

CITOGENETICA NELLE LEUCEMIE ACUTE

Dr.ssa Simona Bernardi

19 ottobre 2022

Cattedra di Ematologia

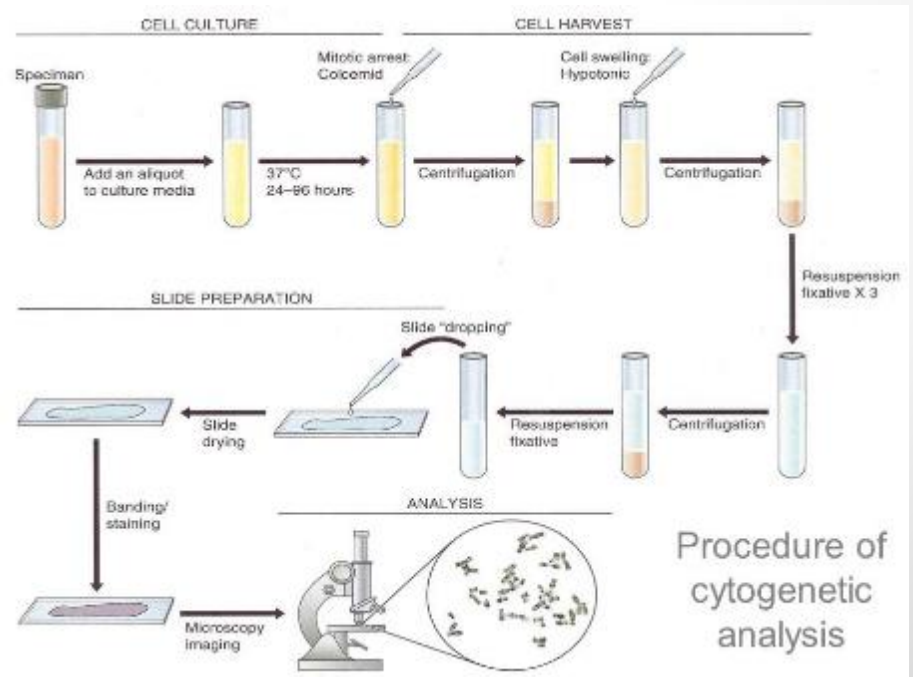
Unità di Malattie del Sangue e Trapianto di Midollo per Adulti

Università degli Studi di Brescia

LA CITOGENETICA CLASSICA

Processamento del campione:

- Prelievo di sangue midollare o periferico
- Diluizione in liquido di Turk e conta
- Coltura cellulare: diretta, medio termine o sincronizzata
- Colcemid
- KCl
- Fissativo
- Vetrino



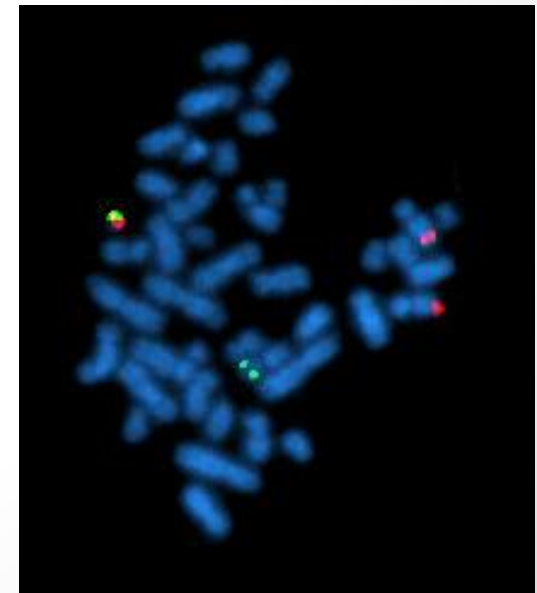
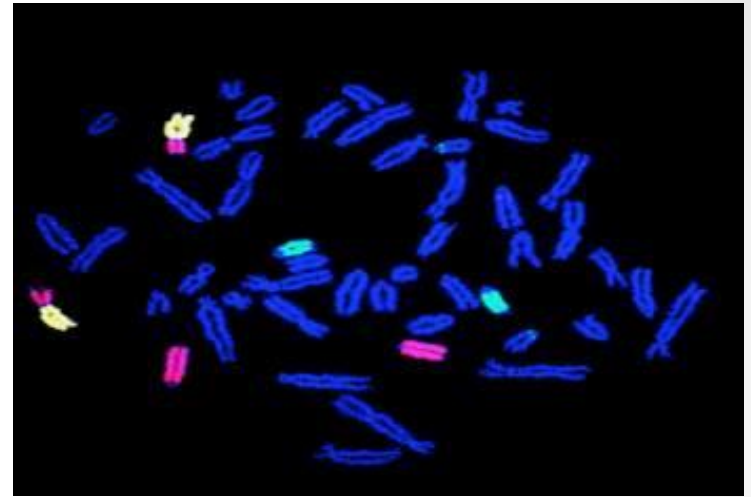
I bandeggi:

- Bandeggio G
- Bandeggio Q
- Bandeggio R
- Bandeggio C



LA FISH

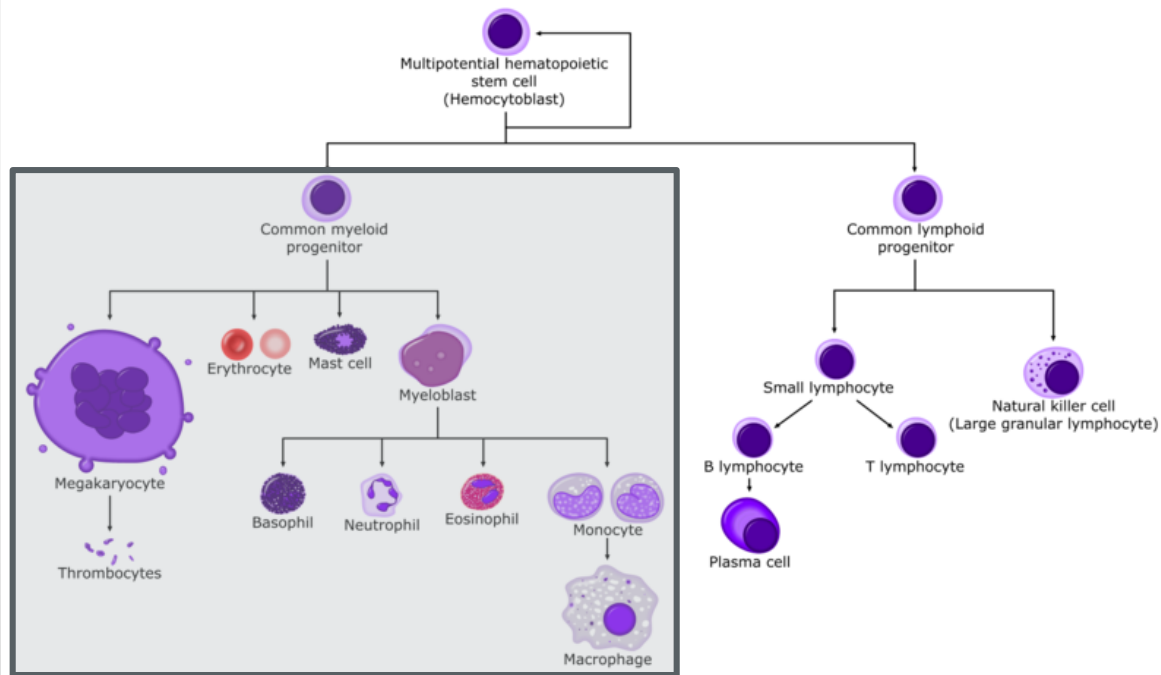
- SSC
- Scala degli alcoli
- Ibridazione della sonda
- Lavaggi in SSC, NP40, PBS e H2O
- Montante con DAPI
- Osservazione



