

# “Cromosomi e geni”

**Nona Giornata Fiorentina  
dedicata ai pazienti con  
malattie mieloproliferative  
croniche**

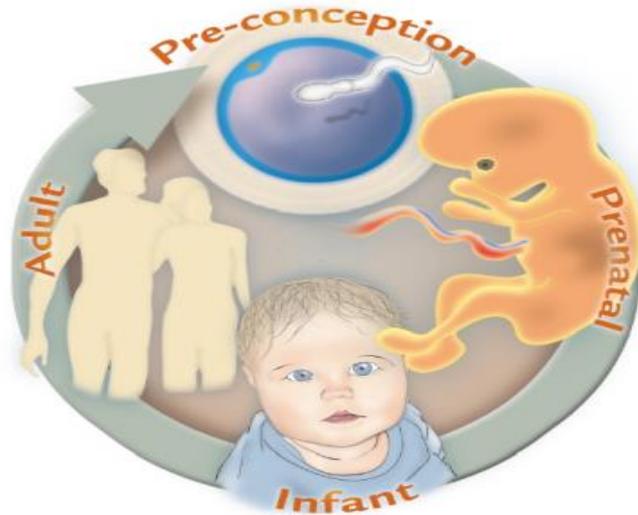
**Sabato 20 maggio 2023**

*Elisabetta Pelo*

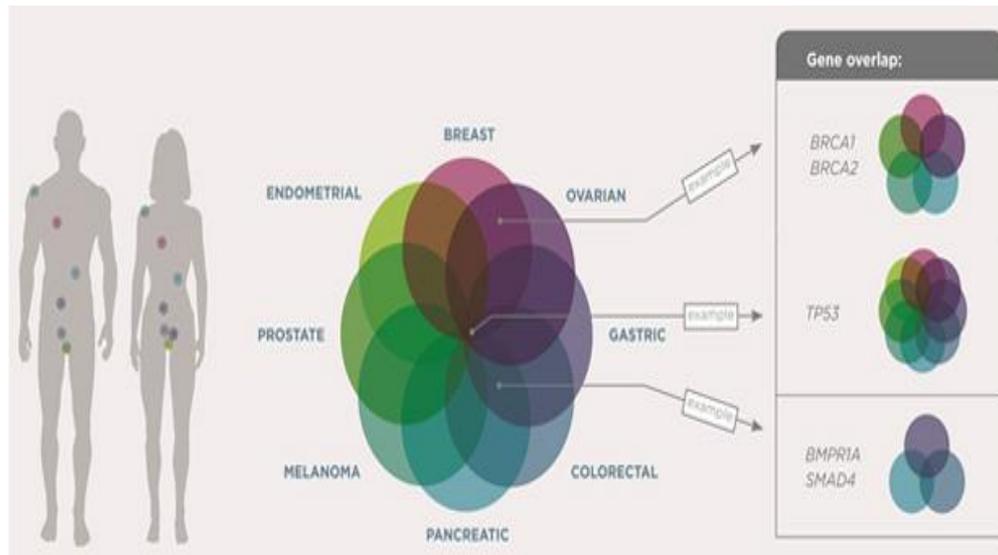
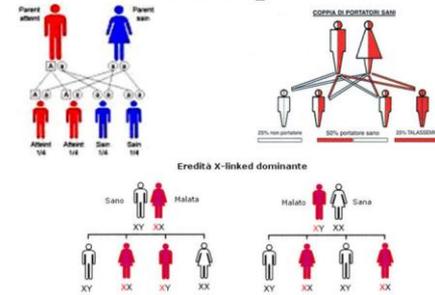
*SOD Diagnostica Genetica*

*Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi*





### Malattie genetiche, esempi trasmissioni genetiche



## **OGNI individuo è diverso dall'altro**

Ogni individuo della specie umana (esclusi i gemelli monozigoti) nasce e rimane **geneticamente diverso** dagli altri. Ciò vale per gran parte degli individui appartenenti alle specie eucarioti.

Questo si traduce in risposte diverse agli stimoli ambientali e permette l'evoluzione degli individui con le caratteristiche migliori.



**eterogeneità genetica**

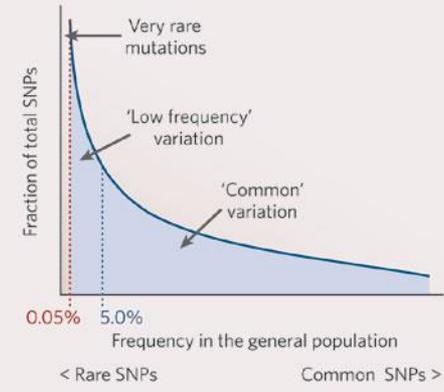
TC TCG ATATAGC TC GCG ACAC AC ACAG ATATAGC GTAGGG CTC TCG ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATATAG CGC TC C CTG AAACAG C  
 TC C GAC AC AGC TCG C AC ACC G CTC GAG ACC TG ACC TGAC AC G TG C TAG CTAGC TCC TCTC GAG GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC GCG AC  
 AC ACAC AG ATATATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G A  
 GAC GTAGGG CTC TC G ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATATAG CGC TC CCTG AAACAG CTC CG ACAC AG C TCG CAC AC C GC TCG AGAC CTTA  
**T**AGC TCC TC TCG AGAC GTAGGG CTC TCG ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATTATAGC TCG C GAC AC ACAC AG ATATATAGCG TAG GGC T  
 CTC GATATAGC TCG C GAC AC ACAC AG ATATATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TCG AG ACC TGAC CTG AC ACG TG  
 CTAGC TAGC TCC TC TCG ACG AGAC GTAGGG CTC TC G ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATATAG CGC TC CCTG AAACAG CTC CG ACAC AG C T  
 CG C AC ACC G CTC GAG ACC TG ACC TGAC AC G TG C TAG CTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TCG CG ACAC AC ACAG ATATATA  
 GCG CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G AG ACC TTAGCTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC GCG AC  
 AC ACAC AG ATATATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G A  
 GAC GTTATAGC TCG C GAC AC ACAC AG ATATATAGC G TAG GGC TC TCG **A** ATATAGC TC G CG ACAC AC ACAG ATATATAG CGC TCC C TGAAAC AGC T  
 CC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TCG AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G AG ACG TAG GGC TCTC  
 CAC AC AGA ATATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TCG AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G AG ACG TAG GGC TCTC  
 ACG TAG GG **Predisposing** AC AC AC ACAG ATATATAGC G CTC TCC TG AAAC AGC TC C GAC AC AGC TCG C AC A  
 CTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC GCG ACAC AC ACAG ATATATAGC G CTC TCC TG AAAC AGC TC C  
 CGC TC G AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G AG ACG TAG ACG TAG GGC TCTC GATATAGC TCG C GAC AC ACAC  
**Pathogenic** CTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC GCG ACAC AC ACAG ATATATAGC G CTC TCC TG AAAC AGC TC C  
 CGC TC G AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G AG ACG TAG GGC TCTC GATATAGC TCG C GAC AC ACAC  
 GC TCTC GATATAGC TCG C GAC AC ACAC AG ATATATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G  
 GTG CTAGC TAGC TCC TC TCG ACG AGAC GTAGGG CTC TC G ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATATAG CGC TC CCTG  
 GC TCG C AC ACC G CTC GAG ACC TG ACC TGAC AC G TG C TAG CTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC G  
 ATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TCG AG ACC TTAGCTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GG C  
 GAC AC ACAC AG ATATATAGC G CTC **C** CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G AG ACC TGAC CTG AC ACG T  
 CG AGAC GTAGGG CTC TCG ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATATAG CG TAG GGC TCTC GATATAGC TCG C GAC AC A  
 TCC CTG AAACAG CTC CG ACAC AG C TC G CAC AC C GC TCG AGAC CTG ACC TG ACAC GTG CTAGC TAG C TCC TC TCG ACG A  
 TATAGC TC G CC TCG C GAC AC ACAC AG ATATATAGC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC G CG ACAC AC ACAG ATATATAG C  
 CC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TCG AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G AG ACG TAG GGC TCTC  
 CAC AC AGAT ATATAG CGC TC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G AG ACG TAG GGC TCTC GATATAGC TCG C GAC AC ACAC  
 CTG AAACAG CTC CG ACAC AG C TC G CAC AC C G C TCG AGAC CTG ACC TG ACAC GTG CTAGC TAG C TCC TC TCG AGAC GTAGGG CTC TCG ATATAGC  
 TC G CG ACAC AC ACAG ATATATAGC G CTC TCC TG AAAC AGC TC C GAC AC AGC TCG C AC ACC G CTC GAG ACC TG ACC TGAC AC G TG C TAG CTAGC TC  
 CTC TC G AG ACG TAG GGC TCTC GATATAGC TCG C GAC AC ACAC AG ATATATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G A  
 GAC CTG ACC TG ACAC GTG CTAGC TAG C TCC TC TCG AGAC GTAGGG CTC TC G ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATATAG CGC TC CCTG AAAC  
 AGC TC C GAC AC AGC TCG C AC ACC G CTC GAG ACC TG ACC TGAC AC G TG C TAG CTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC G CG AC  
 AC ACAC AG ATATATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G A  
 GAC GTAGGG CTC TC G ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATATAG CGC TC CCTG AAACAG CTC CG ACAC AG C TCG CAC AC C GC TCG AGAC CTTA  
 CC TGAC AC G TG C TAG CTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC GCG ACAC AC ACAG ATATATAGC G CTC TCC TG AAAC AGC TC C G  
 AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G AG ACG TAG GGC TCTC GATATAGC TCG C GAC AC ACAC A

**Predisposing**

**Pathogenic**

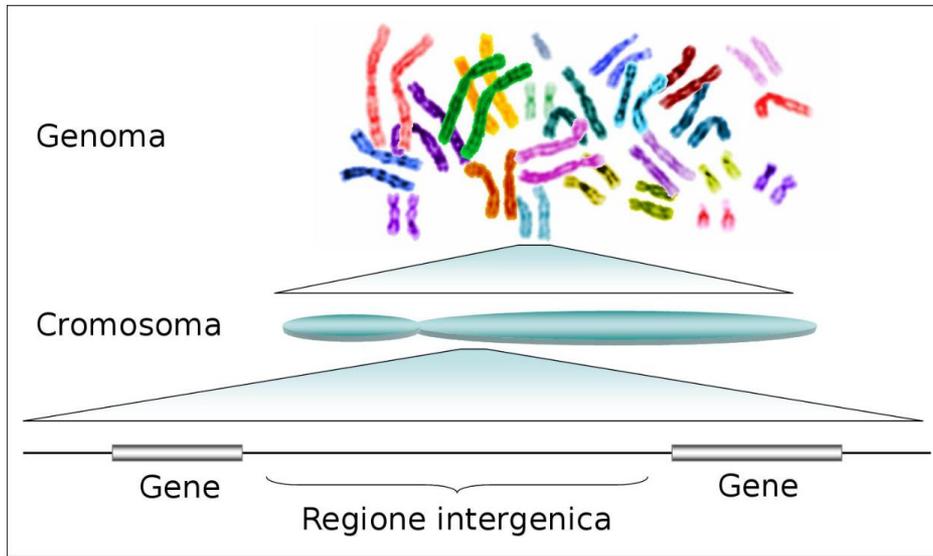
**Neutral**

GENETIC VARIATION IN HUMANS  
 Variation is measured by single nucleotide polymorphisms (SNPs).



