mutazioni di questo gene sono maggiormente documentabili nei casi di NMC in fase blastica⁽⁷⁷⁾ e sono frequentemente associati a cariotipo complesso.

CBL, (*Casitas B-cell lymphoma*), localizzata sul cromosoma 11q23.3, è una proteina multifunzionale coinvolta nel fenomeno di ubiquitizzazione di recettori delle tirosinchinasi e nella trasduzione del segnale intracellulare. Mutazioni di *CBL* sono state identificate in una bassa percentuale di pazienti affetti da MFP (6%), ma non in PV e TE⁽⁷⁸⁾.

Modelli di progressione

La storia naturale delle NMC è caratterizzata dalla possibilità e potenzialità di evolvere in mielofibrosi e leucemia acuta ed è pertanto plausibile considerare di fondamentale importanza tanto il contributo di mutazioni somatiche all'iniziazione dell'ematopoiesi clonale e alla mieloproliferazione, quanto all'evoluzione della malattia. Negli ultimi anni è emersa l'ipotesi di come una singola mutazione non possa essere sufficiente all'iniziazione della malattia ma che sia necessaria una cooperazione genica sinergizzante sia all'induzione come alla progressione della stessa. Questa complessità clonale venne inizialmente suggerita dall'evidenza di leucemie acute mieloidi secondarie a NMC-*JAK2* positive, che risultavano negative per tale mutazione, supportando l'esistenza (o coesistenza) di cloni *JAK2*-indipendenti⁽⁷⁹⁾. Successivamente, studi su modelli animali dimostrarono come la presenza della mutazione *JAK2V617F* a livello della cellula staminale emopoietica fosse capace di iniziare la malattia ma conferisse solo un debole vantaggio in termini di *self-renewal* e crescita cellulare,^(80,81) lasciando aperta la possibilità che altre mutazioni potessero intervenire nell'iniziazione della malattia. Negli anni, studi con tecniche di sequenziamento genico e di genotipizzazione hanno permesso di identificare non solo il profilo mutazionale delle NMC ma anche l'ordine temporale di acquisizione della mutazione che è capace di influenzare il comportamento delle cellule staminali emopoietiche e delle cellule progenitori, condizionando il fenotipo della malattia e la risposta alla terapia. In generale, mutazioni a carico di *TET2* e *DNMT3A* sono considerate eventi genetici acquisiti precedenti a *JAK2V617F* (o coesistenza di cloni separati) mentre, *ASXL1*, *EZH2* e *IDH1* sono spesso successivi a questo; lo stesso pattern di evoluzione clonale è simile per *CALR*⁽⁸²⁾.

Fattori di rischio genetico

Ad oggi, numerosi sono i fattori di rischio identificati nelle NMC, associati ad una evoluzione in senso fibrotico e/o leucemico. Studi mediante tecnologie di *next-generation sequencing* (NGS) hanno permesso l'identificazione di mutazioni responsabili della progressione delle NMC⁽⁹⁾: un aumentato numero di mutazioni è correlato alla progressione di malattia ed è stato documentato essere un marker di prognosi in termini di sopravvivenza e trasformazione leucemica.⁽¹⁵⁾

Tuttavia, è stato dimostrato che le NMC non sono associate a un forte stato ipermutabile e rare sono le mutazioni somatiche addizionali identificabili durante il corso di malattia⁽¹⁵⁾.

Come in precedenza descritto, nei pazienti affetti da PV la carica allelica di *JAK2* si associa a uno specifico fenotipo e numerosi studi hanno identificato la presenza in omozigosi della mutazione *V617F*^(83,84) o di una sua carica allelica superiore al 50%^(31,85,86) come fattore di rischio di trasformazione in mielofibrosi, mentre non sembra avere alcun impatto sulla leucemogenesi.⁽⁸⁷⁾ Nei pazienti affetti da TE e MFP, invece, la presenza della mutazione *JAK2V617F* o una sua elevata carica allelica non hanno alcun impatto in termini di evoluzione mielofibrotica e/o leucemica⁽⁸⁸⁻⁹¹⁾.

La mutazione *MPL* ed in particolare una sua elevata carica allelica nei pazienti affetti da TE associata ad un *acquired copy-neutral loss of heterozygosity* - CN-LOH del cromosoma 1, corrispondente ad una transizione dallo stato di eterozigosi a quello di omozigosi dello stesso gene, è correlata ad un maggior rischio di evoluzione in senso mielofibrotico,⁽⁹²⁾ mentre non sembra avere alcun impatto in termini di trasformazione fibrotica e leucemica nelle altre NMC^(90,93-95).

Il ruolo delle mutazioni di tipo 1 e 2 di *CALR* nei pazienti affetti da TE rimane ancora non del tutto chiarito: infatti i risultati di uno studio multicentrico italiano dimostranti l'impatto prognostico in termini di trasformazione mielofibrotica delle mutazioni di tipo 1 (e tipo 1-like) di *CALR*⁽⁴⁰⁾ non sono stati confermati da un analogo studio condotto dalla Mayo Clinic⁽⁹⁶⁾.

Recentemente Tefferi e coll.⁽⁴⁶⁾ hanno dimostrato che le mutazioni a carico di *SRSF2* e *IDH2* sono prognosticamente rilevanti in termini di trasformazione leucemica e mielofibrotica per i pazienti affetti da PV; nei pazienti affetti da TE, *TP53* ed *EZH2* risultavano significativi in termini di trasformazione leucemica, mentre *SF3B1* e *U2AF1* lo erano per la trasformazione mielofibrotica.

I pazienti affetti da MFP sono caratterizzati da un numero maggiore di mutazioni somatiche rispetto a PV e TE: la presenza di almeno uno dei cinque geni mutati (*ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2* e *IDH1/2*) è associata ad una ridotta sopravvivenza ed in particolare lo stato mutazionale *ASXL1-pos/CALR-neg*⁽⁵⁹⁾. In aggiunta, la presenza di due o più tra queste mutazioni è correlata ad un aumentato rischio di evoluzione leucemica⁽⁹⁷⁾. Studi di NGS hanno identificato il ruolo avverso in termini di sopravvivenza e trasformazione leucemica delle mutazioni a carico di *ASXL1*, *SRSF2*, *CBL*, *KIT*, *RUNX1*, *SH2B3* e *CEBPA*⁽⁹⁸⁾. Le anomalie citogenetiche non sembrano avere alcun impatto prognostico in senso mielofibrotico per i pazienti affetti da PV⁽⁹⁹⁾ e TE⁽¹⁰⁰⁾ mentre il ruolo della terapia citotossica nell'evoluzione della malattia non è ancora univocamente riconosciuto⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾. Infine, per quanto concerne le forme di mielofibrosi secondarie a PV e TE, sono stati recentemente pubblicati i risultati dello studio multicentrico MYSEC, condotto su 781 pazienti: nelle forme secondarie a TE, i pazienti *JAK2* positivi e i tripli negativi hanno un

umentato rischio di evoluzione a leucemia acuta se confrontati con le forme *CALR* mutate⁽¹⁰⁴⁾.

Nell'ultimo decennio, grazie anche alla disponibilità di tecniche all'avanguardia di sequenziamento genico, capaci di identificare mutazioni non altrimenti identificabili con tecnologie convenzio-

nali, la comprensione delle basi genetiche delle NMC è sicuramente migliorata portando non solo a una migliore definizione diagnostica, come recentemente evidenziato dalla classificazione delle neoplasie mieloidi dell'Organizzazione Mondiale della Sanità WHO, ma anche prognostica.

Bibliografia

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
2. Tsukamoto N, Morita K, Maehara T, Okamoto K, Sakai H, Karasawa M, et al. Clonality in chronic myeloproliferative disorders defined by X-chromosome linked probes: demonstration of heterogeneity in lineage involvement. *Br J Haematol*. 1994;86(2):253-258.
3. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144-1148.
4. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387-397.
5. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365(9464):1054-1061.
6. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-1790.
7. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):e270.
8. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108(10):3472-3476.
9. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2391-2405.
10. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calcitriol in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2379-2390.
11. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(16):2507-2513.
12. Chaligne R, Tonetti C, Besancenot R, Roy L, Marty C, Mossuz P, et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia*. 2008;22(8):1557-1566.
13. Cazzola M, Kralovics R. From Janus kinase 2 to calcitriol: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(24):3714-3719.
14. Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, Patel JP, Brunel JP, Mermel CH, et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood*. 2014;123(22):e123-133.
15. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(14):2220-2228.
16. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616-3627; quiz 3699.
17. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289-2301.
18. Boulwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz MJ, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010;24(5):1062-1065.
19. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010;42(8):722-726.
20. Dusa A, Mouton C, Pecquet C, Herman M, Constantinescu SN. JAK2 V617F constitutive activation requires JH2 residue F595: a pseudokinase domain target for specific inhibitors. *PLoS One*. 2010;5(6):e11157.
21. Chen E, Beer PA, Godfrey AL, Ortmann CA, Li J, Costa-Pereira AP, et al. Distinct clinical phenotypes associated with JAK2V617F reflect differential STAT1 signaling. *Cancer Cell*. 2010;18(5):524-535.
22. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356(5):459-468.
23. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*. 2011;117(10):2813-2816.
24. Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;112(6):2190-2198.
25. Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood*. 2006;108(7):2435-2437.
26. Dupont S, Masse A, James C, Teyssandier I, Lecluse Y, Larbret F, et al. The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007;110(3):1013-1021.
27. Mead AJ, Rugless MJ, Jacobsen SE, Schuh A. Germline JAK2 mutation in a family with hereditary thrombocytosis. *N Engl J Med*. 2012;366(10):967-969.
28. Etheridge SL, Cosgrove ME, Sangkhae V, Corbo LM, Roh ME, Seeliger MA, et al. A novel activating, germline JAK2 mutation, JAK2R564Q, causes familial essential thrombocytosis. *Blood*. 2014;123(7):1059-1068.
29. Marty C, Saint-Martin C, Pecquet C, Grosjean S, Saliba J, Mouton C, et al. Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors. *Blood*. 2014;123(9):1372-1383.
30. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia*. 2008;22(7):1299-1307.
31. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia*. 2010;24(9):1574-1579.
32. Tefferi A. Mutant molecules of interest in myeloproliferative neoplasms: introduction. *Acta Haematol*. 2008;119(4):192-193.
33. Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation

- of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*. 2004;103(11):4198-4200.
34. Staerk J, Lacout C, Sato T, Smith SO, Vainchenker W, Constantinescu SN. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood*. 2006;107(5):1864-1871.
 35. Pecquet C, Staerk J, Chaligne R, Goss V, Lee KA, Zhang X, et al. Induction of myeloproliferative disorder and myelofibrosis by thrombopoietin receptor W515 mutants is mediated by cytosolic tyrosine 112 of the receptor. *Blood* 2010;115(5):1037-1048.
 36. Li J, Kent DG, Chen E, Green AR. Mouse models of myeloproliferative neoplasms: JAK of all grades. *Dis Model Mech*. 2011;4(3):311-317.
 37. Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Wassie EA, Ketterling RP, et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia*. 2014;28(7):1568-1570.
 38. Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, Van Duyn LB, Greives MR, Naylor SM, et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J* 2010;24(3):665-683.
 39. Guglielmelli P, Bartalucci N, Rotunno G, Vannucchi AM. Calreticulin: a new horizon for the testing and treatment of myeloproliferative neoplasms. *Expert Rev Hematol*. 2014;7(4):423-425.
 40. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, Di Buduo CA, Milanese C, Cavalloni C, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2016;30(2):431-438.
 41. Vannucchi AM, Rotunno G, Bartalucci N, Raugi G, Carrai V, Balliu M, et al. Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value. *Leukemia*. 2014;28(9):1811-1818.
 42. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127(10):1307-1316.
 43. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu RI, Marty C, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*. 2016;127(10):1325-1335.
 44. Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, El-Khoury M, Chachoua I, Tulliez M, et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood*. 2016;127(10):1317-1324.
 45. Elf S, Abdelfattah NS, Chen E, Perales-Paton J, Rosen EA, Ko A, et al. Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. *Cancer Discov*. 2016;6(4):368-381.
 46. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2017;92(1):94-108.
 47. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014;123(10):1544-1551.
 48. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014;28(7):1472-1477.
 49. Nangalia J, Green TR. The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):287-296.
 50. Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell*. 2010;7(3):299-313.
 51. De Haan G, Gerrits A. Epigenetic control of hematopoietic stem cell aging the case of Ezh2. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1106:233-239.
 52. Dey A, Seshasayee D, Noubade R, French DM, Liu J, Chaurushiya MS, et al. Loss of the tumor suppressor BAP1 causes myeloid transformation. *Science*. 2012;337(6101):1541-1546.
 53. Carbuca N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adelaide J, Rey J, et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2009;23(11):2183-2186.
 54. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Bonansea J, Cervera N, Carbuca N, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;145(6):788-800.
 55. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, et al. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell*. 2012;22(2):180-193.
 56. Abdel-Wahab O, Manshoury T, Patel J, Harris K, Yao J, Hegvat C, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res*. 2010;70(2):447-452.
 57. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, Wadleigh M, Lasho T, Heguy A, et al. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011;25(7):1200-1202.
 58. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861-1869.
 59. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Finke C, Mannarelli C, et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia*. 2014;28(7):1494-1500.
 60. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet*. 2010;42(2):181-185.
 61. Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tonnissen ER, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2010;42(8):665-667.
 62. Makishima H, Jankowska AM, Tiu RV, Szpurka H, Sugimoto Y, Hu Z, et al. Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2010;24(10):1799-1804.
 63. Abdel-Wahab O, Tefferi A, Levine RL. Role of TET2 and ASXL1 mutations in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2012;26(5):1053-1064.
 64. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2009;41(7):838-842.
 65. Tefferi A, Levine RL, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, et al. Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates. *Leukemia*. 2009;23(5):900-904.
 66. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia*. 2009;23(5):905-911.
 67. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(7):1723-1735.
 68. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-1812.
 69. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009;361(11):1058-1066.
 70. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, Mai M, McClure RF, Tefferi A. IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010;24(6):1146-1151.
 71. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-69.
 72. Lindsley RC, Ebert BL. The biology and clinical impact of genetic lesions in myeloid malignancies. *Blood*. 2013;122(23):3741-3748.
 73. Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2008;22(8):1539-1541.
 74. Beer PA, Delhommeau F, LeCoedic JP, Dawson MA, Chen E, Bareford D, et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood*. 2010;115(14):2891-2900.
 75. Harutyunyan A, Klampfl T, Cazzola M, Kralovics R. p53 lesions in leukemic transformation. *N Engl J Med*. 2011;364(5):488-490.

76. Georgopoulos K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(3):162-174.
77. Jager R, Gisslinger H, Passamonti F, Rumi E, Berg T, Gisslinger B, et al. Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010;24(7):1290-1298.
78. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;113(24):6182-6192.
79. Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, Scott LM, Bench AJ, Huntly BJ, et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood*. 2006;108(10):3548-3555.
80. James C, Mazurier F, Dupont S, Chaligne R, Lamrissi-Garcia I, Tulliez M, et al. The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity. *Blood*. 2008;112(6):2429-2438.
81. Kent DG, Li J, Tanna H, Fink J, Kirschner K, Pask DC, et al. Self-renewal of single mouse hematopoietic stem cells is reduced by JAK2V617F without compromising progenitor cell expansion. *PLoS Biol*. 2013;11(6):e1001576.
82. Martin S, Wright CM, Scott LM. Progenitor genotyping reveals a complex clonal architecture in a subset of CALR-mutated myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol*. 2017;177(1):55-66.
83. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer*. 2006;106(3):631-635.
84. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood*. 2007;110(3):840-846.
85. Bai J, Ai L, Zhang L, Yang FC, Zhou Y, Xue Y. Incidence and risk factors for myelofibrotic transformation among 272 Chinese patients with JAK2-mutated polycythemia vera. *Am J Hematol*. 2015;90(12):1116-1121.
86. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;107(9):3676-3682.
87. Malak S, Labopin M, Saint-Martin C, Bellanne-Chantelot C, Najman A, French Group of Familial Myeloproliferative D. Long term follow up of 93 families with myeloproliferative neoplasms: life expectancy and implications of JAK2V617F in the occurrence of complications. *Blood Cells Mol Dis*. 2012;49(3-4):170-176.
88. Gangat N, Wolanskyj AP, McClure RF, Li CY, Schwager S, Wu W, et al. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: a single institutional study of 605 patients. *Leukemia*. 2007;21(2):270-276.
89. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005;366(9501):1945-1953.
90. Thoenissen NH, Krug UO, Lee DH, Kawamata N, Iwanski GB, Lasho T, et al. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115(14):2882-2890.
91. Guglielmelli P, Barosi G, Pieri L, Antonioli E, Bosi A, Vannucchi AM. JAK2V617F mutational status and allele burden have little influence on clinical phenotype and prognosis in patients with post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis. *Haematologica*. 2009;94(1):144-146.
92. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, Bordoni R, Casetti I, Milanese C, et al. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2013;121(21):4388-4395.
93. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008;112(1):141-149.
94. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood*. 2008;3(3):844-847.
95. Pardanani A, Guglielmelli P, Lasho TL, Pancrazzi A, Finke CM, Vannucchi AM, et al. Primary myelofibrosis with or without mutant MPL: comparison of survival and clinical features involving 603 patients. *Leukemia*. 2011;25(12):1834-1839.
96. Elala YC, Lasho TL, Gangat N, Finke C, Barraco D, Haider M, et al. Calreticulin variant stratified driver mutational status and prognosis in essential thrombocythemia. *Am J Hematol*. 2016;91(5):503-506.
97. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Score J, Mannarelli C, Pancrazzi A, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia*. 2014;28(9):1804-1810.
98. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2016;91(12):1262-1271.
99. Gangat N, Strand J, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Pardanani A, et al. Cytogenetic studies at diagnosis in polycythemia vera: clinical and JAK2V617F allele burden correlates. *Eur J Haematol*. 2008;80(3):197-200.
100. Gangat N, Tefferi A, Thanarajasingam G, Patnaik M, Schwager S, Ketterling R, et al. Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia: prevalence and prognostic significance. *Eur J Haematol*. 2009;83(1):17-21.
101. Gangat N, Strand J, Li CY, Wu W, Pardanani A, Tefferi A. Leucocytosis in polycythaemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *Br J Haematol*. 2007;138(3):354-358.
102. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, Capnist G, Chisesi T, Finelli C, et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood*. 2005;105(7):2664-2670.
103. Bjorkholm M, Derolf AR, Hultcrantz M, Kristinsson SY, Ekstrand C, Goldin LR, et al. Treatment-related risk factors for transformation to acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in myeloproliferative neoplasms. *J Clin Oncol*. 2011;29(17):2410-2415.
104. Passamonti F, Mora B, Giorgino T, Guglielmelli P, Cazzola M, Maffioli M, et al. Driver mutations' effect in secondary myelofibrosis: an international multicenter study based on 781 patients. *Leukemia*. 2017;31(4):970-973.

Parole Chiave

Policitemia vera, trombocitemia essenziale, mielofibrosi.

Indirizzi per la corrispondenza

Francesco Passamonti

Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università dell'Insubria, Varese
Tel/Fax. 0332 393 648

E-mail: francesco.passamonti@uninsubria.it

Leucemia linfatica cronica



Gian Matteo Rigolin, Antonio Cuneo

UO di Ematologia - Azienda Ospedaliero Universitaria Arcispedale S. Anna, Ferrara

Introduzione

La leucemia linfatica cronica (LLC) è la leucemia più frequente nel mondo occidentale rappresentando circa il 40% di tutte le forme leucemiche.⁽¹⁾ La LLC è un disordine linfoproliferativo cronico dal comportamento clinico eterogeneo che riflette una complessa sequenza di eventi patogenetici tra i quali spiccano la stimolazione cronica del *B-cell receptor* (BCR) da parte di (auto)antigeni, e l'acquisizione di numerose lesioni genetiche. Se la maggior parte dei pazienti presenta infatti un quadro relativamente indolente che spesso non richiede alcun trattamento per lunghi periodi di tempo, vi sono tuttavia alcuni casi nei quali vi è una evoluzione della malattia rapidamente progressiva tale da rendere necessario un precoce intervento terapeutico.^(2,3) Nella pratica clinica è quindi di fondamentale importanza definire il rischio di progressione e predire la risposta al trattamento soprattutto alla luce dell'armamentario terapeutico che oggi si avvale non solo delle diverse combinazioni di chemioimmunoterapia ma anche di nuovi farmaci che hanno come bersaglio i meccanismi patogenetici della malattia.⁽⁴⁾ A tal fine, i più moderni algoritmi terapeutici prendono in considerazione non solo l'età e la presenza di comorbidità ma anche numerosi fattori prognostici e predittivi tra i quali rivestono particolare importanza quelli genetico molecolari. Tra questi ultimi, vi sono la configurazione non mutata della regione variabile del gene per la catena pesante delle immunoglobuline (IGHV)⁽⁵⁾, specifiche lesioni citogenetiche molecolari identificate mediante l'ibridazione in situ fluorescente (FISH)⁽⁶⁾, e lo studio di svariati geni tra cui TP53, NOTCH1, SF3B1 e BIRC3.⁽⁷⁾ Il sempre maggior affinamento delle tecniche di sequenziamento ci ha inoltre consentito di scoprire come nella LLC vi sia un notevole grado di eterogeneità genetica ed epigenetica che può aiutare a comprendere meglio la storia naturale della malattia ed a spiegare quindi l'eterogeneo comportamento che si osserva nella pratica clinica quotidiana.⁽⁸⁻¹⁰⁾ Scopo della presente rassegna è quello di descrivere le principali lesioni genetico-molecolari nella LLC e inquadrare il fenomeno della evoluzione clonale in relazione alla patogenesi ed evoluzione della malattia.

Lesioni genetiche ricorrenti

Circa l'80% dei pazienti con LLC presenta alla diagnosi anomalie cromosomiche.⁽⁶⁾ Queste alterazioni citogenetiche correlano con il decorso della malattia e sono pertanto utilizzate nella pratica clinica per l'inquadramento prognostico e terapeutico. Più recentemente è stato rivalutato il ruolo prognostico delle aberrazioni del cariotipo ed in particolare del cariotipo complesso,⁽¹¹⁻¹⁴⁾ mentre ampi studi, per lo più retrospettivi, hanno dimostrato il ruolo prognostico negativo delle mutazioni di vari geni tra i quali TP53, NOTCH1, SF3B1 e BIRC3 sia sul tempo al primo trattamento che sulla sopravvivenza complessiva.^(7, 15-19) Questi dati sono stati poi in parte confermati nell'ambito di studi clinici prospettici di pazienti trattati con protocolli terapeutici omogenei,^(12, 20, 21) portando all'inserimento delle lesioni di TP53 nei sistemi prognostici^(17, 22) tra cui il recente CLL-IPI⁽²³⁾ allo scopo di aiutare i clinici nell'inquadramento prognostico terapeutico.

Le tecniche di sequenziamento hanno evidenziato numerose mutazioni geniche ricorrenti, anche se molti di questi geni studiati risultano mutati solo in piccole frazioni di pazienti (Figura 1).^(7, 15, 16, 18) Spesso è inoltre possibile osservare la contemporanea presenza di più di una lesione genetica molecolare con alcune associazioni preferenziali quali ad esempio la delezione 17p e le mutazioni di TP53,⁽²¹⁾ o la delezione 11q e le mutazioni di ATM⁽²⁴⁾ o le mutazioni di NOTCH1 e la trisomia del cromosoma 12.^(25, 26) Circa due terzi delle combinazioni ricorrenti coinvolgono le delezioni 13q e 11q, e le mutazioni di SF3B1 e di ATM mentre nell'8% dei pazienti non si riscontrano tuttavia alterazioni genetiche o molecolari note.⁽¹⁰⁾

In aggiunta, la valutazione della frequenza delle varianti alleliche (VAF) ha consentito di identificare e quantificare anche il fenomeno della eterogeneità intratumorale e di analizzare l'architettura clonale e lo sviluppo filogenetico della malattia identificando eventi preferenzialmente clonali che insorgono precocemente accanto ad eventi preferenzialmente subclonali e ad insorgenza tardiva.⁽¹⁰⁾

Pur nell'eterogeneità dei quadri genetico/molecolari, è tuttavia possibile assegnare i vari geni mutati a specifici programmi biologici,

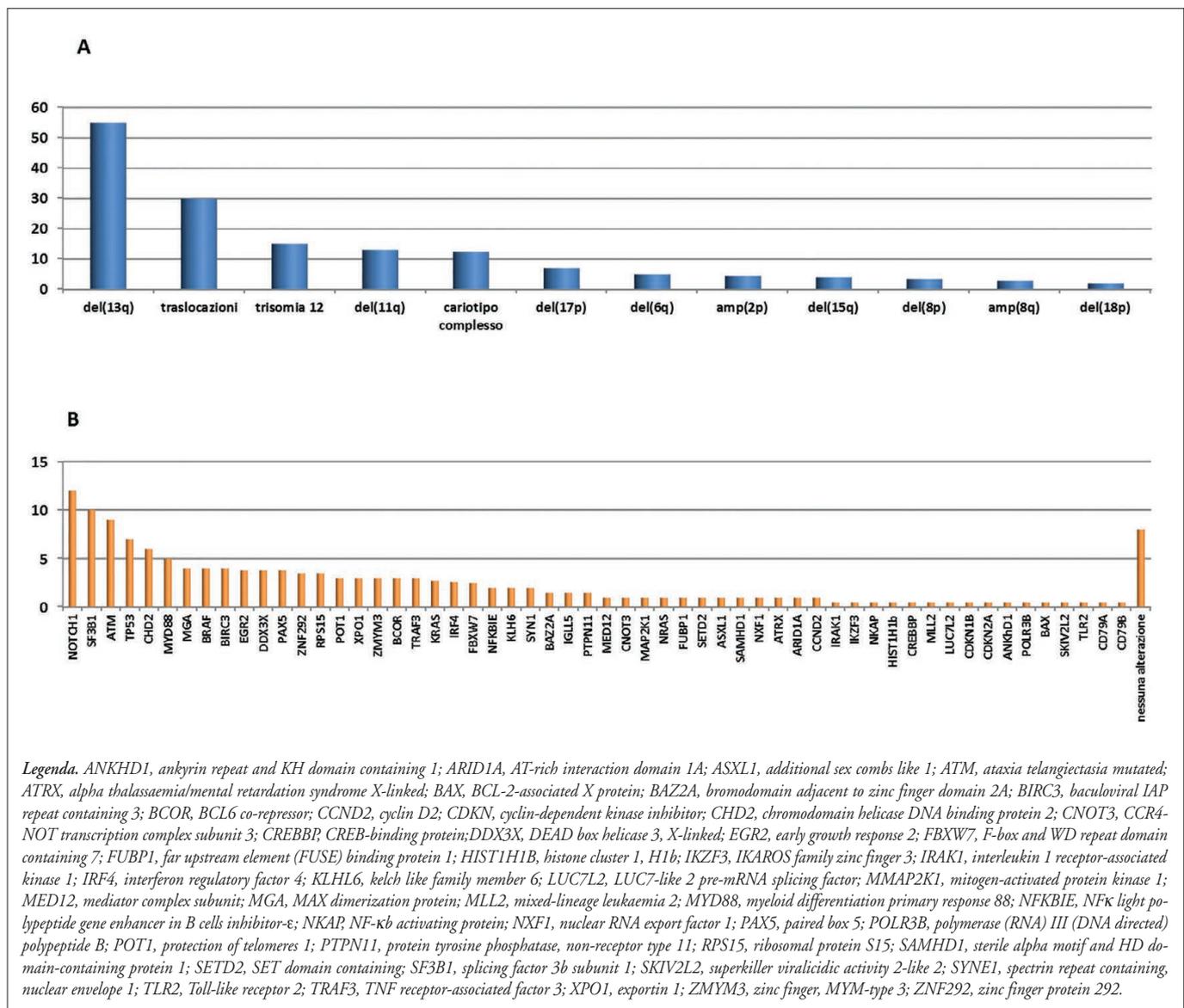


Figura 1 - Frequenza percentuale delle aberrazioni cromosomiche (A) e delle mutazioni geniche somatiche (B) nella LLC.

delineando così alcune vie di segnale comuni che risultano interessate da queste mutazioni (Tabella 1).^(8, 15, 16, 27-31)

Un ulteriore aspetto di complessità che può contribuire alla comprensione della eterogeneità clinica deriva dal diverso tipo di cellula di origine coinvolta nel processo leucemico in relazione allo stato mutato o non mutato dei geni IGHV. In particolare, le LLC con IGHV mutato presentano un più ristretto spettro di mutazioni *driver* rispetto alle forme non mutate.⁽¹⁸⁾ Lo spettro di mutazioni geniche ricorrenti varia inoltre anche in rapporto ai diversi subset di LLC relativamente alla stereotipia del B-cell receptor.⁽³²⁾

del13q14 La delezione del braccio lungo del cromosoma 13 è la lesione genetica più frequentemente osservabile nei pazienti con LLC.⁽⁶⁾ Essa è presente in circa il 50-60% dei casi e nell'80% di questi è di tipo monoallelico.⁽⁸⁾ È spesso la sola lesione genetica presente e nella maggior parte dei casi si associa ad uno stato mutato di

IGHV. Le dimensioni della delezione sono eterogenee ma la minima regione deleta include il locus DLEU2 (*deleted in lymphocytic leucemia 2*) che codifica per il *long non-coding RNA* (lncRNA) DLEU2, il cluster dei microRNA MIR15A-MIR16-1, il gene del lncRNA DLEU1 e, in alcuni casi per il gene DLEU7, che codifica per un regolatore putativo negativo del complesso trascrizionale del fattore nucleare κ B (NF- κ B).⁽³³⁻³⁸⁾ Nei modelli animali la delezione 13q14 causa dei disordini linfoproliferativi che ricapitolano le fasi di malattia della LLC anche se si ritiene siano necessarie ulteriori lesioni genetiche per determinarne lo sviluppo.⁽⁸⁾ In particolare, si ritiene che i microRNA mir15a e miR16-1 svolgano un ruolo di soppressori tumorali esercitando la loro azione inibitoria su geni coinvolti nel ciclo cellulare⁽³⁹⁾ e regolando l'espressione di BCL-2.⁽⁴⁰⁾ Recentemente è stato dimostrato come il rimpiazzo di questi microRNA possa determinare una regressione tumorale sia in vitro che in mo-

| Programmi biologici | Lesioni genetiche | | | |
|--|--|--|--|--|
| Notch | NOTCH1 | SPEN | FBXW7 | CREBBP |
| B Cell Receptor NF-kB Toll Like Receptor | BCL6 BCOR BIRC3 BRAF BTK | CD79A CD79B EGR2 IKZF3 IRAK1 IRF4 | KLHL6 MAP2K1 MAP2K3 MYD88 NFKBIE NKAP | PAX5 PKC PLCGamma 2 TLR2 TRAF3 |
| Struttura cromatinica e del genoma | ARID1A ASXL1 ATRX BAZ2A CHD2 | CREBBP FUBP1 HIST1H1B HIST1H1C MED12 | MED1 MLL2 POLR3B SETD1A SETD2 | SYNE1 ZMYM3 |
| Risposta al danno del DNA | ATM ATR | BRCC3 Del11q | Del17p POT1 | SAMHD1 TP53 |
| Apoptosi e Ciclo cellulare | ANKHD1 BAX BRAF | CCND2 CDKN1B CDKN2A | Del13q14 KRAS NRAS | PTPN11 TP53 |
| Metabolismo RNA | CNOT3 DDX3X LUC7L2 | MED12 MGA NXF1 | RPS15 SF3B1 SKIV2L2 | XP01 ZNF292 |
| Altre | Trisomia 12 | | | |