TIPOLOGIA DI ANOMALIE CROMOSOMICHE

TIPOLOGIA	ANOMALIA	EFFETTO
Tipo I	Gene di fusione	Gain of function su oncogeni, fattori di trascrizione e chinasi
Tipo II	Effetto di posizione	Disregolazione di oncogeni e altri geni
Tipo III	Guadagno di copy number su interi geni o parti di essi	Effetto dose sugli oncogeni
Tipo IIIa	Amplificazione genica (2-4) per set aploide	Effetto dose sugli oncogeni
Tipo IV	Perdite parziali o totali di cromosomi	Loss of function e LOH in geni oncosoppressori

LE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE



Coinvolgono cellule della
linea granulocitica,
monocitico/macrofagica
eritrocitica,
megacariocitica e delle
mast cells

t(8;21)(q22;q22)

RUNX1-RUNX1T1 o AML1-ETO:

AML1: subunità del Core Binding Factor (CBF).

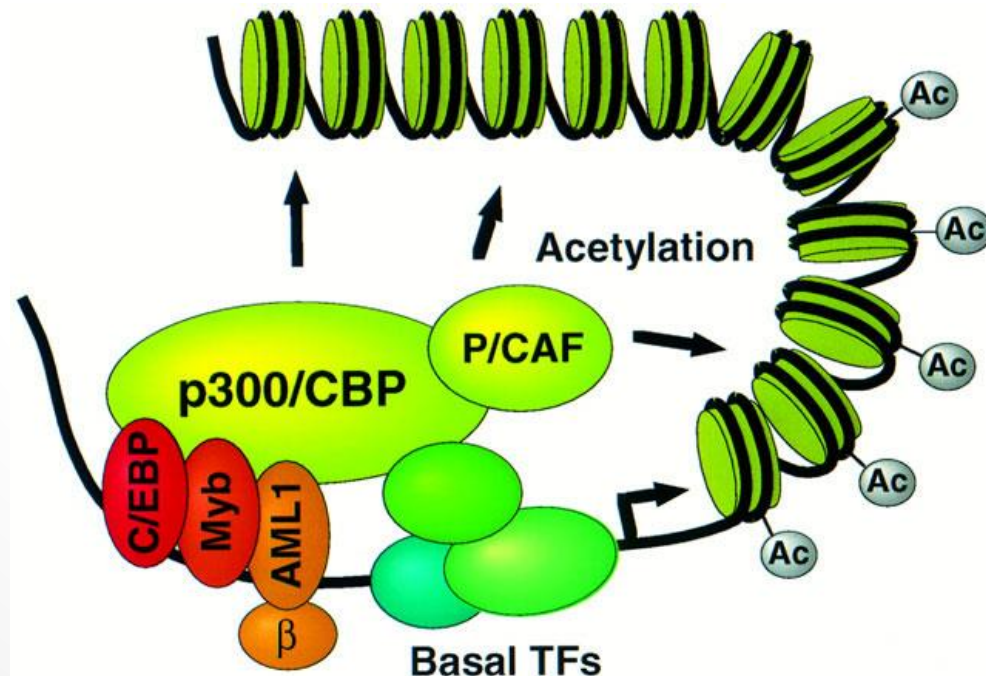
ETO: regola la trascrizione tramite interazioni proteina-proteina.

PROGNOSI: positiva

t(8;21)(q22;q22)

AML1: Attivatore trascrizionale critico per l'espressione tessuto-specifica di geni chiave per l'emopoiesi e repressore trascrizionale per altri geni, in particolare CD4.

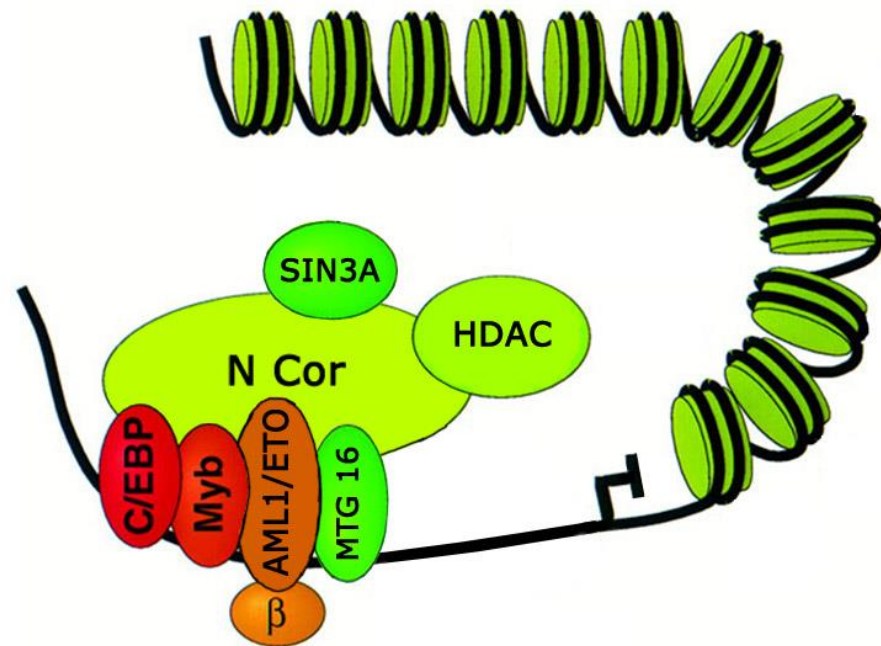
ETO: fosfoproteina nucleare con domini zinc-finger. Non lega direttamente il DNA. Interagisce con co-repressori trascrizionali e con Histone deacetylases.