Frequenza SNPs:  
 1/1000basi

## IL GENOMA

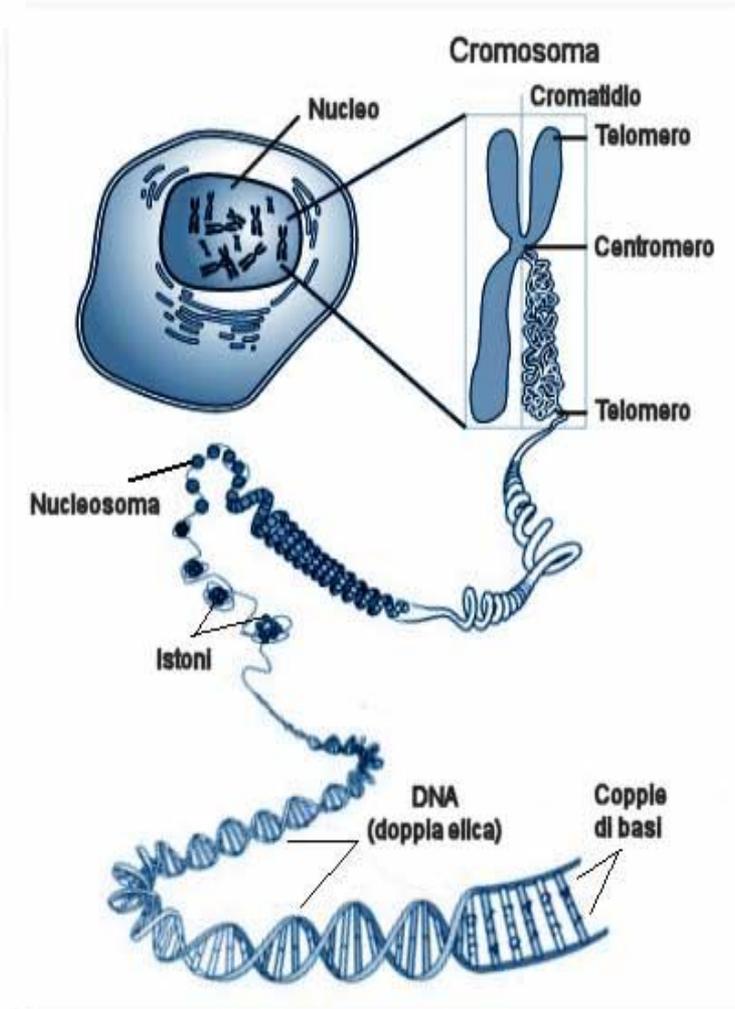


## *Genotipo e Fenotipo*



- **Fenotipo:** l'insieme della caratteristiche visibili di un individuo
- **Genotipo:** l'insieme delle informazioni genetiche trasmesse dai genitori ai figli
- **Carattere:** una caratteristica fenotipica

## ..un po' di terminologia.....



- il patrimonio genetico: **genoma**
- l'informazione genetica: **gene**
- dove sono localizzati i geni: **cromosomi**
- la posizione sul cromosoma del gene: **locus**
- le forme alternative di informazione: **alleli**

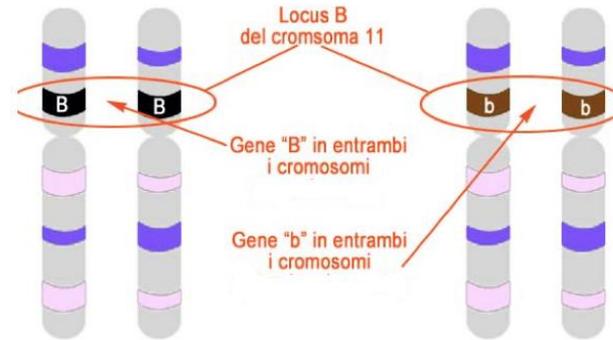
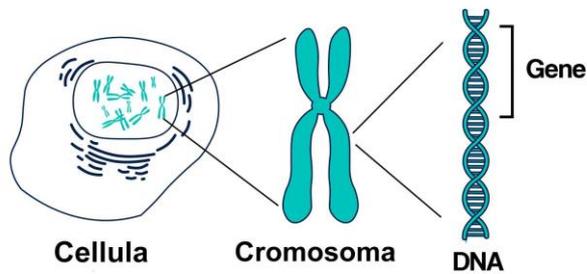
# OMIM<sup>®</sup> - Online Mendelian Inheritance in Man<sup>®</sup>



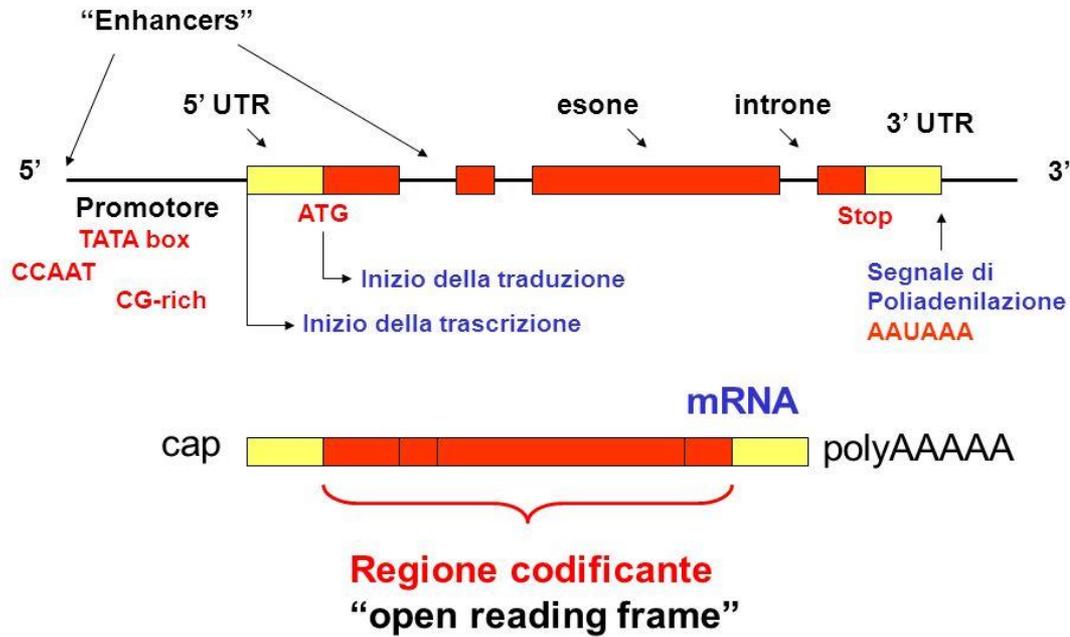
## OMIM Entry Statistics

Number of Entries in OMIM (Updated May 17th, 2023) :

| MIM Number Prefix  | Autosomal | X Linked | Y Linked | Mitochondrial | Totals |
|--|-----------|----------|----------|---------------|--------|
| Gene description <sup>*</sup>  | 16,159    | 767      | 51       | 37            | 17,014 |
| Gene and phenotype, combined <sup>+</sup>                            | 25        | 0        | 0        | 0             | 25     |
| Phenotype description, molecular basis known <sup>#</sup>            | 6,233     | 375      | 5        | 34            | 6,647  |
| Phenotype description or locus, molecular basis unknown <sup>%</sup> | 1,391     | 112      | 4        | 0             | 1,507  |
| Other, mainly phenotypes with suspected mendelian basis              | 1,645     | 102      | 3        | 0             | 1,750  |
| Totals   | 25,453    | 1,356    | 63       | 71            | 26,943 |



## Struttura dei geni degli eucarioti



# 1) ORIGINE DELLE MUTAZIONI

## ❖ SPONTANEE:

- ✓ errori di duplicazione o modificazioni chimiche del DNA spontanee
- ✓ Tasso di mutazione spontanea (m. puntiformi) nell'uomo si stima sia di  $1/10^{-9}$  -  $1/10^{-11}$

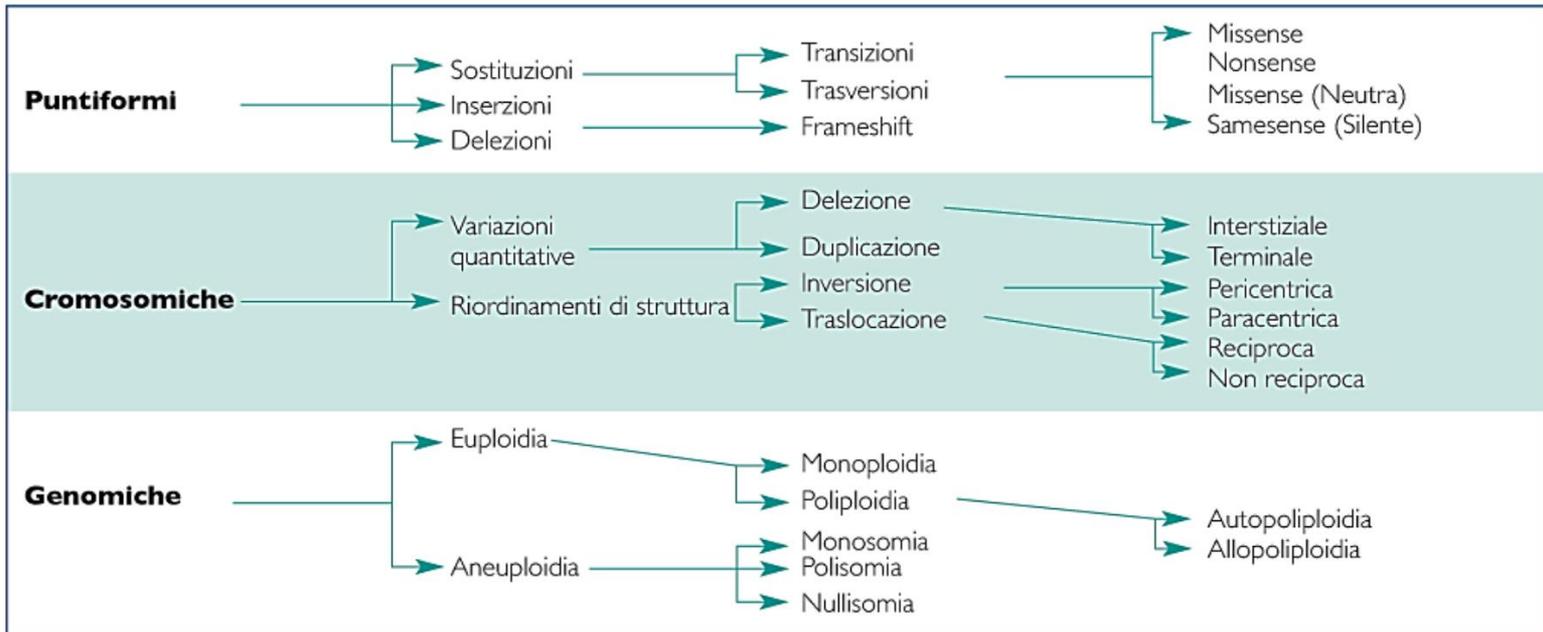
## ❖ INDOTTE

- ✓ AGENTI MUTAGENI: CHIMICI e FISICI, come agenti intercalanti, alchilanti o analoghi delle basi oppure radiazioni U.V. e ionizzanti (raggi X e gamma).