Tabella 1 - Lesioni genetiche e programmi biologici implicati nella patogenesi della LLC.

delli animali in vivo anche se questo fenomeno non risulta essere limitato ai soli casi con delezione 13q.⁽⁴¹⁾ La delezione 13q si associa generalmente ad una buona prognosi sebbene i pazienti con una delezione che include anche il gene RB1 (circa il 20% dei casi) presentino una prognosi un po' meno favorevole.⁽⁴²⁾

Trisomia 12 La trisomia del cromosoma 12 è presente in circa il 15% dei pazienti con LLC.⁽⁶⁾ Non è ancor stato ben chiarito attraverso quale meccanismo eziopatogenetico la trisomia 12 contribuisca allo svilupparsi della malattia. La trisomia 12, considerata storicamente una lesione citogenetica a rischio intermedio, determina una prognosi più sfavorevole quando si associa a mutazioni di NOTCH1.⁽⁴³⁾ Nei pazienti con trisomia 12 è stata anche osservata una maggiore incidenza di seconde neoplasie ed evoluzione in sindrome di Richter.⁽⁴⁴⁾

del11q22-23 e mutazioni di ATM La delezione del braccio lungo del cromosoma 11 si riscontra in circa il 10-15% dei pazienti con LLC.⁽⁶⁾ Generalmente si associa ad un stato non mutato di IGHV e ad una malattia con un importante interessamento adenopatico.^(45, 46) Questa delezione è generalmente di tipo monoallelico e

di grandi dimensioni (> 20 megabasi) ed include il gene oncosoppressore ATM (*Atassia Telegeectasia Mutated*) che codifica per una proteina che svolge un ruolo importante nella risposta cellulare al danno del DNA.⁽⁴⁷⁾ Più di un terzo dei casi con delezione 11q presenta una mutazione del rimanente allele di ATM, mentre una mutazione di ATM in assenza di delezione 11q è osservabile solo in una parte minore dei pazienti suggerendo un possibile ruolo patogenetico della aploinsufficienza di ATM.^(11, 15, 16, 24, 28, 48-53) In alcuni casi di delezione 11q non vi è il coinvolgimento di ATM ma del gene BIRC3 (*Baculoviral IAP Repeat Containing 3*) un regolatore negativo della via non canonica di NF-kb.⁽⁵⁴⁾ I casi con delezione 11q ed interessamento di ATM presentano instabilità genomica con l'acquisizione di lesioni genetiche aggiuntive e resistenza ai trattamenti.⁽⁴⁵⁾

del6q21 La delezione del braccio lungo del cromosoma 6 è presente in circa il 5-6% dei casi con LLC ed in circa il 40% dei casi si può presentare come singola anomalia.⁽¹¹⁾ I pazienti con delezione 6q si caratterizzano per una elevata incidenza di morfologia atipica, positività per il CD38 ed una prognosi assimilabile al gruppo a rischio citogenetico intermedio.⁽⁵⁵⁾

del17p13 e mutazioni di TP53 La delezione del braccio corto del cromosoma 17 è presente alla diagnosi in circa il 5-7% dei pazienti⁽⁶⁾. Questa delezione interessa il gene oncosoppressore TP53 che nell'80% circa dei casi risulta mutato ed inattivato anche nell'allele rimanente.^(18, 38, 56) L'inattivazione di TP53, comportando instabilità genetica, si associa generalmente a cariotipi complessi ed a prognosi severa^(28, 29, 57-61) anche se sono stati osservati casi, per lo più con configurazione mutata di IGHV nei quali la prognosi non sembrerebbe così sfavorevole.^(62, 63) Le mutazioni di TP53, anche in assenza di delezione del secondo allele in 17p13, si associano ad una scarsa risposta ai trattamenti chemioimmunoterapici a conferma della funzione dominante negativa di TP53.⁽⁶⁴⁻⁶⁹⁾ La rilevanza prognostica delle delezioni 17p13 e mutazioni di TP53 ha portato all'inclusione delle aberrazioni di TP53 quale fattore prognostico più importante nel sistema prognostico CLL-IPI.⁽²³⁾ Recentemente è stato osservato come anche mutazioni subclonali di TP53 conferiscano una analoga prognosi severa.⁽⁷⁰⁻⁷²⁾ Il riscontro di delezioni o mutazioni di TP53 assume oggi particolare rilevanza dal punto di vista terapeutico in considerazione della scarsa risposta che questi pazienti presentano ai trattamenti chemioimmunoterapici ed alla disponibilità di trattamenti con farmaci inibitori del BCR *signalling*.⁽⁷³⁾

Altre lesioni citogenetiche Altre lesioni citogenetiche che si riscontrano con minore frequenza sono rappresentate da: le amplificazioni del cromosoma 2p nel 2-7% dei casi che contengono i geni MYCN, REL, e BCL11A,^(74, 75) le amplificazioni del cromosoma 8q nel 2-4% dei casi responsabili delle amplificazioni di MYC⁽⁷⁶⁾ e le delezioni del cromosoma 8p nel 2-5% dei casi e del cromosoma 15q nel 4% dei casi che interessano rispettivamente i geni TNFRSF10A/B⁽⁷⁷⁾ e MGA.⁽³⁸⁾

Mutazioni di NOTCH1 Il gene NOTCH1 codifica per una proteina recettoriale transmembranaria che in risposta al legame di specifici ligandi va incontro a modificazioni conformazionali che determinano, dopo vari clivaggi proteolitici, la migrazione della porzione intracellulare ICN1 nel nucleo e quindi l'attivazione di programmi trascrizionali che regolano la proliferazione e la sopravvivenza cellulare.⁽⁸⁾ Mutazioni della porzione codificante del gene NOTCH1 sono presenti in circa il 10-14% dei pazienti con LLC alla diagnosi.^(31, 53) Queste mutazioni si associano generalmente ad uno stato non mutato di IGHV e nel 40% di casi alla presenza di una trisomia del cromosoma 12 suggerendo una sinergia tra queste due lesioni genetiche.⁽⁴³⁾ Le mutazioni di NOTCH1 comporterebbero, nei pazienti con trisomia 12, una modulazione dell'espressione dell'integrina beta2 nel contesto di una generale upregolazione funzionale del *signalling* delle integrine.⁽²⁶⁾ La maggior parte delle mutazioni di NOTCH1 osservate nella LLC comportano la formazione di una proteina transmembranaria troncata con abrogazione del dominio PEST che è necessario per il riconoscimento e successivo processo di degradazione nel proteasoma da parte della

ubiquitino ligasi FBXW7 (F-box and WD repeat containing protein 7).⁽⁸⁾ In casi privi di mutazioni stabilizzanti di NOTCH1 sono state descritte mutazioni che interessano la regione non tradotta 3' del gene (circa il 3% dei pazienti con LLC) con conseguente splicing aberrante del dominio PEST⁽⁵³⁾ oltre che mutazioni, molto rare, che inattivano il gene *FBXW7*.^(53, 78) Queste diverse lesioni genetiche comportano in ultima analisi una deregolazione dell'espressione di ICN1 e quindi l'attivazione di programmi trascrizionali correlati a NOTCH1 con implicazioni in termini di sopravvivenza cellulare e modulazione dei segnali apoptotici.⁽⁷⁹⁾ Le mutazioni di NOTCH1 sono risultate associate a più breve tempo al primo trattamento ed ad una più breve sopravvivenza globale⁽⁵³⁾ probabilmente per una ridotta espressione del CD20 che pertanto determinerebbe in questi pazienti un minor beneficio dei trattamenti che utilizzano gli anticorpi monoclonali anti CD20.⁽⁸⁰⁾

Mutazioni di SF3B1 Il gene SF3B1 (*splicing factor 3b subunit 1*) codifica per un componente importante dello spliceosoma che partecipa alle fasi iniziali dello splicing del RNA.⁽⁸⁾ Le mutazioni del gene SF3B1 sono presenti in circa il 10% della LLC alla diagnosi.^(15, 16, 18, 31, 53, 81, 82) La maggior parte di questi casi sono IGHV non mutati. Le mutazioni di SF3B1 sono di tipo eterozigote e *missense* e mappano nella regione C terminale del gene comportando una alterata interazione tra la proteina e l'RNA. Circa il 50% di queste mutazioni è rappresentata dalla variante K700E.⁽¹⁶⁾ Oltre che nello *splicing*, le mutazioni di SF3B1 possono avere un ruolo nei processi di risposta al danno del DNA come suggerito dall'associazione con le delezioni 11q e dalle risposte trascrizionali alterate di ATM e p53 nei casi privi di alterazioni di ATM e/o TP53.⁽⁸³⁾ Le mutazioni di SF3B1 possono inoltre comportare una disregolazione di altre funzioni cellulari quali il mantenimento dei telomeri ed il *signalling* di Notch⁽⁸⁴⁾ Altri geni implicati nello *splicing* possono essere mutati, con minor frequenza nella LLC (Tabella 1): nel complesso circa il 30% delle LLC ha mutazioni in geni implicati nello *splicing*.⁽⁸⁵⁾ La presenza di mutazioni di SF3B1 è stata associata ad un più breve tempo al primo trattamento e ad una minore sopravvivenza globale⁽⁷⁾ ed alla chemorefrattarietà a trattamenti con fludarabina.⁽⁸⁶⁾

Mutazioni di BIRC3 Le mutazioni di BIRC3 si osservano in circa il 4% dei casi di LLC alla diagnosi.^(15, 16, 18, 53) Per effetto delle mutazioni si ha la formazione di una proteina inattiva troncata priva del dominio RING C-terminale che è coinvolto nella attività della ubiquitino ligasi E3 richiesta per la degradazione nel proteasoma di MAP3K14, un attivatore chiave della via canonica di NF- κ B. Il risultato di questa mutazione è pertanto una attivazione costitutiva di NF- κ B.⁽⁷⁾ Oltre alle mutazioni, nella LLC possiamo avere anche delezioni monoalleliche di BIRC3 in casi con delezioni 11q. L'alterazione di BIRC3 si associa ad una prognosi sfavorevole⁽¹⁷⁾ e ad una chemorefrattarietà ai regimi contenenti fludarabina.⁽⁵⁴⁾

Mutazioni di MYD88 MYD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) è un gene che codifica per una proteina citoplasmatica adattatrice implicata nella via del *toll-like receptor* (TLR) che interviene in svariate funzioni B cellulari tra le quali l'attivazione di NF- κ B.⁽⁸⁷⁾ Il gene MYD88 è mutato in circa il 5% di tutte le LLC alla diagnosi.^(15,31) Le mutazioni di MYD88 si associano ad una età più giovane dei pazienti e quasi esclusivamente ad uno stato mutato di IGHV.⁽⁸⁸⁾ Le mutazioni interessano uno specifico residuo aminoacidico (L265) che è mutato anche nei linfomi diffusi a grandi cellule B tipo ABC (*activated B cell*)⁽⁸⁹⁾ e nella macroglobulinemia di Waldenström.⁽⁹⁰⁾ Questa mutazione avviene a livello del dominio TIR (*Toll/Interleukin 1 receptor*) e determina una aumentata capacità legante di MYD88 con la chinasi IRAK1 (*Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) con conseguente aumentata fosforilazione ed attivazione di varie molecole bersaglio tra cui STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) e la subunità p65 di NF- κ B.⁽⁸⁷⁾

Mutazioni di POT1 Il gene POT1 (*protection of telomeres 1*) codifica per un componente del complesso della proteina shelterina ed è implicato nella protezione dei telomeri.⁽³⁰⁾ Recentemente è stato inoltre dimostrato che mutazioni germline nel complesso dei geni della shelterina si associano a LLC familiari suggerendo che quindi alterazioni della regolazione dei telomeri possano avere un ruolo nello sviluppo della LLC.⁽⁹¹⁾ POT 1 è mutato in circa il 3% dei pazienti e si associa ad una malattia in genere in stadio avanzato e con uno stato di IGHV non mutato.^(15, 16, 18, 31, 53) La maggior parte delle mutazioni di POT1 interessano la regione N terminale implicata nella interazione con le sequenze TTAGGG del DNA determinando un legame con il DNA non stabile e pertanto rotture ed alterazioni strutturali del DNA senza evidenza di una risposta cellulare al danno del DNA.⁽³⁰⁾

Mutazioni di XPO1 Il gene XPO1 (*exportin 1*) codifica per una proteina che svolge un ruolo importante nel trasporto nucleocitoplasmatico. Mutazioni di XPO1 sono presenti in circa il 3% dei pazienti con LLC⁽¹⁰⁾ e si associano a più alte percentuali di cellule con immunofenotipo da LLC, con l'espressione di CD38 e ZAP70, con la presenza di mutazioni di NOTCH1 e con uno stato non mutato di IGHV.⁽⁷⁾

Mutazioni di NFKBIE NFKBIE (*NF κ light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor- ϵ*) è un gene che codifica per un regolatore negativo della via canonica di NF- κ B. Risulta mutato in modo monoallelico in circa l'1-3% delle LLC.⁽⁷⁾ Le mutazioni determinano la formazione di un inibitore ϵ troncato il quale, perdendo la propria funzione di limitare la migrazione dei dimeri NF- κ B nel nucleo, comporterebbe una attivazione della via di NF- κ B. Le mutazioni di NFKBIE si associano ad una prognosi più severa.⁽⁹²⁾

Mutazioni di FBXW7 Il gene FBXW7 (*F-Box and WD40 domain protein 7*) codifica per una ubiquitina ligasi nel *signalling* di

NOTCH1 (vedi sopra). Mutazioni di BXW7 sono presenti in circa il 2-3% dei casi di LLC, sono per lo più di tipo *missense* e si associano alla espressione del CD38 e alla trisomia del cromosoma 12 e risultano mutualmente esclusive con le mutazioni di SF3B1.⁽⁷⁾

Mutazioni di EGR2 Il gene EGR2 (*early growth response 2*) codifica per un fattore trascrizionale implicato nella differenziazione delle cellule emopoietiche.⁽⁹³⁾ Mutazioni EGR2 sono riscontrabili nel 3.8% delle LLC e sono associate ad una giovane età alla diagnosi, ad uno stadio clinico avanzato, alla espressione del CD38 e ad uno stato non mutato di IGHV. I pazienti con mutazioni di EGR2 presentano inoltre lesioni di ATM nel 42% dei casi, mutazioni di TP53 nel 18% e mutazioni di NOTCH1/FBXW7 nel 16%. Le mutazioni di EGR2 predicono in modo indipendente per un più breve tempo al primo trattamento e una peggiore sopravvivenza globale.⁽⁹⁴⁾

Mutazioni di RPS15 RPS15 è un gene che codifica per la proteina ribosomale S15, un componente della subunità ribosomale 40S. Recentemente è stata anche descritta una interazione tra RPS15 e MDM2/MDMX18 e una ridotta stabilizzazione e aumentata degradazione di p53 nei casi con mutazioni di RPS15 rispetto ai casi *wild-type*, suggerendo un possibile nuovo meccanismo molecolare nella patogenesi della LLC.⁽⁹⁵⁾ Questo gene risulta mutato in circa il 20% dei pazienti che recidivano dopo FCR e in circa il 3-4% dei pazienti arruolati in protocolli clinici di prima linea. Le mutazioni di RPS15 si associano generalmente alla presenza di fattori prognostici negative quali uno stato IGHV non mutato e la presenza di mutazioni di TP53 e quindi ad una ridotta sopravvivenza.⁽⁹⁶⁾

Multi-hit profile Nella LLC pochi geni sono mutati con una certa frequenza mentre la maggior parte dei geni presentano alterazioni solo in piccole frazioni di pazienti. Considerato il sempre maggior numero di geni che vengono studiati e trovati mutati non è infrequente la possibilità che più geni possano risultare mutati nello stesso paziente, configurando quadri mutazionali cosiddetti *multi-hit*. Mediante analisi di sequenziamento in NGS si è osservato che alla diagnosi, studiando un pannello di 20 geni, il 18.0% dei pazienti presentava 2 o più mutazioni, mentre in pazienti che necessitavano trattamento, arruolati nel trial clinico CLL11, si sono osservate mutazioni in 42 degli 85 geni analizzati, con il 42.2% dei pazienti che presentava ≥ 2 geni mutati.⁽¹²⁾ Il numero delle mutazioni si è dimostrato correlare con un più breve tempo al trattamento e peggiore sopravvivenza.^(15, 97)

Subcloni La dimostrazione che subcloni con mutazioni di TP53 conferiscono lo stesso significato prognostico dei cloni maggiori e la disponibilità di tecniche di sequenziamento sempre più sensibili (*ultra deep* NGS) che consentono di studiare mutazioni subclonali con frequenza allelica minore dell'1% ha portato ad estendere lo studio delle mutazioni subclonali anche ad altri geni frequentemente mutati nella LLC. Si è potuto quindi dimostrare che mutazioni di TP53 erano presenti nel 10.6% dei pazienti (6.4% clonali, 4.2%

subclonali), mutazioni di ATM nell'11.1% (7.8% clonali, 1.3% subclonali, 2% mutazioni *germ line* considerate patogenetiche), mutazioni di SF3B1 nel 12.6% (7.4% clonali, 5.2% subclonali), mutazioni di NOTCH1 nel 21.8% (14.2% clonali, 7.6% subclonali), e mutazioni di BIRC3 nel 4.2% (2% clonali, 2.2% subclonali).⁽⁹⁸⁾ Si è confermato il ruolo prognostico negativo in termini di sopravvivenza globale per le mutazioni subclonali di TP53 mentre fra gli altri geni solo le mutazioni subclonali di NOTCH1 correlavano con un più breve tempo al primo trattamento.⁽⁹⁸⁾ Similmente in un altro studio si è evidenziato che le mutazioni subclonali di SF3B1, NOTCH1 e BIRC3 non impattavano sulla sopravvivenza globale mostrando un minor grado di aggressività rispetto alle mutazioni subclonali di TP53.⁽⁹⁹⁾ In considerazione della numerosità dei geni che possono risultare mutati nella LLC, della complessità del quadro genomico che è emerso e del continuo avanzamento tecnologico in futuro sarà importante definire quali geni avranno un impatto clinicamente significativo, quale *cut-off* di VAF sarà da considerare clinicamente e prognosticamente significativo, se questo valore sarà da considerare o meno gene specifico, e quale sarà la migliore e più adeguata tecnologia per affrontare lo studio di questi subcloni.^(100, 101)

Cariotipo e cariotipo complesso Nell'ultimo decennio grazie all'utilizzo di nuove tecniche di stimolazione cellulare che utilizzano i cosiddetti nuovi mitogeni (CD40 *ligand* o la combinazione di IL2 e CpG-*oligodeoxynucleotides*), è stato possibile ottenere metafasi valutabili in oltre 90% dei casi di LLC migliorando notevolmente il tasso di successo dell'analisi citogenetica rispetto al periodo precedente nel quale si utilizzavano i classici stimolatori.⁽¹¹⁾ In questo modo sono state acquisite informazioni su alterazioni citogenetiche che la FISH, con il tradizionale pannello a 4 sonde (trisomia 12, delezioni 13q14, 17p13, 11q22), non consentiva di ottenere, dimostrando che oltre l'80% dei pazienti con LLC presenta anomalie cariotipiche.⁽¹¹⁾ Con l'utilizzo dei nuovi mitogeni si è potuto dimostrare che circa il 30% dei pazienti con FISH normale, cioè negativa per la presenza di alterazioni con il classico pannello FISH a 4 sonde, presenta anomalie del cariotipo e come queste anomalie si associno ad una prognosi più sfavorevole in termini di tempo al primo trattamento e sopravvivenza complessiva.⁽¹⁰²⁾

Un cariotipo complesso definito dalla presenza di 3 o più anomalie citogenetiche è risultato presente in circa il 10-15% dei pazienti alla diagnosi ed è stato individuato come un fattore predittivo indipendente per un tempo più breve al primo trattamento e per una più breve sopravvivenza globale in pazienti analizzati alla diagnosi.^(13, 14, 97, 103) Il cariotipo complesso e le mutazioni di POT1 si sono inoltre dimostrati essere fattori prognostici negativi indipendenti per la sopravvivenza globale dopo il trattamento di prima linea con regimi comprendenti clorambucile e anticorpi anti CD20,⁽¹²⁾ mentre nei casi di LLC recidivanti/refrattari trattati con regimi a base di ibrutinib, il cariotipo complesso è risultato più forte della

delezione 17p13 nel predire una prognosi sfavorevole.⁽¹⁰⁴⁾ Il cariotipo complesso risulta spesso associato ad uno stato non mutato del gene IGHV ad aberrazioni del cromosoma 17p.⁽¹³⁾

Allo stesso modo, un cariotipo sfavorevole che include il cariotipo complesso e le delezioni del 11q e 17p predice una più breve sopravvivenza e tempo al primo trattamento e rappresenta il più importante parametro prognostico per la progressione della malattia in pazienti non selezionati alla diagnosi⁽¹⁴⁾ e consente inoltre di identificare, fra i pazienti ad alto rischio citogenetico molecolare, quelli che presentano un maggior rischio di refrattarietà ai trattamenti chemioimmunoterapici.⁽⁶³⁾

L'analisi del cariotipo ha inoltre consentito di evidenziare traslocazioni cromosomiche in circa il 30% di tutti i casi di LLC.^(13, 105) Il 70% circa di queste traslocazioni è presente come singolo evento mentre i rimanenti casi presentano più di una traslocazione. Circa il 50-60 % sono traslocazioni bilanciate mentre la restante parte sono non bilanciate. In circa un terzo dei casi le traslocazioni sono presenti nell'ambito di un cariotipo complesso.⁽¹³⁾ I cromosomi più frequentemente coinvolti nelle traslocazioni sono 13q (13.9%), seguito da 14q (6.9%), 18q (5.5%), 17p (4.5%), 17q (3.8%), 2p (3.5%), 1p (3.4%), 5q (3.3%), e 11q (3.1%). A differenza dagli altri disordini linfoproliferativi B cellulari, nella LLC le traslocazioni bilanciate ricorrenti sono molto rare e sono rappresentate in circa il 2% dei casi dalla t(14;18)(q32;q21) che coinvolge il gene BCL2 tutti con IGHV mutato.^(13, 15) La presenza di traslocazioni si associa ad una significativa riduzione del tempo al primo trattamento e della sopravvivenza.⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾

Evoluzione clonale

La disponibilità di tecniche di analisi molecolare sempre più sofisticate e sensibili ha consentito di comprendere meglio lo scenario genetico molecolare della LLC. In particolare si è scoperto che nella LLC il tasso di mutazioni somatiche (circa 1 per megabase) è inferiore a quello presente nei tumori solidi o in altre neoplasie linfoidi quali il mieloma ed il linfoma diffuso a grandi cellule B, ma simile a quello di altri disordini leucemici.⁽¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾ Il numero di eventi totali non silenti per paziente è di circa 10-30 mentre il numero di CNA (*copy number aberrations*) è generalmente basso, con un range di 0-2 lesioni per paziente.^(8, 111)

Si è inoltre potuto dimostrare che, come nella maggior parte delle neoplasie, anche nella LLC vi è una notevole eterogeneità intratumorale, oltre che intertumoreale, con la popolazione di cellule neoplastiche che è costituita da una varietà di cloni con differenti anomalie genetiche. L'analisi delle frequenze di varianti alleliche ha inoltre consentito di distinguere mutazioni clonali o fondanti o *driver* che sono presenti sulla maggior parte delle cellule tumorali e che sono pertanto eventi precoci verosimilmente implicati nei meccanismi di trasformazione leucemica, accanto a mutazioni subclonali o

passenger che sono probabilmente acquisite nel tempo. Questi subcloni nel tempo possono evolvere in risposta a stimoli intrinseci, legati al microambiente nel quale le cellule neoplastiche sono presenti, o a stimoli estrinseci rappresentati principalmente dalla pressione selettiva esercitata dalla terapia.

La disponibilità di popolazioni pure di cellule tumorali nelle diverse fasi della malattia ha inoltre consentito di studiare e comprendere l'architettura clonale e lo sviluppo filogenetico della neoplasia nei diversi stadi di malattia. Si è compreso in particolare il contributo dell'eterogeneità genetica intratumorale alla evoluzione clonale ed il suo impatto sulla progressione clinica della malattia.

L'eterogeneità genetica intratumorale rappresenta il punto di partenza per quello che sarà il processo di evoluzione clonale inteso come l'accumulazione di modificazione genetiche ed epigenetiche che portano all'emergenza di nuovi subcloni cellulari.⁽¹¹²⁾ Secondo questa interpretazione, che ha le sue origini nella teoria dell'evoluzione darwiniana, il tumore evolve attraverso un processo di espansione, diversificazione e selezione clonale nell'ecosistema del tessuto tumorale.⁽¹¹³⁾ Lo studio longitudinale dei cambiamenti genetici della composizione clonale nel corso della progressione della LLC ha permesso pertanto di sviluppare un modello filogenetico ad albero dei vari stadi di malattia (Figura 2). Il tutto prenderebbe origine a livello di un elemento B maturo o di un progenitore emopoietico che si è dimostrato essere in grado di generare, in modelli murini di xenotrapianto, cellule B clonali con il fenotipo della LLC.⁽¹¹⁴⁾

Nell'uomo, la situazione pre-maligna della LLC è rappresentata dalla linfocitosi B monoclonale (MBL) che presenta un rischio di progressione in LLC pari a circa 1-2% all'anno. Al riguardo si è potuto recentemente dimostrare che nelle MBL ad alto conteggio linfocitario (> 500 linfociti per microlitro), eccetto che per le mutazioni di NOTCH1, TP53 e XPO1 che presentano una minore incidenza, le altre mutazioni hanno una eguale prevalenza suggerendo una origine precoce delle mutazioni driver in un continuum tra MBL e LLC. Inoltre, si è osservato che le MBL con mutazioni presentano un più breve tempo al primo trattamento e come una espansione subclonale delle mutazioni driver si associ ad un più breve tempo alla progressione in LLC. Nel complesso queste osservazioni indicano che l'evoluzione clonale ha rilevanza prognostica già nella fase pre-leucemica di MBL consentendo l'identificazione di quei pazienti che progrediranno in LLC.⁽¹¹⁵⁾

Il monitoraggio longitudinale della composizione subclonale ha inoltre permesso di evidenziare sostanzialmente due diversi tipi di modalità evolutive: una evoluzione di tipo lineare in cui il singolo clone acquisisce nel tempo ulteriori eventi *driver* che si aggiungono alle anomalie iniziali e una evoluzione di tipo ramificato (*branched*) nella quale coesistono due o più sottopopolazioni genetiche che evolvono in modo parallelo. Si è inoltre evidenziato come questi subcloni possano mantenere una proporzione relativamente costante nel tempo

(equilibrio clonale) mentre in altri casi vi può essere il prevalere di subcloni che risultano più competitivi.^(9, 18, 82)

Gli studi longitudinali hanno poi dimostrato come l'equilibrio e la competizione clonale rivestano grande rilevanza nell'evoluzione clonale che si può sviluppare in corso di trattamento. In assenza di terapia la composizione clonale si mantiene nel tempo relativamente stabile, mentre l'esposizione alla terapia può determinare una evoluzione caratterizzata dall'emergenza di subcloni cellulari più resistenti, spesso già rilevabili nella fase iniziale, che possono presentare anche una modificazione genetica.⁽¹¹⁶⁾ Questi subcloni preesistenti, presentando una minore sensibilità o una resistenza alla terapia, possono costituire, alla recidiva, i cloni predominanti o, in alternativa, dopo una iniziale riduzione bilanciata di tutti i subcloni, possono emergere in modo competitivo come cloni prevalenti in ragione di una loro maggiore efficienza proliferativa. Le mutazioni di TP53 rappresentano in tal senso le lesioni che in modo più consistente sono state associate a questa modalità di evoluzione clonale. Le mutazioni di TP53 conferiscono infatti resistenza ai più comuni regimi

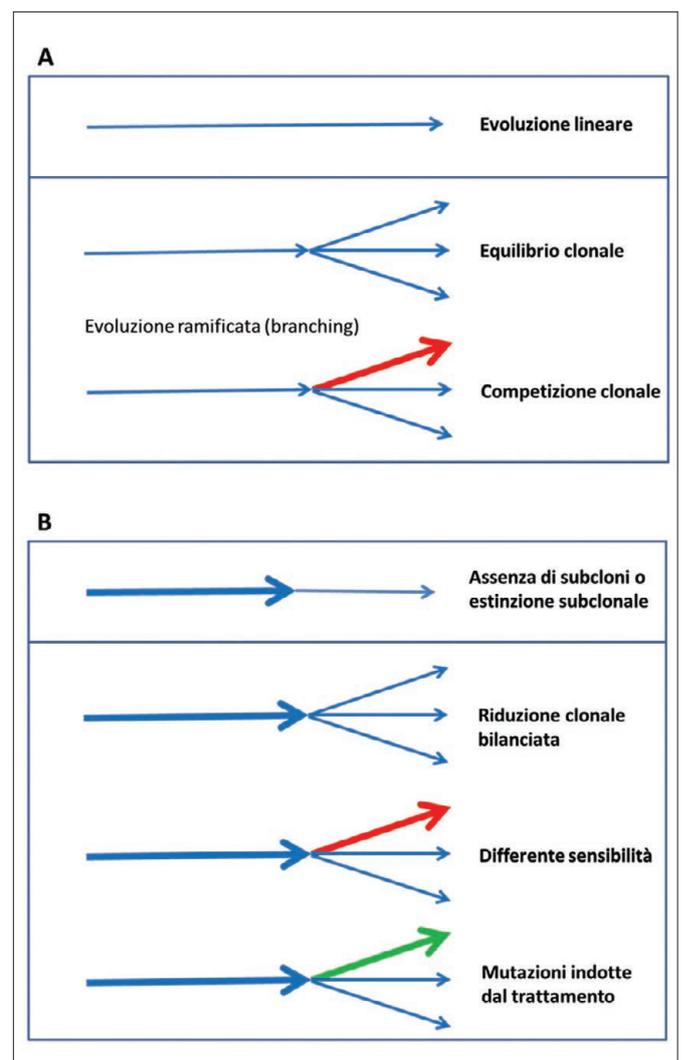


Figura 2 - Traiettorie evolutive dei cloni e subcloni in corso di LLC non trattata (A) e dopo trattamento (B).

di chemioimmunoterapia e spesso si associano, alla recidiva, ad alterazioni genomiche particolarmente complesse.^(9, 18, 82, 117)

La stessa terapia può però indurre la comparsa di mutazioni *de novo* che conferiscono ai nuovi subcloni un maggiore vantaggio proliferativo.⁽⁸²⁾ Quest'ultima evenienza è dimostrata dalla emergenza in corso di trattamento di cloni resistenti come nel caso di pazienti trattati con inibitori del *B cell receptor* quali l'ibrutinib, per la comparsa di mutazioni nella tirosin chinasi di Bruton (BTK) o il suo partner immediatamente a valle nella via di *signalling* la fosfolipasi C gamma 2 (PLCG2).⁽¹¹⁸⁻¹²¹⁾ Recentemente è emerso come la resistenza ad ibrutinib sia un fenomeno più complesso che si può estrinsecare in una fase più precoce (entro 15 mesi di trattamento) mediante l'emergenza di un linfoma aggressivo (sindrome di Richter) clonalmente correlato o non correlato alla LLC, o in una fase successiva (generalmente dopo 12-18 mesi di trattamento) attraverso l'acquisizione di mutazioni di BTK e/o di PLG2, o in una fase ancora più tardiva con la comparsa di mutazioni non coinvolgenti BTK e/o PLG2.⁽¹²²⁾

Epigenetica

Se è ben definito il ruolo che la diversità genetica intratumorale esplica nell'evoluzione clonale, solo in anni più recenti sono emerse evidenze che suggeriscono come anche la diversità epigenetica possa contribuire alla evoluzione tumorale.