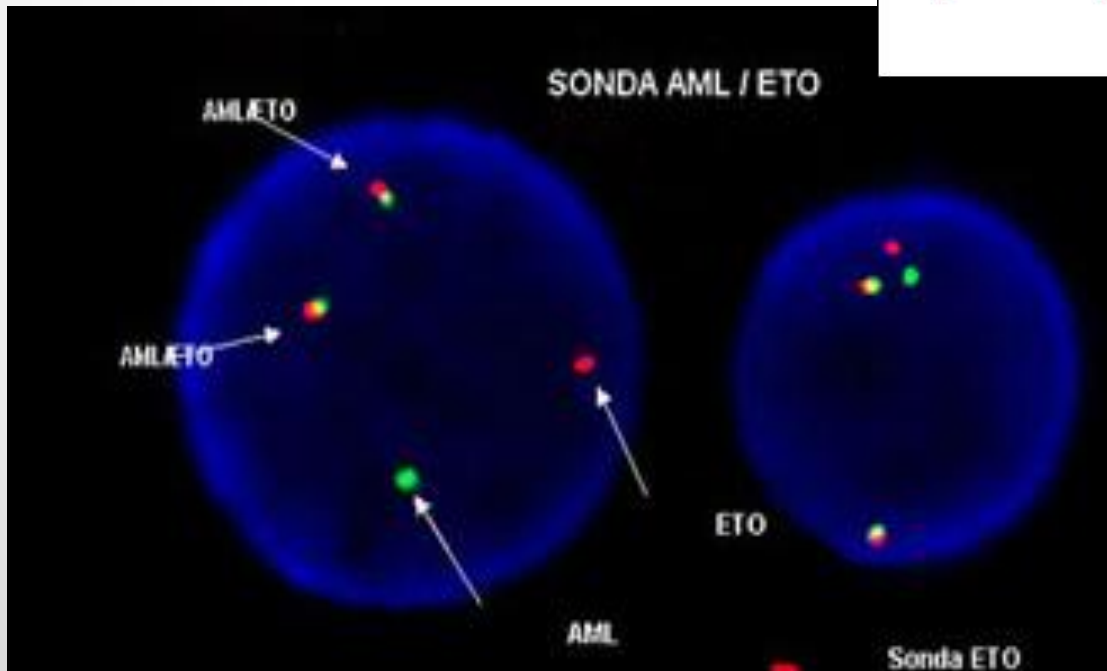
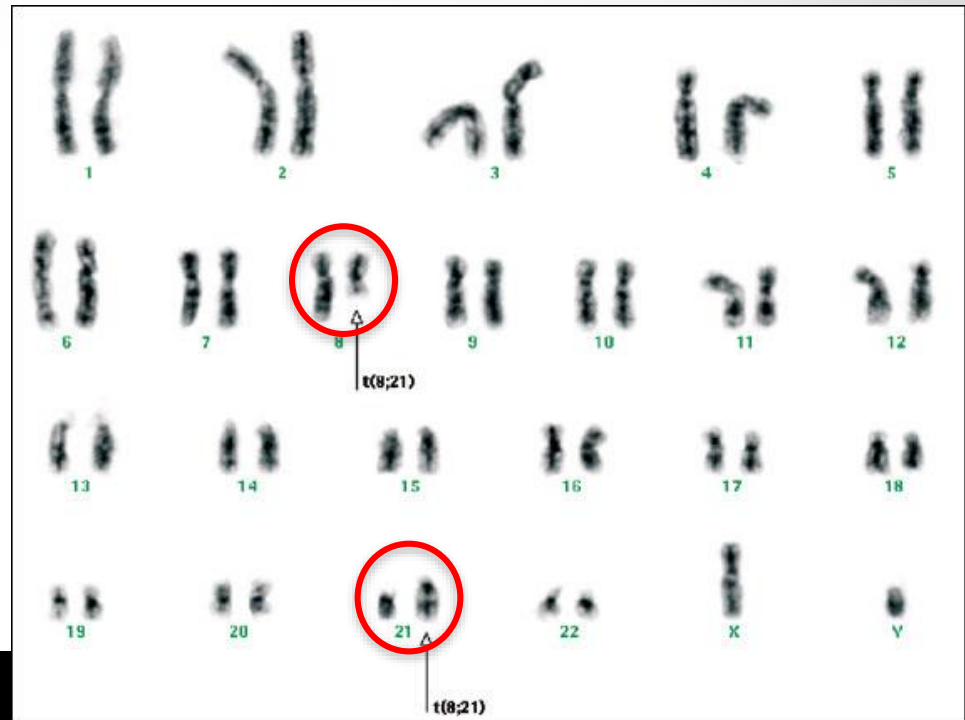
AML1-ETO: presenta domini leganti il DNA e CBFbeta di AML-1 e domini per l'interazione con i co-repressori di ETO.

Inibisce l'espressione dei geni target di attivazione di AML1 e attiva geni coinvolti nel self-renovation delle cellule staminali.

Il complesso provoca la deacetilazione degli istoni e l'alterazione della struttura cromatinica.



La traslocazione
rilevata con il
bandeggio G



La traslocazione
rilevata con FISH

inv(16)(p13.1;q22) o
t(16;16)(p13.1;q22)

CBFbeta-MYH11

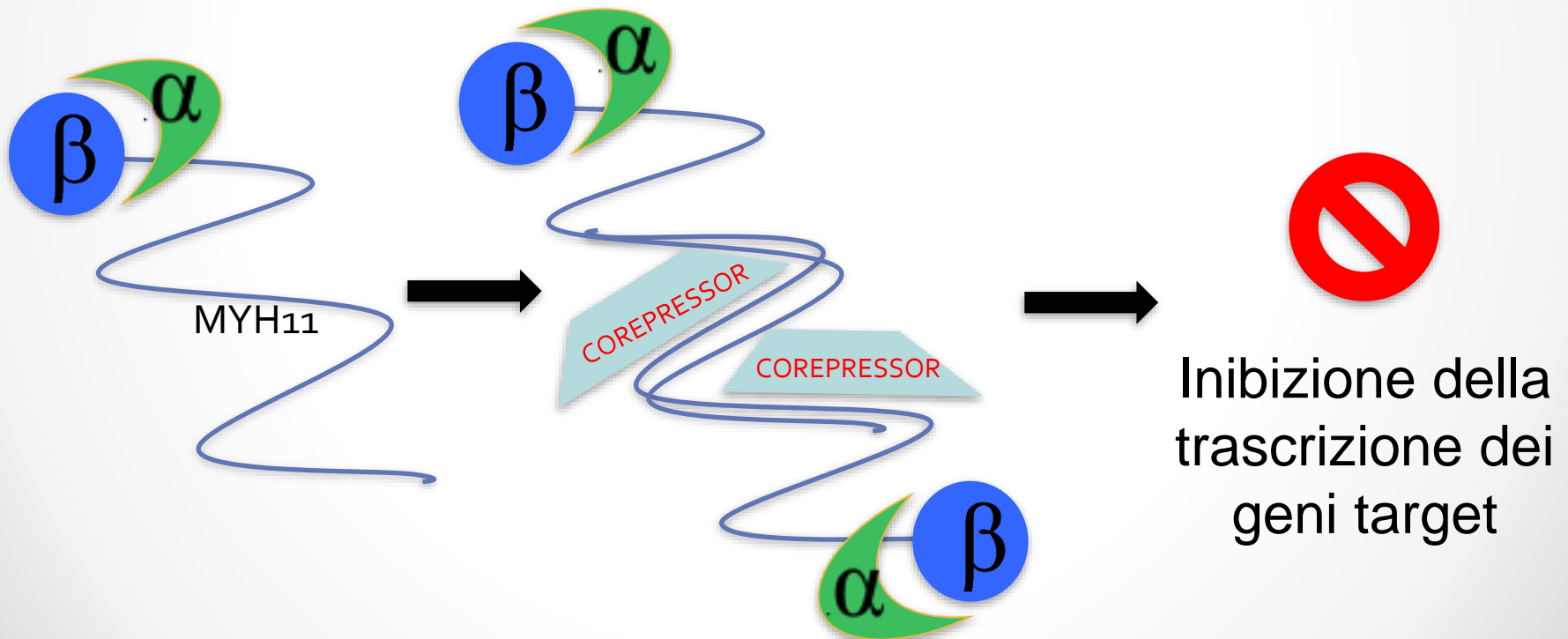
CBFbeta: subunità del Core Binding Factor che non lega il DNA.