# MUTAZIONI: Tipi, Origini, Conseguenze

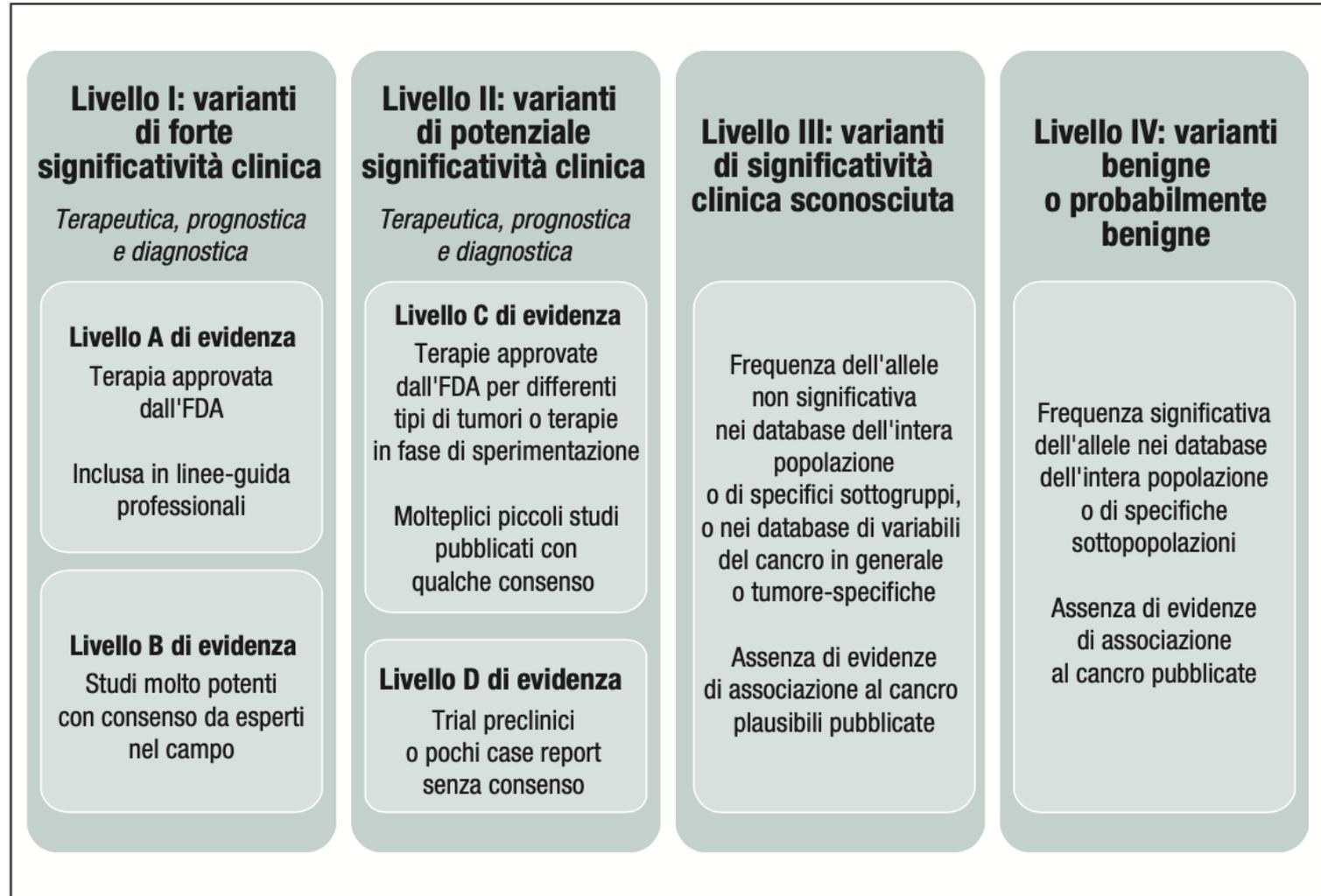
## Conseguenze

### Mutazioni puntiformi



**Tabella 10.1** Classificazione semplificata di diversi tipi di mutazioni.

**Figura 4.1 • Classificazione delle varianti somatiche dell'AMP<sup>4</sup>**



# Tumori e Genetica

- **Geni con diverse funzioni**
  - Controllo del ciclo cellulare
  - Inibizione da contatto
  - Controllo dell' apoptosi
  - Riparazione del DNA
- **Mutazioni con diversi effetti**
  - Acquisizione di funzione (“gain of function”)
  - Perdita di funzione (“loss of function”)
  - Effetto dominante negativo
  - Anomalie cromosomiche
  - Amplificazione genica

# **TIPO DI CELLULE COLPITE**

## **a) MUTAZIONI in cellule SOMATICHE**

### **INDIVIDUO: MOSAICO GENETICO**

es: tumore oppure colore occhio azzurro e scuro

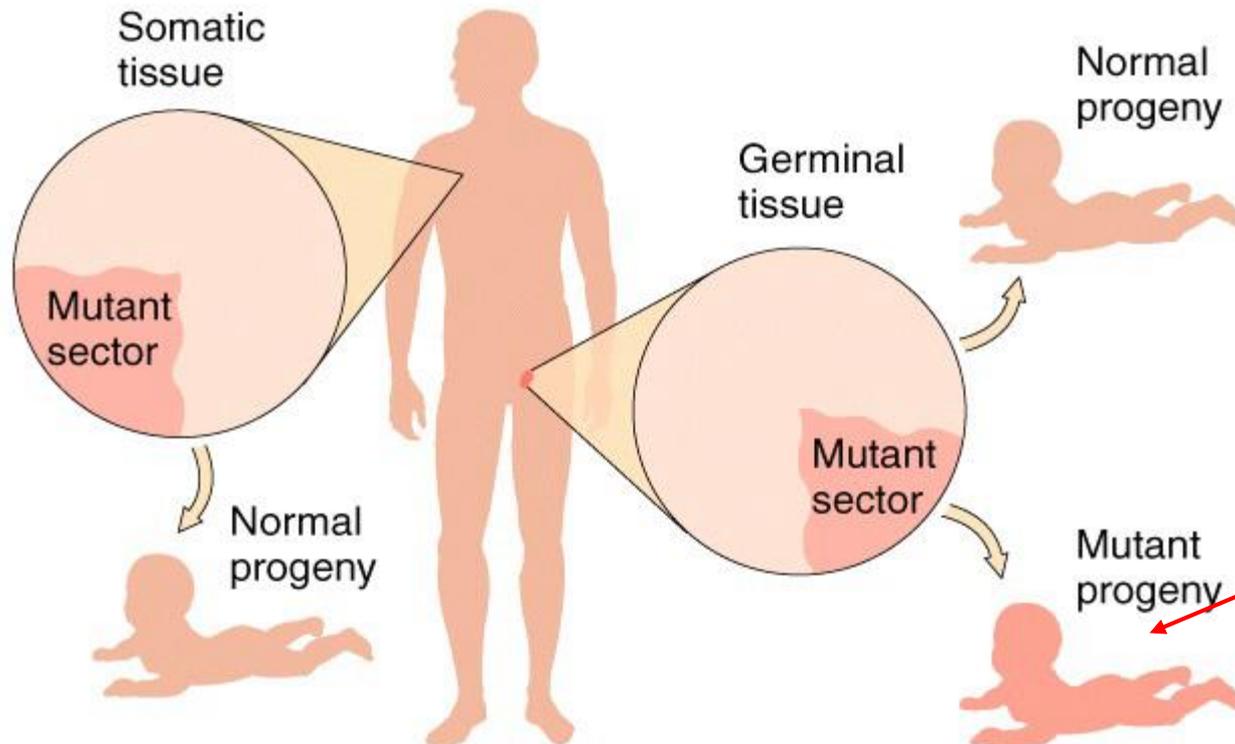
**Individui che presentano 2 o più tipi cellulari geneticamente distinti derivati da un unico zigote.**

## **b) MUTAZIONI in cellule GERMINALI**

**Trasmesse alla progenie**

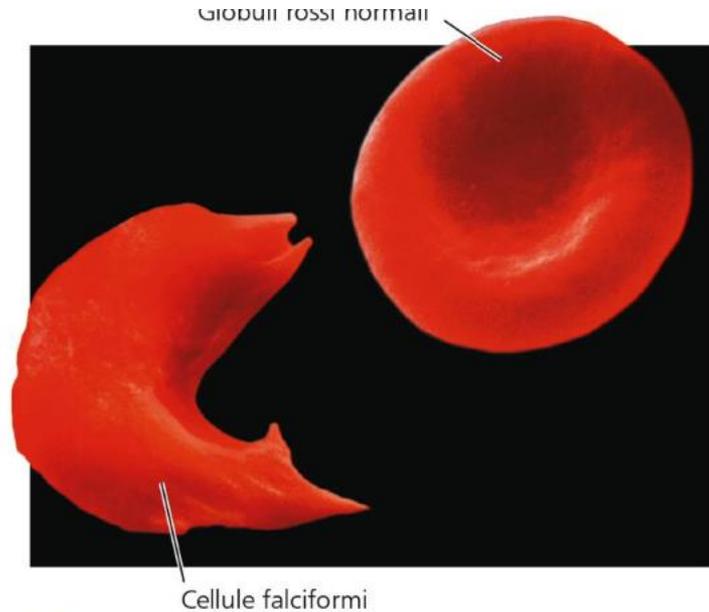
# Mutazioni germinali

Mutazioni germinali possono presentarsi in tutte le cellule germinali o solo in una proporzione di esse (mosaicismo germinale) a seconda dello stadio di sviluppo dell'embrione in cui sono avvenute, e una volta trasmesse alla prole diventano "stabili"