È noto che nelle cellule neoplastiche le modificazioni epigenetiche possono contribuire alla deregolazione dell'espressione dei geni rappresentando quindi un evento chiave nella patogenesi tumorale.⁽¹²³⁾

Nella LLC numerosi geni risultano metilati in modo aberrante ed alcuni di questi rivestono un ruolo importante dal punto di vista clinico e biologico (DAPK1, ZAP70, TWIST2, HOXA4, SFRP4 e ID4).⁽¹²⁴⁻¹²⁹⁾ Lo stato di metilazione del DNA risulta inoltre essere stabile nel tempo e simile nei diversi compartimenti cellulari (sangue periferico e linfonodi) suggerendo come l'aberrante metilazione possa rappresentare un evento precoce nella patogenesi della leucemia. È stato inoltre osservato che pazienti IGHV mutati e non mutati hanno un diverso stato di metilazione per svariati geni tra cui alcuni noti per avere impatto prognostico (quali per esempio CLLU1, LPL, ZAP70 e NOTCH1), o altri implicati nella regolazione epigenetica (quali HDAC9, HDAC4 e DNMT3B), o nel *B-cell signaling* (IBTK) o nelle vie del TGF-beta e NF-κb/TNF.⁽¹³⁰⁾

Inoltre l'analisi del metiloma di pazienti affetti da LLC e della controparte cellulare normale ha mostrato come i due sottogruppi con IGHV mutato e non mutato presentino un distinto stato di metilazione che riflette quello della cellula putativa di origine (cellula B *naive* o cellula B memoria).⁽¹³¹⁾ Più recentemente si è infine osservato come in alcuni pazienti con LLC possa essere presente un elevato livello di eterogeneità intratumorale nello stato di metilazione e come questo correli con la presenza di lesioni genetiche ad alto rischio e con una prognosi peggiore.⁽¹³²⁻¹³³⁾

Nel complesso queste osservazioni suggeriscono che l'analisi del profilo epigenetico può aggiungere informazioni utili che integrate allo studio delle alterazioni genetiche consentono un più preciso inquadramento prognostico e possono aiutare nella gestione clinica dei pazienti.⁽⁸⁾

Ruolo della eterogeneità epigenetica nella evoluzione clonale

Recentemente è stato inoltre dimostrato che, sebbene la maggior parte delle LLC presenti una elevata stabilità della metilazione del DNA, esiste un subset di pazienti con un elevato livello di eterogeneità intratumorale di tipo epigenetico.⁽¹³³⁾ Questi pazienti hanno una malattia con caratteristiche biologiche associate ad una maggiore aggressività (IGHV non mutato, bassa metilazione di ZAP70), e una più precoce necessità di trattamento. L'incremento di eterogeneità nella metilazione è risultato inoltre correlato alla presenza di fattori prognostici sfavorevoli (IGHV non mutato, basso livello di metilazione di ZAP70 e mutazioni di TP53) e ad una maggiore complessità dell'architettura genetica di tipo subclonale piuttosto che clonale, suggerendo una possibile, anche se al momento ancora non ben compresa, connessione tra evoluzione genetica ed epigenetica.

Similmente è stato dimostrato come i pazienti con LLC presentino una elevata variabilità intratumorale della metilazione del DNA per effetto di una metilazione localmente disordinata, proprietà comune ai processi tumorali.⁽¹³²⁾ Questa disordinata metilazione si manifesta nelle cellule neoplastiche in modo stocastico e impatta sulla variabilità dell'espressione genica agevolando traiettorie di evoluzione neoplastica alternative tramite ad esempio l'attivazione di geni correlati alla biologia delle cellule staminali. Questa metilazione localmente disordinata, determinando una maggiore plasticità genetica, favorirebbe l'evoluzione tumorale attraverso la generazione di nuovi subcloni, l'incremento della diversità tumorale e il crearsi di una maggiore capacità adattativa delle cellule tumorali. A supporto di questa ipotesi vi è l'osservazione che la metilazione localmente disordinata si associa ad una prognosi più severa.⁽¹³²⁾

Conclusioni

L'evoluzione delle tecniche di sequenziamento ci ha consentito di studiare sempre meglio la complessità genetica ed epigenetica inter ed intratumorale della LLC. Si è potuto comprendere come questa eterogeneità non solo determini lo sviluppo e la progressione della malattia ma anche sia implicata nel fenomeno della resistenza ai trattamenti. In futuro tutte queste informazioni potranno consentirci di identificare, sulla base delle caratteristiche genetiche, i pazienti che meglio potranno beneficiare delle terapie disponibili, che includono non solo i classici trattamenti chemioimmunoterapici ma anche farmaci che hanno come bersaglio i meccanismi molecolari implicati nello sviluppo della malattia.

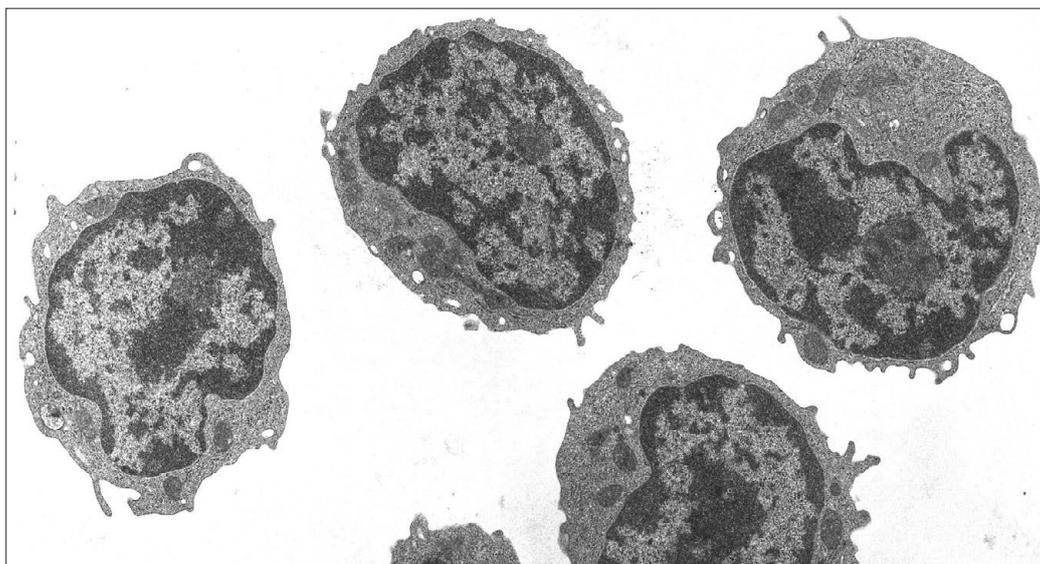
Bibliografia

1. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:16096.
2. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352(8):804-15.
3. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(1):37-50.
4. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. 2015;90(5):446-60.
5. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840-7.
6. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-6.
7. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*. 2014;28(1):108-17.
8. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(3):145-62.
9. Guièze R, Wu CJ. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;126(4):445-53.
10. Lazarian G, Guièze R, Wu CJ. Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):984-93.
11. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgHV status and immunophenotyping. *Leukemia*. 2007;21(12):2442-51.
12. Herling CD, Klaumünzer M, Rocha CK, Altmüller J, Thiele H, Bahlo J, et al. Complex karyotypes, KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil based chemo- or chemoimmunotherapy. *Blood*. 2016;128(3):395-404.
13. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol*. 2014;89(3):249-55.
14. Rigolin GM, del Giudice I, Formigaro L, Saccenti E, Martinelli S, Cavallari M, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biologic correlations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015;54(2):818-26.
15. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101-5.
16. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011;44(1):47-52.
17. Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(8):1403-12.
18. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015;526(7574):525-30.
19. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Rossi D, Minga E, Villamor N, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(2):329-36.
20. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, Gonzalez de Castro D, Gomez B, Forster J, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood*. 2013;121(3):468-75.
21. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Döhner K, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*. 2014;123(21):3247-54.
22. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, Eichhorst BF, Bergmann MA, Elter T, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;124(1):49-62.
23. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):779-90.
24. Austen B, Skowronska A, Baker C, Powell JE, Gardiner A, Oscier D, et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol*. 2007;25(34):5448-57.
25. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, Alder H, Rassenti LZ, Kipps TJ, et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood*. 2012;119(2):329-31.
26. Riches JC, O'Donovan CJ, Kingdon SJ, McClanahan F, Clear AJ, Neuberg DS, et al. Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells exhibit upregulation of integrin signaling that is modulated by NOTCH1 mutations. *Blood*. 2014;123(26):4101-10.
27. Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Blood*. 2013;122(23):3723-34.
28. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011;208(7):1389-401.
29. Fabbri G, Khiabani H, Holmes AB, Wang J, Messina M, Mullighan CG, et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J Exp Med*. 2013;210(11):2273-88.
30. Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M, Conde L, Martínez-Trillos A, Villamor N, et al. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2013;45(5):526-30.
31. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(26):2497-506.
32. Sutton LA, Young E, Baliakas P, Hadzidimitriou A, Moysiadi T, Plevova K, et al. Different spectra of recurrent gene mutations in subsets of chronic lymphocytic leukemia harboring stereotyped B-cell receptors. *Haematologica*. 2016;101(8):959-67.
33. Kalachikov S, Migliazza A, Cayanis E, Fracchiolla NS, Bonaldo MF, Lawton L, et al. Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics*. 1997;42(3):369-77.
34. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9.
35. Hammarsund M, Corcoran MM, Wilson W, Zhu C, Einhorn S, Sangfelt O, et al. Characterization of a novel B-CLL candidate gene--DLEU7--located in the 13q14 tumor suppressor locus. *FEBS Lett*. 2004;556(1-3):75-80.
36. Palamarchuk A, Efanov A, Nazaryan N, Santanam U, Alder H, Rassenti L, et al. 13q14 deletions in CLL involve cooperating tumor suppressors. *Blood*. 2010;115(19):3916-22.
37. Migliazza A, Bosch F, Komatsu H, Cayanis E, Martinotti S, Toniato E, et al. Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;97(7):2098-104.
38. Edelmann J, Holzmann K, Miller F, Winkler D, Bühler A, Zenz T, et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*. 2012;120(24):4783-94.
39. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2010;17(1):28-40.
40. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(39):13944-9.

41. Cutrona G, Matis S, Colombo M, Massucco C, Baio G, Valdora F, et al. Effects of miRNA-15 and miRNA-16 expression replacement in chronic lymphocytic leukemia: Implication for therapy. *Leukemia*. 2017 Feb 3. doi: 10.1038/leu.2016.394. [Epub ahead of print].
42. Ouillette P, Collins R, Shakhani S, Li J, Li C, Shedden K, Malek SN. The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2011;17(21):6778-90.
43. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, Marinelli M, Tavaloro S, Gabrielli S, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica*. 2012;97(3):437-41.
44. Strati P, Abruzzo LV, Wierda WG, O'Brien S, Ferrajoli A, Keating MJ. Second cancers and Richter transformation are the leading causes of death in patients with trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15(7):420-7.
45. Stankovic T, Skowronska A. The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(6):1227-39.
46. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do KA, et al. Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(31):4088-95.
47. Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(4):197-210.
48. Bullrich F, Rasio D, Kitada S, Starostik P, Kipps T, Keating M, et al. ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 1999;59(1):24-7.
49. Stankovic T, Weber P, Stewart G, Bedenham T, Murray J, Byrd PJ, et al. Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 1999;353(9146):26-9.
50. Austen B, Powell JE, Alvi A, Edwards I, Hooper L, Starczynski J, et al. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood*. 2005;106(9):3175-82.
51. Guarini A, Marinelli M, Tavaloro S, Bellacchio E, Magliozzi M, Chiaretti S, et al. ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica*. 2012;97(1):47-55.
52. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013;152(4):714-26.
53. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JJ, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015;526(7574):519-24.
54. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(12):2854-62.
55. Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, De Angeli C, Veronese A, Cavazzini F, et al. Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia*. 2004;18(3):476-83.
56. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(12):5413-7.
57. Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, et al. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*. 1994;84(9):3148-57.
58. Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansens K, Benner A, Cabot G, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995;85(6):1580-9.
59. Zenz T, Häbe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Bühler A, et al. 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*. 2009;114(13):2589-97.
60. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376(9747):1164-74.
61. Ouillette P, Fossus S, Parkin B, Ding L, Bockenstedt P, Al-Zoubi A, et al. Aggressive chronic lymphocytic leukemia with elevated genomic complexity is associated with multiple gene defects in the response to DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res*. 2010;16(3):835-47.
62. Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, Abruzzo LV, Van Dyke DL, O'Brien S, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood*. 2009;114(5):957-64.
63. Rigolin GM, Formigaro L, Cavallari M, Quaglia FM, Lista E, Urso A, et al. An extensive molecular cytogenetic characterization in high-risk chronic lymphocytic leukemia identifies karyotype aberrations and TP53 disruption as predictors of outcome and chemorefractoriness. *Oncotarget*. 2017: in press. doi: 10.18632/oncotarget.15883
64. Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*. 2008;112(8):3322-9.
65. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2009;23(1):117-24.
66. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood*. 2009;114(26):5307-14.
67. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res*. 2009;15(3):995-1004.
68. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(29):4473-9.
69. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(7):1458-61.
70. Rossi D, Khiabanian H, Spina V, Ciardullo C, Brusca G, Famà R, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(14):2139-47.
71. Guièze R, Robbe P, Clifford R, de Guibert S, Pereira B, Timbs A, et al. Presence of multiple recurrent mutations confers poor trial outcome of relapsed/refractory CLL. *Blood*. 2015;126(18):2110-7.
72. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, Kantorova B, Pavlova S, Tom N, et al. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(4):877-85.
73. Cuneo A, Cavazzini F, Ciccone M, Daghia G, Sofritti O, Saccenti E, et al. Modern treatment in chronic lymphocytic leukemia: impact on survival and efficacy in high-risk subgroups. *Cancer Med*. 2014;3(3):555-64.
74. Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, Rawluk J, Kreutz C, Martens UM, et al. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood*. 2007;109(3):1202-10.
75. Chapiro N, Leporrier N, Radford-Weiss I, Bastard C, Mossafa H, Leroux D, et al. 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*. 2010;34(1):63-8.
76. Brown JR, Hanna M, Tesar B, Werner L, Pochet N, Asara JM, et al. Integrative genomic analysis implicates gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2012;18(14):3791-802.
77. Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, et al. Cha-

- racterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*. 2005;106(9):3214-22.
78. O'Neil J, Grim J, Strack P, Rao S, Tibbitts D, Winter C, et al. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med*. 2007;204(8):1813-24.
 79. Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K, et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*. 2009;113(4):856-65.
 80. Pozzo F, Bittolo T, Arruga F, Bulian P, Macor P, Tissino E, et al. NOTCH1 mutations associate with low CD20 level in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a NOTCH1 mutation-driven epigenetic dysregulation. *Leukemia*. 2016;30(1):182-9.
 81. Cazzola M, Rossi M, Malcovati L; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative. Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. *Blood*. 2013;121(2):260-9.
 82. Landau DA, Carter SL, Getz G, Wu CJ. Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia*. 2014;28(1):34-43.
 83. Te Raa GD, Derks IA, Navrkalova V, Skowronska A, Moerland PD, van Laar J, et al. The impact of SF3B1 mutations in CLL on the DNA-damage response. *Leukemia*. 2015;29(5):1133-42.
 84. Wang L, Brooks AN, Fan J, Wan Y, Gambe R, Li S, et al. Transcriptomic Characterization of SF3B1 Mutation Reveals Its Pleiotropic Effects in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*. 2016;30(5):750-63.
 85. Ramsay AJ, Rodríguez D, Villamor N, Kwarcia A, Tejedor JR, Valcárcel J, et al. Frequent somatic mutations in components of the RNA processing machinery in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2013;27(7):1600-3.
 86. Rossi D, Brusca G, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118(26):6904-8.
 87. Rawlings DJ, Schwartz MA, Jackson SW, Meyer-Bahlburg A. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):282-94.
 88. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Rossi D, Sutton LA, Kminkova J, et al. Prognostic relevance of MYD88 mutations in CLL: the jury is still out. *Blood*. 2015;126(8):1043-4.
 89. Ngo V, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011;470(7332):115-9.
 90. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012;367(9):826-33.
 91. Speedy HE, Kinnersley B, Chubb D, Broderick P, Law PJ, Litchfield K, et al. Germline mutations in shelterin complex genes are associated with familial chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016 Aug 15. pii: blood-2016-01-695692. [Epub ahead of print]
 92. Mansouri L, Sutton LA, Ljungström V, Bondza S, Arngården L, Bhoi S, et al. Functional loss of IκBε leads to NF-κB deregulation in aggressive chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2015;212(6):833-43.
 93. Li S, Miao T, Sebastian M, Bhullar P, Ghaffari E, Liu M et al. The transcription factors Egr2 and Egr3 are essential for the control of inflammation and antigen-induced proliferation of B and T cells. *Immunity*. 2012;37(4):685-96.
 94. Young E, Noerenberg D, Mansouri L, Ljungström V, Frick M, Sutton LA, et al. EGR2 mutations define a new clinically aggressive subgroup of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017 Jan 3. doi: 10.1038/leu.2016.359. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27890934.
 95. Daftuar L, Zhu Y, Jacq X, Prives C. Ribosomal proteins RPL37, RPS15 and RPS20 regulate the Mdm2-p53-MdmX network. *PLoS One*. 2013;8(7):e68667.
 96. Ljungström V, Cortese D, Young E, Pandzic T, Mansouri L, Plevova K, et al. Whole-exome sequencing in relapsing chronic lymphocytic leukemia: clinical impact of recurrent RPS15 mutations. *Blood*. 2016;127(8):1007-16.
 97. Rigolin GM, Saccenti E, Bassi C, Lupini L, Quaglia FM, Cavallari M, et al. Extensive Next Generation Sequencing analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia at diagnosis: clinical and biological correlations. *J Hematol Oncol*. 2016;9(1):88.
 98. Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016;127(17):2122-30.
 99. Rasi S, Khiabani H, Ciardullo C, Terzi-di-Bergamo L, Monti S, Spina V, et al. Clinical impact of small subclones harboring NOTCH1, SF3B1 or BIRC3 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(4):e135-8.
 100. Sutton LA, Ljungström V, Mansouri L, Young E, Cortese D, Navrkalova V, et al. Targeted next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia: a high-throughput yet tailored approach will facilitate implementation in a clinical setting. *Haematologica*. 2015;100(3):370-6.
 101. Sutton LA, Rosenquist R. Not all subclones matter in CLL. *Blood*. 2016;127(17):2052-4.
 102. Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, Formigaro L, Rizzotto L, Tamisio E, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with "normal" FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood*. 2012;119(10):2310-3.
 103. Rigolin GM, Cavallari M, Quaglia FM, Formigaro R, Lista E, Urso A, et al. In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. *Blood*. 2017; in press
 104. Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG, Ferrajoli A, Stingo F, Smith SC, et al. 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*. 2015;121(20):3612-21.
 105. Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;107(2):742-51.
 106. Van Den Neste E, Robin V, Francart J, Hagemeyer A, Stul M, Vandenberghe P, et al. Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine. *Leukemia* 2007;21(8):1715-22.
 107. Cavazzini F, Hernandez JA, Gozzetti A, Russo Rossi A, De Angeli C, Tiseo R, et al. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol*. 2008;142(4):529-37.
 108. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2014;505(7484):495-501.
 109. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-58.
 110. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-21.
 111. Ouillette P, Collins R, Shakhani S, Li J, Peres E, Kujawski L, et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(11):3051-61.
 112. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-13.
 113. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20(2):246-59.
 114. Barrio S, Shanafelt TD, Ojha J, Chaffee KG, Secreto C, Kortüm KM, et al. Genomic characterization of high-count MBL cases indicates that early detection of driver mutations and subclonal expansion are predictors of adverse clinical outcome. *Leukemia*. 2017;31(1):170-6.
 115. Wang J, Khiabani H, Rossi D, Fabbri G, Gattei V, Forconi F, et al. Tumor evolutionary directed graphs and the history of chronic lymphocytic leukemia. *Elife*. 2014;3. doi: 10.7554/eLife.02869.
 116. Ouillette P, Saiya-Cork K, Seymour E, Li C, Shedden K, Malek SN. Clonal evolution, genomic drivers, and effects of therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2013;19(11):2893-904.
 117. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med*. 2014;370(24):2286-94.
 118. Jones D, Woyach JA, Zhao W, Caruthers S, Tu H, Coleman J, et al. PLCG2 C2

- domain mutations co-occur with BTK and PLCG2 resistance mutations in chronic lymphocytic leukemia undergoing ibrutinib treatment. *Leukemia*. 2017 Apr 3. doi: 10.1038/leu.2017.110. [Epub ahead of print].
119. Hamasy A, Wang Q, Blomberg KE, Mohammad DK, Yu L, Vihinen M, et al. Substitution scanning identifies a novel, catalytically active ibrutinib-resistant BTK cysteine 481 to threonine (C481T) variant. *Leukemia*. 2017;31(1):177-85.
 120. Burger JA, Landau DA, Taylor-Weiner A, Bozic I, Zhang H, Sarosiek K, et al. Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nat Commun*. 2016;7:11589.
 121. Ahn IE, Underbayev C, Albitar A, Herman SE, Tian X, Maric I, et al. Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2017;129(11):1469-79.
 122. Delgado J, Villamor N, López-Guillermo A, Campo E. Genetic evolution in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2016;29(1):67-78.
 123. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003;349(21):2042-54.
 124. Raval A, Lucas DM, Matkovic JJ, Bennett KL, Liyanarachchi S, Young DC et al. TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(17):3877-85.
 125. Corcoran M, Parker A, Orchard J, Davis Z, Wirtz M, Schmitz OJ et al. ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2005;90(8):1078-88.
 126. Raval A, Tanner SM, Byrd JC, Angerman EB, Perko JD, Chen SS et al. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2007;129(5):879-90.
 127. Strathdee G, Sim A, Parker A, Oscier D, Brown R. Promoter hypermethylation silences expression of the HoxA4 gene and correlates with IgVh mutational status in CLL. *Leukemia* 2006;20(7):1326-9.
 128. Liu TH, Raval A, Chen SS, Matkovic JJ, Byrd JC, Plass C. CpG island methylation and expression of the secreted frizzled-related protein gene family in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2006;66(2):653-8.
 129. Chen SS, Claus R, Lucas DM, Yu L, Qian J, Ruppert AS et al. Silencing of the inhibitor of DNA binding protein 4 (ID4) contributes to the pathogenesis of mouse and human CLL. *Blood*. 2011;117(3):862-71.
 130. Cahill N, Bergh AC, Kanduri M, Göransson-Kultima H, Mansouri L, Isaksson A, et al. 450K-array analysis of chronic lymphocytic leukemia cells reveals global DNA methylation to be relatively stable over time and similar in resting and proliferative compartments. *Leukemia*. 2013;27(1):150-8.
 131. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queirós AC, Navarro A, Clot G, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012;44(11):1236-42.
 132. Landau DA, Clement K, Ziller MJ, Boyle P, Fan J, Gu H, et al. Locally disordered methylation forms the basis of intratumor methylome variation in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2014;26(6):813-825.
 133. Oakes CC, Claus R, Gu L, Assenov Y, Hülllein J, Zucknick M, et al. Evolution of DNA methylation is linked to genetic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Discov*. 2014;4(3):348-61.



LLC-B: linfociti al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).

Parole Chiave

Leucemia linfatica cronica, evoluzione clonale, lesioni geniche.

Ringraziamenti

Si ringrazia la sezione AIL di Ferrara per il continuo e prezioso sostegno ai pazienti ed alle attività di ricerca.

Indirizzi per la corrispondenza

Gian Matteo Rigolin, Antonio Cuneo
 UO di Ematologia
 Azienda Ospedaliero Universitaria Arcispedale S. Anna
 Via Aldo Moro 8 44124 Cona, Ferrara
 Tel: +39 0532 239674
 Fax: +39 0532 236094
 E-mail: rglgmt@unife.it

Sindromi mielodisplastiche



Matteo G Della Porta, Marianna Rossi, Elisabetta Todisco,
Lucio Morabito, Chiara Milanesi, Elena Saba

Cancer Center - Humanitas Research Hospital & Humanitas University, Milano

Introduzione

Nell'ambito della classificazione WHO 2016 dei tumori dei tessuti ematopoietici e linfoidi, le sindromi mielodisplastiche (mielodisplasie, SMD) sono definite come disturbi clonali del compartimento staminale emopoietico, caratterizzate da citopenia, mielodisplasia midollare (che si evidenzia attraverso anomalie morfologiche a carico delle cellule emopoietiche), emopoiesi inefficace e aumentato rischio di progressione in leucemia mieloide acuta (LMA).⁽¹⁾ Il riscontro mielodisplasia non è limitato alle SMD ma può essere trovato anche in altre neoplasie mieloidi. L'esempio paradigmatico è l'anemia refrattaria con sideroblasti anulari associati a trombocitosi segnata (RARS-T), che ha sia le caratteristiche mielodisplastiche di RARS sia le caratteristiche mieloproliferative della trombocitemia essenziale.⁽²⁾ Ciò suggerisce che le caratteristiche mielodisplastiche di diverse neoplasie mieloidi possano riflettere una base genetica comune, e che queste lesioni genetiche contribuiscono alla determinazione clinica del fenotipo. In questo articolo, esamineremo i più recenti progressi nel processo di comprensione delle basi genetiche delle SMD e la loro rilevanza clinica.⁽²⁻⁶⁾

Ematopoiesi inefficace ed evoluzione leucemica

Una componente essenziale della definizione di SMD da parte della attuale classificazione WHO è la dimostrazione della natura clonale dell'emopoiesi mielodisplastica.^(1,7) Diversi approcci possono essere utilizzati per dimostrare l'esistenza di una popolazione di cellule emopoietiche clonale, la più diretta è l'uso di anomalie cromosomiche. Tuttavia, con tecniche di citogenetica convenzionale una anomalia cromosomica clonale è identificabile in meno della metà dei pazienti con SMD.⁽⁷⁾

In uno studio estremamente rilevante, Walter et al.⁽⁸⁾ hanno eseguito un sequenziamento completo del genoma per identificare mutazioni somatiche ricorrenti in campioni di midollo osseo di pazienti con LMA secondaria a SMD (in cui erano disponibili cel-

lule midollari nella fase cronica di malattia e nella fase leucemica acuta). Circa il 90% delle cellule del midollo osseo sono risultate clonali in questi pazienti, sia nella fase di SMD che di LMA. Questo studio formalmente ha dimostrato che quasi tutte le cellule delle linee cellulari mieloidi del midollo osseo (cioè, cellule eritroidi immature, precursori granulocitari/monocitari e megacariociti) sono derivate clonalmente da uno stesso progenitore nei pazienti SMD in qualsiasi fase della malattia (cioè fino dal momento della diagnosi) e non solo dopo la trasformazione in LMA. L'architettura clonale delle SMD è stata studiata elegantemente da Delhommeau et al.⁽⁹⁾ attraverso l'identificazione di mutazioni somatiche ricorrenti a carico del gene TET2. Le cellule CD34+ ottenute da pazienti SMD sono state frazionate in un compartimento di progenitori immaturi CD34+CD38- e uno di progenitori più maturi CD34+CD38+. Le mutazioni di TET2 sono state rilevate solo in una piccola frazione di cellule CD34+CD38-, ma erano presenti in una elevata percentuale di progenitori più maturi. Ciò suggerisce che la mutazione somatica del gene TET2 si è verificata inizialmente in una cellula CD34+CD38- ed è stata trasmessa successivamente alla progenie CD34+CD38+. Una simile architettura clonale è stata osservata anche nei pazienti con leucemia mielomonocitica cronica (LMMC).⁽¹⁰⁾