MYH11: catena pesante della miosina della muscolatura liscia.

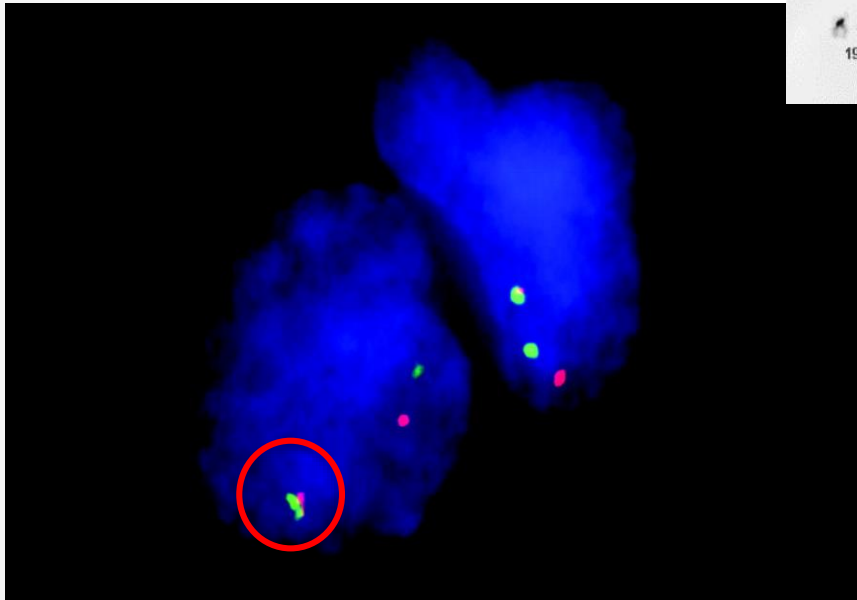
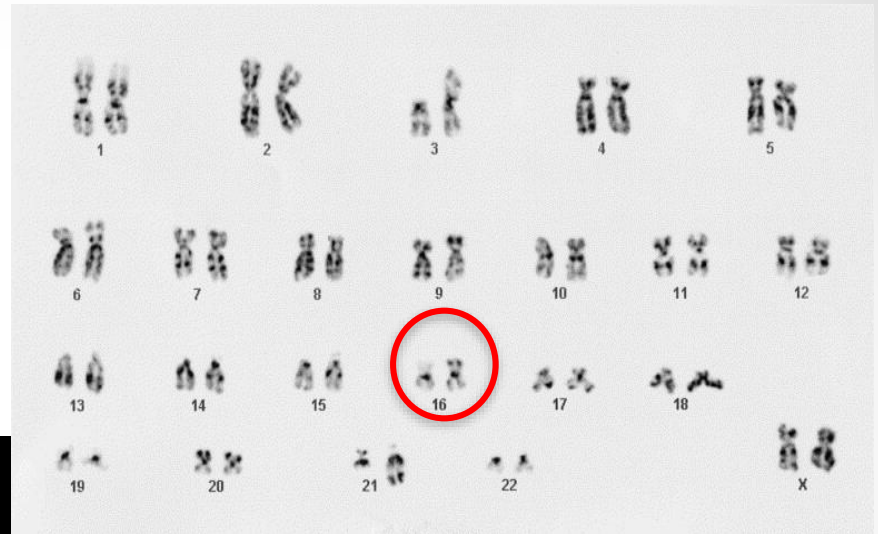
PROGNOSI: positiva

inv(16)(p13.1;q22) o
t(16;16)(p13.1;q22)

Il trascritto di fusione interagisce con co-repressori portando ad una disregolazione della trascrizione:



La traslocazione
rilevata con il
bandeggio G



La traslocazione
rilevata con FISH

Difficile identificazione a livello citogenetico. Spesso è meglio rilevabile con tecniche di biologia molecolare.

t(9;11)(p22;q23)

AF9-MLL or MLLT3-MLL

AF9: attivatore trascrizionale localizzato nel nucleo.