Tutte le cellule (tutte le germinali + tutte le somatiche) portano la mutazione

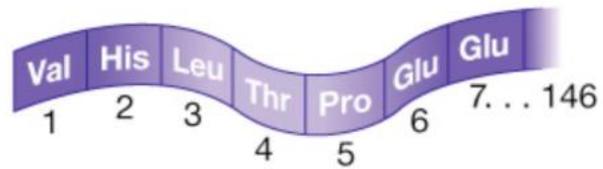
# ANEMIA FALCIFORME



SEM 18 000X



(a) Globulo rosso normale

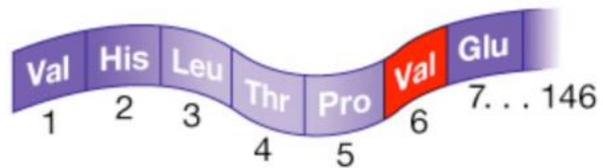


Emoglobina normale

SEM 18 000X



(b) Globulo rosso falciforme



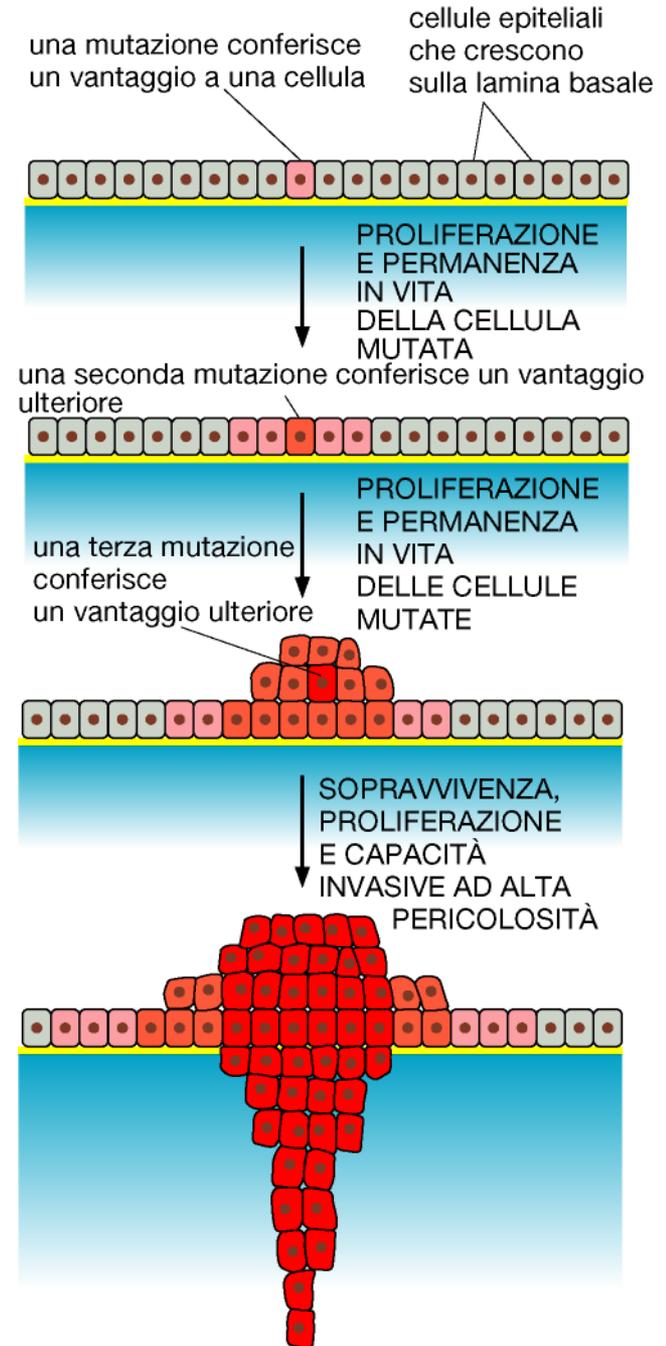
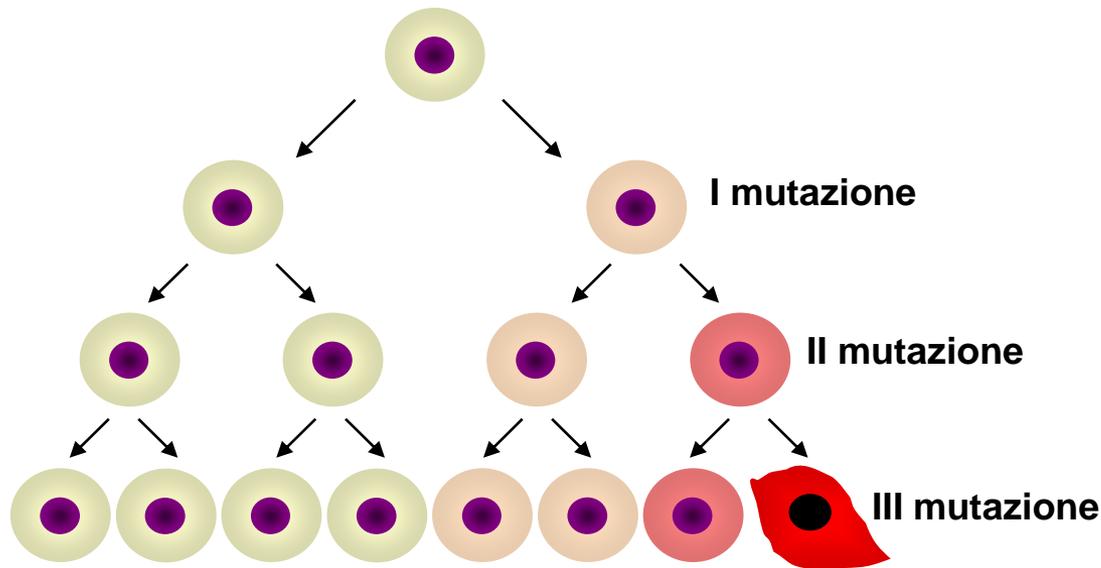
Emoglobina falciforme

# Mutazioni germinali e somatiche

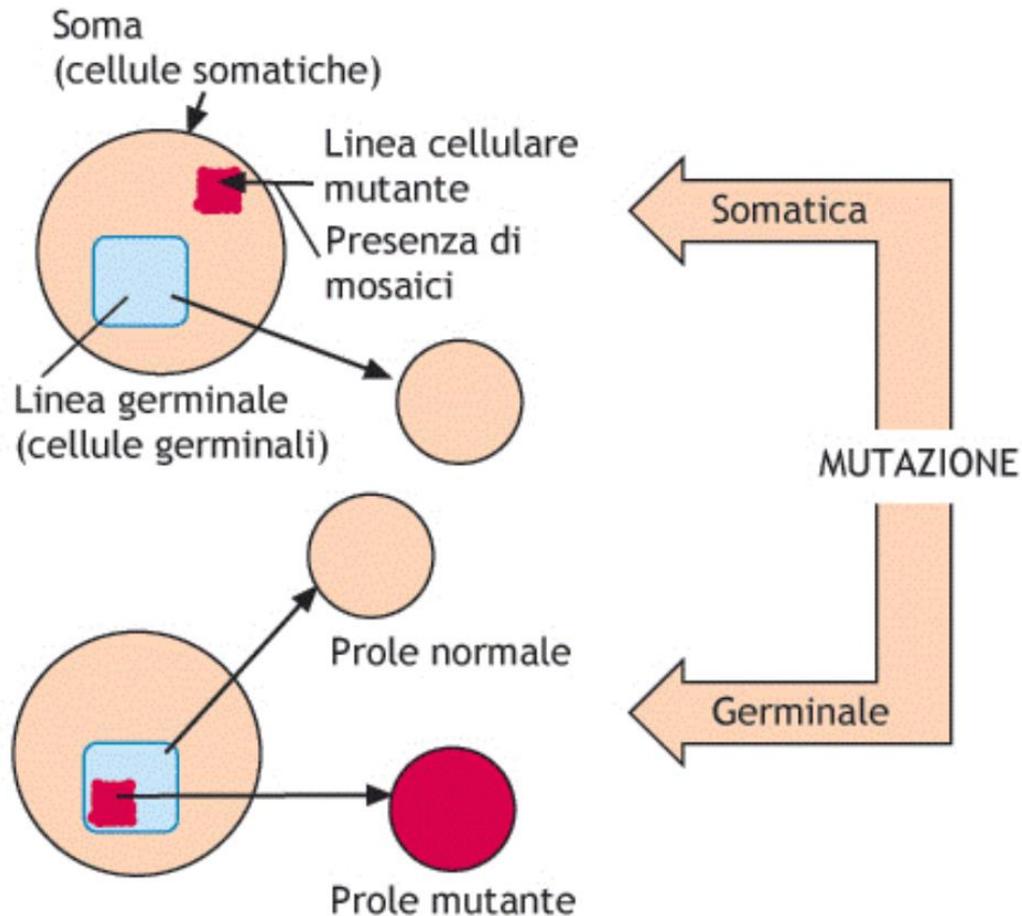
Per quanto riguarda la *sede* della mutazione è necessario distinguere:

- a) *mutazioni germinali* che colpiscono i gameti e possono essere trasmesse alla prole
  
- b) ***mutazioni somatiche*** che colpiscono le cellule somatiche e si esauriscono nell'individuo. La mutazione viene trasmessa attraverso la mitosi alla progenie della cellula colpita in origine = l'individuo sarà un mosaico