Il verificarsi in una cellula staminale ematopoietica immatura di una mutazione somatica che induce vantaggio proliferativo e minore propensione all'apoptosi porta alla formazione di un clone. Affinché questo clone diventi pienamente dominante a livello midollare, è necessario che le cellule staminali mutate abbiano ulteriori vantaggi.⁽⁴⁾ Una volta che il clone mielodisplastico è diventato completamente dominante nel midollo osseo, la malattia può o meno apparire clinicamente evidente.⁽⁴⁾ Ad esempio, una mutazione somatica del gene SF3B1 sembra essere in grado di causare un fenotipo clinico di per sé (SMD con sideroblasti ad anello),⁽²⁻⁵⁾ mentre una mutazione del gene TET2 può determinare ematopoiesi clonale senza manifestazioni ematologiche, suggerendo che potrebbero essere necessari altri geni mutanti che collaborino

nell'induzione di un fenotipo ematologico clinicamente evidente.^(2-5,9) L'emopoiesi mielodisplastica è caratterizzata da eccessiva apoptosi dei precursori ematopoietici, almeno nei pazienti con malattia a basso rischio.⁽⁴⁾ L'emopoiesi inefficace, cioè la morte intramidollare prematura di eritroblasti, granulociti/monociti e megacariociti, è responsabile della produzione difettosa di cellule ematiche mature e quindi di citopenia periferica.^(4,7) Questo modello di malattia quindi presume che la mutazione somatica, responsabile del guadagno di funzione a livello della cellula staminale, comporti una perdita di funzione a livello della maturazione dei progenitori emopoietici nel midollo.⁽⁴⁾ La mutazione di SF3B1 nelle SMD con sideroblasti ad anello rappresenta un esempio di guadagno di funzione a livello delle cellule staminali ematopoietiche combinato con perdita di funzione (eccessiva apoptosi delle cellule rosse immature) a livello dei precursori ematopoietici.^(2,3,5) Nella LMMC, la precoce dominanza clonale indotta da mutazioni del gene TET2 induce una differenziazione granulo-monocitica a spese della differenziazione in senso eritroide e megacariocitaria.⁽¹⁰⁾ Durante il corso naturale della malattia, i pazienti con SMD sono ad alto rischio di progredire in LMA.⁽⁷⁾ L'interpretazione più probabile di questa suscettibilità è che l'acquisizione di ulteriori mutazioni porti alla formazione di subcloni di cellule ematopoietiche caratterizzate da una ulteriore alterazione del processo di differenziazione e/o maturazione.⁽⁴⁾ La percentuale di queste cellule aumenta progressivamente nel tempo e si sviluppa clinicamente una LMA. Questo modello è stato dimostrato da Walter et al. nello studio sull'architettura clonale delle LMA secondarie a SMD.⁽⁸⁾ In ognuno dei 7 pazienti con SMD studiati, infatti, la progressione leucemica è stata caratterizzata dalla persistenza del clone mielodisplastico fondante e dall'emergenza di un subclone con nuove mutazioni somatiche. In questo modo, una LMA secondaria che si sviluppa da SMD non è monoclonale nel senso rigoroso del termine, ma piuttosto un mosaico di diversi cloni/genomi con diversi gruppi di mutazioni somatiche.⁽⁸⁾

Anomalie cromosomiche ricorrenti con rilevanza clinico prognostica

Le anomalie cromosomiche ricorrenti sono state molto importanti finora per la diagnosi e l'inquadramento prognostico delle SMD.⁽⁷⁾ Per quanto riguarda la diagnosi, il riscontro di una aberrazione citogenetica in un paziente con citopenia periferica e displasia del midollo osseo è un importante marcatore di proliferazione clonale. Al contrario, la diagnosi di SMD può essere difficile nei pazienti con un cariotipo normale o citogenetica non informativa.⁽⁷⁾

Anomalie cromosomiche ricorrenti vengono rilevate in circa la metà dei pazienti con SMD, e le più comuni includono del(5q), trisomia 8, del(20q), e monosomia 7.^(7,11) Si tratta probabilmente di eventi secondari derivanti dalla instabilità del genoma causata

dalla mutazione genetica fondante. L'eccezione alla regola finora nota è la del(5q) isolata, che caratterizza la 5q-sindrome: infatti, l'aploinsufficienza di RPS14 e miR-145, che mappano nella regione comune deleta, rappresenta la base fisiopatologica di questo sottotipo di SMD.⁽¹²⁻¹⁴⁾

Riguardo al significato prognostico delle anomalie cromosomiche ricorrenti, in un recente studio collaborativo per lo sviluppo dello score IPSS-*revised* (IPSS-R), sono stati rianalizzati database di istituzioni internazionali, per un totale di 7012 pazienti.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ Le anomalie citogenetiche ricorrenti sono state classificate in 5 sottogruppi prognostici che hanno dimostrato di avere una significativa rilevanza prognostica in termini di sopravvivenza e rischio di evoluzione in LMA.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ Questo sistema di stratificazione citogenetica è stato recentemente testato per prevedere il successo del trapianto allogenico nei pazienti con SMD. I pazienti con un cariotipo complesso o monosomico hanno mostrato un ridotta sopravvivenza dopo il trapianto.⁽¹⁸⁾ Questi studi suggeriscono che probabilmente le anomalie citogenetiche continueranno ad avere rilevanza clinica in SMD anche nell'epoca della medicina molecolare, possibilmente con ulteriore beneficio derivante dall'utilizzo di tecniche più sensibili del bandeggio G.

Mutazioni somatiche di geni candidati al sequenziamento dell'intero genoma tumorale

La nostra comprensione della base molecolare di SMD è migliorata drammaticamente negli ultimi 5-6 anni.⁽⁴⁾ La prima grande scoperta è stata l'identificazione delle mutazioni del gene TET2 nei pazienti con riarrangiamenti del cromosoma 4q24, regione dove è mappato il gene.⁽⁹⁾ Successivamente, Bejar et al. hanno utilizzato un approccio NGS per ricercare mutazioni ricorrenti in 111 geni rilevanti per il processo di tumorigenesi in una popolazione di 439 pazienti con SMD.⁽¹⁹⁾ Negli ultimi anni, studi di sequenziamento genomico hanno portato alla scoperta di mutazioni ricorrenti in geni implicati nello splicing dell'RNA e in altre vie metaboliche nei pazienti con SMD.^(2,3,5,6) Utilizzando metodi di sequenziamento ad alta sensibilità sono state identificate mutazioni somatiche nella maggior parte dei pazienti SMD sequenziati, con frequenza variabile tra 78% e 90% in diversi studi.⁽²⁻⁶⁾ Un elenco dei più comuni geni ricorrentemente mutati nei pazienti con SMD è riportato nella Tabella 1.

Mutazioni dello spliceosoma

Mutazioni nei geni coinvolti nel processo di splicing dell'RNA si trovano in oltre il 50% dei pazienti con SMD;⁽²⁻⁵⁾ si tratta in gran parte di mutazioni mutualmente esclusive e fondanti (il carico allelico è tipicamente compreso tra 40% e 50%, indicando un clone

dominante eterozigote per la mutazione).⁽²⁻⁵⁾ Le mutazioni nei geni più frequentemente coinvolti (SF3B1, SRSF2 e U2AF1), sono quasi tutte missense (non vi sono mutazioni nonsense o frameshift).⁽²⁻⁵⁾ Complessivamente, le evidenze disponibili suggeriscono che le mutazioni che interessano il processo di splicing dell'RNA possono creare nuove proteine isoforme che sono responsabili della induzione di dominanza clonale da parte delle cellule staminali mutate.⁽⁴⁾ Questa situazione biologica era difficilmente prevedibile poiché una mutazione dello spliceosoma era attesa indurre una pletera di anomalie cellulari non specifiche piuttosto che promuovere la proliferazione

clonale. Le differenti mutazioni dello spliceosoma sono associate a differenti fenotipi e risultati clinici diversi (Tabella 1).⁽²⁻⁵⁾

Le mutazioni somatiche del gene SF3B1 si trovano quasi esclusivamente nei pazienti con SMD con sideroblasti ad anello e questo chiaramente suggerisce a una relazione causale tra mutazione e formazione di sideroblasti.^(2,3) Inoltre, la stragrande maggioranza dei pazienti con mutazione di SF3B1 hanno una buona prognosi e un basso rischio di evoluzione leucemica.^(4,5) Le mutazioni del gene SRSF2 si trovano principalmente nei pazienti con displasia multilineare e/o eccesso di blasti e, a differenza delle mutazioni di SF3B1,

| Biological pathways and genes | Frequency, % | Timing of mutation acquisition | Relationship between mutant gene and clinical phenotype | Prognostic or predictive relevance of mutant gene |
|-------------------------------|--------------|--------------------------------|--|--|
| RNA splicing | | | | |
| SF3B1 | 15-30% | Founding mutation | Associated with ring sideroblasts phenotype | Good overall survival and low risk of leukemic evolution |
| SRSF2 | 10-20% | Founding mutation | Associated with RCMD or RAEB, co-mutated with TET2 in CMML | Poor overall survival and high risk of leukemic evolution |
| U2AF1 | <10% | Founding mutation | Associated with RCMD or RAEB | High risk of leukemic evolution |
| ZRSR2 | <10% | Founding mutation | Not defined | Not defined |
| DNA methylation | | | | |
| TET2 | 20-30% | Founding mutation | All MDS subtypes, high mutation frequency (50-60%) in CMML | No impact on overall survival, may predict response to hypomethylating agents |
| DNMT3A | 10% | Founding mutation | MDS subtypes, co-mutated with SF3B1 in RARS | Unfavorable clinical outcome |
| IDH1/IDH2 | 5% | Founding mutation | Associated with RCMD or RAEB | Unfavorable clinical outcome |
| Chromatin modification | | | | |
| ASXL1 | 15-20% | Subclonal mutation | Associated with RCMD or RAEB, high mutation frequency (40%) in CMML | Unfavorable clinical outcome |
| EZH2 | 5% | Subclonal mutation | Associated with RCMD or RAEB | Unfavorable clinical outcome |
| Transcription | | | | |
| RUNX1 | 10% | Subclonal mutation | Associated with RCMD or RAEB | Unfavorable clinical outcome |
| BCOR | 5% | Subclonal mutation | Associated with RCMD or RAEB | unfavorable clinical outcome |
| DNA repair control | | | | |
| TP53 | 5-10% | Subclonal mutation | Associated with advanced disease and complex karyotype, mutated in 20% of MDS with del(5q) | Poor overall survival and high risk of leukemic evolution; Predicts poor response to lenalidomide and poor survival after transplant |
| Cohesin | | | | |
| STAG2 | 5-10% | Subclonal mutation | Associated with RCMD or RAEB. | Unfavorable clinical outcome |
| RAS pathway | | | | |
| CBL | 5% | Subclonal mutation | Found in different MDS subtypes, associated with JMML in children | Not defined in MDS |
| NRAS/KRAS | 5% | Subclonal mutation | Found in different MDS subtypes, associated with JMML in children | Not defined in MDS |
| NF1 | 5% | Subclonal mutation | Found in different MDS subtypes, associated with JMML in children | Not defined in MDS |
| DNA replication | | | | |
| SETBP1 | 5% | Subclonal mutation | Found in 25% of patients with aCML and in advanced MDS | Poor overall survival and high risk of leukemic evolution |

Tabella 1 - Mutazioni genetiche ricorrenti nei pazienti con SMD

si associano ad un elevato rischio di evoluzione leucemica e ridotta sopravvivenza.⁽⁵⁾ Mutazioni di SRSF2 sono state rilevate in circa un quinto dei casi di LMA secondaria ad altra neoplasia mieloidale e nel 40-50% dei pazienti con LMMC, dove sono spesso associati a mutazioni TET2.⁽³⁾ Mutazioni di U2AF1 sono state riportate in vari sottotipi SMD, e sono ritenute predittive di un elevato rischio di evoluzione leucemica e breve sopravvivenza.^(3,5) L'osservazione che le mutazioni dello spliceosoma sono principalmente mutazioni fondanti associate a diversi fenotipi clinici, hanno portato a ipotizzare che essi possano dare luogo a cloni con predestinazione genetica diversa. Secondo questo modello, la mutazione fondante dovrebbe determinare la traiettoria di evoluzione del clone, eventualmente anche attraverso l'interazione con altre lesioni genetiche concomitanti.⁽⁴⁾

Mutazioni somatiche nei geni implicati nei meccanismi di regolazione epigenetica

In un recente articolo, Issa⁽²⁰⁾ descrive la differenziazione cellulare come un processo epigenetico che richiede regolazioni specifiche ed altamente complesse della metilazione del DNA e della struttura della cromatina. Una differenziazione cellulare disordinata è spesso associata alle SMD.⁽⁴⁾ Mutazioni somatiche nei geni che controllano la metilazione del DNA (TET2, DNMT3A e IDH1 / IDH2) o che regolano le modificazioni della cromatina (ASXL1 e EZH2), sono presenti frequentemente nei pazienti con SMD.⁽⁵⁾ Mutazioni somatiche del gene TET2 sono state descritte per la prima volta nei pazienti con neoplasie mieloidi nel 2009.⁽⁹⁾ TET2 è mutato nel 20 - 25% di pazienti con SMD e nel 50 - 60% dei pazienti con LMMC.^(5,9,10) In uno studio molto elegante, Busque et al. hanno identificato mutazioni ricorrenti nel gene TET2 in donne anziane con emocromo normale in cui era stata dimostrata la presenza di ematopoiesi clonale.⁽²¹⁾ Questa osservazione ci porta a considerare la mutazione di TET2 come un evento in grado di indurre un vantaggio proliferativo (ematopoiesi clonale) da parte delle cellule staminali mutate, ma non un fenotipo specifico di malattia ematologica.^(4,21) Le mutazioni TET2 sono spesso riscontrate in pazienti con cariotipo normale e quindi rappresentano un indicatore utile della clonalità dell'emopoiesi in questi soggetti.⁽⁵⁾ Inoltre, la co-occorrenza della mutazione di TET2 e SRSF2 è tipicamente presente nei pazienti con LMMC.⁽¹⁰⁾ Finora, non è stata dimostrata nessuna correlazione conclusiva tra presenza della mutazione di TET2 e una prognosi definita,⁽⁵⁾ e tuttavia studi recenti suggeriscono che la mutazione di TET2 può essere associata ad elevata probabilità di risposta al trattamento con farmaci ipometilanti.⁽²²⁾

In uno studio basato su sequenziamento NGS, Ley et al.⁽²³⁾ hanno osservato che mutazioni del gene DNMT3A sono altamente ricorrenti in pazienti con LMA *de novo* e associate a cattiva prognosi. Mutazioni somatiche di DNMT3A sono state successivamente ri-

levate in circa il 10-15% dei pazienti con SMD.^(5,19) Sono associate a ridotta sopravvivenza e rapida progressione in LMA nei pazienti con RCMD o RAEB ma non in quelli con RARS, probabilmente perché la co-occorrenza della mutazione di SF3B1 mitiga l'effetto negativo di DNMT3A.⁽⁵⁾ Questa osservazione può indicare che l'effetto delle mutazioni di geni specifici può essere differente in contesti genomici diversi. Mutazioni ricorrenti nei geni IDH1 e IDH2 (che codificano per le isocitrato deidrogenasi 1 e 2, rispettivamente) si trovano nei pazienti con LMA e SMD.^(5,19) Nelle LMA, la co-occorrenza delle mutazioni dei geni NPM1 e IDH1/IDH2 è associata a buona prognosi; al contrario, la mutazione IDH1 è stata trovata associata a una ridotta sopravvivenza libera dalla leucemia nelle SMD.⁽⁵⁾

Due geni coinvolti nelle modificazioni e regolazione della cromatina sono ricorrentemente mutati nelle SMD: ASXL1 (*Additional Sex Combs Like 1*) e EZH2.^(5,19) Le mutazioni di ASXL1 sono comuni non solo nelle SMD, ma anche nei pazienti con LMA, LMMC e mielofibrosi primaria e sono generalmente associate a ridotta sopravvivenza in tutti questi contesti clinici.⁽⁴⁻⁶⁾ Analogamente, le mutazioni di EZH2 sono risultate associate a prognosi sfavorevole nei pazienti con SMD a basso rischio.^(5,24)

Mutazioni somatiche in altre vie cellulari

Sono state descritte mutazioni acquisite in fattori di trascrizione nelle SMD.^(5,6,19,24) Ad esempio, mutazioni somatiche del gene RUNX1 si trovano in circa il 7-10% di tutti i pazienti con SMD e sono generalmente associate a malattie avanzate, trombocitopenia severa, e ridotta sopravvivenza.^(5,19,24) Il gene TP53, situato sul cromosoma 17p13.1, codifica per la proteina p53 che regola il ciclo cellulare e il processo di trascrizione di geni coinvolti nei meccanismi di *tumor suppression*.⁽⁴⁾ Mutazioni di TP53 si trovano in circa il 5-10% dei pazienti con SMD, principalmente nei soggetti con malattia avanzata, cariotipo complesso, e anomalie del cromosoma 17, o delezioni del cromosoma 5 e 7.^(5,19) I pazienti con mutazione del gene TP53 hanno una prognosi sfavorevole, una scarsa probabilità di risposta a trattamenti convenzionali e un elevato rischio di evoluzione leucemica.^(4,5) Nei pazienti con SMD del(5q), subcloni con mutazione di TP53 possono essere presenti sin dalle prime fasi di malattia, e la loro presenza è associata ad una ridotta probabilità di risposta al trattamento con lenalidomide e ad un aumento del rischio di progressione leucemica.⁽²⁵⁾ Inoltre, in pazienti con SMD sottoposti a trapianto, le mutazioni di TP53 sono risultate associate ad elevato rischio di recidiva dopo la procedura.⁽²⁶⁾

Mutazioni in diversi geni coinvolti nel pathway di RAS (come NRAS, KRAS, NF1, PTPN11 e CBL) sono state descritte nei pazienti con SMD^(4,5,19) e sono presenti in circa il 90% dei pazienti di LMMC giovanile. La coesina è una struttura ad anello di 4 su-

bunità molto conservata che circonda i cromatidi durante il processo di metafase favorendo la loro coesione, e svolge in aggiunta ruoli critici nella regolazione trascrizionale e nei processi di riparazione del DNA. ⁽⁴⁾ Mutazioni somatiche di STAG2, un gene del complesso della coesina, sono stati trovati in circa il 5-6% dei pazienti con SMD. ^(4,5,19) In un recente lavoro, Kon et al hanno rilevato mutazioni che coinvolgono diversi geni del complesso della coesina (STAG2, RAD21, SMC1A e SMC3) nell'8% dei pazienti con SMD, nel 10% di quelli con LMMC e nel 12% di quelli con LMA, suggerendo che alterazioni del complesso della coesina possono svolgere un ruolo patogenetico nel processo di leucemogenesi nelle neoplasie mieloidi. ⁽²⁷⁾

Rilevanza clinica delle mutazioni genetiche

Le coorti di pazienti con SMD studiate finora per l'identificazione di geni ricorrentemente mutati sono molto eterogenee e fondamentalmente retrospettive. ^(4,5,19,24) Tenuto conto di queste limitazioni, solo un numero limitato di geni (SF3B1, TET2, SRSF2, ASXL1, DNMT3A e RUNX1) sono mutati in >10% dei pazienti con SMD, mentre un numero ulteriore di circa 40-50 geni sono mutati in <5% dei pazienti. ^(4,5) Alla diagnosi, la maggior parte dei pazienti con SMD ha 2 o 3 mutazioni oncogeniche e centinaia di mutazioni passengers. Considerando le frequenze alleliche, le mutazioni di geni implicati nello splicing RNA e nella metilazione del DNA, sembrano essere principalmente associati alla proliferazione clonale iniziale. ⁽⁵⁾ Comunque l'ordine temporale di acquisizione delle mutazioni non è fisso e varia da soggetto a soggetto. ^(4,5) L'attuale approccio diagnostico in un paziente con sospetta SMD comprende l'osservazione morfologica del sangue periferico e del midollo osseo per valutare la presenza di anomalie morfologiche suggestive, la biopsia ossea per valutare la cellularità emopoietica e l'eventuale presenza di fibrosi e la citogenetica per identificare anomalie cromosomiche clonali nelle cellule emopoietiche. ⁽⁷⁾ Le tecniche di sequenziamento NGS sono destinate a migliorare drammaticamente il nostro approccio alla diagnosi di SMD. ^(4,7) Anche se il sequenziamento del genoma è chiaramente più informativo, il sequenziamento di un pannello di geni mieloidi selezionati è sicuramente più fattibile in un laboratorio clinico, e consentirà verosimilmente di individuare una mutazione oncogenica in circa l'80-90% dei pazienti, migliorando sensibilmente la sensibilità del processo diagnostico in questo contesto clinico. ⁽⁴⁾ L'implementazione clinica della ricerca di mutazioni genetiche ricorrenti è attesa in aggiunta e può avere un impatto positivo nella stratificazione prognostica dei pazienti con SMD. ^(4,5) L'attuale classificazione WHO delle SMD ha una importante rilevanza prognostica, ed in particolare le presenza di displasia multilineare e una elevata percentuale di blasti midollari sono associate ad un elevato rischio di evoluzione leucemica. ^(1,7) Tuttavia, la riproducibilità della

valutazione morfologica della displasia midollare e del conteggio di blasti sono tutt'altro che ottimali, e vi è quindi necessità di sviluppare sistemi prognostici più robusti. L'IPSS-R rappresenta chiaramente un passo in avanti in questo senso, ma prende in considerazione solo le anomalie cromosomiche, che rappresentano nella maggior parte dei casi eventi genetici secondari, e soprattutto sono presenti solo in meno della metà dei pazienti. ⁽¹⁷⁾ La definizione di mutazioni oncogeniche potrebbe migliorare notevolmente il processo di stratificazione prognostica dei pazienti con SMD, e più in generale il processo clinico-decisionale in questo campo. ^(4,5) In primo luogo, l'identificazione del gene mutante responsabile del clone iniziale è rilevante ai fini clinici. Per esempio, i sideroblasti ad anello possono essere trovati non solo in pazienti con una mutazione di SF3B1, ma anche in quelli con una lesione oncogenica di SRSF2: infatti, la sopravvivenza libera da leucemia è di 10 anni nel primo caso e di 2 anni nel secondo caso. ^(4,5) In secondo luogo, l'individuazione di mutazioni associate a piccoli cloni può consentire una diagnosi precoce della progressione di malattia e dell'evoluzione in LMA. ^(4,5) Alcuni studi hanno già suggerito che l'incorporazione di mutazioni somatiche nei sistemi prognostici attualmente in uso (IPSS, IPSS-R) possono migliorare la stratificazione prognostica delle SMD. ⁽¹⁷⁾ L'*International Working Group for Prognosis in SMD (IWG-PM)* ha avviato un progetto di ricerca mirato a sviluppare un sistema di punteggio prognostico (IPSS-Mol) che include parametri clinici, ematologici e molecolari. Evidenze preliminari suggeriscono tuttavia che parametri prognostici tradizionali come il livello dell'emoglobina, il conteggio dei blasti midollari, e le anomalie citogenetiche ad alto rischio continueranno a mantenere un forte valore prognostico indipendente. ⁽⁴⁾ Infine, la caratterizzazione del genoma del paziente può essere rilevante per la scelta del trattamento. Le mutazioni TET2 potrebbero essere associate a una maggiore probabilità di risposta ad agenti ipometilanti, ⁽²²⁾ mentre le mutazioni di TP53 sono associate a ridotta probabilità di risposta a lenalidomide nei pazienti con del(5q) ⁽²⁵⁾ e ridotta sopravvivenza dopo trapianto allogenico. ⁽²⁶⁾ Dati recenti mostrano che la presenza di mutazioni di SF3B1 conferisce elevata probabilità di risposta a farmaci inibitori di TGFβ per il trattamento dell'anemia. In ultima analisi, l'identificazione delle mutazioni oncogeniche nel singolo paziente con SMD costituirà la base nei prossimi anni per lo sviluppo e l'implementazione clinica di programmi di medicina personalizzata, che sono attesi avere un impatto rilevante nel miglioramento della qualità e dell'aspettativa di vita dei pazienti.

Conclusioni

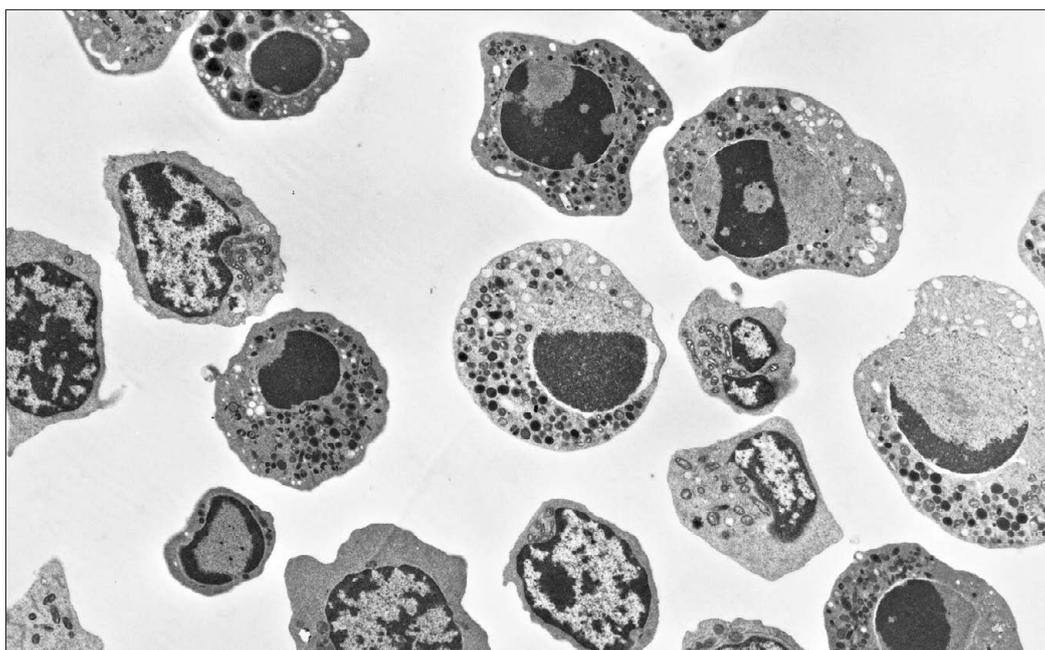
Le basi molecolari delle sindromi mielodisplastiche (SMD) sono state recentemente chiarite grazie a studi di sequenziamento con tecniche di nuova generazione (*next-generation sequencing*, NGS). Circa il 90% dei pazienti con SMD presenta una o più mutazioni

oncogeniche, e due terzi di essi si trovano negli individui con cariotipo normale. Le mutazioni sono a carico di geni coinvolti nello splicing dell'RNA (SF3B1, SRSF2, U2AF1 e ZRSR2), nella metilazione del DNA (TET2, DNMT3A e IDH1/2), nelle modificazioni della cromatina (ASXL1 e EZH2), nella regolazione della trascrizione (RUNX1), nella riparazione del DNA (TP53), nella trasduzione del segnale (CBL, NRAS e KRAS) e nel complesso della coesina (STAG2). Solo pochi geni sono mutati in oltre il 10% dei pazienti con SMD, mentre una lunga coda di circa 50 geni sono mutati meno frequentemente. Alla diagnosi clinica, la maggior parte dei pazienti ha tipicamente 2 o 3 muta-

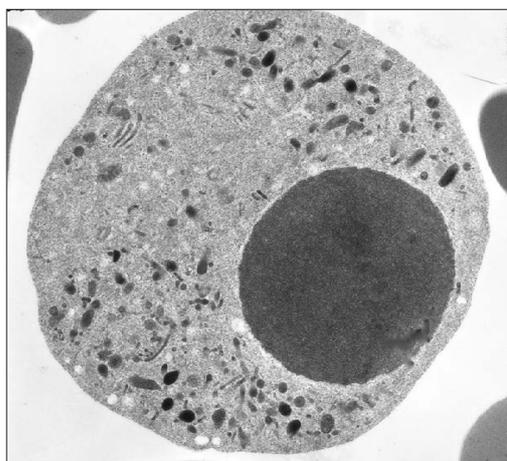
zioni oncogeniche *driver* e centinaia di mutazioni *passengers*. Esempi di associazioni genotipo/fenotipo includono l'associazione delle mutazioni del gene SF3B1 con un quadro clinico di anemia refrattaria con sideroblasti ad anello e la co-mutazione dei geni TET2 / SRSF2 con un quadro clinico di leucemia mielomonocitica cronica. Recenti evidenze indicano che le mutazioni somatiche hanno un valore prognostico sulla sopravvivenza e il rischio di evoluzione leucemica. Ci si attende pertanto che l'introduzione nella pratica clinica di parametri molecolari possa migliorare nel prossimo futuro il processo clinico decisionale a livello del singolo paziente.

Bibliografia

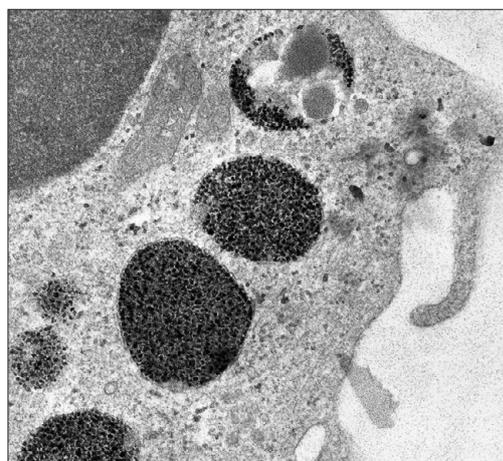
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-40
- Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulton J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365(15):1384-1395.
- Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-69.
- Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood*. 2013;122(25):4021-4034.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2013;122(22):3616-3627.
- Gerstung M, Pellagatti A, Malcovati L, Giagounidis A, Della Porta MG, Jädersten M, et al. Combining gene mutation with gene expression data improves outcome prediction in myelodysplastic syndromes. *Nat Commun*. 2015;6(11):5901.
- Malcovati L, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, Adès L, Cermak J, Del Cañizo C et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood* 2013;122(17):2943-2964.
- Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1090-1098.
- Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289-2301.
- Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Morabito M, Preudhomme C, Berthon C et al. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood*. 2013;121(12):2186-2198.
- Ades L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. *Lancet* 2014;383(9936):2239-2252.
- Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008;451(7176):335-339.
- Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med*. 2010;16(1):49-58.
- Barlow JL, Drynan LF, Hewett DR, Holmes LR, Lorenzo-Abalde S, Lane AL et al. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med*. 2010;16(1):59-66.
- Schanz J, Tüchler H, Sole F, Mallo M, Luño E, Cervera J et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):820-829.
- Della Porta MG, Tüchler H, Malcovati L, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G et al. Validation of WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS) for myelodysplastic syndromes and comparison with the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). A study of the International Working Group for Prognosis in Myelodysplasia (IWG-PM). *Leukemia*. 2015;29(7):1502-13.
- Greenberg PL, Tüchler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-2465.
- Della Porta MG, Alessandrino EP, Bacigalupo A, van Lint MT, Malcovati L, Pascutto C et al. Predictive factors for the outcome of allogeneic transplantation in patients with MDS stratified according to the revised IPSS-R. *Blood*. 2014;123(15):2333-42.
- Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496-2506.
- Issa JP. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. *Blood*. 2013;121(12):3811-3817.
- Busque L, Patel JP, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Provost S, Hamilou Z et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet*. 2012;44(11):1179-1181.
- Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, Mansat-De Mas V, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O et al; Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM). Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2011;25(7):1147-1152.
- Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;363(25):2424-2433.
- Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, Abdel-Wahab O, Steensma DP, Galili N et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2012;30(27):3376-3382.
- Jädersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Göhring G, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1971-1979.
- Della Porta MG, Galli A, Bacigalupo A, Zibellini S, Bernardi M, Rizzo E et al. Clinical effects of driver somatic mutations on the outcomes of patients with myelodysplastic syndromes treated with allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2016 Sep 6. pii: JCO673616. [Epub ahead of print]
- Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, et al. Recurrent mutations in multiple components of the cohesion complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet*. 2013;45(10):1232-1237.