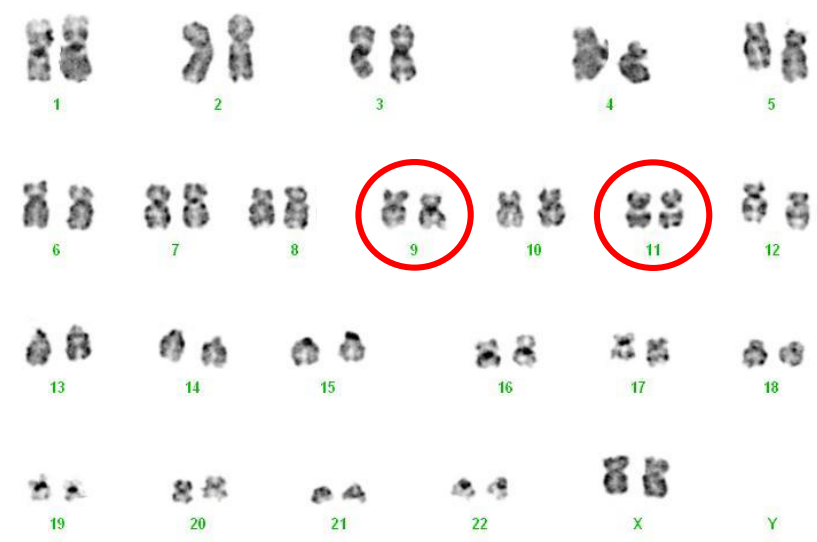
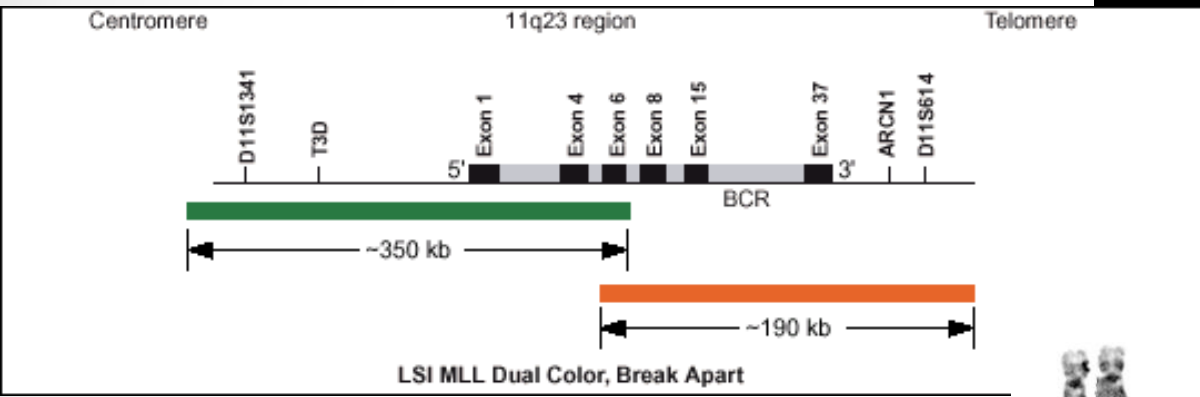
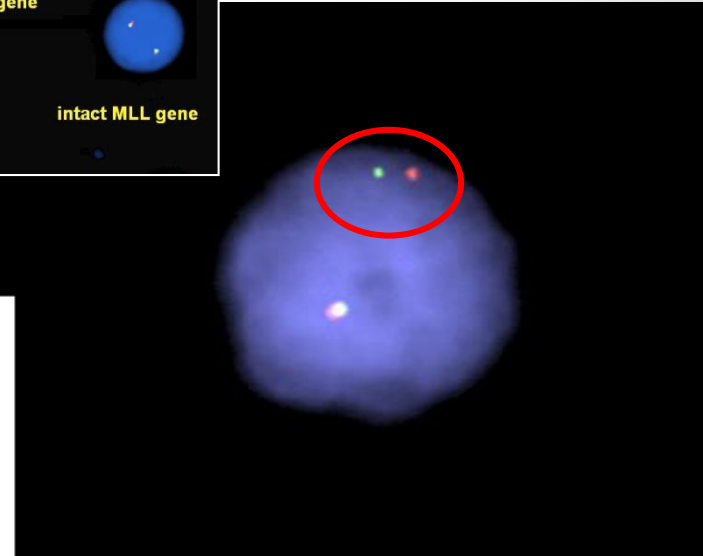
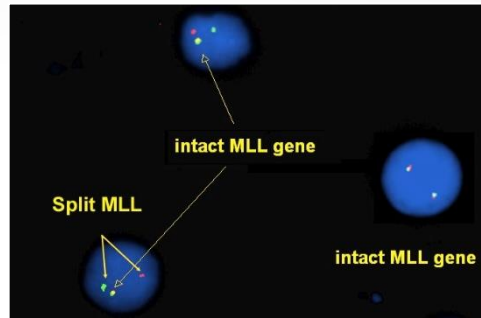
MLL: Istone metiltransferasi. Regolatore trascrizionale ubiquitario. Regola il mantenimento della memoria epigenetica.

PROGNOSI: intermedia/negativa

normal MLL

regione centromerica 350kb

regione telomerica 190kb



Si analizza anche in
biologia molecolare.

inv(3)(q21;q26.2) o
t(3;3) (q21;q26.2)

RPN1-EVI1

RPN1: riboforina 1. Parte di un complesso N-oligosaccaril transferasi costitutivamente espresso.

EVI1 o PRDM3: fattore di trascrizione nucleare che regola sia l'apoptosi sia la differenziazione.

PROGNOSI: negativa

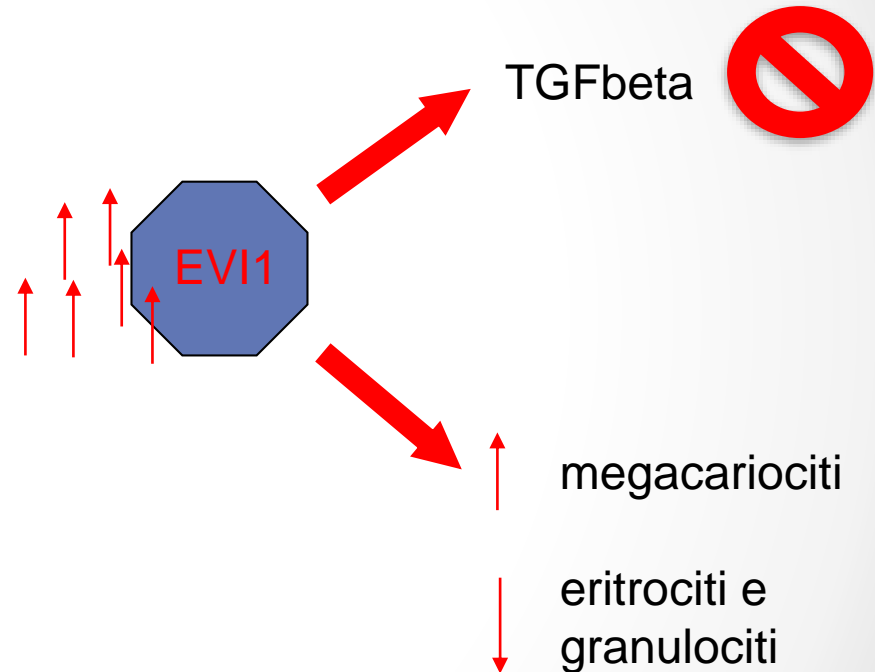
inv(3)(q21;q26.2) o
t(3;3) (q21;q26.2)

EVI1 nelle cellule della
linea mieloide normali, è
espresso a bassi livelli.