# EVOLUZIONE CLONALE: Accumulo di mutazioni multiple sequenziali di una singola cellula e della sua progenie



# MUTAZIONI: Tipi, Origini, Conseguenze



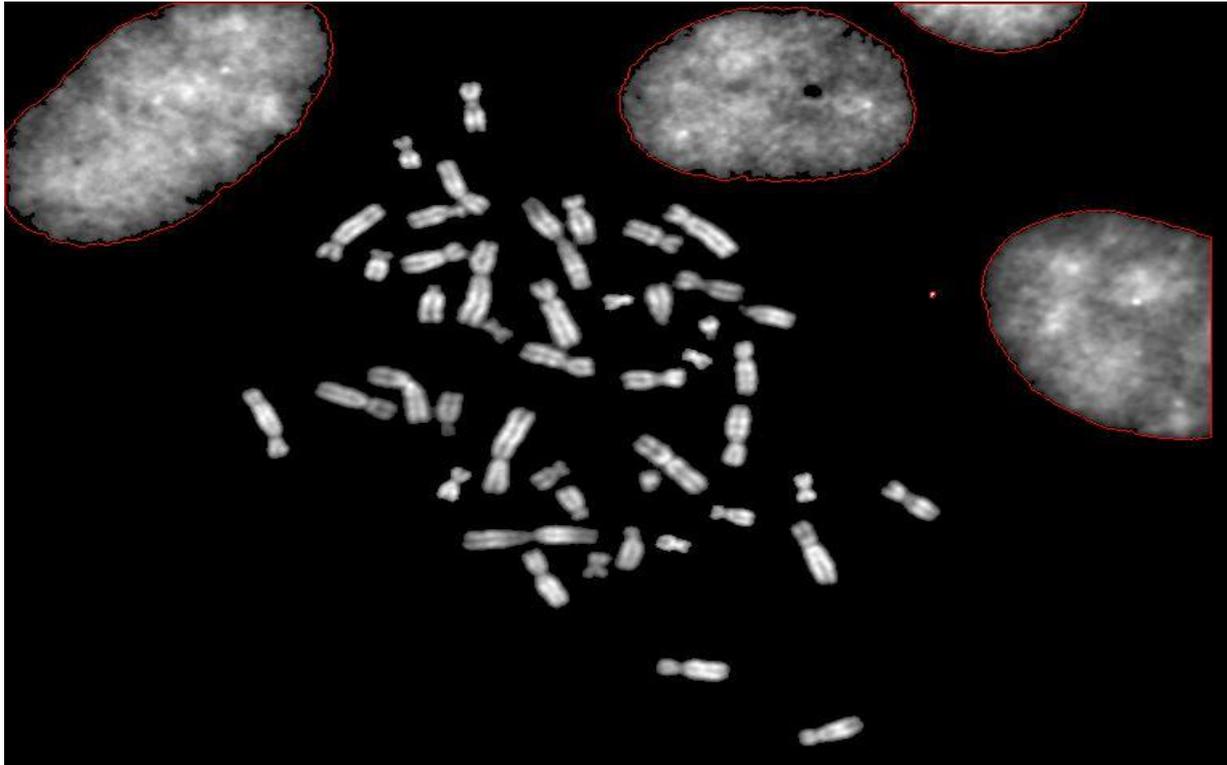
**Figura 10.2** La mutazione può verificarsi in una qualsiasi cellula in qualsiasi momento. Rappresentazione schematica del tipo di mutazione, somatica o germinale, e rispettive conseguenze.

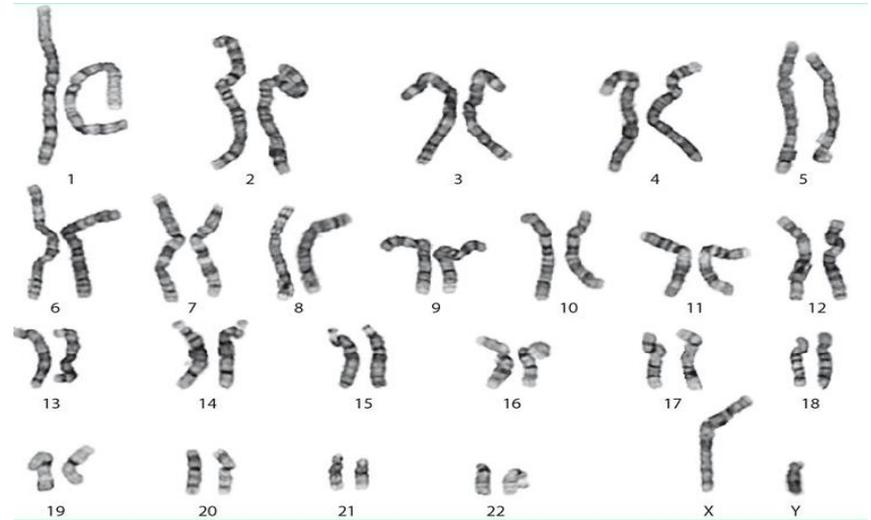
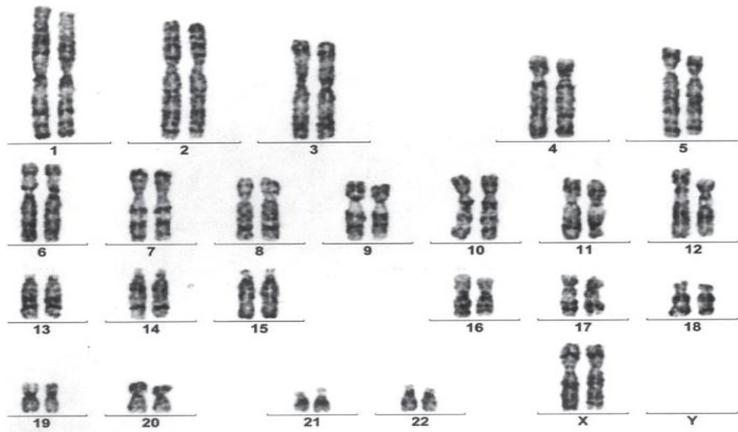
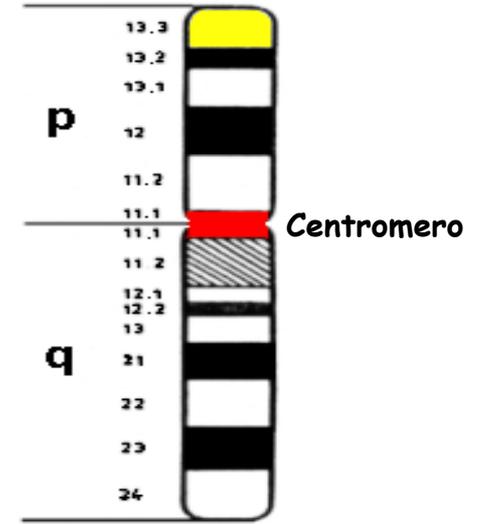
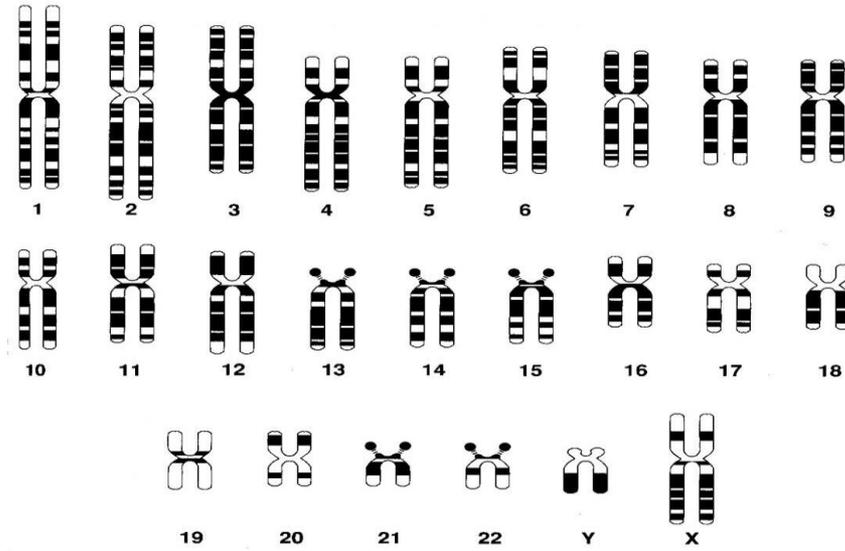
# *STRUTTURA DEI CROMOSOMI*

L'analisi citogenetica viene eseguita in metafase, quando i cromosomi appaiono costituiti da 2 cromatidi fratelli tenuti insieme dal centromero



# METAFASE





# STRUTTURA DEL CROMOSOMA IN METAFASE

- Durante la metafase (divisione del nucleo) i cromosomi diventano **completamente eterocromatici** ad opera di 2 complessi proteici (condensina e coesina).
- Durante l'interfase il DNA si è replicato, quindi in metafase ci sono due copie per ogni cromosoma
- **Ogni cromosoma è costituito da due cromatidi fratelli tenuti insieme dal centromero**