SMD: cellule midollari in apoptosi al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).



SMD: cellula midollare con picnosi nucleare al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).



SMD: accumulo di ferritina post-trasfusionale al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).

Parole Chiave

Sindromi mielodisplastiche, mutazioni geniche, prognosi

Indirizzi per la corrispondenza

Matteo G Della Porta
Cancer Center - Humanitas Research Hospital & Humanitas
University, Milano
Tel: +39 02 8224 7668
Fax: +39 02 8224 4592
E-mail: matteo.della_porta@hunimed.eu

Mieloma multiplo



Carolina Terragna

Istituto di Ematologia "L.A.Seràgnoli", Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale, DIMES, Università degli Studi di Bologna

Introduzione

Il mieloma multiplo (MM) è una malattia linfoproliferativa del lineage B, caratterizzata dall'accumulo di plasmacellule aberranti nel midollo osseo. Il mieloma conclamato è preceduto da uno stadio pre-neoplastico, la gammopatia monoclonale di significato incerto (MGUS) e da uno stadio di malattia indolente, il mieloma *smouldering* (SMM). La fase terminale della malattia è caratterizzata dalla perdita dell'*homing* del clone di plasmacellule neoplastiche: queste iniziano a migrare dal midollo al sangue periferico, dove si possono riscontrare in percentuali molto superiori alla media fisiologica. I diversi stadi della progressione del MM sono identificati da una serie di parametri precisi, che complessivamente descrivono il quadro clinico del paziente: percentuale di plasmacellule nel midollo, presenza di lesioni osteolitiche, rapporto fra le catene leggere dell'immunoglobulina, sintomatologia clinica. L'idea che il MM sia una malattia monoclonale è stata completamente rivisitata in questi ultimi anni, alla luce dei risultati ottenuti dall'impiego delle tecnologie ad alta risoluzione per lo studio genetico e genomico della plasmacellula neoplastica, che hanno rivelato la natura policlonale di questa malattia. Oggi sappiamo che il clone di mieloma è geneticamente e fenotipicamente eterogeneo, e dal punto di vista genomico possiamo dire che virtualmente non esiste un paziente uguale all'altro. La biologia del mieloma resta tuttavia caratterizzata dalla de-regolazione di alcuni *pathway* fondamentali della plasmacellula, in maniera trasversale e indipendente dal background genomico. Questo rappresenta il presupposto del successo delle terapie di ultima generazione, che colpiscono la biologia normale della plasmacellula neoplastica, provocando una importante citotossicità, che si traduce nell'ottenimento di risposte cliniche di buona qualità nella maggior parte dei pazienti⁽¹⁾. Nonostante i successi della terapia di ultima generazione, tuttavia il mieloma ha un andamento clinico tipicamente altalenante, caratterizzato da fasi di risposta alla terapia, cui si alternano fasi di ripresa di malattia, con tempi liberi da progressione progressivamente sempre più brevi e ricadute sempre più aggressive, fino ad una fase terminale di totale refrattarietà e chemioresistenza del clone neoplastico, che porta

al decesso del paziente. Questa dinamica di progressione del MM segue una logica di tipo evolutivo, come è stato ampiamente descritto anche per i tumori solidi e per altre patologie ematologiche: l'eterogeneità genetica e fenotipica del clone di plasmacellule rappresenta la risorsa più potente per la sopravvivenza del clone stesso, che - sotto la pressione selettiva di forze esogene - tende a modificarsi e adattarsi all'ambiente che cambia, selezionando cloni in grado di sopravvivere anche in condizioni ostili (ad esempio in presenza di farmaci) e a espandersi nuovamente. Alla luce di queste premesse, lo scopo di questa *review* è descrivere come le più recenti acquisizioni sulla genetica delle plasmacellule di mieloma siano state interpretate nell'ottica della teoria dell'evoluzione clonale dei tumori, con l'obiettivo finale di fornire un razionale per la traslazione in clinica di queste informazioni biologiche. La comprensione di queste dinamiche è, infatti, diventata oggi cruciale per la definizione di nuovi schemi di terapia del mieloma, il cui obiettivo potrebbe essere quello di adattarsi alla logica evolutiva del clone neoplastico.

Progressione da MGUS a MM

La maggior parte dei tumori è preceduta da una fase pre-neoplastica molto più comune nella popolazione del tumore stesso. Anche il MM è sempre preceduto da una fase pre-neoplastica molto ben definita, la MGUS e il SMM^(2,3): virtualmente in tutti i pazienti, un piccolo clone pre-neoplastico è rilevabile nel siero mediante elettroforesi delle proteine prima della progressione a mieloma sintomatico; non tutte le MGUS però progrediscono a MM, suggerendo che, nonostante vi sia una chiara sequenza temporale di eventi che portano alla progressione da fase pre-neoplastica a fase neoplastica, diversi elementi, non sempre prevedibili né comuni a tutti i pazienti, contribuiscono al processo evolutivo del mieloma. Generalmente si dice che il processo di trasformazione neoplastica del MM prevede una serie di passaggi successivi di modificazione del clone, che trasformano una situazione per lo più indolente, in una situazione francamente patologica. Diversi fattori controllano questa progressione tumorale: vi possono essere fattori intrinseci (determinati dalla biologia del tu-

more), oppure estrinseci (dipendenti ad esempio dal microambiente), che in momenti e con modalità diverse possono condizionare l'espansione del clone neoplastico. La definizione dei tre diversi stadi di progressione del MM è stata validata e si basa su diversi fattori, come la presenza di un disordine clonale della plasmacellula, la presenza o assenza di danno d'organo, la presenza di determinati livelli di proteina monoclonale sierica e di plasmacellule nello striscio di midollo osseo⁽⁴⁾. Questi criteri hanno consentito di identificare coorti di pazienti a diverso rischio di progressione a mieloma sintomatico (1% all'anno per la MGUS e 10% all'anno per il SMM) e quindi armonizzare tra loro i risultati della ricerca clinica^(5,6). In generale, le fasi pre-neoplastiche di un tumore sono generalmente difficili da studiare e i primi passaggi della progressione tumorale non sono quasi mai direttamente analizzabili. Per questo motivo, la progressione da MGUS a MM rappresenta un modello molto importante per lo studio degli aspetti di base della patogenesi tumorale, poiché ci consente di inferire la sequenza temporale degli eventi che si susseguono nel processo patogenetico del MM.

Eterogeneità genetica

Il MM è una patologia eterogenea sotto diversi punti di vista. Clinicamente, la sintomatologia (presenza o meno di fratture ossee, anemia, danno renale, localizzazioni extramidollari) e il decorso clinico (rapida evoluzione e refrattarietà della malattia, sopravvivenza a lungo termine, cura) possono essere molto diversi da paziente a paziente. Questo è verosimilmente il riflesso di una biologia che, a dispetto di un quadro fenotipico e morfologico relativamente omogeneo, è caratterizzata - a livello genomico - da una eterogeneità tale da porre il MM in una posizione intermedia nel panorama delle neoplasie umane, compresa tra i tumori solidi e le patologie ematologiche più semplici (come le emopatie mieloidi).

Fino a circa 15 anni fa, l'eterogeneità genetica del mieloma - descritta attraverso tecnologie a bassa risoluzione, come la citogenetica convenzionale e la FISH - veniva attribuita soltanto alla presenza di alcune alterazioni genomiche numeriche e strutturali ricorrenti, come la delezione del cromosoma 13 (del13), l'iperdiploidia dei cromosomi dispari, la delezione del cromosoma 17 (del17p), le traslocazioni del cromosoma 14 con partner cromosomici ricorrenti, come il cromosoma 4, l'11, il 16. L'impiego di tecnologie di analisi del genoma progressivamente più complesse e ad alta risoluzione, come lo studio del profilo di espressione genica (GEP), gli *SNPs array* e il *Next Generation Sequencing* (NGS), ha arricchito il quadro con informazioni sempre più dettagliate, che oggi possono essere utilizzate per classificare i pazienti in categorie ben definite⁽⁷⁾.

In generale le alterazioni citogenetiche sono di due tipi: primarie e secondarie. La classificazione dei pazienti si fa in base alle alterazioni primarie, ovvero quelle che si verificano nelle fasi iniziali della patogenesi del mieloma e che hanno un ruolo patogenetico. In base alla

presenza di queste alterazioni, i pazienti si stratificano in categorie ben distinte tra loro. Le alterazioni citogenetiche secondarie possono verificarsi in qualunque sottogruppo di pazienti e hanno un significato prognostico preciso; a differenza delle alterazioni primarie, non sono mutualmente esclusive e diverse alterazioni secondarie possono trovarsi nello stesso paziente.

Le alterazioni primarie sono essenzialmente di due tipi: le trisomie dei cromosomi dispari e le traslocazioni coinvolgenti il locus della catena pesante delle immunoglobuline (IgH); le traslocazioni più frequenti sono la t(11;14), la t(4;14), la t(6;14), la t(14,16) e la t(14,20). Queste traslocazioni tipicamente non producono un gene di fusione, ma hanno come risultato quello di portare un oncogene (localizzato sul cromosoma partner) sotto il controllo dell'*enhancer* delle immunoglobuline (localizzato sul cromosoma 14q32), causando la de-regolazione trascrizionale. Gli oncogeni coinvolti sono *CCND1* sul cromosoma 11q13, *FGFR3* e *WHSC1* sul cromosoma 4p16, *CCND3* sul cromosoma 6p21, *c-MAF* sul cromosoma 16q23 e *MAF-B* sul cromosoma 20q11. Raramente, l'iperdiploidia e la presenza di una traslocazione si riscontrano insieme; tipicamente questi due eventi non occorrono contemporaneamente. È possibile che nei pochissimi pazienti in cui non si riscontrano iperdiploidie o traslocazioni del locus IgH, siano presenti traslocazioni rare (non rilevabili per ragioni tecniche) oppure traslocazioni coinvolgenti il locus della catena leggera delle immunoglobuline.

Le alterazioni secondarie sono prevalentemente numeriche. La più frequente è la delezione/monosomia del cromosoma 13, del(13q): si riscontra in circa il 50% dei pazienti alla diagnosi e probabilmente è un evento precoce nella patogenesi del mieloma. Una delezione non molto frequente alla diagnosi (si osserva in circa il 10% dei pazienti di nuova diagnosi), ma la cui presenza è invariabilmente indice di prognosi sfavorevole, è la delezione del cromosoma 17, del(17p). La duplicazione del braccio lungo del cromosoma 1, amp(1q21) si osserva nel 40% dei pazienti. Altre alterazioni secondarie ricorrenti sono la delezione del braccio corto del cromosoma 1, del(1p) e alterazioni numeriche o strutturali a carico di *MYC*, sul cromosoma 8. La del(13q) è stata per lungo tempo associata a prognosi sfavorevole, in studi in cui veniva utilizzata la citogenetica convenzionale per la caratterizzazione del background genomico dei pazienti. L'impiego della FISH ha successivamente messo in evidenza che questa alterazione numerica è probabilmente un marcatore surrogato di iperdiploidia, traslocazioni IgH o proliferazione, più che un vero e proprio evento *driver* nella patogenesi del mieloma. Tutte le altre traslocazioni secondarie sono invece associate a prognosi sfavorevole e la presenza di due o più alterazioni secondarie nello stesso paziente rappresenta un fattore di rischio molto elevato.

Quest'ultimo aspetto è stato formalizzato in uno studio inglese⁽⁸⁾, eseguito in maniera retrospettiva su una casistica molto ampia di pazienti (più di 1000). In questo studio è stato messo in evidenza che

alcune lesioni genetiche tendono a co-segregare: in particolare l'amp(1q21) è spesso in associazione con la t(14;16), o in generale con traslocazioni del locus IgH; inoltre, la del(17p13) è spesso in associazione con la amp(1q21). In generale, una prognosi particolarmente sfavorevole è caratterizzata dalla co-segregazione di almeno due alterazioni cromosomiche comprese tra la t(4;14), la t(14;16), la t(14;20), l'amp(1q21) e la del(17p13)⁽⁸⁾.

Accanto alla descrizione del quadro citogenetico, una decina di anni fa è stato utilizzato un approccio di espressione genica per capire se la variabilità genetica osservata nei pazienti potesse essere ricondotta alla de-regolazione trascrizionale di alcuni *pathway* ricorrenti e il risultato di questo studio ha portato alla scoperta che in tutti i mielomi si osserva la de-regolazione trascrizionale di almeno una delle cicline D (D1, D2, oppure D3), ovvero di alcuni dei geni criticamente coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare⁽⁹⁾: le cicline regolano la transizione G/S del ciclo, interagendo positivamente con chinasi che regolano la fosforilazione di RB1 (retinoblastoma). In base a quale ciclina risulta over-espressa e a quale traslocazione IgH è presente, i pazienti possono essere suddivisi in 7 gruppi (*TC classification*)⁽¹⁰⁾; questa stratificazione dei pazienti avviene probabilmente molto presto durante il processo patogenetico e ha un ruolo nel controllare la progressione del mieloma. Infatti, i diversi sottogruppi di pazienti

sono caratterizzati da una biologia e un decorso clinico diversi, anche se - ad oggi - non si ritiene che questa debba tradursi nell'impiego di un approccio terapeutico diverso nei vari gruppi di pazienti. Questa classificazione dei pazienti ha avuto poca fortuna anche in ambito diagnostico, data la relativa complessità della metodica necessaria per ottenerla e dell'analisi dei dati di espressione genica. Tuttavia il suo ruolo resta importante per definire le vie biosintetiche alterate nei diversi sottogruppi di pazienti.

Infine, molto più recentemente, grazie all'impiego di tecnologie di NGS, è stata messa in evidenza anche nel MM la presenza di diverse mutazioni in diversi geni con un numero medio di mutazioni per genoma di circa 60⁽¹¹⁾. Questo panorama mutazionale è molto eterogeneo: oggi sappiamo che tra i geni più frequentemente mutati vi sono *KRAS* e *NRAS* (ciascuno mutato in circa il 20% dei pazienti), seguiti da *TP53*, *DIS3*, *FAM46C* e *BRAF*, mutati in circa il 10% dei pazienti. Mutazioni in altri geni sono state osservate in <5% dei pazienti. In alcuni casi è stata osservata una ridondanza di mutazioni in geni appartenenti allo stesso *pathway*, nello stesso paziente (esempio *pathway* RAS/MAPK).

La complessità del quadro riassuntivo delle alterazioni genomiche strutturali e numeriche e delle mutazioni più frequentemente osservate nei pazienti con MM è apprezzabile nella Figura 1.

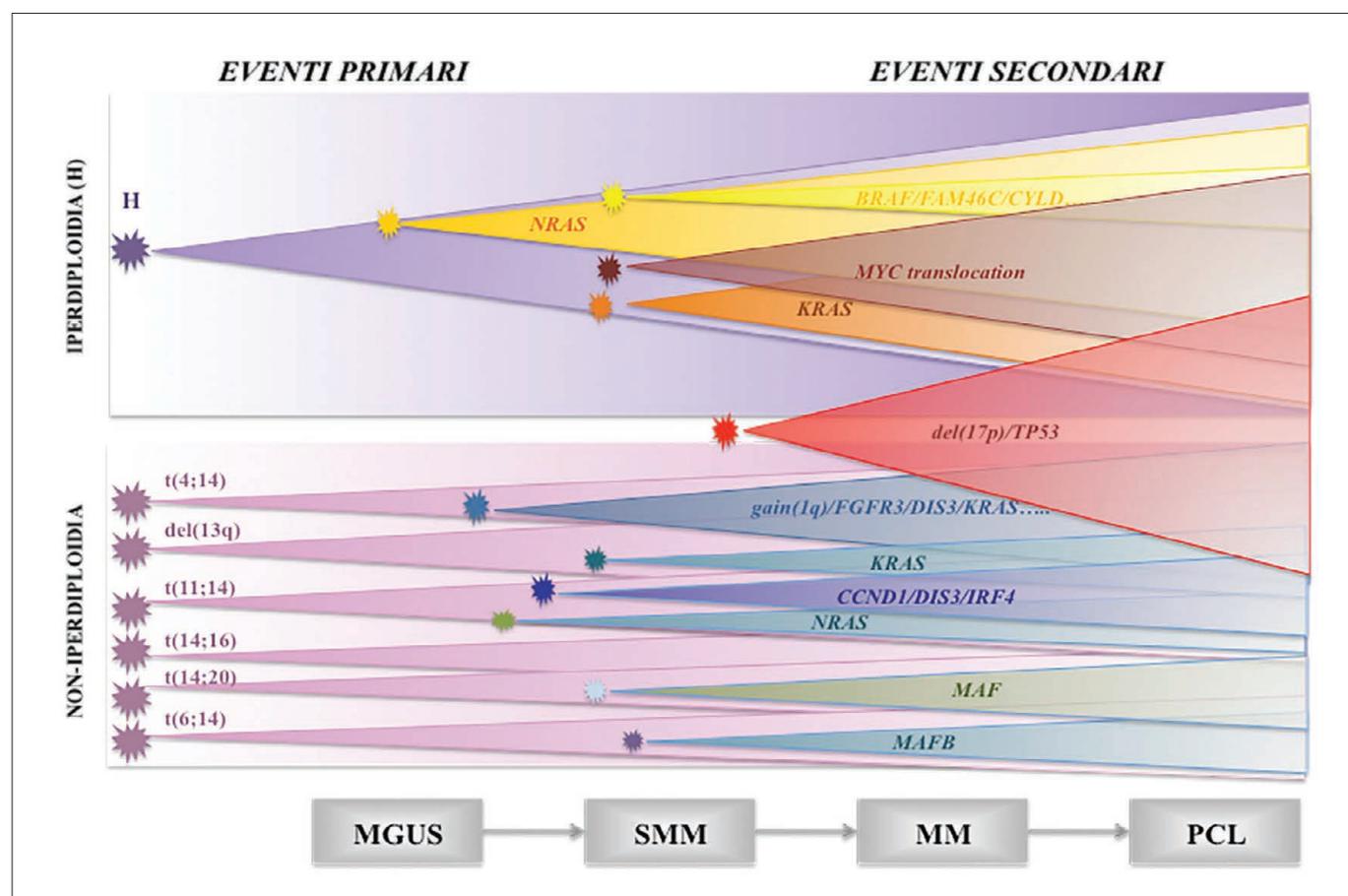


Figura 1 - Quadro riassuntivo delle alterazioni genomiche strutturali e numeriche e delle mutazioni più frequentemente osservate nei pazienti con MM⁽⁷⁾.

Subclonalità delle alterazioni genomiche

Una delle acquisizioni più importanti derivate dall'impiego di tecnologie ad alta risoluzione per lo studio del genoma riguarda l'oligoclonalità del mieloma^(12,13); contrariamente a quanto si pensava, infatti, il clone di mieloma è caratterizzato anche da una eterogeneità intra-clonale, cioè le alterazioni genomiche o le mutazioni che si osservano in un determinato paziente, non sono necessariamente presenti in tutte le cellule del suo clone neoplastico; questo suggerisce che diversi sub-cloni possano coesistere nello stesso paziente, nonostante la malattia sia caratterizzata dalla secrezione di una proteina monoclonale unica. Questa caratteristica è condivisa da quasi tutti i tumori (solidi o ematologici), il cui carico mutazionale e il livello di oligoclonalità possono essere molto variabili, suggerendo che diversi processi mutazionali possano essere attivi nei diversi tumori in fasi diverse della malattia. Recentemente, la possibilità di sequenziare il genoma di singole cellule ha consentito di entrare ancora di più nel dettaglio dell'eterogeneità del clone neoplastico, rivelando che in media cinque sub-cloni sono presenti in tutti i MM all'esordio di malattia^(13,14). Si pensa che questi risultati siano addirittura una sottostima della reale eterogeneità sub-clonale del MM, poiché la sensibilità della tecnologia impiegata ha consentito di rilevare soltanto sub-cloni presenti almeno nel 10% della popolazione: è possibile quindi che una molteplicità di sub-cloni meno rappresentati sia presente in ciascun paziente con mieloma⁽¹²⁾. Ovviamente il ruolo prognostico di queste alterazioni così poco rappresentate non è ancora chiaro; tuttavia è realistico pensare che anche alterazioni sub-clonali, però in geni oncosoppressori (come ad esempio *TP53*), possano avere un impatto significativo sulla prognosi dei pazienti: è infatti possibile che sub-cloni portatori di queste alterazioni siano resistenti alla terapia e permangano nel paziente in remissione, al limite come malattia minima residua.

In generale, è stato osservato che le mutazioni nella maggior parte dei geni che sono mutati in maniera ricorrente nel MM possono essere clonali o sub-clonali, mentre i geni che mutano meno frequentemente sono spesso mutati clonalmente, suggerendo che la mutazione in questo caso sia un evento precoce del processo patogenetico, oppure che la mutazione fornisca un vantaggio proliferativo al clone che l'ha acquisita⁽¹⁵⁾. Altri geni sono infine mutati quasi sempre solo in sub-cloni, suggerendo che la mutazione sia un evento tardivo.

Sia geni *driver* - ovvero quelli che controllano il processo patogenetico - che geni *passenger* - ovvero quelli che non hanno un ruolo patogenetico in quel particolare paziente - possono essere mutati in sub-cloni, suggerendo un dinamismo e una plasticità del clone di mieloma nel corso della malattia. Infatti, l'analisi di campioni dello stesso paziente raccolti in fasi diverse della sua malattia ha dimostrato che il quadro genomico è in continua evoluzione a causa di fluttuazioni nelle frequenze delle alterazioni che si osservano nei diversi

momenti. È importante notare che il catalogo delle mutazioni o delle alterazioni genomiche presenti nel campione di tessuto neoplastico di un paziente rappresenta lo storico delle alterazioni che si sono accumulate durante la progressione di quel particolare tumore e che quindi può essere utilizzato per definire la sequenza temporale degli eventi che hanno portato al suo sviluppo. Infatti, dalla composizione sub-clonale di un campione, si può inferire che alterazioni clonali (presenti in tutte le cellule del clone) siano avvenute prima di alterazioni sub-clonali; queste ultime sono tanto più recenti, quanto inferiore risulta la loro frequenza.

Lo studio della sequenza temporale degli eventi che hanno portato allo sviluppo del tumore è importante per la prognosi del paziente; inoltre consente di identificare le alterazioni che guidano la progressione di un particolare tumore e di distinguerle da quelle accessorie, che hanno solo un significato marginale in quel particolare contesto.

Evoluzione clonale

L'eterogeneità genetica rappresenta il substrato essenziale perché avvenga evoluzione. Questo è un concetto fondamentale nella genetica evoluzionistica: le mutazioni sono una delle tre forze che interagiscono perché una popolazione vada incontro a evoluzione. Le altre due sono la selezione naturale e la deriva genetica: entrambe causano un cambiamento delle frequenze alleliche in una popolazione, supportando l'espansione di alcuni cloni (che così diventano dominanti) oppure l'eliminazione (estinzione) di altri. La deriva genetica è una forza condizionata da eventi casuali (comparsa di una mutazione con un vantaggio proliferativo), la selezione darwiniana è una forza non casuale, condizionata da eventi esogeni, come alterazioni dell'*habitat* di una popolazione⁽¹⁶⁾.

Il concetto di evoluzione ha generalmente una connotazione positiva: l'evoluzione è la strategia adottata naturalmente da un insieme di individui - ovvero da una popolazione - per tendere al meglio e sopravvivere. La rivisitazione di questo concetto nel contesto della biologia del tumore gli attribuisce al contrario una connotazione totalmente negativa⁽¹⁷⁾: se la progressione del tumore segue una dinamica di tipo evoluzionistico, il clone neoplastico tenderà continuamente a modificarsi per sopravvivere, anche nella peggiore condizione ambientale in cui potrebbe trovarsi, ovvero in presenza di terapia. Secondo questa teoria infatti, la terapia potrebbe essere una delle forze esogene che potrebbe provocare la formazione di colli di bottiglia che, attraverso un processo di selezione darwiniana, potrebbero facilitare la morte o la sopravvivenza di diversi sub-cloni: in questo modo, sub-cloni diversi potrebbero dominare diverse fasi della malattia di un paziente e la progressione post terapia potrebbe spiegarsi con la selezione di sub-cloni che sono stati in grado di sfuggire alla pressione selettiva della terapia stessa, superando il collo di bottiglia e proliferando in maniera non condizionata.

In generale, il processo di evoluzione clonale si studia su campioni

raccolti dallo stesso paziente, in maniera longitudinale, ovvero in fasi diverse della malattia. Bisogna però tener conto del fatto che il mieloma è una malattia generalmente piuttosto indolente, e che quindi il processo evolutivo richiede tempi molto lunghi per poter essere messo in evidenza. Questo significa che la raccolta del materiale biologico rappresenta un punto critico quando si intende studiare la dinamica evolutiva di un paziente. Una possibile alternativa allo studio longitudinale è rappresentata dallo studio del clone tumorale mediante analisi su singola cellula: questo approccio è altamente tecnologico e richiede una serie di strumentazioni molto costose, ma è molto potente, poiché consente di inferire la filogenesi del processo patogenetico dallo studio del campione raccolto in una sola fase della malattia⁽¹⁸⁾.

Ad oggi, sono stati pubblicati diversi lavori che dimostrano l'esistenza di un'evoluzione clonale nel MM^(13,15,19-23) e in generale è chiaro che le dinamiche evolutive della fase pre-neoplastica sono diverse da quelle della fase sintomatica del MM: nella fase pre-neoplastica infatti la storia della progressione è la storia naturale del mieloma, non condizionata da agenti esogeni, come la terapia. Nella fase sintomatica, invece, la terapia condiziona in maniera decisiva l'evoluzione del mieloma, agendo come forza selettiva per modificare l'architettura sub-clonale dei diversi pazienti. Per la comprensione del processo evolutivo nella fase sintomatica del mieloma, diventa quindi cruciale tener conto dell'integrazione di almeno due serie di fattori, ovvero la composizione genomica sub-clonale del paziente e la combinazione di farmaci impiegati per la cura. Infatti, l'identificazione di diverse traiettorie evolutive e il riconoscimento di dinamiche ricorrenti in presenza di specifici approcci terapeutici potrebbe fornire il razionale per il disegno di strategie terapeutiche più efficaci e personalizzate di quelle in uso attualmente.

Evoluzione clonale nella fase pre-neoplastica

Da tempo si sa che l'eterogeneità che caratterizza il mieloma è presente già dalle fasi pre-neoplastiche della malattia: infatti i pazienti con MGUS presentano caratteristiche cliniche di base eterogenee, al punto da poter essere utilizzate per creare modelli di predizione del rischio, utili nel *management* del paziente con MGUS⁽²⁴⁾. Anche dal punto di vista genomico, l'instabilità cariotipica che caratterizza il mieloma si riscontra ugualmente nelle fasi pre-neoplastiche e il catalogo di alterazioni strutturali, numeriche o di mutazioni che si rilevano nel MM è sovrapponibile a quello che si osserva nelle MGUS; inoltre, nella maggior parte dei pazienti, la progressione a MM non si associa alla comparsa di nuove alterazioni⁽²⁵⁻²⁷⁾. Quello che invece cambia in questi due stadi di malattia è la percentuale di plasmacellule aberranti affette da quella particolare lesione genetica, suggerendo che le dimensioni del clone neoplastico rappresentano il reale elemento distintivo di queste due fasi⁽¹³⁾.

Queste osservazioni portano a concludere che la MGUS sia già una fase attiva della malattia, durante la quale non succede nulla dal punto di vista fenotipico (infatti la malattia procede in maniera indolente), ma dove in realtà il genotipo è già in fermento e accumula progressivamente alterazioni, senza che nessuna di queste prevalga sulle altre e diventi dominante in questa fase di malattia.