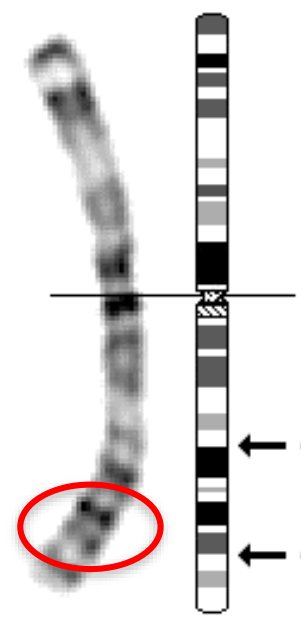
A seguito della
traslocazione, il gene EVI1
si trova sotto il controllo del
promotore di RPN1 che è
costitutivamente attivo.



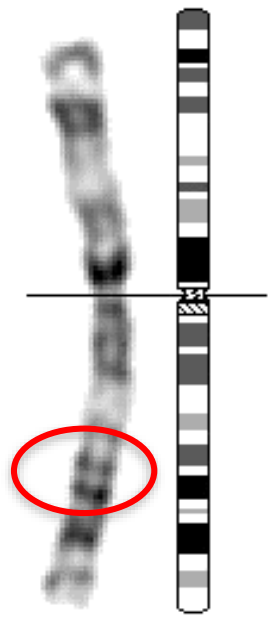
Espressione aberrante di
EVI1



La traslocazione rilevata con il bandeggio G

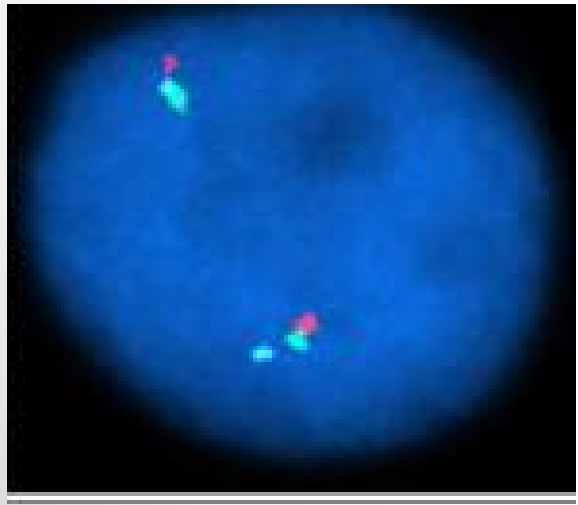


3 Normal

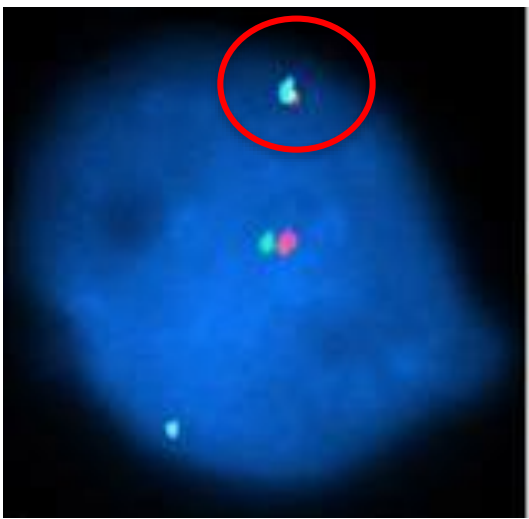


3 Invertido

La traslocazione rilevata con la FISH



● Normale



Traslocato



t(15;17)(q22;q12)

Focus sulla Leucemia acuta promielocitica

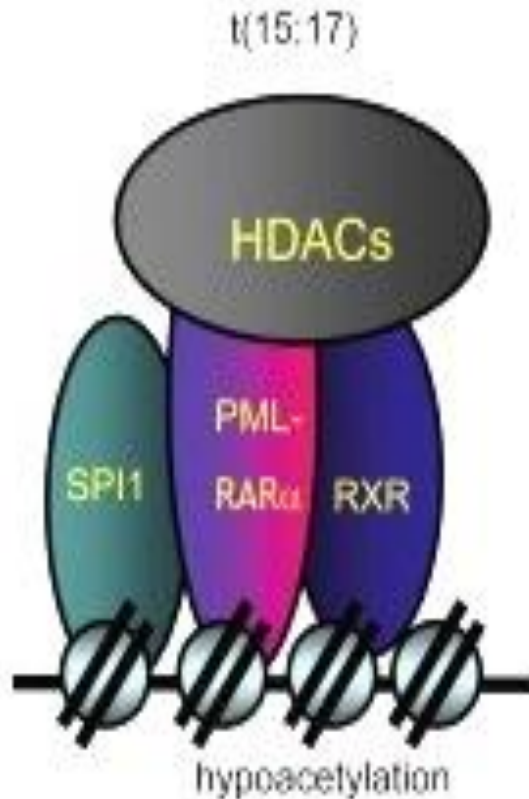
PML-RARalfa

PML: promyelocytic leukemia gene. Ruolo nell'ematopoiesi precoce.

RARalfa: regolatore trascrizionale. Agisce sia come attivatore che come repressore.

PROGNOSI: positiva

t(15;17)(q22;q12)



PML-RAR α è un repressore trascrizionale costitutivamente attivo che regola l'espressione di geni coinvolti nella differenziazione, apoptosi e nel self-renewal.