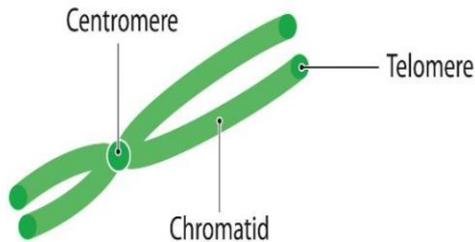
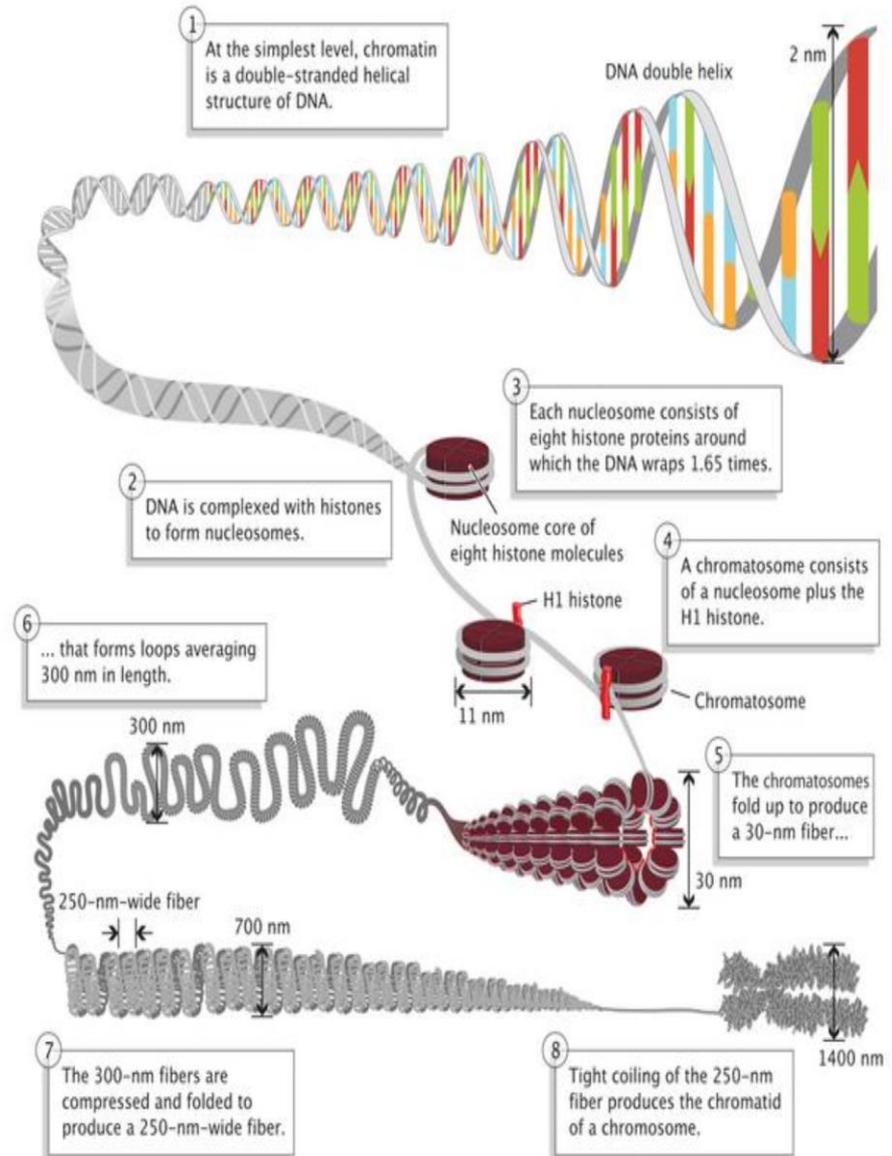
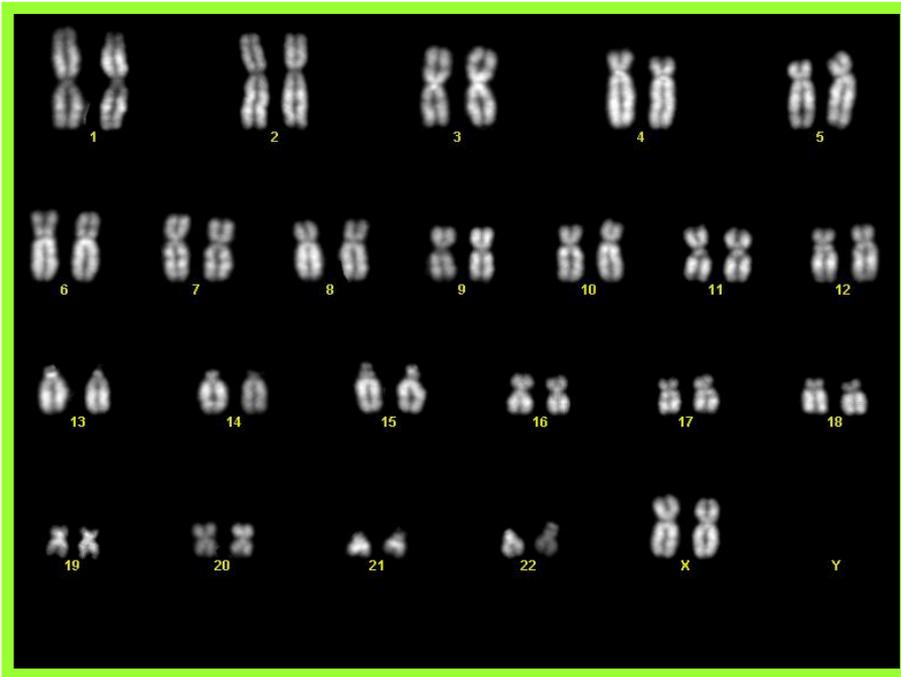


Figure 1.5. Genomes 4.0 © Garland Science 2010





BANDEGGIO Q



BANDEGGIO G

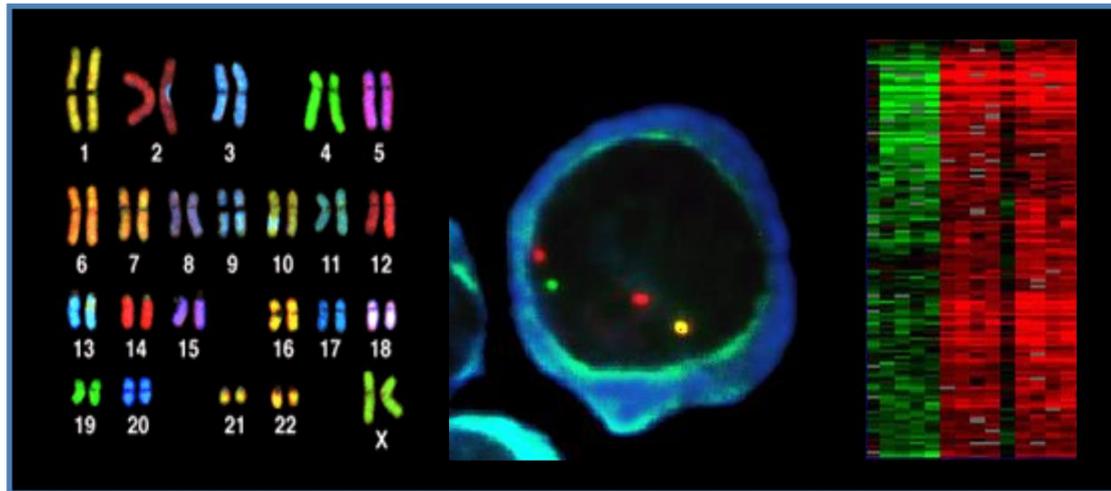


# ANALISI GENETICA DELLE CELLULE MIDOLLARI

CITOGENETICA

FISH

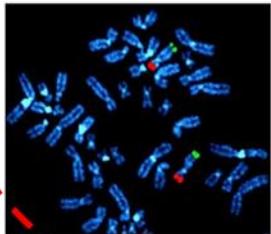
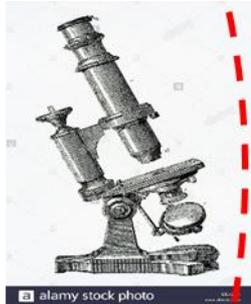
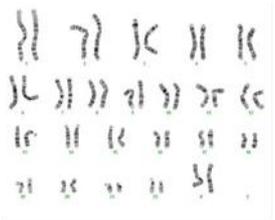
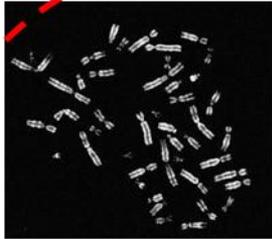
PROFILO  
DEI GENI



Identificare pazienti  
ad alto rischio

Può identificare  
pazienti con necessità  
di terapie particolari

# Citogenetica e Citogenomica



## ***Vantaggi e Svantaggi delle tecniche:***

**CC** : ✓ **vantaggio**:  
unico esperimento  
assetto cromosomico  
completo  
-evidenzia cloni  
distinti ed anomalie  
dell'evoluzione  
clonale  
✓ **svantaggio**: scarsa  
sensibilità per  
anomalie criptiche  
-richiede cellule  
proliferanti  
-tecnica laboriosa e  
che richiede molta  
esperienza

**FISH**: ✓ **vantaggio** : evidenzia  
anomalie criptiche  
-indipendente dall'indice  
mitotico  
-utile nello studio di casi con  
cariotipo non disponibile per  
mancanza di mitosi  
-si associa alla CC nell'  
identificazione di un clone  
anomalo poco rappresentati  
in CC  
- ✓ **svantaggio**: scarsa  
disponibilità di sonde per uso  
diagnostico  
- utilizzo di 1-3max sonde in  
esperimenti di coibridazione  
per esperimento

### 3) Riarrangiamenti cromosomici: traslocazioni

| Neoplasm                     | Chromosomal translocation | % of cases | Proto-Oncogene affected |
|------------------------------|---------------------------|------------|-------------------------|
| Burkitt lymphoma             | t(8;14)(q24;q32)          | 0.80       | MYC                     |
|                              | t(8;22)(q24;q11)          | 0.15       |                         |
|                              | t(2;8)(q11;q24)           | 0.05       |                         |
| Chronic myelogenous leukemia | t(9;22)(q34;q11)          | 0.90-0.95  | ABL-BCR                 |
| Acute lymphocytic leukemia   | t(9;22)(q34;q11)          | 0.10-0.15  | BCR-ABL                 |
| Acute Lymphoblastic leukemia | t(1;19)(q23;p13)          |            | PRL homeobox gene       |
| Acute promyelocytic leukemia | t(15;17)(q22;q11)         |            | PML-RARA                |
| Chronic lymphocytic leukemia | t(11;14)(q13;q32)         | 0.10-0.30  | BCL-1                   |
| Follicular lymphoma          | t(14;18)(q32;q21)         |            | BCL-2                   |

## Analisi citogenetica

**Materiale esaminato: sangue midollare**

**N° protocollo: 23PE383**

### **Coltura**

|   |                        |
|---|------------------------|
| Numero di colture indipendenti analizzate | 2                      |
| Numero di colture allestite               | 2                      |
| Metodo utilizzato                         | Coltura in sospensione |
| Coltura                                   | 24 ore, 48 ore         |

### **Mitosi esaminate**

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| Numero di metafasi cariotipate       | 21       |
| Livello di risoluzione del bandeggio | 300-band |
| Tecnica di bandeggio utilizzata      | GTG      |

### **Cariotipo**

**46,XY,del(20)(q?) [5]/  
46,XY,der(7)inv(7)(p1?5q3?2)del(7)(q22q31),del(20)(q?) [16]**

### **COMMENTI E CONCLUSIONI**

L'esame citogenetico ha messo in evidenza la presenza di due linee cellulari:

- una linea mostra un cariotipo maschile a 46 cromosomi con una delezione parziale del braccio lungo di un cromosoma 20 in 5 delle 21 metafasi analizzate;
- l'altra linea presenta un cariotipo maschile a 46 cromosomi, che oltre alla delezione sopradescritta, mostra la presenza di un cromosoma 7 derivativo originatosi da un' inversione pericentrica e da una delezione interstiziale della regione q22q31, confermata anche dalla FISH (vedi referto 23FISH187), in 16 delle 21 metafasi analizzate. Per l'interpretazione clinica del risultato si raccomanda la valutazione da parte dello specialista di riferimento.

Limiti dell'esame: l'analisi citogenetica non permette di evidenziare piccoli riarrangiamenti al di sotto del limite di risoluzione della metodica (5-10 Mb) e bassi mosaicismi come indicato nella tabella di Hook (Am.J.Hum.Genet. 29:94-97,1977)

"European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms - Leukemia 33, 1851-1867(2019)".