Questo quadro è compatibile con un modello di evoluzione neutrale della malattia, secondo il quale alterazioni genomiche casuali avverrebbero in plasmacellule di MGUS, causando nel tempo l'espansione di piccoli sub-cloni diversi tra loro, che coesisterebbero senza prevalere l'uno sull'altro^(28,29) (Figura 2b). Questa eterogeneità di per sé non avrebbe una funzione specifica nel guidare la progressione tumorale, ma sarebbe una sua stessa conseguenza e cioè, in assenza

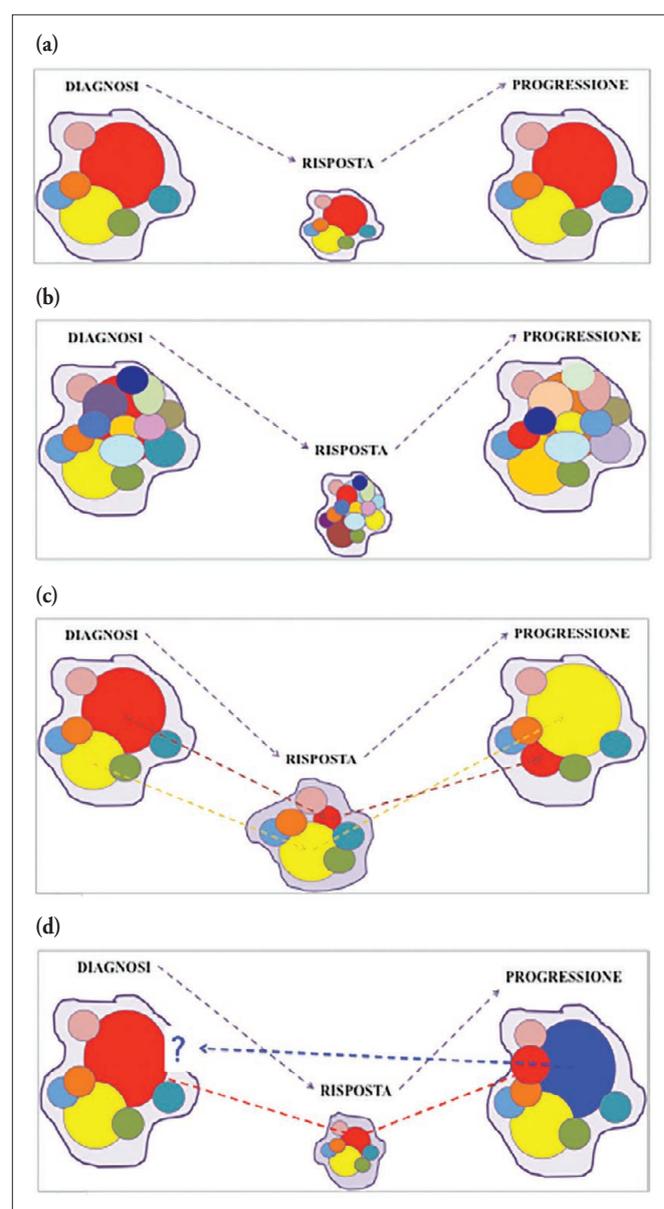


Figura 2 - Traiettorie di evoluzione clonale descritte nel MM. (a) = no evoluzione; (b) =evoluzione NEUTRALE; (c) = evoluzione LINEARE; (d) evoluzione RAMIFICATA

di pressione selettiva esogena, la generazione - naturale e tollerata - di un livello massimo di variabilità genetica, senza squilibri significativi nelle frequenze alleliche delle diverse varianti. Secondo questo modello, la progressione a MM avverrebbe al superamento di un livello-soglia di tolleranza da parte del microambiente, per il quale fino a quel momento tutto questa variabilità era invisibile. La combinazione (casualmente) favorevole di una particolare lesione genetica con una particolare condizione ambientale porterebbe, infatti, a selezionare favorevolmente il sub-clone portatore di quella lesione, provocandone l'espansione, con conseguente progressione da MGUS a MM. Una analogia efficace per spiegare la dinamica di evoluzione neutrale potrebbe essere quella del clone di MGUS con un palloncino sgonfio che può essere riempito con palline colorate completamente diverse tra loro, senza causare effetti traumatici finché non si raggiunge un livello-soglia, oltre il quale qualunque pallina aggiunta provoca l'esplosione del palloncino e la diffusione di tutte le palline in esso contenute.

Dati sperimentali a favore di questa teoria sono stati presentati al 16th *International Myeloma Workshop* dal gruppo inglese, che in un subset di pazienti arruolati nel protocollo clinico Myeloma XI ha eseguito un *Whole Exome Sequencing* (WES) e ha analizzato i risultati utilizzando un modello matematico che consente di inferire la dinamica evolutiva dalle frequenze alleliche con cui sono presenti diverse varianti in un campione di paziente. Secondo questo studio, il 19% dei pazienti con MM di nuova diagnosi esordisce con un quadro genomico compatibile con una dinamica di evoluzione neutrale. Questi pazienti hanno una prognosi più sfavorevole degli altri, come risposta alla terapia di induzione con immunomodulanti e come *overall e progression free survival*. Questa osservazione si può spiegare pensando che il clone neoplastico di questi pazienti, mostrando una dinamica evolutiva di tipo neutrale, potrebbe essere meno dipendente dal microambiente per la propria sopravvivenza e quindi meno sensibile ad una terapia che - come meccanismo di azione - colpisce anche le interazioni tra clone e microambiente.

Evoluzione clonale nella fase clinica

La storia clinica del mieloma segue tipicamente un andamento altalenante, con fasi di risposta alla terapia che si alternano a ricadute; nel tempo, le fasi di risposta diventano progressivamente più corte e le ricadute più aggressive, fino a una fase finale della malattia di totale refrattarietà a qualunque trattamento terapeutico, che porta al decesso del paziente. Questa dinamica oscillante si rispecchia molto bene in un modello di evoluzione clonale in cui la terapia da un lato è in grado di ridurre le dimensioni del clone neoplastico, ma dall'altro agisce anche come forza selettiva, selezionando sub-cloni chemioresistenti che, in particolari condizioni, possono ri-espandere e provocare la ricaduta di malattia. Questa relazione così diretta tra terapia e modellamento del clone neoplastico è stata dimostrata per

la prima volta in uno studio della Mayo Clinic⁽¹⁹⁾ in cui l'evoluzione clonale di un paziente è stata monitorata durante tutto il corso della sua malattia, dalla diagnosi alla fase terminale di PCL: per questo paziente era stato raccolto il campione biologico 7 volte nel corso del suo percorso terapeutico, ed era stata eseguita una genotipizzazione molecolare del clone neoplastico mediante *array Comparative Genomic Hybridization* (aCGH). In questo modo era stato possibile osservare una alternanza di diversi cloni prevalenti, monitorando le variazioni di frequenza di un certo numero di *Copy Number Alterations* (CNAs). Alcune CNAs erano presenti in tutti i campioni analizzati nel corso della storia clinica del paziente, suggerendone un ruolo come alterazioni *driver* per la neoplasia di quel particolare paziente. Inoltre, il campione dello stadio terminale di malattia era caratterizzato da un numero significativamente superiore di CNA, rispetto ai campioni delle prime fasi, suggerendo un accumulo progressivo di alterazioni nel tempo, compatibile con una evoluzione di cloni diversi, tutti resistenti alle terapie impiegate. In questo paziente, infatti, l'alternanza di soppressione e riemersione di cloni corrispondeva rispettivamente alle fasi cliniche di risposta e resistenza alle diverse terapie, suggerendo un ruolo diretto del trattamento terapeutico nel provocarla, probabilmente in compartecipazione con altre forze esogene coinvolte in questo processo.

In altri studi^(19,21), una dinamica evolutiva è stata messa in evidenza studiando il panorama genomico di coorti di pazienti, quasi mai trattati in maniera omogenea (trattandosi di studi prevalentemente retrospettivi) e confrontando campioni prelevati in fasi successive della malattia. Le fluttuazioni delle frequenze con cui sono state rilevate le diverse alterazioni citogenetiche, sono state descritte come marea clonale e da questi primi studi sono state evidenziate almeno due dinamiche evolutive: una lineare e una ramificata. La traiettoria di evoluzione lineare (Figura 2c) era dedotta dall'osservazione che la frequenza di alcune alterazioni genomiche aumentava dalla diagnosi alla progressione, suggerendo l'espansione di sub-cloni già presenti all'esordio di malattia. La traiettoria di evoluzione ramificata (Figura 2d) era dedotta dall'osservazione che alcune alterazioni genomiche sembravano comparire alla progressione, poiché - con la profondità di analisi impiegata - non era possibile osservarle alla diagnosi, suggerendo che il sub-clone emerso alla ricaduta derivasse dall'evoluzione divergente di uno o più sub-cloni presenti nel paziente, prima della diagnosi di MM. In alcuni pazienti, infine, non si osservavano cambiamenti nel panorama genomico nelle due fasi di malattia, suggerendo una assenza di evoluzione in un sottogruppo di pazienti (Figura 2a). Con tutti i limiti derivanti da uno studio retrospettivo, realizzato su una piccola casistica non omogeneamente trattata, gli autori di questi studi osservavano la sopravvivenza più lunga nei pazienti in cui era avvenuta una evoluzione ramificata e la più breve in quelli in cui non era avvenuta evoluzione⁽¹⁹⁾.

Dalle prime pubblicazioni ad oggi, questi dati sono stati consolidati

con l'impiego di tecnologie progressivamente più ad alta risoluzione, come l'NGS⁽¹⁵⁾ o l'analisi su singola cellula⁽¹⁴⁾ e il quadro attuale delle conoscenze rispecchia sostanzialmente le prime osservazioni. Ovviamente, grazie alla possibilità di ottenere una profondità di analisi superiore, le frequenze con cui si osservano le diverse traiettorie evolutive sono cambiate, risultando molto sbilanciate a favore della traiettoria ramificata, che realisticamente è quella più comune nei pazienti con MM. Inoltre, gli studi su singola cellula sono risultati particolarmente potenti nel decifrare il percorso evolutivo che sottende la progressione della malattia, come mostrato in un lavoro inglese⁽¹⁴⁾, che descrive la logica che è stata e si utilizza per inferire la successione degli eventi evolutivi di un particolare clone neoplastico da una percentuale di frequenza di allele variante (VAF).

Riconosciuta la validità della teoria dell'evoluzione clonale per spiegare il decorso clinico del MM oppure la progressione da MGUS, l'aspetto oggi considerato più critico è relativo all'attribuzione di un significato clinico/prognostico alle diverse traiettorie evoluzionistiche: il problema risiede nella possibilità di studiare casistiche ampie trattate in maniera omogenea, in modo da mantenere costante almeno una delle variabili che influenzano il sistema (la terapia). Essendo la maggior parte di questi studi retrospettivi, è molto difficile riuscire a rispondere a questa esigenza. Infatti, oltre alla pubblicazione sopra citata, ve ne sono soltanto altre due^(15,23) nelle quali si fa una correlazione tra la dinamica di evoluzione e la probabilità di progressione dei pazienti, fermo restando che si tratta sempre di casistiche non trattate in maniera omogenea. L'unica osservazione condivisa dalle tre pubblicazioni è quella relativa ai pazienti che non fanno evoluzione clonale per i quali la sopravvivenza è molto breve; in questi pazienti, realisticamente, il clone dell'esordio è refrattario alla terapia e - anche se si riduce - non viene modellato e ri-esponde uguale a sé stesso. In generale, tuttavia gli autori concordano nel riconoscere che i tre pattern di evoluzione clonale non sono ugualmente rappresentati nei pazienti ad alto o basso rischio: le cellule dei pazienti ad alto rischio tendono, infatti, ad essere più instabili genomicamente e quindi ad evolvere seguendo preferibilmente traiettorie ramificate.

Anche il microambiente potrebbe avere un ruolo come forza selettiva esogena nel modellare l'architettura sub-clonale nel MM; è, infatti, noto il ruolo del microambiente nel supportare la patogenesi e la progressione del MM⁽³⁰⁾: le cellule stromali e mesenchimali non soltanto interagiscono con le plasmacellule attraverso le molecole di adesione, attivando in maniera bidirezionale vie biosintetiche che convergono nel determinare un vantaggio proliferativo delle plasmacellule, ma sono anche coinvolte in processi di scambio di macromolecole (come acidi nucleici e proteine) attraverso microvescicole e exosomi⁽³¹⁾. Ad oggi, non è noto quale sia la natura esatta del materiale biologico scambiato per mezzo degli exosomi tra plasmacellule neoplastiche e cellule della nicchia tumorale, anche se nei tumori

solidi è stato osservato che può essere scambiato DNA e addirittura oncogeni. Nel MM, il miR-15a - il cui ruolo come oncosoppressore è stato riconosciuto nel MM - è stato trovato significativamente downregolato in exosomi rilasciati da cellule stromali/mesenchimali del midollo osseo di pazienti, rispetto a donatori sani⁽³²⁾. Questi dati sono suggestivi di un possibile impatto delle cellule della nicchia ematopoietica midollare nei pazienti sul controllo dell'evoluzione clonale nel MM.

Ripercussioni cliniche dell'evoluzione clonale

La teoria dell'evoluzione clonale e i diversi modelli di dinamica evolutiva possono avere alcune implicazioni sia sulla diagnosi e la prognosi del mieloma, che sull'atteggiamento terapeutico nei confronti di questa patologia. Data la capacità evolutiva del tumore, in generale il monitoraggio dell'evoluzione clonale potrebbe essere utilizzato 1. per guidare l'intervento terapeutico, 2. per valutare le traiettorie evoluzionistiche e prevenire eventuali ricadute e 3. per comprendere i meccanismi di resistenza alla terapia. Da questo punto di vista, come già detto, è cruciale la raccolta del materiale biologico in maniera longitudinale, anche con l'obiettivo di supportare la ricerca traslazionale in questo campo. Una tecnologia che sta muovendo i primi passi anche nel MM e che potrebbe facilitare una raccolta continua del materiale biologico è la cosiddetta *liquid biopsy*, ovvero una tecnologia che consente di valutare le caratteristiche del clone tumorale nel campione di sangue periferico, che è relativamente più semplice da ottenere del sangue midollare, dove invece normalmente vengono effettuate tutte le indagini molecolari.

Considerazioni generali

In generale, dal punto di vista diagnostico, il tipo e quantità di eterogeneità genetica presente all'esordio di malattia di per sé può essere suggestiva di dinamiche terapeutiche diverse. Infatti, una traiettoria evolutiva lineare implica un livello di eterogeneità inferiore, mentre traiettorie di tipo ramificato o neutrale implicano un livello di eterogeneità molto superiore. Questo significa che nel primo caso, un campionamento potrebbe essere sufficiente per descrivere accuratamente il clone di MM di quel paziente; nel secondo caso un singolo campionamento potrebbe non catturare tutta l'eterogeneità genetica che potrebbe caratterizzare quel paziente. Oggi non è prassi comune prelevare o caratterizzare più di un campione per paziente di MM, in un dato momento del suo percorso terapeutico, perché non è necessario - per fini diagnostici - arrivare a descrivere con precisione la presenza di mutazioni targettabili terapeuticamente. Nella pratica comune attuale, l'obiettivo della caratterizzazione genomica del MM è essenzialmente quello di identificare fattori prognostici per costruire modelli di stratificazione del rischio. Nei modelli più recenti⁽³³⁾ vengono incluse informazioni che derivano sia da eventi genomici macroscopici (strutturali e numerici), che da mutazioni in

geni importanti nella patogenesi del MM (come *TP53*, *ATM*, *ATR*, *CCND1* e altri). Accanto all'esigenza di costruire modelli prognostici, tuttavia potrebbe non essere lontana la possibilità di eseguire una medicina di precisione anche nel MM. In questo caso - come per altre patologie neoplastiche - potrebbe rendersi necessaria l'esecuzione di più prelievi per paziente, con l'obiettivo di descriverne accuratamente l'eterogeneità genetica, per definire le alterazioni prevalenti, possibili target terapeutici.

La gestione clinica dell'evoluzione clonale deve tener conto di alcune considerazioni generali.

- **L'instabilità genomica è un possibile target terapeutico** L'instabilità genomica è il presupposto essenziale perché avvenga selezione clonale e quindi evoluzione. Un approccio interessante per la gestione dell'evoluzione clonale potrebbe quindi essere quello di colpire i meccanismi che alimentano l'instabilità genomica, con l'obiettivo di bloccare l'evoluzione del tumore e limitare la progressione della malattia, soprattutto nei primi stadi della malattia. Questo approccio è stato ampiamente esplorato nei tumori solidi, dove l'impiego di farmaci come i *PARP inhibitor* ha mostrato un certo grado di successo nel trattamento di tumori caratterizzati da mutazioni in *BRCA* ⁽³⁴⁾. Nel MM questo approccio è stato esplorato mostrando potenzialità interessanti: è stato infatti recentemente pubblicato un lavoro in cui mediante un approccio combinato - che da un lato potenzia lo stress ossidativo, e dall'altro colpisce la risposta allo stress stesso - vengono colpiti i meccanismi che alimentano l'instabilità genomica provocando l'induzione di apoptosi nelle cellule di MM ⁽³⁵⁾.

- **Una terapia adattativa potrebbe arginare la selezione di cloni resistenti** Nonostante il notevole prolungamento della sopravvivenza libera da progressione che è stato ottenuto nel MM grazie all'impiego dei nuovi algoritmi terapeutici, è osservazione comune che questo obiettivo terapeutico non sempre si traduca in un reale prolungamento della sopravvivenza globale dei pazienti. Questo potrebbe essere il riflesso di una competizione tra sub-cloni, indotta dal trattamento terapeutico stesso, che provocherebbe la selezione di sub-cloni resistenti alla terapia che potrebbero emergere anche a notevole distanza temporale dall'inizio della terapia, dopo un iniziale beneficio di sopravvivenza libera da progressione. La possibilità di controllare questo processo mantenendo stabile e costante nel tempo una popolazione di sub-cloni sensibili alla terapia è stata esplorata in modelli animali di tumore solido ⁽³⁶⁾, dimostrando che la modifica della schedula di trattamento per mantenere una costante pressione selettiva su piccoli cloni residui potrebbe centrare questo ambizioso obiettivo. Nel MM, l'impiego di una terapia di mantenimento ha questo ruolo, come verrà discusso più avanti.

- **È importante identificare le varianti clonali nell'ambito dell'eterogeneità genetica di un tumore** Le varianti clonali potrebbero essere nuovi potenziali target terapeutici. Questo presuppone

un notevole sforzo della ricerca farmaceutica nello sviluppo di farmaci mirati sulle diverse varianti identificate, che potrebbe richiedere tempi molto lunghi di realizzazione. Inoltre, colpire una variante clonale non preserva dalla involontaria selezione di sub-cloni resistenti o dalla comparsa *de novo* di varianti acquisite in corso di terapia. Per questo motivo si ritiene che combinazioni terapeutiche - che colpiscano contemporaneamente diversi target - possano essere più efficaci di terapie con agenti singoli nel bloccare l'evoluzione clonale, anche se nel MM, dove vengono comunemente impiegate combinazioni terapeutiche, l'evoluzione clonale della malattia non viene impedita. Recentemente, l'impiego di approcci di immunoterapia adottiva, che ha come obiettivo colpire diversi neo-antigeni tumorali risvegliando le potenzialità anti-tumorali del sistema immunitario dell'ospite, si sta rivelando particolarmente efficace anche nel MM e potrebbe rappresentare un modo per superare, o almeno arginare il problema dell'evoluzione clonale ^(37,38).

Considerazioni cliniche

La teoria dell'evoluzione clonale valutata nello specifico contesto del MM deve tener conto delle seguenti situazioni particolari.

- **Il trattamento nelle fasi pre-neoplastiche** Nella maggior parte dei tumori solidi, l'idea di trattare il tumore prima che la complessità genomica diventi estrema è un concetto terapeutico molto importante. Nel MM questa ipotesi è invece molto discussa. Dal punto di vista evolutivistico possiamo immaginare che in uno stato clinico relativamente indolente (MGUS o SMM) vi sia un equilibrio tra il clone neoplastico e il microambiente, che porta l'organismo a mantenere sotto controllo un clone aberrante, anche per tempi molto lunghi, impedendone l'espansione. Quindi, un trattamento terapeutico, se da un lato potrebbe ridurre o eliminare completamente la massa tumorale, eventualmente selezionando sub-cloni indolenti e quindi rallentando la progressione tumorale, dall'altro potrebbe invece eliminare i cloni più sensibili, ma al tempo stesso selezionare sub-cloni aggressivi e quindi provocare un'accelerazione della progressione tumorale. Nel MM, la questione cruciale è se alcuni degli stati pre-neoplastici più avanzati (SMM) debbano o meno essere considerati MM a tutti gli effetti e quindi debbano essere trattati. Dal punto di vista genomico, come detto in precedenza, il SMM deve essere considerato una lesione genetica. Dal punto di vista clinico, si tratta di perturbare una situazione di equilibrio che potrebbe rimanere stabile per tempi anche molto lunghi. Sperimentalmente, non sono presenti in letteratura dati a supporto o contro queste ipotesi. L'unico studio ad oggi disponibile è quello del gruppo spagnolo ⁽³⁹⁾, che ha arruolato pazienti con SMM ad alto rischio citogenetico in uno studio randomizzato di fase III di terapia con lenalidomide e desametasone verso osservazione; in questo studio si dimostra che una terapia precoce con lenalidomide prolunga significativamente il tempo

alla progressione e che i pazienti che progrediscono a MM in corso di terapia non hanno una malattia più aggressiva degli altri, suggerendo che un trattamento anticipato nella storia naturale del MM può essere di beneficio per il paziente. Tuttavia, l'inclusione in questo studio solamente di SMM ad alto rischio, che hanno cioè un rischio maggiore di progressione a MM, lascia ancora aperta la possibilità che possa non valer la pena trattare pazienti con malattia più indolente. Quindi resta importante capire la biologia della progressione tumorale dagli stadi pre-neoplastici a quelli di malattia sintomatica, prima di escludere la possibilità che una terapia preventiva possa rappresentare una possibilità terapeutica anche nel MM⁽⁴⁰⁾.

• **Impiego di terapia sequenziale o continuativa** Nonostante i significativi miglioramenti nel decorso clinico dei pazienti con MM dovuti all'introduzione dei nuovi farmaci, è noto che alcuni sottotipi biologici, i cosiddetti pazienti ad alto rischio citogenetico, possono discostarsi significativamente dal resto della popolazione di pazienti, in termini di outcome clinici; in particolare questi pazienti tendono a rispondere come gli altri, oppure addirittura meglio degli altri, alle terapie, ma poi ricadono più in fretta. Al contrario, esiste un sottogruppo di pazienti, cosiddetti *MGUS-like*⁽⁴¹⁾, il cui decorso clinico è particolarmente indolente. In questi pazienti, nonostante il mancato raggiungimento della risposta completa, la sopravvivenza libera da progressione è prolungata rispetto al resto della popolazione di pazienti.

Quindi, la possibilità di entrare nel dettaglio dell'eterogeneità genetica del clone neoplastico e distinguere i cloni più o meno aggressivi, e quanto sono rappresentativi dell'intero clone di MM, costituisce un obiettivo importante per migliorare l'atteggiamento clinico e finalizzare meglio le strategie terapeutiche a disposizione.

Il moderno algoritmo terapeutico nel MM prevede una serie di blocchi sequenziali di trattamento, definiti induzione, consolidamento, mantenimento. L'induzione ha come obiettivo quello di ridurre le dimensioni della massa tumorale, possibilmente ai livelli di malattia minima residua. Dal punto di vista evolutivo, questo ha l'obiettivo di ridurre al massimo l'eterogeneità del clone neoplastico, per ridurre le potenzialità evolutive della malattia, andando a colpire e limitare i sub-cloni più attivamente proliferanti. Il consolidamento dovrebbe rinforzare il risultato ottenuto con la terapia di induzione, possibilmente eliminando anche la quota di malattia minima residua, ovvero portando il paziente in remissione completa. Infine il mantenimento ha come obiettivo quello di tenere sotto controllo l'eventuale proliferazione di cloni residui, portando alla loro estinzione e possibilmente alla cura del paziente.

L'enorme eterogeneità intra-clonale del MM e il suo comportamento clinico, suggeriscono che i diversi sub-cloni possano avere una capacità diversa di rispondere alla terapia. Pensando ai farmaci attualmente *gold-standard* della terapia del MM, possiamo dire che i cloni

più proliferativi potrebbero essere più sensibili ad una terapia con inibitori del proteasoma, il cui meccanismo di azione richiede che la plasmacellula sia attivamente proliferante⁽⁴²⁾. Al contrario, i cloni più indolenti potrebbero dipendere maggiormente dalle interazioni con il microambiente e quindi risultare più sensibili ad una terapia con immunomodulatori. La ricerca clinica dimostra molto chiaramente che la combinazione di queste due categorie di farmaci è molto potente nel MM^(43,44) e nuove combinazioni terapeutiche che includono nuovi farmaci immunomodulanti stanno confermando la correttezza di questa impostazione teorica^(45,46).

Un altro aspetto importante che deve essere tenuto in considerazione dal punto di vista evolutivo riguarda la durata del trattamento. In questo senso, il consolidamento dovrebbe essere visto come un prolungamento dell'induzione, e il razionale dovrebbe essere quello di continuare una terapia che ha mostrato di funzionare. Esiste, in effetti, un dibattito aperto su quale potrebbe essere il vantaggio di continuare una terapia che funziona finché funziona, rispetto a quello di utilizzarla per un periodo di tempo prefissato⁽⁴⁷⁾. Studi condotti soprattutto dal gruppo inglese⁽⁴⁸⁾ sarebbero a favore della prima ipotesi, anche se molti degli schemi terapeutici testati nei protocolli clinici attuali prevedono una durata prefissata del trattamento. L'obiettivo di queste prime fasi di terapia del MM è comunque quello di ridurre le dimensioni del clone fino al livello di malattia minima residua.

La terapia di mantenimento ha quindi come scopo quello di modificare la biologia della malattia minima residua, possibilmente selezionando positivamente i cloni indolenti, e quindi non inducendo l'acquisizione di ulteriore variabilità genetica. Per questo motivo, rispetto ai farmaci citotossici (che potrebbero essere mutageni), che in questa fase della malattia potrebbero provocare un effetto opposto a quello atteso, si privilegia l'impiego di farmaci non mutageni che potrebbero invece agire su *pathway* che controllano la proliferazione della plasmacellula in maniera indiretta^(49,50). In quest'ottica, l'impiego di combinazioni di farmaci ad azione diversa potrebbe essere ancora più efficace in questa fase della malattia, mantenendo continuamente sotto pressione selettiva i cloni residui agendo su fronti diversi. Infatti, i protocolli clinici più recenti stanno esplorando questa ipotesi e i risultati chiariranno se questo concetto evolutivo è stato davvero correttamente interpretato nella realtà clinica.

Considerazioni diagnostiche

Dal punto di vista diagnostico, il riconoscimento delle dinamiche di evoluzione clonale suggerisce che il clone della ricaduta potrebbe essere diverso da quello della diagnosi. Quindi, i fattori prognostici che caratterizzano le fasi più avanzate della malattia potrebbero non essere gli stessi delle fasi iniziali. Uno degli scenari più comuni è la comparsa della del(17p) alla ricaduta, in pazienti nei quali era assente alla diagnosi, che deve essere interpretata come l'espansione di un sub-clone portatore della del(17p), già presente alla diagnosi della

malattia, selezionato positivamente dalla terapia e espanso nelle fasi finali della malattia. Data l'importanza dell'inquadramento diagnostico del paziente, diventa quindi fondamentale una rivalutazione citogenetica tutte le volte che la malattia progredisce, per stabilire le caratteristiche del clone dominante in questa fase. Infatti, un razionale che prende spunto da queste osservazioni potrebbe essere quello di non ritrattare con la stessa combinazione terapeutica un paziente che ha risposto alla terapia in prima linea, ma che è ricaduto con lo stesso clone che era presente alla diagnosi, poiché questo potrebbe avere caratteristiche di resistenza alla terapia impiegata.

Un altro aspetto importante riguarda la malattia minima residua; in generale, lo studio della malattia minima residua ha un obiettivo quantitativo: deve infatti quantificare la quota di malattia rimasta dopo la terapia per dimostrare una riduzione della massa tumorale, indotta dall'attività citotossica diretta o indiretta dei farmaci impiegati. Dal punto di vista evolutivo, qualora la quantità di malattia rilevata sia maggiore di zero, è possibile pensare che le cellule che residuano siano proprio quelle chemioresistenti e che quindi la loro caratterizzazione qualitativa potrebbe aiutare nella definizione dei meccanismi di azione dei farmaci impiegati. Lo studio di un gruppo spagnolo⁽⁵¹⁾ ha infatti dimostrato che le cellule residue dopo terapia possono essere separate e caratterizzate molecolarmente e citofluorimetricamente e che il loro profilo di espressione genica è significativamente diverso da quello delle plasmacellule dell'esordio di malattia. In generale è possibile pensare che cellule che residuano dopo una combinazione terapeutica molto efficace nell'indurre una

maggiore profondità di risposta, siano quelle più resistenti di tutto l'intero clone presente prima della terapia. Quindi, se da un lato è necessario indurre una elevata profondità di risposta, compatibilmente con la tossicità indotta da trattamenti così intensivi, dall'altro bisogna tener conto anche della qualità di quanto residua dopo terapia. Una valutazione diagnostica completa dovrebbe essere quindi in grado di valutare la presenza di fattori prognostici in tutte le fasi cruciali del percorso terapeutico di un paziente con MM.

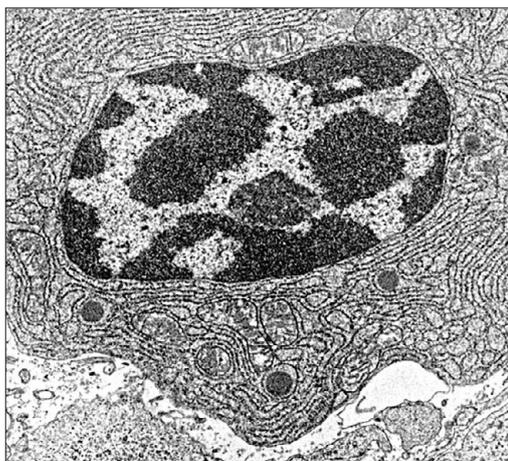
Conclusioni

La terapia del mieloma sta conoscendo una fase particolarmente brillante, con l'introduzione in clinica di farmaci molto efficaci e l'impostazione di algoritmi di trattamento molto innovativi. I risultati si traducono in reali vantaggi per il paziente, la cui sopravvivenza è significativamente più lunga di quanto non si potesse immaginare fino a qualche anno fa. Contemporaneamente, l'impiego di tecnologie ad alta risoluzione progressivamente sempre più precise e accurate, ha consentito di chiarire molti aspetti della biologia del mieloma, in particolare l'esistenza di un elevato livello di eterogeneità intra-clonale, e di comprendere a fondo le dinamiche di evoluzione di questa malattia. L'integrazione di queste informazioni con quelle derivanti dalle conoscenze sul meccanismo di azione dei farmaci deve fornire un razionale per la definizione di schemi terapeutici ancora più innovativi, che tengano conto del dinamismo del clone tumorale, per centrare l'obiettivo di personalizzare il trattamento sulle caratteristiche peculiari di ciascun tumore.

Bibliografia

1. Boise LH, Kaufman JL, Bahlis NJ, Lonial S, Lee KP. The Tao of myeloma. *Blood* 2014;124(12):1873-9.
2. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009;113(22):5412-7.
3. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009;113(22):5418-22.
4. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15(12):e538-48.
5. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007;356(25):2582-90.
6. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002;346(8):564-9.
7. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(2):100-13.
8. Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, Dagrada GP, Konn ZJ, Tapper WJ, et al. A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia* 2012;26(2):349-55.
9. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J, Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 2005;106(1):296-303.
10. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006;108(6):2020-8.
11. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 2011;471(7339):467-72.
12. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell* 2014;25(1):91-101.
13. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, Brioli A, Johnson DC, Kaiser MF, et al. Intracolon heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia* 2014;28(2):384-90.
14. Melchor L, Brioli A, Wardell CP, Murison A, Potter NE, Kaiser MF, et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia* 2014;28(8):1705-15.
15. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun* 2014;5:2997.
16. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012;481(7381):306-13.
17. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194(4260):23-8.