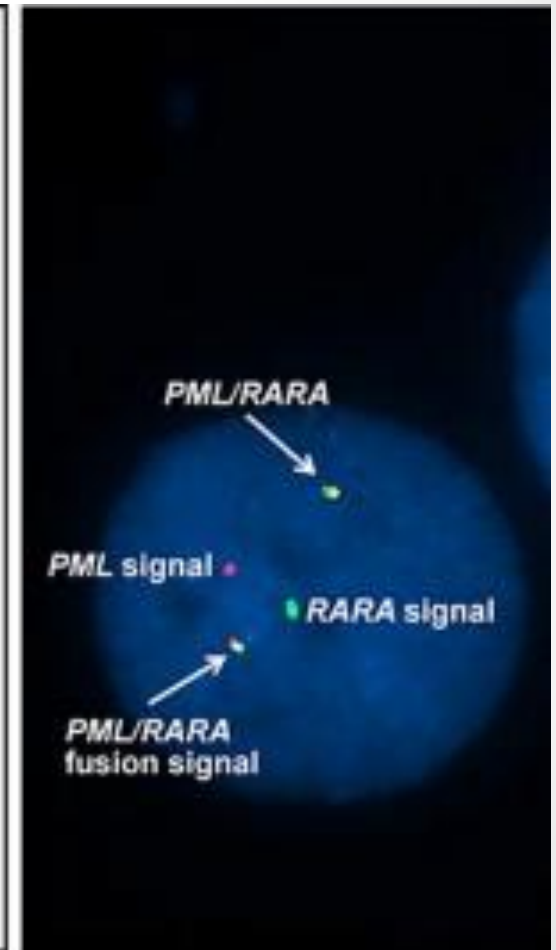
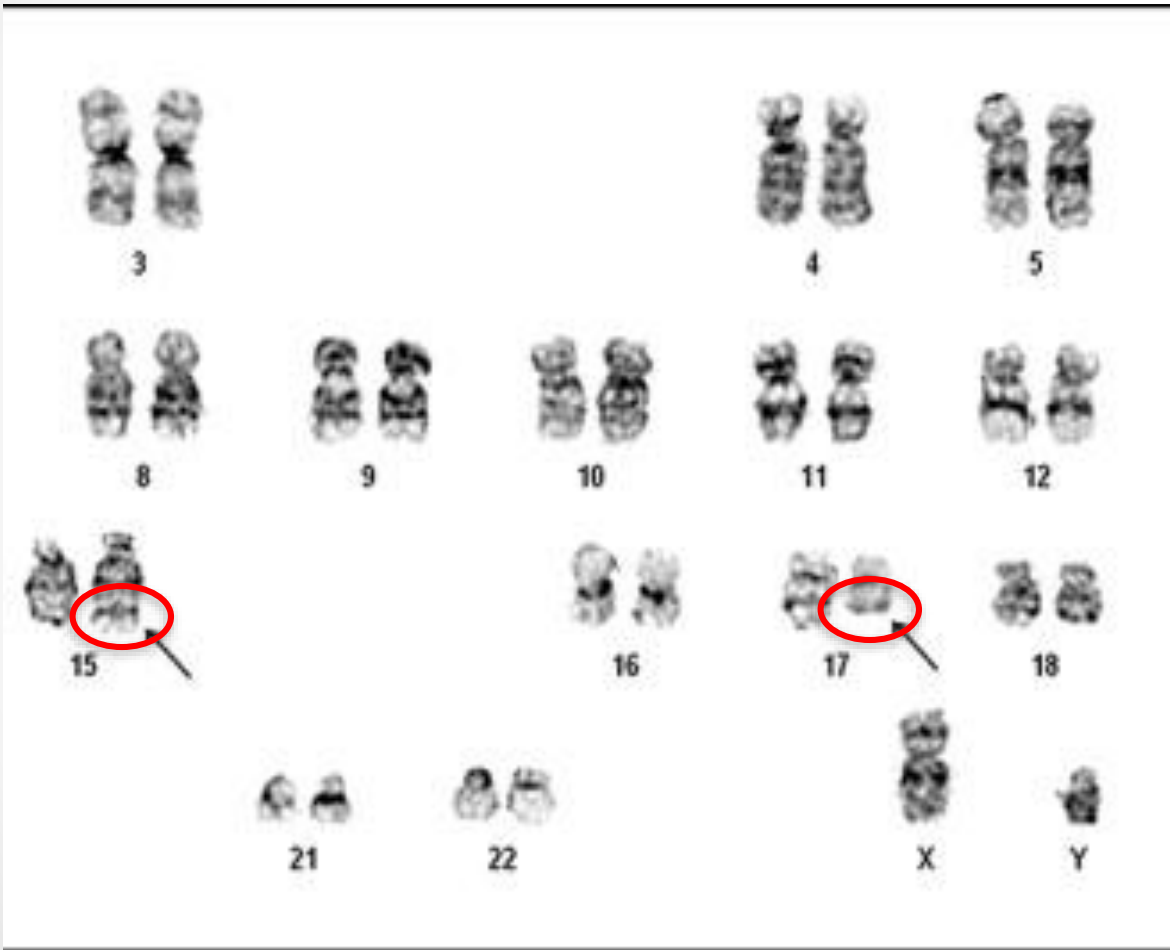


Ipoacetilazione costante dei geni target

Approccio terapeutico: ATRA ad alte dosi!

La traslocazione
rilevata con il
bandeggio classico

t(15;17)(q22;q12)

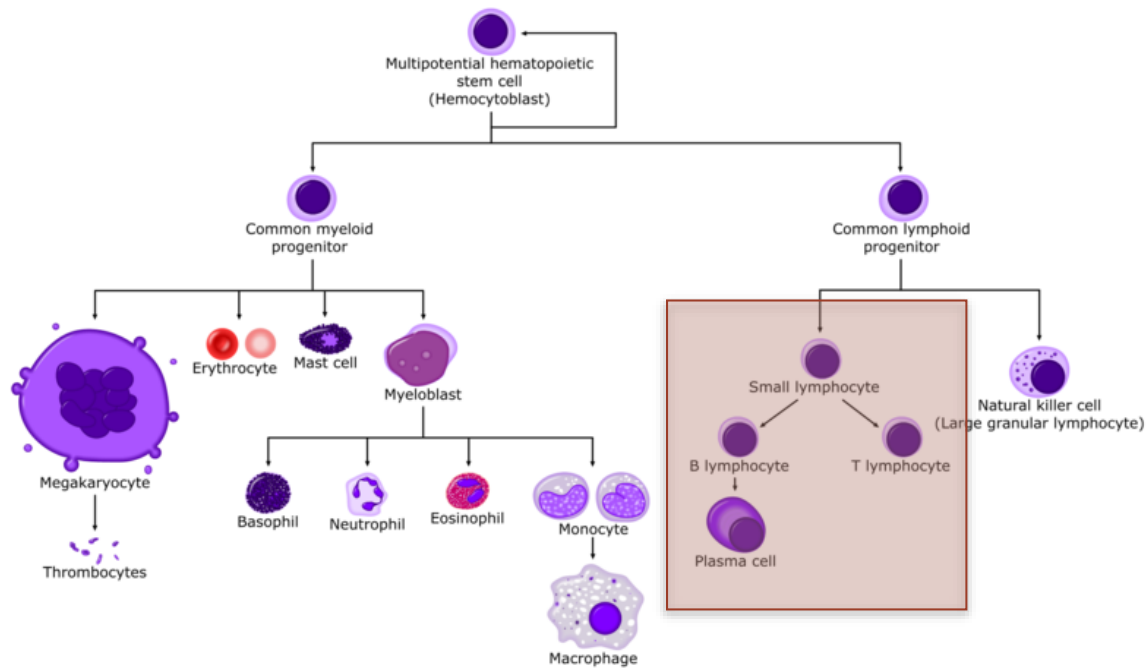


La traslocazione
rilevata con la FISH ●

LE LEUCEMIE LINFOIDI ACUTE

Coinvolgono cellule precursori della linea linfoide B o T

Le LAL che presentano riarrangiamenti rilevabili in citogenetica sono principalmente le LAL che coinvolgono la linea linfoide B



t(9;22)(q34;q11.2)

BCR-ABL1 :

ABL: tirosin-chinasi con debole attività enzimatica. 2 isoforme: citoplasmatica e di membrana.