**46,XY,del(20)(q?) [5]/**

**46,XY,der(7)inv(7)(p1?5q3?2)del(7)(q22q31),del(20)(q?) [**

**16]**

46,XY,del(20)(q?) [5]/

46,XY,der(7)inv(7)(p1?5q3?2)del(7)(q22q31),del(20)(q?) [16]



## Analisi citogenetica

Materiale esaminato: sangue midollare

N° protocollo: 23PE379

### Coltura

|   |                        |
|---|------------------------|
| Numero di colture allestite               | 2                      |
| Metodo utilizzato                         | Coltura in sospensione |
| Numero di colture indipendenti analizzate | 2                      |
| Coltura                                   | 24 ore,48 ore          |

### Mitosi esaminate

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| Numero di metafasi cariotipate       | 21       |
| Tecnica di bandeggio utilizzata      | GTG,QFQ  |
| Livello di risoluzione del bandeggio | 300-band |

### Cariotipo

45,XX der(13;14)(q10;q10)?c[1]/  
45,XX,del(5)(q?),der(13;14)(q10;q10)?c[20]

### COMMENTI E CONCLUSIONI

L'esame citogenetico ha messo in evidenza, in 20 delle 21 metafasi esaminate, un cariotipo femminile a 45 cromosomi con una delezione parziale del braccio lungo di un cromosoma 5 e la presenza di un cromosoma derivativo originatosi da una traslocazione tra il braccio lungo di un cromosoma 13 e il braccio lungo di un cromosoma 14.

Una metafase presenta un cariotipo femminile a 45 cromosomi con la presenza del cromosoma derivativo sopra descritto.

Si consiglia approfondimento diagnostico mediante esecuzione di cariotipo costituzionale per identificare l'origine del cromosoma derivativo.

Per l'interpretazione clinica del risultato si raccomanda la valutazione da parte dello specialista di riferimento.

Limiti dell'esame: l'analisi citogenetica non permette di evidenziare piccoli riarrangiamenti al di sotto del limite di risoluzione della metodica (5-10 Mb) e bassi mosaicismi come indicato nella tabella di Hook (Am.J.Hum.Genet. 29:94-97,1977)

"European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms - Leukemia 33, 1851-1867(2019).

**Germinale o Somatica ???????**

**Le anomalie citogenetiche sono uno dei fattori determinante per la prognosi in oncoematologia e la loro determinazione è importante a fini .....**

**✓ *Classificativi***

la classificazione dei Tumori secondo la World Health Organization (WHO) incorpora le aberrazioni cromosomiche insieme alla morfologia , all'immunofenotipo e alle caratteristiche cliniche, nella classificazione delle leucemie e dei linfomi(WHO 2016).

**✓ *Monitoraggio della malattia minima residua (MMR)***

**✓ *Prognostici***

L'impatto clinico delle aberrazioni citogenetiche è tale che i pazienti vengono suddivisi in base alle aberrazioni cromosomiche in: gruppo a prognosi favorevole, intermedia e sfavorevole.

Richiesta: 94227901 11/04/2023

Motivo Invio: LLC

### Analisi molecolare del gene TP53

**Materiale esaminato: DNA****N° protocollo: 23TP35**

|                      |  |
|----------------------|--|
| Materiale biologico  | Sangue periferico  |
| Metodica utilizzata: | Sequenziamento diretto su 3730 Genetic Analyzer (sensibilità 98%).<br>Analisi dati con utilizzo di GLASS: web-based tool per valutazione di mutazioni somatiche con frequenza allelica >10%. |
| Gene indagato:       | TP53 (LRG_321t1, NM_000546.5) esoni 4-11   |
| Risultato dell'esame | NM_000546.5: c.742C>T p.(Arg248Trp)  |
| N° DNA analizzato    | 23DNA2039  |

#### COMMENTI E CONCLUSIONI

L'analisi di sequenza del gene TP53 (LRG\_321t1, NM\_000546.5) ha evidenziato la variante c.742C>T p.(Arg248Trp) nell'esone 7. La variante è annotata nel database di TP53iarc ed è descritta in ClinVar (variation ID 12347) come patogenetica. Tale variante cade in un hot spot mutazionale.

Si raccomanda valutazione del risultato da parte dell'ematologo di riferimento.

**Limiti del test:** Il sequenziamento con metodica Sanger non permette di rilevare varianti somatiche presenti con bassa frequenza allelica (VAF<10%).

#### Riferimenti bibliografici:

International Agency for Research on Cancer (IARC) TP53 database: <<http://p53.iarc.fr/>>

Malcikova J. et al. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia update on methodological approaches and results interpretation. Leukemia. 2018;32:1070-1080.

<<http://www.ericll.org/guidance-toolstp53/>>

<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

<<http://www.hgvs.org/content/guidelines>>

# “Cromosomi e geni”

**Nona Giornata Fiorentina  
dedicata ai pazienti con  
malattie mieloproliferative  
croniche**

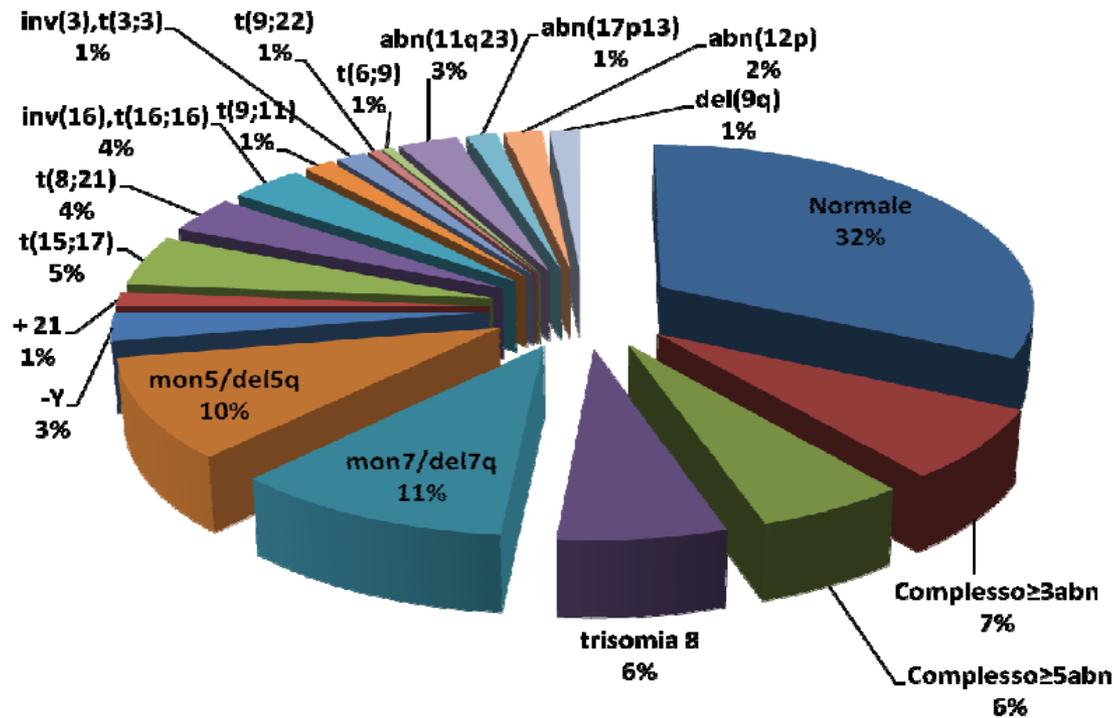
**Sabato 20 maggio 2023**

*Elisabetta Pelo*

*SOD Diagnostica Genetica*

*Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi*

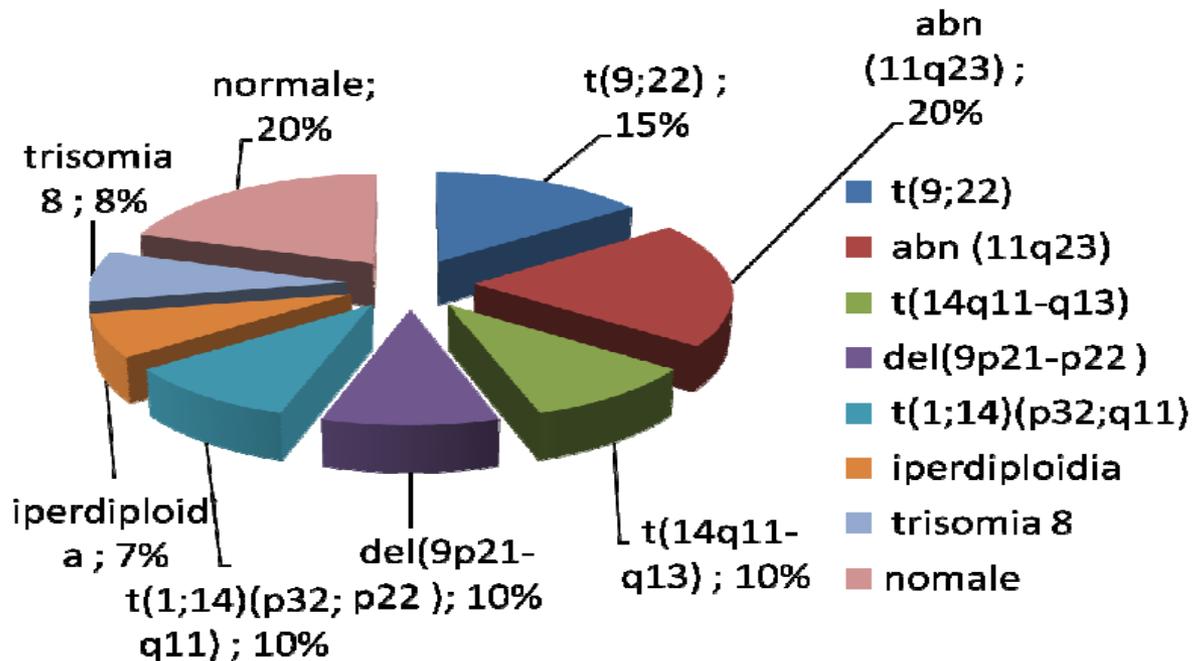




Nelle LAM l'incidenza delle anomalie cromosomiche è di circa il 40-60%, nel 10-15% è presente un cariotipo complesso, definito come la coesistenza di un n° di ≥3 anomalie cromosomiche nello stesso clone il cariotipo normale è presente nel 50-60% dei casi ioni

## Anomalie cromosomiche nelle LAM

## Anomalie cromosomiche nelle LLA



Nelle LLA  
l'incidenza  
delle  
aberrazioni  
cromosomiche  
è dell'80-90%.