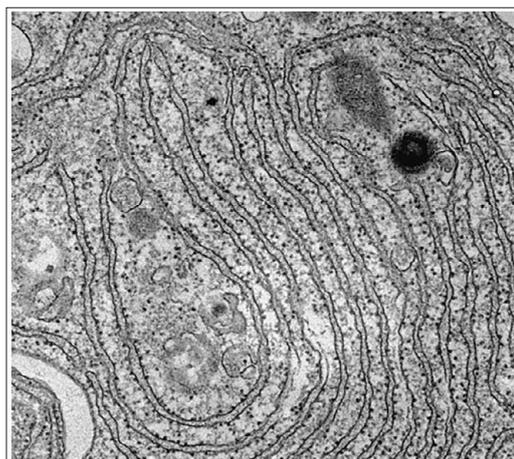
18. Landau DA, Carter SL, Getz G, Wu CJ. Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia* 2014;28(1):34-43.
19. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* 2012;120(5):1067-76.
20. Egan JB, Shi CX, Tembe W, Christoforides A, Kurdoglu A, Sinari S, et al. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood* 2012;120(5):1060-6.
21. Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Gouraud W, Lodé L, Decaux O, Godmer P, et al. Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. *Leukemia* 2013;27(2):473-8122.
22. Bianchi G, Ghobrial IM. Biological and Clinical Implications of Clonal Heterogeneity and Clonal Evolution in Multiple Myeloma. *Curr Cancer Ther Rev* 2014;10(2):70-79.
23. Weinhold N, Ashby C, Rasche L, Chavan SS, Stein C, Stephens OW, et al. Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood* 2016;128(13):1735-44.
24. van de Donk NW, Palumbo A, Johnsen HE, Engelhardt M, Gay F, Gregersen H, et al. The clinical relevance and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and related disorders: recommendations from the European Myeloma Network. *Haematologica* 2014;99(6):984-96.
25. Lopez-Corral L, Gutierrez NC, Vidriales MB, Mateos MV, Rasillo A, García-Sanz R, et al. The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells. *Clin Cancer Res* 2011;17(7):1692-700.
26. Lopez-Corral L, Sarasquete ME, Bea S, García-Sanz R, Mateos MV, Corchete LA, et al. SNP-based mapping arrays reveal high genomic complexity in monoclonal gammopathies, from MGUS to myeloma status. *Leukemia* 2012;26(12):2521-9.
27. Mikulasova A, Smetana J, Wayhelova M, Janyskova H, Sandecka V, Kufova Z, et al. Genomewide profiling of copy-number alteration in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Eur J Haematol* 2016; 97(6):568-575.
28. Davis A, Gao R, Navin N. Tumor evolution: Linear, branching, neutral or punctuated? *Biochim Biophys Acta* 2017;1867(2):151-161.
29. Sottoriva A, Barnes CP, Graham TA. Catch my drift? Making sense of genomic intra-tumour heterogeneity. *Biochim Biophys Acta* 2017;1867(2):95-100.
30. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013;19(11):1423-37.
31. Camussi G, Deregibus MC, Tetta C. Tumor-derived microvesicles and the cancer microenvironment. *Curr Mol Med* 2013;13(1):58-67.
32. Roccaro AM, Sacco A, Chen C, e Runnels J, Leleu X, Azab F, et al. MicroRNA expression in the biology, prognosis, and therapy of Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2009;113(18):4391-402.
33. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23(15):3412-20.
34. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer* 2016;16(2):110-20.
35. Cottini F, Hideshima T, Suzuki R, Tai YT, Bianchini G, Richardson PG, et al. Synthetic Lethal Approaches Exploiting DNA Damage in Aggressive Myeloma. *Cancer Discov* 2015;5(9):972-87.
36. Enriquez-Navas PM, Kam Y, Das T, Hassan S, Silva A, Foroutan P, et al. Exploiting evolutionary principles to prolong tumor control in preclinical models of breast cancer. *Sci Transl Med* 2016;8(327):327ra24.
37. Podar K, Jager D. Targeting the immune niche within the bone marrow microenvironment: The rise of immunotherapy in Multiple Myeloma. *Curr Cancer Drug Targets* 2017. doi: 10.2174/1568009617666170214103834. [Epub ahead of print].
38. Neri P, Bahlis NJ, Lonial S. New Strategies in Multiple Myeloma: Immunotherapy as a Novel Approach to Treat Patients with Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 2016;22(24):5959-5965.
39. Mateos MV, Hernandez MT, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, López Corral L, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med* 2013;369(5):438-47.
40. Dhodapkar MV, Sexton R, Waheed S, Usmani S, Papanikolaou X, Nair B, et al. Clinical, genomic, and imaging predictors of myeloma progression from asymptomatic monoclonal gammopathies (SWOG S0120). *Blood* 2014;123(1):78-85.
41. Paiva B, Vidriales MB, Rosinol L, Martínez-López J, Mateos MV, Ocio EM, et al. A multiparameter flow cytometry immunophenotypic algorithm for the identification of newly diagnosed symptomatic myeloma with an MGUS-like signature and long-term disease control. *Leukemia* 2013;27(10):2056-61.
42. Leung-Hagesteijn C, Erdmann N, Cheung G, Keats JJ, Stewart AK, Reece DE, et al. Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2013;24(3):289-304.
43. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, Petrucci MT, Pantani L, Galli M, et al. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study. *Lancet* 2010;376(9758):2075-85.
44. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H, Marit G, Caillot D, Mohty M, et al. Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristine plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005-01 phase III trial. *J Clin Oncol* 2010;28(30):4621-9.
45. Dimopoulos MA, Stewart AK, Masszi T, Špička I, Oriol A, Hájek R, et al. Carfilzomib-lenalidomide-dexamethasone vs lenalidomide-dexamethasone in relapsed multiple myeloma by previous treatment. *Blood Cancer J* 2017;7(4):e554.
46. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, White D, Grosicki S, Spicka I, et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2015;373(7):621-31.
47. Palumbo A, Gay F, Cavallo F, Di Raimondo F, Larocca A, Hardan I, et al. Continuous Therapy Versus Fixed Duration of Therapy in Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* 2015;33:3459-66.
48. Morgan GJ, Davies FE, Gregory WM, Cocks K, Bell SE, Szubert AJ, et al. First-line treatment with zoledronic acid as compared with clodronic acid in multiple myeloma (MRC Myeloma IX): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376(9757):1989-99.
49. Anderson KC. Progress and Paradigms in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 2016;22(22):5419-5427.
50. Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, Caillot D, Moreau P, Facon T, et al. Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2012;366(19):1782-91.
51. Paino T, Paiva B, Sayagues JM, Mota I, Carvalheiro T, Corchete LA, et al. Phenotypic identification of subclones in multiple myeloma with different chemoresistant, cytogenetic and clonogenic potential. *Leukemia* 2015;29(5):1186-94.



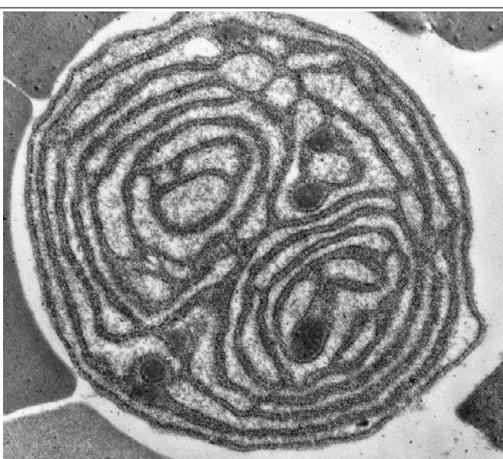
Mieloma multiplo: plasmacellula in fase quiescente al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).



Mieloma multiplo: plasmacellula in fase secretiva al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).



Sviluppo ergastoplasmatico in plasmacellule mielomatose al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).



Parole Chiave

Mieloma Multiplo, evoluzione clonale, eterogeneità genetica, SNPs array, NGS

Ringraziamenti

Fondazione Guido Berlucci per la ricerca sul Cancro, Fondazione del Monte di Bologna e Ravenna, AIRC

Indirizzi per la corrispondenza

Carolina Terragna
 Istituto di Ematologia "L.A.Seràgnoli", DIMES,
 Università degli Studi di Bologna
 Via Massarenti, 9
 40138 Bologna
 Tel.: 051 214 3832 (studio); 3791 (laboratorio)
 Fax: 051 214 4037
 E-mail: carolina.terragna@unibo.it

Leucemia acuta mieloide



Cristina Mecucci, Caterina Matteucci

Ematologia - CREO, Centro Ricerche Emato-Oncologiche, Università di Perugia

Introduzione

Nel 1976 Peter Nowell pubblicò un lavoro che rappresenta una pietra miliare nella biologia dei tumori, caratterizzati come malattie clonali in cui l'intera popolazione neoplastica deriva da una singola cellula⁽¹⁾. Il clone, composto da cellule geneticamente identiche, può andare incontro a variazioni evolutive al suo interno, con la comparsa di anomalie addizionali. Questo processo vede almeno due vie di sviluppo: l'acquisizione in sequenza di nuove mutazioni che si sovrappongono nel clone in espansione (evoluzione lineare)⁽²⁾, e l'espansione per *branching* con acquisizione di nuove anomalie in cellule che si discostano geneticamente dall'originaria e danno origine a nuovi (sub)cloni che possono espandersi autonomamente ed acquisire ulteriori mutazioni. In entrambe le vie di sviluppo viene riconosciuta una sequenzialità nell'evoluzione clonale. In accordo a tutto ciò le lesioni genetiche sono state distinte in fondanti (*driver*) e accompagnanti (*passenger*). Sebbene le ultime si sviluppino come secondarie rispetto alle lesioni fondanti, possono tuttavia giocare un ruolo determinante nell'evoluzione e selezione clonale, come pure nell'aggressività clinica, in relazione al panorama delle altre mutazioni con cui si combinano (effetto epistatico).

Ulteriori aspetti che sono stati collegati all'origine e allo sviluppo della clonalità sono: una sottostante instabilità genetica e la conseguente emergenza di cloni dominanti per un fenomeno di selezione evolutiva di tipo darwiniano, e l'idea che la cellula da cui il clone si origina sia la cosiddetta LIC (*Leukemia Initiating Cell*), la cellula da cui inizia la leucemia, la cui eliminazione sarebbe decisiva al fine di eradicare la malattia. Se all'eterogeneità clonale corrisponda una eterogeneità delle cellule staminali leucemiche è materia da definire.

Evoluzione del concetto di clonalità

In citogenetica la clonalità leucemica è definita da un minimo di due cellule mitotiche con acquisizione dello stesso cromosoma (trisomia) o con la stessa anomalia strutturale, o anche da tre cellule mitotiche con perdita dello stesso cromosoma (monosomia)⁽³⁾.

Nel sequenziamento Sanger la clonalità emerge per mutazioni che interessano il 15-20% delle cellule rispetto al totale del campione in esame⁽⁴⁾.

In genomica la clonalità leucemica viene definita attraverso l'analisi bioinformatica di milioni di sequenze a partire da DNA, anche da singole cellule. Pertanto le valutazioni quantitative vengono fatte sul DNA e la quantità di cellule viene definita sulla base di metodi computazionali che utilizzano modelli probabilistici, e algoritmi in grado di scomporre la popolazione tumorale in subcloni basandosi sull'analisi simultanea e combinata di varie tipologie di dati (variazioni nel numero di copie, profondità di lettura delle sequenze, conta delle varianti alleliche)⁽⁵⁾.

Clonalità e leucemia acuta mieloide

La leucemia acuta mieloide (LAM) è un vero e proprio paradigma di malattia clonale evolutiva, in cui una lesione fondante può essere preceduta da eventi preleucemici e/o acquisire anomalie addizionali con formazione di subcloni, sia alla diagnosi che, successivamente, in eventuali ricadute. L'evoluzione clonale costituisce in genere un meccanismo biologico di aumento della malignità, sottostante la progressione clinica.

I sequenziamenti del genoma di nuova generazione stanno aiutando a comprendere nuovi aspetti relativi alla clonalità e alla sua composizione. In particolare, lo studio di mutazioni puntiformi ha senz'altro confermato l'espansione clonale a partire da una singola cellula, ma ha anche mostrato una eterogeneità intratumorale in una stessa leucemia, compatibile con la concomitanza di più cloni, diversi sia per dimensione che per caratteristiche di malignità. Sebbene tale fenomeno sia molto più frequente nei tumori solidi, rispetto a quelli ematopoietici, anche in questi ultimi, compresa la LAM, si può assistere a fenomeni di eterogeneità clonale⁽⁶⁾. Più sorprendentemente inoltre si è dimostrata la presenza di cloni midollari in individui normali la cui dimensione correla con l'età, confermando e ampliando il concetto, noto in ematologia, secondo cui clonalità non coincide con la malignità, anche se ne è elemento fondante. Tuttavia la pre-

senza di cloni midollari silenti può essere elemento favorente lo sviluppo di leucemia. Inoltre, subcloni diversi possono corrispondere a fenotipi diversi⁽⁷⁾.

Un'altra informazione ottenuta dal sequenziamento massivo del genoma nelle LAM è la coesistenza di più di una mutazione nonché combinazioni di mutazioni diverse in una stessa leucemia. In realtà si considera che nell'origine delle LAM siano sufficienti poche mutazioni (<5), in numero decisamente inferiore a quello che si trova nei tumori solidi^(8,9). È interessante tuttavia notare che esistono leucemie, come quella *MLL* positiva, in cui il numero di mutazioni può essere inferiore; due mutazioni sembrano essere sufficienti per lo sviluppo della malattia⁽¹⁰⁾. Il basso numero di mutazioni genomiche ha fatto ipotizzare che eventi epigenetici contribuiscano in maniera rilevante allo sviluppo delle LAM. Li et al⁽¹¹⁾ hanno testato questa ipotesi valutando lo stato di metilazione a livello di singoli loci, all'interno del genoma, in un'ampia casistica di pazienti con LAM. I risultati ottenuti evidenziano l'esistenza di una eterogeneità di tipo epigenetico che non necessariamente si sovrappone, né correla con lo stato mutazionale, rendendo inverosimile l'esistenza di un profilo epigenetico intraclonale. L'ipotesi che viene avanzata è che la variazione del pattern epigenetico rappresenti una risposta a stimoli ambientali, compresi i trattamenti chemioterapici, e che non sia correlato con l'instabilità genetica sottostante lo sviluppo dei cloni con mutazioni genomiche, ma sia, piuttosto, un meccanismo parallelo alla clonalità genomica che contribuisce allo sviluppo e alla progressione leucemica con variazioni di tipo trascrizionale⁽¹¹⁾.

La coesistenza o meno di mutazioni diverse è un importante elemento di comprensione e definizione degli eventi leucemogeni sinergici e di quelli che invece si escludono vicendevolmente, arricchendo enormemente l'informazione sulla dinamica clonale nell'origine ed evoluzione leucemica, nell'enucleare entità specifiche, ma anche offrendo un'informazione cruciale per una potenziale associazione delle terapie bersaglio.

A tale proposito è evidente che le traslocazioni specifiche delle LAM non si associano fra loro, mentre una mutazione specifica come quella di *FLT3* sinergizza con leucemie diverse, inclusa la leucemia promielocitica e la leucemia *NPM+*.

Nel merito del tipo e numero di mutazioni associate alle LAM un primo modello formulato da Gilliland e Griffin⁽¹²⁾, cosiddetto *two-hit model*, ha distinto lesioni di classe I capaci di conferire un vantaggio proliferativo (es. *FLT3*-ITD o *N-RAS*), considerate eventi tardivi, e lesioni di classe II, coinvolte in processi di differenziamento (es. *PML-RARA* o *MLL*), considerati eventi iniziali. Sebbene allo stato attuale delle conoscenze il modello risulti limitato, va riconosciuta l'originalità di un'intuizione che, per la prima volta, ha messo l'accento e enucleato vie funzionali specifiche che, nella cellula leucemica, possono essere compromesse per effetto di geni diversi⁽¹³⁾. È interessante notare che proprio questo concetto si è

affermato in considerazione dei risultati del *next generation sequencing* che ha delineato un modello secondo il quale le LAM sono caratterizzate dalla presenza di mutazioni somatiche a carico di geni appartenenti a diverse categorie funzionali ed in cui i pattern di mutazione seguono traiettorie precise e articolate in step successivi che si susseguono nel tempo. In particolare, il *Cancer Genome Atlas Research Network*, sulla base di 200 casi di LAM *de novo*, tramite un approccio globale di *whole-genome* e *whole-exome sequencing*, oltre che RNA e microRNA sequencing e studio dello stato di metilazione, ha identificato 9 categorie di geni rilevanti nella patogenesi delle LAM: fusioni di fattori di trascrizione, oncosoppressori, geni del *pathway* di trasduzione del segnale, geni coinvolti nella metilazione, nel rimodellamento della cromatina, o appartenenti al complesso dello spliceosoma, fattori di trascrizione mieloide, geni del complesso della coesina, e infine il gene *NPM1*⁽¹⁰⁾.

Uno dei valori aggiunti dei sequenziamenti del genoma a partire da cellule isolate è la possibilità di determinare anche l'ordine con cui le diverse mutazioni si succedono, nonché l'evidenza che mutazioni diverse possano cooperare in alcuni tipi di leucemia, ma anche che esistano mutazioni che si escludono vicendevolmente.

Dalla citogenetica ai sequenziamenti massivi

Tra le numerose anomalie clonali che caratterizzano le LAM, la WHO⁽¹⁴⁾ mette l'accento in quelli che sono stati riconosciuti fino ad oggi come biomarcatori di entità clinico patologiche (Tabella 1). Le traslocazioni cromosomiche reciproche, che producono geni e proteine di fusione, predominano. A queste vanno aggiunte le mutazioni di *NPM1*, *CEBPA* e *RUNX1*. Queste lesioni, pertanto, sono l'esempio di anomalie fondanti che sostengono anche le ricadute. Tuttavia studi funzionali sia in vitro che in vivo hanno dimostrato la necessità di eventi addizionali al fine di ottenere l'effetto leucemogeno. A tale proposito, le complessità clonali che emergono dagli studi sul genoma sono particolarmente interessanti per ripercorrere i meccanismi e gli eventi critici nell'evoluzione clonale⁽¹⁵⁾.

Nella LAM con t(8;21) e fusione *RUNX1-RUNX1T1* l'effetto leucemogeno necessita di eventi addizionali, quali anomalie cromosomiche, mutazioni di geni coinvolti nella trasduzione del segnale, mutazioni di geni coinvolti nell'epigenetica^(16,17). Studi funzionali hanno evidenziato un effetto leucemogeno delle mutazioni di *TET2* e *PTPN11* in associazione alla t(8;21). Le anomalie cromosomiche addizionali sono presenti in circa il 70% delle leucemie *AML1-ETO* positive⁽¹⁸⁾. La più frequente è la perdita dei cromosomi sessuali, indifferentemente X o Y, in circa il 50% dei pazienti. Il fatto che entrambi i cromosomi sessuali siano affetti con uguale frequenza, indica che probabilmente i geni coinvolti in questo sottotipo di leucemia mappano nelle regioni pseudoautosomiche comuni (*PAR 1, 2 e 3*). Le altre anomalie cromosomiche più frequentemente associate

| LAM con anomalie genetiche ricorrenti |
|--|
| LAM con t(8;21)(q22;q22) |
| LAM con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22) |
| LAP con riarrangiamento di <i>RARA</i> |
| LAM con t(9;11)(p21.3;q23.3) |
| LAM con t(6;9)(p23;q34.1) |
| LAM con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2) |
| LAM megacarioblastica con t(1;22)(p13.3;q13.3) |
| LAM con riarrangiamento <i>BCR/ABL1</i> (entità provvisoria) |
| LAM con mutazione di <i>NPM1</i> |
| LAM con mutazione biallelica di <i>CEBPA</i> |
| LAM con mutazione di <i>RUNX1</i> (entità provvisoria) |

Tabella 1 - Classificazione genetica delle Leucemia Acute Mieloidi in accordo alla WHO 2016⁽¹⁴⁾

alla t(8;21) sono la delezione del 9q (circa 15% dei casi) e la trisomia 8 (5%). Fra i geni di trasduzione del segnale, *KIT* è presente in circa il 20% dei pazienti e può cambiare la prognosi relativamente benigna della leucemia. La sua attività leucemogena, in cooperazione con la t(8;21) è ampiamente dimostrata in modelli murini e su saggi colturali di cellule provenienti da sangue di cordone ombelicale umano. Altri geni frequentemente mutati sono *N-* e *K-RAS*, *FLT3* (mutazioni ITD e TKD), *CBL* e *JAK2*, che riguardano, complessivamente circa il 30% dei pazienti con t(8;21). Infine, sono anche emerse mutazioni in geni coinvolti in processi di tipo epigenetico, quali *ASXL1* (10%), *ASXL2* (20%), *IDH1* e *IDH2* (5%)⁽¹⁹⁾.

L'altra leucemia del gruppo CBF (*Core Binding Factor*) contrassegnata dalla inv(16) con fusione *CBFB-MYH11* vede la trisomia 22 come anomalia cromosomica addizionale nel 40% dei casi e la trisomia 8 nel 10-15% dei casi, la del(7q) o la trisomia 21 nel 5% dei casi. Le mutazioni di *KIT* così come quelle di *N-* e *K-RAS* si trovano in circa il 30% dei casi, mentre le mutazioni di *FLT3* (ITD e TDK) sono meno frequenti, rispettivamente 7% e 5%^(20,21).

Il panorama genomico ha prodotto un'interessante osservazione che può dare ragione delle differenze clinico-patologiche delle due leucemie CBF. Infatti a fronte di mutazioni comuni ad entrambi i sottotipi, esistono eventi cosiddetti privati che si sviluppano nel sottogruppo *RUNX1/RUNX1T1*^(20,22) (Tabella 2).

La t(15;17) è il paradigma della lesione fondante e del successo della terapia bersaglio nelle LAM. Tuttavia anche in questo caso topi transgenici nel cui compartimento mieloide veniva espresso il trascritto *PML-RARA* sviluppavano una leucemia soltanto dopo un lungo periodo di latenza, indicando che il trascritto *PML-RARA* è critico per

lo sviluppo della leucemia, sebbene non sufficiente di per sé. In altri modelli, l'espressione del trascritto di fusione reciproco *RARA-X*, svolge funzione di cooperazione con il trascritto principale, concorrendo non solo al processo leucemogeno ma anche a determinare le caratteristiche specifiche della malattia^(23,24).

L'anomalia subclonale più frequente è la trisomia 8 o la duplicazione del braccio lungo del cromosoma 8, seguita dalla delezione del cromosoma 7. Sono riportati casi di microdelezioni del cromosoma 15 e 17 in regioni prossime al *breakpoint*, o la presenza di isocromosoma i(17q)^(25,26). Dal punto di vista mutazionale, le mutazioni di *FLT3* (mutazioni del dominio tirosin-kinasico, ma soprattutto *internal tandem duplications*) sono senz'altro le più frequenti, e si verificano nel 35-45% dei casi. Altre mutazioni possono essere riscontrate a livello dei geni *WT1*, *N-* e *K-RAS*, e due membri del complesso SWI/SNF, in particolare *ARID1B* e *ARID1A*⁽²⁷⁾. Inoltre, un network di almeno 8 geni (*STAG2*, *U2AF1*, *SMC1A*, *USP9X*, *IKZF1*, *LYN*, *MYCBP2* e *PTPN11*) significativamente coesistenti con *PML-RARA* è emerso dall'analisi dell'intero esoma di leucemie promielocitiche⁽²⁸⁾.

La t(9;11) rappresenta la leucemia MLL più comune, clinicamente eterogenea anche se con andamento relativamente più benigno rispetto alle altre leucemie MLL. L'iperespressione di *EVII* (40% dei casi) ne peggiora la prognosi⁽²⁹⁾. Talvolta sono presenti anomalie cromosomiche addizionali, fra le quali la trisomia del cromosoma 8/+8q

| t(8;21)(q22;q22.1) <i>RUNX1-RUNX1T1</i> Anomalie private | Anomalie comuni | inv(16)(p13.1q22) / t(16;16)(p13.1;q22) <i>CBFB-MYH11</i> Anomalie private |
|--|-----------------|--|
| -Y | +8 / +8q | +22 |
| -X | | +11 |
| 9q- | | 7q- |
| Geni coesina | <i>KIT</i> | |
| <i>RAD21</i> | <i>N-RAS</i> | |
| <i>SMC1A</i> | <i>K-RAS</i> | |
| <i>SMC3</i> | <i>FLT3</i> | |
| <i>ASXL2</i> | | |
| <i>ASXL1</i> | | |
| <i>EZH2</i> | | |
| <i>KDM6A</i> | | |
| <i>MGA</i> | | |
| <i>DHX15</i> | | |

Tabella 2 - Leucemie CBF: anomalie genetiche comuni e private⁽¹⁹⁾

è senz'altro la più frequente (circa il 30% dei casi). Dal punto di vista molecolare, si associa a mutazioni di *N-RAS* (circa 20% dei casi) o di *FLT3* (*FLT3-TDK* 10%, *FLT3-ITD* 5%). L'analisi genomica ha rivelato pochissime mutazioni cooperanti e per lo più non significativamente ricorrenti. Inoltre, è noto che l'aggressività di questa leucemia è maggiore se la cellula di origine è una staminale ematopoietica o progenitori multipotenti rispetto a progenitori già commissionati⁽³⁰⁾. Tuttavia il panorama mutazionale è simile nei due casi, indipendentemente dall'origine cellulare.

La *t(6;9)*, seppure rara (1-2% delle LAM) è una entità distinta molto caratteristica sia sul piano morfologico che clinico e frequentemente unica aberrazione citogenetica. Tuttavia una percentuale consistente di pazienti (circa il 70%) presenta associazione con mutazione *FLT3-ITD*, che conferisce caratteristiche cliniche peculiari, quali incremento dei leucociti e della quota blastica e cattiva prognosi. In una percentuale minore di pazienti la *t(6;9)* è stata associata a mutazioni di *K-RAS* (circa 20%). Un recente studio ha inoltre messo in luce, tramite analisi di *whole-genome* e *targeted sequencing*, almeno una mutazione dei geni *WT1*, *ETV6*, *IDH1*, *GATA1*, *N-RAS*, *CUX1* e *KDM6A*, suggerendo che anche in questo caso l'evoluzione leucemica non necessita di un elevato numero di lesioni addizionali^(20,31-33).

L'inversione e la traslocazione del cromosoma 3, *inv(3)(q21q26.2)* e *t(3;3)(q21;q26.2)*, vanno oggi considerate come il capostipite della LAM con espressione aberrante di *EVII* che comprende altre traslocazioni cromosomiche, ma anche cariotipo normale. Il meccanismo molecolare sottostante si basa su un *enhancer* di *GATA2* che va incontro a trasposizione nel riarrangiamento *inv(3)* e *t(3;3)*, ed è responsabile al contempo dell'iperespressione di *EVII* e della aploinsufficienza funzionale di *GATA2*⁽³⁴⁾. Il riarrangiamento del cromosoma 3 è frequentemente associato a monosomia 7 (circa il 20% dei casi) o a cariotipo complesso (20%)⁽³⁵⁾. *EVII* è un fattore di trascrizione con un pattern di espressione specifico nelle cellule staminali più primitive (CD34+ CD38-), ed è essenziale per la regolazione del *self-renewal* della cellula staminale ematopoietica. Agisce come fattore trascrizionale e regola l'espressione di geni target, fra cui alcuni noti per il loro ruolo nell'ematopoiesi, come *GATA2*, *PBX1* e *PML*, tramite i due domini a dita di zinco situati alle estremità N-terminale e C-terminale. *EVII* è anche noto per indurre cambiamenti di tipo epigenetico, attraverso la sua diretta interazione con l'enzima istone deacetilasi. Da sola, tuttavia, l'espressione di *EVII* non è sufficiente allo sviluppo completo della leucemia e gli eventi genomici che sono stati individuati nella cooperazione sono quelli coinvolgenti *HOXA9*, *MEIS1*, e la fusione *KMT2A-MLLT3*. L'architettura clonale emersa dagli studi sul genoma vede come mutazioni ricorrenti il gene *N-RAS* (30%), *K-RAS* (15%), *PTPN11* e *SF3B1* (20%) *GATA2*, *ETV6*, *PHF6* (15%), ed infine *RUNX1*, *BCOR*, *ASXL1*, *NFI* e *IKZF1* (10%)⁽²⁰⁾.

La *t(1;22)* è stata la prima fusione genica descritta nella leucemia acuta megacarioblastica in pazienti non-Down^(36,37). I geni coinvolti sono *RBM15* (1p13.3) e *MKL1* (22q13.1-q13.2). A seguire sono stati identificati numerosi sbilanciamenti genomici (variazioni nel numero di copie, o CNV, *Copy Number Variations*). Tuttavia, il contributo determinante nella caratterizzazione di questa rara leucemia è stato dato dalla genomica con l'identificazione di fusioni fondanti in sottogruppi specifici e di eventi cooperanti⁽³⁸⁾. Risulta evidente tuttavia (Tabella 3) che le informazioni ottenute fino ad oggi riguardano l'età pediatrica, mentre molto è da spiegare in questa rara forma nell'adulto.

| | Bambini | Adulti |
|--------------------------|---------|--------|
| <i>GATA1</i> (mutazioni) | 9.2% | 4.2% |
| <i>HOX</i> | 14.9% | - |
| <i>RBM15-MKL1</i> | 10.2% | - |
| <i>NUP98-KDM5A</i> | 11.5% | - |
| <i>KTM2A-MLL</i> | 17.2% | - |
| <i>CBFA2T3-GLIS2</i> | 18.4% | - |

Tabella 3 - Fusioni nella leucemia acuta megacarioblastica⁽³⁸⁾

NPM1

Le mutazioni di *NPM1* riguardano circa un terzo dei casi di LAM. Fra le oltre 40 mutazioni descritte, la grande maggioranza riguarda l'esone 12, più raramente gli esoni 9 o 11, e sporadicamente altri esoni. Tutte funzionalmente aumentano l'export nucleare della proteina. In analogia con le altre lesioni fondanti, le mutazioni di *NPM1* non sono di per sé capaci di indurre il fenotipo leucemico. Nel 40% dei casi si associano a mutazioni *FLT3-ITD*, nel 20% a mutazione di *N-RAS*, e in circa il 20% si associano a mutazioni del complesso della coesina (*RAD21*, *SMC1A*, *SMC3*). In circa il 75% dei casi sono inoltre presenti mutazioni preleucemiche di geni coinvolti nei meccanismi di regolazione epigenetica, quali *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2*, *ASXL1*⁽³⁹⁾. In particolare, nella LAM *NPM1+* la mutazione di *DNMT3A* può rappresentare il *fil rouge* di clonalità sempre presente, dalla diagnosi, alla remissione, alla ricaduta, facendo assegnare a *DNMT3A* un ruolo di lesione clonale molto precoce (di una cellula staminale leucemica?) e a *NPM1* il ruolo di mutazione driver, ma tardiva. È interessante notare che il termine preleucemico non correla in alcun modo con manifestazioni cliniche tipo sindromi mielodisplastiche, ma sta soltanto ad indicare che nell'evoluzione clonale tali mutazioni precedono la lesione fondante, come ad esempio la mutazione di

NPM1⁽⁴⁰⁾. In accordo, le mutazioni dei geni che regolano l'epigenetica si sviluppano in cellule staminali e progenitori che mantengono le caratteristiche di totipotenza, e la leucemia si manifesta quando la mutazione di *NPM1* si aggiunge nel comparto di progenitori più tardivi, come un progenitore granulo-monocitico⁽⁴⁰⁾. La mutazione di *DNMT3A*, d'altra parte, è stato dimostrato conferire alle cellule staminali un certo grado di vantaggio proliferativo favorente l'espansione clonale⁽⁴⁰⁾.

CEBPA

Le mutazioni di *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein- α) sono specificamente presenti nelle LAM, spesso in forma biallelica. Le mutazioni di *CEBPA*, con perdita di funzione, sono sparse in tutta la sequenza codificante ma sono rappresentate essenzialmente da inserzioni/delezioni *out of frame* della regione N-terminale (che contiene i domini di transattivazione) o *in frame* della regione C-terminale che ha funzione di legame con il DNA. Nei casi con mutazione biallelica, una mutazione della regione N-terminale si associa a mutazione della regione C-terminale. Nelle LAM con mutazione biallelica, le lesioni di *CEBPA* sono in compresenza con quelle di *GATA2*, *N-RAS*, *WT1* e *CSF3R*⁽⁴¹⁾.

RUNX1

Il gene *RUNX1* è stato per ora inserito come entità provvisoria nella WHO. Le sue aberrazioni nelle LAM sono ricorrenti sia come traslocazioni, che mutazioni, che delezioni. *RUNX1*, che svolge un ruolo cruciale nell'ematopoiesi definitiva ed è necessario per la generazione, allo stadio embrionale, della cellula staminale ematopo-

ietica, riarrangia con numerosi geni in aggiunta a *RUNX1T1/ETO*. *PRDM16* nella $t(1;21)(p36;q22)$, *MECOM/EVI1* o *RPL22L1* in $t(3;21)(q26;q22)$, *CBFA2T3* in $t(16;21)(q24;q22)$ rappresentano i più frequenti partners di questo gene promiscuo⁽⁴²⁾. Le mutazioni puntiformi in *RUNX1* riguardano prevalentemente il dominio RUNT e comportano la perdita di funzionalità dovuta all'incapacità di questo fattore di trascrizione di legarsi al DNA e/o alla subunità CBF β . Sono mutazioni di tipo missenso, nonsense o *frameshift*. Sulla base delle osservazioni che le mutazioni inattivanti di *RUNX1* sono tumorigeniche, *RUNX1* è stato a lungo considerato come un gene oncosoppressore. Tuttavia, alcune leucemie ne mostrano l'amplificazione, suggerendo che un certo livello di attività è necessario e potrebbe essere vantaggioso per la progressione della malattia. Nelle LAM le mutazioni di *RUNX1* sono associate a cariotipo normale, con una frequenza che va dal 15-20% nelle SMD/LAM e LAM *de novo*, fino al 35% nelle LAM secondarie⁽⁴³⁾. Mutazioni di altri geni in possibile associazione sono *FLT3* (sia ITD che TDK), *MLL*, ma anche *ASXL1*, *CEBPA*, *DNMT3A*, *N-RAS*, *KIT*, *IDH1*, *IDH2*, *WT1*. Le mutazioni di *NPM1*, invece, sembrano essere mutualmente esclusive con quelle di *RUNX1*⁽⁴⁴⁾.

Importante ricordare che le mutazioni degli ultimi due geni, *CEBPA* e *RUNX1*, possono essere anche di natura germinale e pertanto associate a leucemie familiari in un particolare modello di sviluppo clonale che vede il primo hit leucemogeno congenito nella mutazione monoallelica e un secondo evento, acquisito, che comprende la mutazione, a livello midollare, del secondo allele o la duplicazione di quello mutato (Figura 1)^(41,45).

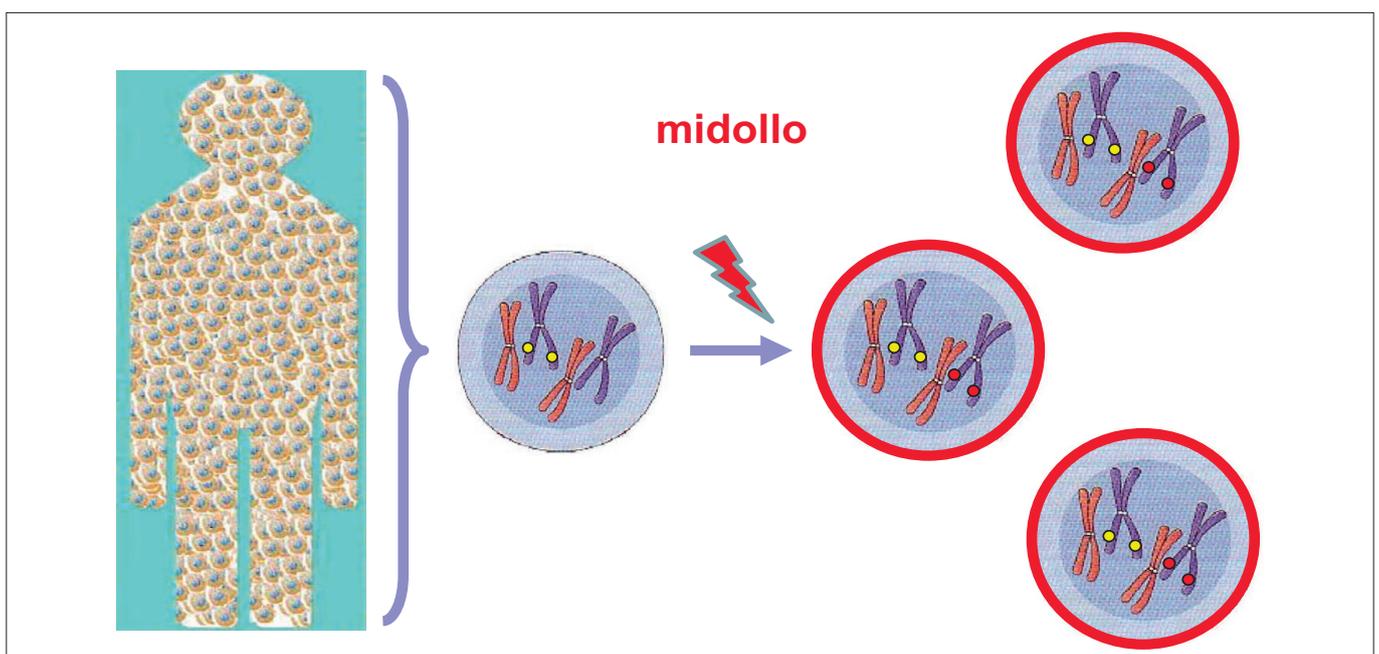


Figura 1 - Origine ed evoluzione di mutazioni familiari

Evoluzione clonale nelle LAM secondarie

La diagnosi delle LAM secondarie che si sviluppano in corso di altre neoplasie mieloidi croniche, nella fattispecie sindromi mielodisplastiche e mieloproliferative, si basa a tutt'oggi sulla citomorfologia, poiché, convenzionalmente, solo una quota di mieloblasti superiore al 20% viene definita leucemia acuta. A tale proposito tuttavia è necessario precisare che non viene attribuito particolare rilievo alla quota di blasti nel caso di diagnosi di sindrome mielodisplastica (SMD) con lesioni genetiche tipiche quali la $t(8;21)$, la $t(15;17)$, l'inv(16), o anche i riarrangiamenti di *NUP98* o *EVII*, proprio per la forza evolutiva e l'aggressività di tali cloni neoplastici, che determina una rapida comparsa (entro i 6 mesi) del fenotipo leucemico. A questo gruppo di lesioni vanno anche aggiunte le mutazioni di *NPM1* in SMD, il cui impatto clinico è fortemente indicativo dello sviluppo rapido di una LAM⁽⁴⁶⁾. Inoltre studi sulla clonalità hanno mostrato che, nonostante la quota blastica nella fase mielodisplastica sia inferiore al 20%, il clone maligno abbia in realtà dimensioni maggiori. Nel merito del tipo di mutazioni, Abdel-Wahab⁽⁴⁷⁾, analizzando 63 pazienti con LAM secondaria a disordine mieloproliferativo, ha riconosciuto in *TET2* uno dei geni più frequentemente mutato nella fase di trasformazione leucemica, mentre le mutazioni di *ASXL1* erano già presenti nella fase di disordine mieloproliferativo. Un modello di evoluzione particolare è emerso da una fusione *EWSR1-MYB* con espressione aberrante di *MYB* in una LAM secondaria in corso di mielofibrosi *JAK2*-positiva, che, mantenendo il suo assetto invariato nella fase di remissione completa della leucemia acuta con normalizzazione di *MYB*, evoca il modello di evoluzione in cui cloni diversi sostengono i due fenotipi, quello della mielofibrosi e quello della leucemia acuta⁽⁴⁸⁾ (Figura 2).

Nelle LAM evolute da SMD si riconosce chiaramente una clonalità, in quanto nella fase di leucemia acuta persiste in genere una lesione fondante associata ad uno o più subcloni in cui nuove anomalie si accompagnano alle precedenti. Così, mentre i geni con funzione epigenetica svolgono un ruolo precoce nel processo di trasformazione, le mutazioni di geni coinvolti nella trasduzione del segnale (*FLT3*, *RAS*), degli oncosoppressori (*TP53*), dei fattori di trascrizione (*MLL*, *CEBPA*, *RUNX1*) sono acquisite nel corso dell'evoluzione di malattia⁽⁴⁹⁻⁵³⁾.

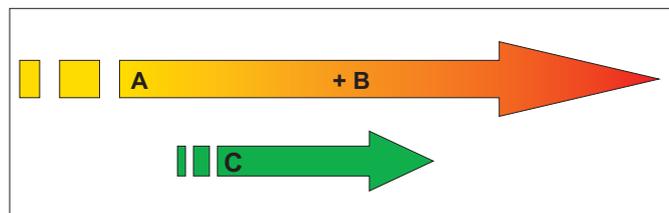


Figura 2 - Cloni indipendenti in LAM secondaria

L'esempio emblematico di leucemia secondaria in SMD è la leucemia che si sviluppa nella SMD con $del(5q)$ isolato. È noto che il clone $del(5q)$ va incontro a un'evoluzione clonale di tipo lineare sul piano citogenetico, acquisendo una o più anomalie cromosomiche aggiuntive nella maggioranza dei casi. Tuttavia i sequenziamenti di nuova generazione hanno fornito un'informazione estremamente importante nel predire una predisposizione alla progressione rappresentata dalla presenza di una mutazione di *TP53* che, a partire da un clone anche di dimensioni molto piccole, si espande nella leucemia acuta⁽⁵⁴⁾. Pertanto questo marcatore molecolare è di particolare importanza anche per la sua espansione in relazione al trattamento con lenalidomide. Accanto a *TP53* nell'evoluzione di questa leucemia secondaria sono ricorrenti anche le mutazioni di *RUNX1* e *TET2*⁽⁵⁵⁾. È descritta una elevata frequenza delle mutazioni di *RUNX1*, *MLL*, *FLT3*, *NPM1* e *N-RAS* nelle leucemie secondarie, facendo attribuire a queste variazioni un elevato effetto leucemogeno, sia che esse compaiano alla diagnosi, sia che compaiano in un momento successivo, sommandosi a mutazioni preesistenti⁽⁵⁶⁾.

Recidiva leucemica

Nella Figura 3 vengono schematizzati alcuni modelli di ricaduta che, sintetizzando le acquisizioni citogenetico-molecolari arricchite dalle analisi del genoma, vedono l'origine 1) dal clone con la lesione fondante della diagnosi ed eventuale acquisizione di anomalie aggiuntive in un'evoluzione clonale lineare (3a); 2) da un subclone già presente alla diagnosi e sopravvissuto alla terapia (3b); 3) da un subclone emergente a causa della terapia (3c); 4) da un iniziale clone preleucemico che acquisisce mutazioni dopo la terapia (3d)^(2,57).

È evidente che l'eterogeneità clonale in questi casi non prescinde dalla pressione selettiva e mutagena dei trattamenti chemioterapici. A tale proposito è importante anche notare che questi modelli non si escludono vicendevolmente ed è plausibile che la ricaduta in un singolo paziente possa emergere sulla base dell'associazione di uno o più di tali meccanismi^(57,58).

Conclusioni

Il concetto di clonalità leucemica, che ha ispirato le ipotesi patogenetiche, le classificazioni a valenza diagnostica, la stratificazione prognostica, il monitoraggio della malattia residua, e terapie bersaglio di successo, si è basato, fino ad oggi, sui marcatori citogenetico-molecolari identificati dal cariotipo, dalla FISH e dal sequenziamento genico. Le nuove tecnologie di sequenziamento massivo, oggi a disposizione, arrivando a determinare l'assetto genomico di ogni singola cellula leucemica (microscopia genetica), hanno ampliato il concetto di clonalità verso quello di architettura clonale all'interno della quale è compresa una costellazione di mutazioni distribuite in grandi e piccoli cloni. È così che, accanto alle lesioni fondanti di entità specifiche, si sono evidenziate lesioni nuove e soprattutto com-

binazioni preferenziali di lesioni che cooperano nel determinare la dinamica e la selezione clonale nelle diverse leucemie. Queste profonde conoscenze sull'evoluzione clonale delle LAM forniranno una solida base biologica per la comprensione della leucemogenesi con conseguente innovazione nella condotta terapeutica.

Molte le domande aperte intorno cui la ricerca in atto saprà dare indicazioni. Tra queste, l'individuazione delle mutazioni e, più pre-

cisamente, delle loro combinazioni, capaci, da un lato, di impartire al (sub)clone un vantaggio di crescita e/o una resistenza alle terapie, d'altro lato di interagire, operando su meccanismi cellulari la cui identificazione potrà essere di ispirazione per nuovi interventi e schemi di trattamento. Infine, il significato dei cloni minori e il loro potenziale ruolo nell'indirizzare le ricadute potrà cambiare le modalità di monitoraggio e le decisioni terapeutiche⁽⁵⁹⁾.

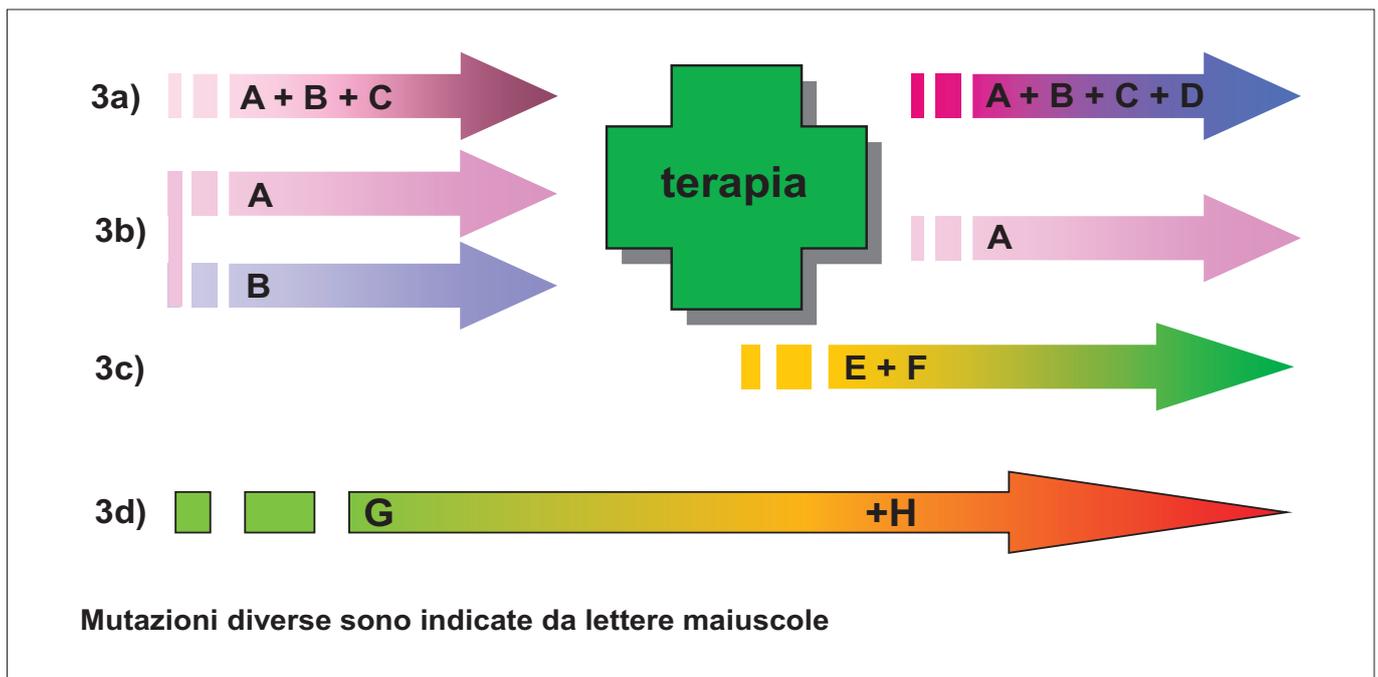
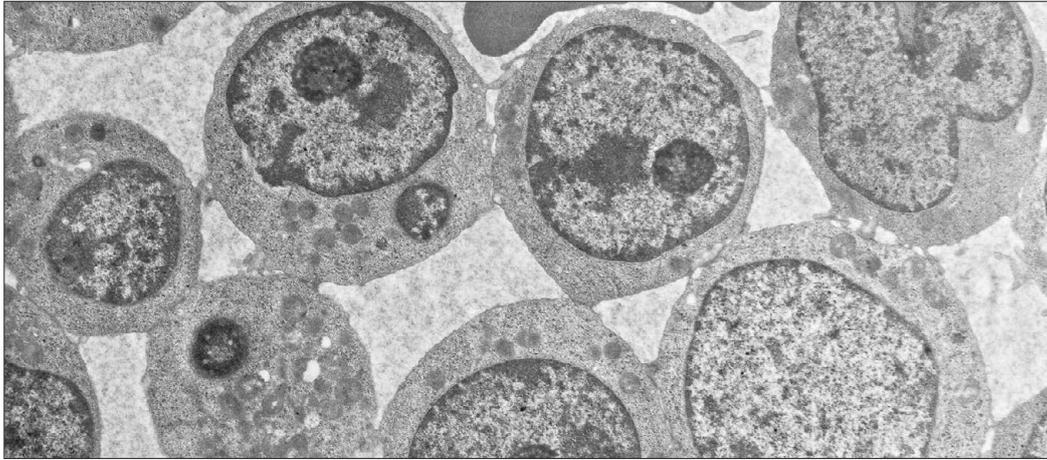


Figura 3 - Rappresentazione schematica di modelli di evoluzione clonale nelle LAM

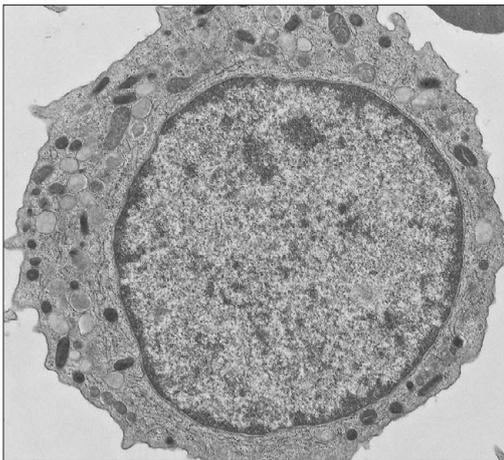
Bibliografia

- Nowell PC. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. *Science*. 1976;194(4260):23-28.
- Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-13.
- ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016). McGowan-Jordan, A. Simons, Michael Schmid editors. Karger.
- Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn*. 2010;12(4):425-32.
- Fischer A, Vázquez-García I, Illingworth CJ, Mustonen V. High-definition reconstruction of clonal composition in cancer. *Cell Reports*. 2014;7(5):1740-52.
- Grove CS, Vassiliou GS. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Disease Models & Mechanisms*. 2014;7(8):941-951.
- Klco JM, Spencer DH, Miller CA, Griffith M, Lamprecht TL, O'Laughlin M, et al. Functional heterogeneity of genetically defined subclones in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2014;25(3):379-392.
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24.
- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214-8.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-74.
- Li S, Garrett-Bakelman FE, Chung SS, Sanders MA, Hricik T, Rapaport F, et al. Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. *Nat Med*. 2016;22(7):792-9.
- Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002;100(5):1532-42.
- Kitamura T, Watanabe-Okochi N, Enomoto Y, Nakahara F, Oki T, Komeno Y, et al. Novel working hypothesis for pathogenesis of hematological malignancies: combination of mutations-induced cellular phenotypes determines the disease (cMIP-DD). *J Biochem*. 2016;159(1):17-25.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
- Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2015;127(1):29-41.
- Hatlen MA, Arora K, Vacic V, Grabowska EA, Liao W, Riley-Gillis B, et al. Integrative genetic analysis of mouse and human AML identifies cooperating disease alleles. *J Exp Med*. 2016;213(1):25-34.

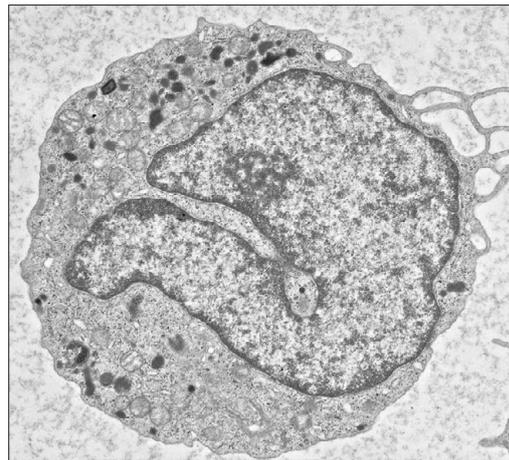
17. Lin S, Mulloy JC, Goyama S. RUNX1-ETO Leukemia. *Adv Exp Med Biol.* 2017;962:151-173.
18. Sangle NA, Perkins SL. Core-binding factor acute myeloid leukemia. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(11):1504-9.
19. Metzeler KH, Bloomfield CD. Clinical Relevance of RUNX1 and CBFβ Alterations in Acute Myeloid Leukemia and Other Hematological Disorders. *Adv Exp Med Biol.* 2017;962:175-199.
20. Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol.* 2017;35(9):934-946.
21. Reilly JT. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br J Haematol.* 2005;128(1):18-34.
22. Faber ZJ, Chen X, Gedman AL, Boggs K, Cheng J, Ma J, et al. The genomic landscape of core-binding factor acute myeloid leukemias. *Nat Genet.* 2016;48(12):1551-1556.
23. Pandolfi PP. Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Hum Mol Genet.* 2001;10(7):769-75.
24. Vitoux D, Nasr R, de The H. Acute promyelocytic leukemia: new issues on pathogenesis and treatment response. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(6):1063-70.
25. Gómez-Seguí I, Sánchez-Izquierdo D, Barragán E, Such E, Luna I, López-Pavía M, et al. Single-nucleotide polymorphism array-based karyotyping of acute promyelocytic leukemia. *PLoS One.* 2014;9(6):e100245.
26. Slack JL, Arthur DC, Lawrence D, Mrózek K, Mayer RJ, Davey FR, et al. Secondary cytogenetic changes in acute promyelocytic leukemia--prognostic importance in patients treated with chemotherapy alone and association with the intron 3 breakpoint of the PML gene: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 1997;15(5):1786-95.
27. Madan V, Shyamsunder P, Han L, Mayakonda A, Nagata Y, Sundaresan J, et al. Comprehensive mutational analysis of primary and relapse acute promyelocytic leukemia. *Leukemia.* 2016;30(8):1672-81.
28. Ibáñez M, Carbonell-Caballero J, García-Alonso L, Such E, Jiménez-Almazán J, Vidal E, et al. The Mutational Landscape of Acute Promyelocytic Leukemia Reveals an Interacting Network of Co-Occurrences and Recurrent Mutations. *Plos One.* 2016;11(2):e0148346
29. Gröschel S, Schlenk RF, Engelmann J, Rockova V, Teleanu V, Kühn MW, et al. Deregulated expression of EVI1 defines a poor prognostic subset of MLL-rearranged acute myeloid leukemias: a study of the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group and the Dutch-Belgian-Swiss HOVON/SAKK Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 2013;31(1):95-103.
30. George J, Uyar A, Young K, Kuffler L, Waldron-Francis K, Marquez E, et al. Leukaemia cell of origin identified by chromatin landscape of bulk tumor cells. *Nat Commun.* 2016;7:12166.
31. Visconte V, Shetty S, Przychodzen B, Hirsch C, Bodo J, Maciejewski JP, et al. Clinicopathologic and molecular characterization of myeloid neoplasms with isolated t(6;9)(p23;q34). *Int J Lab Hematol.* 2017 Mar 20. doi: 10.1111/ijlh.12641.
32. Oancea C, Rüster B, Henschler R, Puccetti E, Ruthardt M. The t(6;9) associated DEK/CAN fusion protein targets a population of long-term repopulating hematopoietic stem cells for leukemogenic transformation. *Leukemia.* 2010;24(11):1910-9.
33. DiNardo CD, Cortes JE. Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016;2016(1):348-355.
34. Hinai A, Valk PJM. Aberrant EVI1 expression in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology.* 2016;172(6):870-878.
35. De Braekeleer M, Le Bris MJ, De Braekeleer E, Basinko A, Morel F, Douet-Guilbert N. 3q26/EVI1 rearrangements in myeloid hemopathies: a cytogenetic review. *Future Oncol.* 2015;11(11):1675-86.
36. Ma Z, Morris SW, Valentine V, Li M, Herbrick JA, Cui X, et al. Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2001;28(3):220-1.
37. Duchayne E, Fenneteau O, Pages MP, Saintry D, Arnoulet C, Dastugue N, et al. Acute megakaryoblastic leukaemia: a national clinical and biological study of 53 adult and childhood cases by the Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC). *Leuk Lymphoma.* 2003;44(1):49-58.
38. De Rooij JDE, Branstetter C, Ma J, Li Y, Walsh MP, Cheng J, et al. Pediatric non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia is characterized by distinct genomic subsets with varying outcomes. *Nat Genet.* 2017;49(3):451-456.
39. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374(23):2209-2221.
40. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature.* 2014;506(7488):328-33.
41. Tawana K, Wang J, Renneville A, Bödör C, Hills R, Loveday C, et al. Disease evolution and outcomes in familial AML with germline CEBPA mutations. *Blood.* 2015;126(10):1214-23.
42. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Férec C, De Braekeleer M. RUNX1 translocations and fusion genes in malignant hemopathies. *Future Oncol.* 2011;7(1):77-91.
43. Osato M. Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene.* 2004;23(24):4284-96.
44. Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood.* 2017;129(15):2070-2082.
45. Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, Philippe N, Roche-Lestienne C, Boissel N, et al. High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood.* 2009;113(22):5583-7.
46. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Alpermann T, Dicker F, Sundermann J, et al. Characterization of NPM1-mutated AML with a history of myelodysplastic syndromes or myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2011;25(4):615-21.
47. Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res.* 2010;70(2):447-52.
48. Pierini T, Di Giacomo D, Pierini V, Gorello P, Barba G, Lema Fernandez AG, et al. MYB deregulation from a EWSR1-MYB fusion at leukemic evolution of a JAK2 (V617F) positive primary myelofibrosis. *Mol Cytogenet.* 2016;9(1):68-73.
49. Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2012;366(12):1090-8.
50. Shih LY, Huang CF, Wang PN, Wu JH, Lin TL, Dunn P, et al. Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2004;18(3):466-75.
51. Chen CY, Lin LI, Tang JL, Ko BS, Tsay W, Chou WC, et al. RUNX1 gene mutation in primary myelodysplastic syndrome--the mutation can be detected early at diagnosis or acquired during disease progression and is associated with poor outcome. *Br J Haematol.* 2007;139(3):405-14.
52. Jasek M, Gondek LP, Bejanyan N, Tiu R, Huh J, Theil KS, et al. TP53 mutations in myeloid malignancies are either homozygous or hemizygous due to copy number-neutral loss of heterozygosity or deletion of 17p. *Leukemia.* 2010;24(1):216-9.
53. Kaeferstein A, Krug U, Tiesmeier J, Aivado M, Faulhaber M, Stadler M, et al. The emergence of a C/EBPα mutation in the clonal evolution of MDS towards secondary AML. *Leukemia.* 2003;17(2):343-9.
54. Jädersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Göhring G, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):1971-9.
55. Scharenberg C, Giai V, Pellagatti A, Saft L, Dimitriou M, Jansson M, et al. Progression in patients with low- and intermediate-1-risk del(5q) myelodysplastic syndromes is predicted by a limited subset of mutations. *Haematologica.* 2017;102(3):498-508.
56. Dicker F, Haferlach C, Sundermann J, Wendland N, Weiss T, Kern W, et al. Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML. *Leukemia.* 2010;24(8):1528-32.
57. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2012;481(7382):506-510.
58. Sykes SM, Kokkalis KD, Milsom MD, Levine RL, Majeti R. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 2015;43(12):989-92.
59. Meyer SC, Levine RL. Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 2014;15(9):e382-94.



LMA-M0: blasti mieloidi al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).



LMA-M1: blasto mieloidi al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).



LMA-M4: monoblasto al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).

Parole Chiave

Leucemia Acuta Mieloidi, Clonalità, Genomica

Indirizzi per la corrispondenza

Cristina Mecucci
Ematologia Università di Perugia
CREO, piazza Menghini 9 06124 Perugia
Tel.: 075 578 3808
Fax: 075 578 3691
E-mail: cristina.mecucci@unipg.it

La rivista è consultabile anche sui siti web:

Fondazione Matarelli

www.fondazionematarelli.it

Società Italiana di Ematologia (SIE)

www.siematologia.it

Società Italiana di Ematologia Sperimentale (SIES)

www.siesonline.it

Fondazione Beat Leukemia Dr Alessandro Cevenini

www.beat-leukemia.com

Nel prossimo numero: Anno 4 - Numero 3 - 2017

Nuove strategie di immunoterapia

Immunobiologia: recenti progressi

Linfomi maligni

Mieloma multiplo

Leucemie acute

Leucemia linfoblastica acuta dell'adulto

Con il supporto non condizionato di