Cytogenetics and molecular genetics

# European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms

K. A. Rack<sup>1</sup> · E. van den Berg<sup>2</sup> · C. Haferlach<sup>3</sup> · H. B. Beverloo<sup>4</sup> · D. Costa<sup>5</sup> · B. Espinet<sup>6</sup> · N. Foot<sup>7</sup> · S. Jeffries<sup>8</sup> · K. Martin<sup>9</sup> · S. O'Connor<sup>10</sup> · J. Schoumans<sup>11</sup> · P. Talley<sup>10</sup> · N. Telford<sup>12</sup> · S. Stioui<sup>13</sup> · Z. Zemanova<sup>14</sup> · R. J. Hastings<sup>15</sup>

Received: 25 April 2018 / Revised: 11 December 2018 / Accepted: 17 December 2018

© The Author(s) 2019. This article is published with open access

## Abstract

Cytogenomic investigations of haematological neoplasms, including chromosome banding analysis, fluorescence in situ hybridisation (FISH) and microarray analyses have become increasingly important in the clinical management of patients with haematological neoplasms. The widespread implementation of these techniques in genetic diagnostics has highlighted the need for guidance on the essential criteria to follow when providing cytogenomic testing, regardless of choice of methodology. These recommendations provide an updated, practical and easily available document that will assist laboratories in the choice of testing and methodology enabling them to operate within acceptable standards and maintain a quality service.

**Table 1** Recommended testing for different haematological neoplasms

| Disease                                      | Test   | Requirement   | Suggested methodology                                     | Guidelines   |
|--|--|---|---|--|
| CML  | Karyotype  | Mandatory   | Chromosome banding  | Baccarani et al. 2013 [24], 2015 [25]  |
|  | <i>BCR-ABL1</i> gene fusion  | Mandatory   | FISH or molecular methods                                 |  |
|  | <i>ABL1</i> mutation when resistance to therapy  | Mandatory   | Molecular methods   |  |
| MPN  | <i>JAK2, CALR, MPL</i> mutations depending on referral reason  | Indicated   | Molecular methods   | Gong et al. 2013 [32]<br>Xia and Hassejian 2016 [33]<br>WHO 2017 [1]   |
|  | Karyotype  | Optional  | Chromosome banding  |  |
| Myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia | Recurrent gene fusions involving <i>PDGFRA, PDGFRB, FGFR1, PCM1-JAK2</i>   | Strongly recommended for most patients  | FISH or molecular methods                                 | Butt et al. 2017 [40]  |
|  | Karyotype  | Recommended in absence of recurrent gene fusion   | Chromosome banding  |  |
| MDS  | Karyotype  | Mandatory   | Chromosome banding  | Malcovati et al. 2013 [41]   |
|  | Targeted chromosome abnormalities -5/5q-, -7/7q-, <i>MECOM</i> (extended panel + 8,20q-del <i>TP53</i> )                   | Recommended <sup>b</sup>  | FISH/ SNP array/ Molecular methods                        |  |
|  | High resolution chromosome analysis and aCN-LOH <sup>c</sup><br>Mutation analysis of candidate genes                       | Recommended<br>Recommended  | SNP array<br>Molecular methods                            |  |
| AML  | Karyotype  | Mandatory   | Chromosome banding  | Döhner et al. 2017 [47]  |
|  | Gene mutations: <i>NMP1, CEBPA, RUNX1, FLT3, TP53, ASXL1</i>   | Mandatory   | Molecular methods   |  |
|  | Recurrent gene fusions: <i>PML-RARA, CBFβ-MYH11, RUNX1-RUNXIT</i> . Gene rearrangements of <i>KMT2A</i> and <i>MECOM</i> . | Recommended <sup>d</sup>  | FISH or molecular methods                                 |  |
| ALL  | Recurrent gene fusions (Age-related priority see Table 3)  | Mandatory   | FISH or molecular methods                                 | Harrison et al. 2010 [57]<br>Moorman et al. 2010 [59]  |
|  | Hyperdiploidy  | Recommended   | Chromosome banding or SNP-Array/<br>FISH                  |  |
|  | Recurrent microdeletions<br>Karyotype <sup>d</sup>   | Recommended in paediatric<br>Mandatory  | MLPA, Array, molecular methods                            | Harrison et al. 2010 [57]<br>Hoelzer et al. 2016 [60]  |
| CLL  | Deletion 13q14, <i>ATM, TP53</i> , trisomy 12<br><i>TP53</i> mutation/IGHV mutational status                               | Mandatory<br>Mandatory  | FISH, SNP-array or molecular methods<br>Molecular methods | Hallek et al. 2018 [71]<br>Malcikova et al. 2018 [75],<br>Rosenquist et al. 2017 [76]<br>Hallek et al. 2018 [71] |
|  | Karyotype  | Desirable for clinical trials   |   |  |
|  | Multiple myeloma   | t(4;14) <sup>e</sup> , t(14;16), deletion <i>TP53</i> <sup>e</sup><br>gain 1q/del(1p)<br>t(11;14), t(14;20), ploidy status (extended panel) | Recommended   |  |
| Other mature B-cell neoplasms                | Recurrent gene rearrangements depending on differential diagnosis  |   | FISH  | WHO 2017 [1]   |
|  | <i>MYC</i> rearrangements for prognostic testing <sup>f</sup>  |   | FISH  |  |

<sup>a</sup>For prognostic impact

<sup>b</sup>In cases of karyotype failure or where morphological suspicion of specific abnormality

<sup>c</sup>aCN-LOH: acquired copy neutral loss of heterozygosity

<sup>d</sup>May not be required for all paediatric B-ALL where only basic risk stratification is required

<sup>e</sup>Minimum testing required

<sup>f</sup>If *MYC* rearrangement is detected *BCL2* and *BCL6* should be undertaken for differential diagnosis between Burkitt lymphoma and a double-hit lymphoma

**Table 2** Alternative testing strategies

---

Testing requirement

Alternative strategies for testing

---

Whole-genome numerical and structural abnormalities

Chromosome banding plus FISH/molecular testing for recurrent cryptic structural abnormalities

or

Array/NGS copy number analysis plus FISH/molecular analysis for recurrent structural abnormalities

or

Whole-genome NGS analysis including copy number and structural abnormalities

Targeted region-specific analysis for recurrent structural abnormalities deletions, gain, translocations

FISH for copy number and structural abnormalities

or

FISH for copy number plus molecular techniques for structural abnormalities

or

Molecular-based copy number (e.g. MLPA, PCR) plus FISH/molecular analysis for recurrent structural abnormalities

or

Targeted Array/NGS copy number analysis plus FISH/molecular analysis for structural abnormalities

or

Targeted NGS analysis, including copy number and structural abnormalities

---

NGS next generation sequencing

**Table 3** Recommended analyses for fusion gene rearrangement testing in ALL

| Patient details |   | Recommended   | Optional   |
|-----------------|---|---|--|
| B-ALL           | Infants (<1 year old)                     | <i>KMT2A</i>  | <i>ETV6-RUNX1, BCR-ABL1</i>                          |
|                 | For paediatric/adolescent ALL (<25 years) | <i>ETV6-RUNX1, BCR-ABL1</i> , then <i>KMT2A</i> and <i>TCF3</i> |  |
|                 | Adult                                     | <i>BCR-ABL1</i> then <i>KMT2A</i> and <i>TCF3</i>               | <i>ETV6-RUNX1</i>                                    |
| T-ALL           | Childhood and adult                       |   | <i>TLX3, TLX1, KMT2A, TALI, LMO2</i> and <i>ABL1</i> |

---

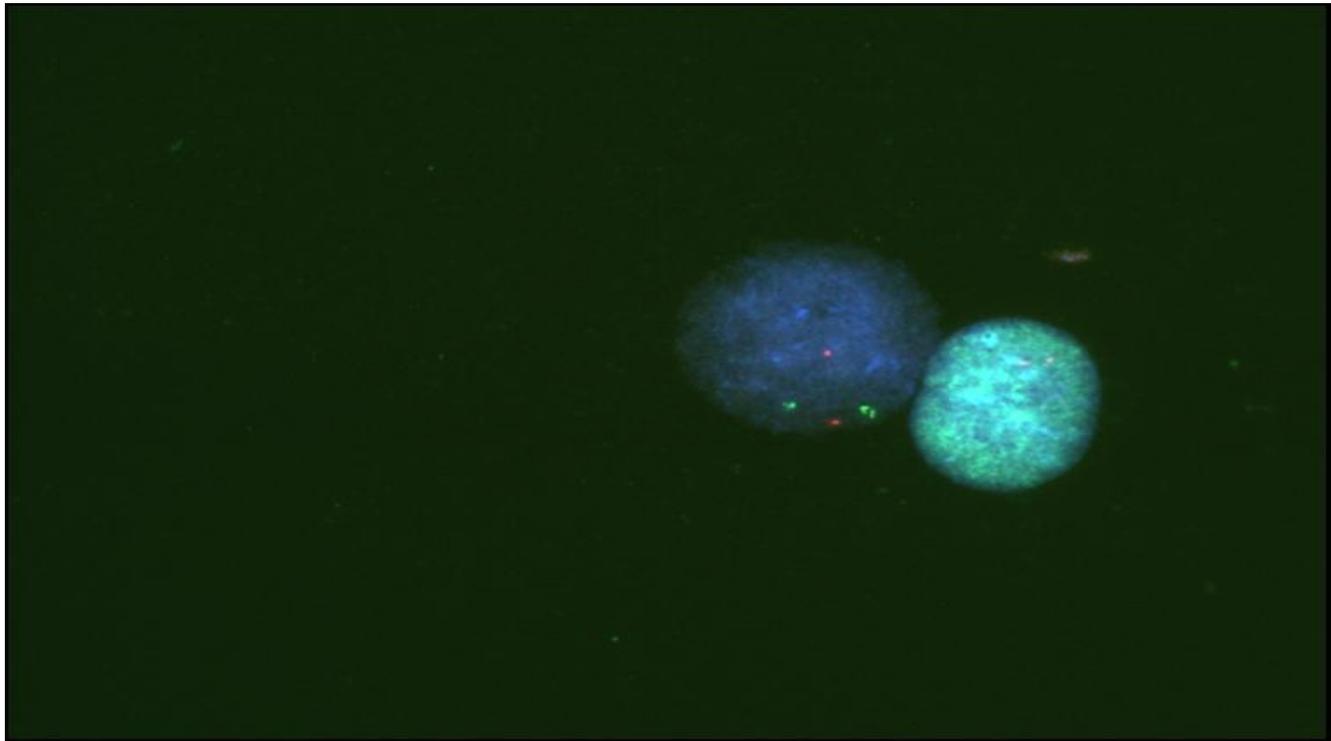
**Table 4** Recommended reporting times

---

|  |  |
|--|--|
| Urgent referrals (e.g. acute leukaemia):                 | 95% should be reported within 10 calendar days. A diagnostic FISH result is adequate in this category, with confirmatory chromosome banding analysis treated as for routine referrals. |
| Rapid test by FISH/PCR (e.g. <i>RARA</i> rearrangements) | 95% reported in 3 working days.<br>A result should be given in <24 h.  |
| Routine referral (e.g. follow-up):                       | 90% should be reported within 21 calendar days.  |

---

Sonda bcr/abl  
Sonda dual color dual fusion



2 segnali verdi 2 segnali rossi.