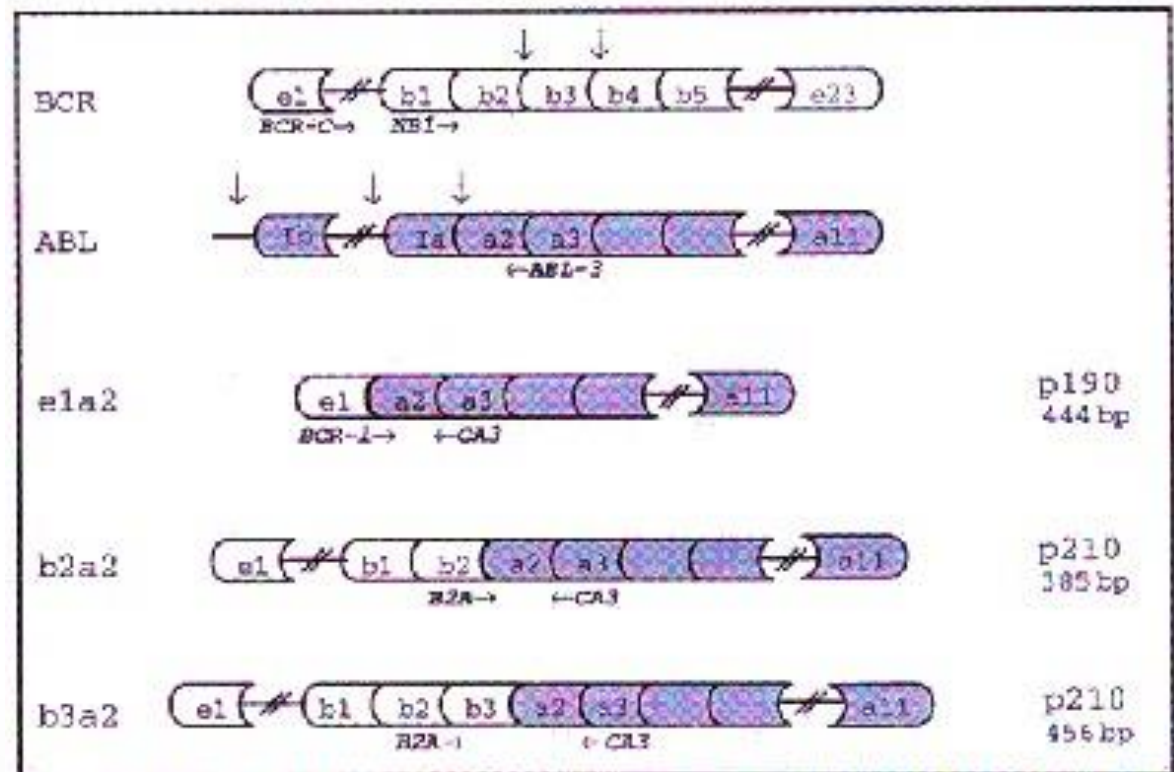
BCR: serina/treonina chinasi con ruolo chiave nella trasduzione del segnale.

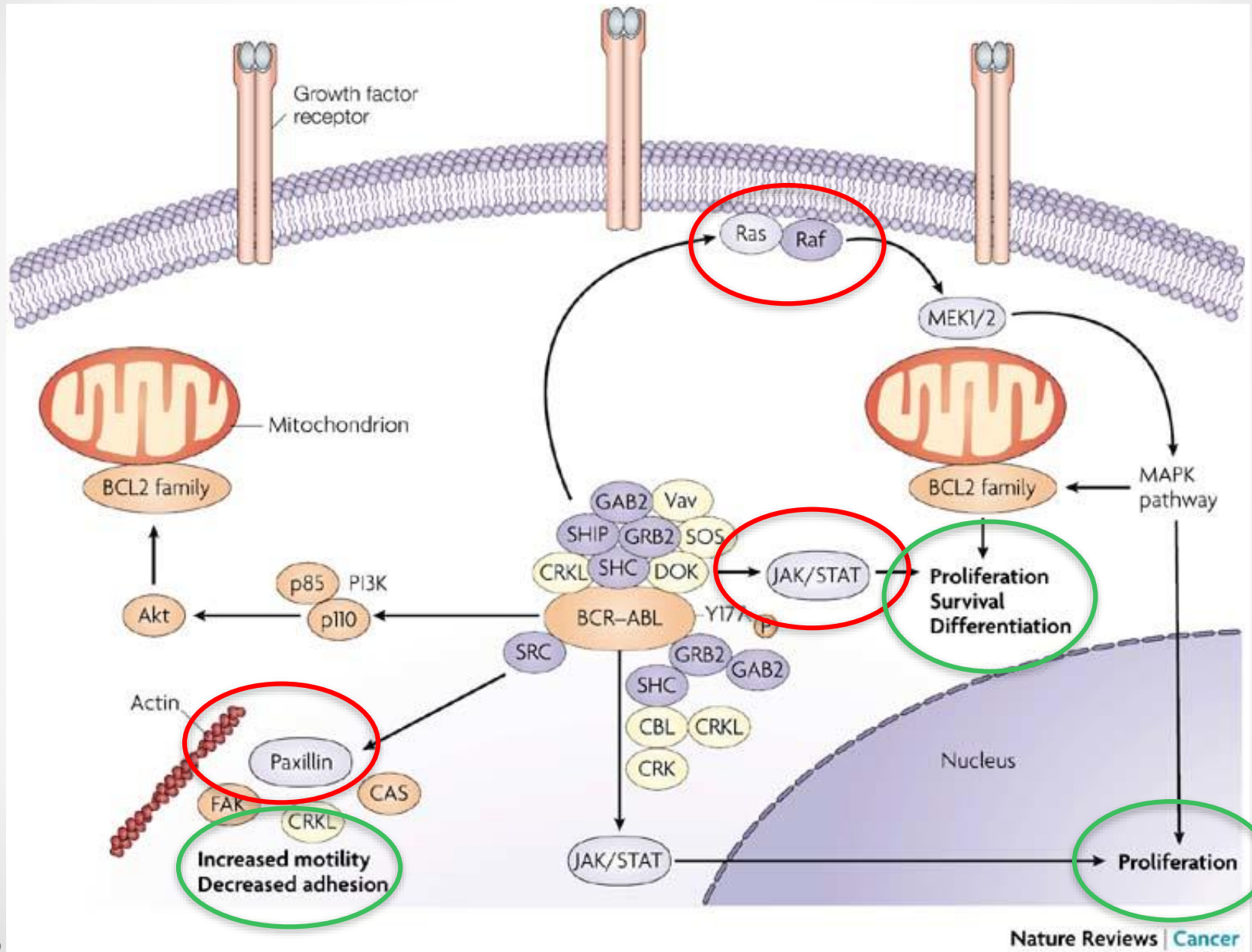
Isoforme della proteina chimerica

p190 (LAL)

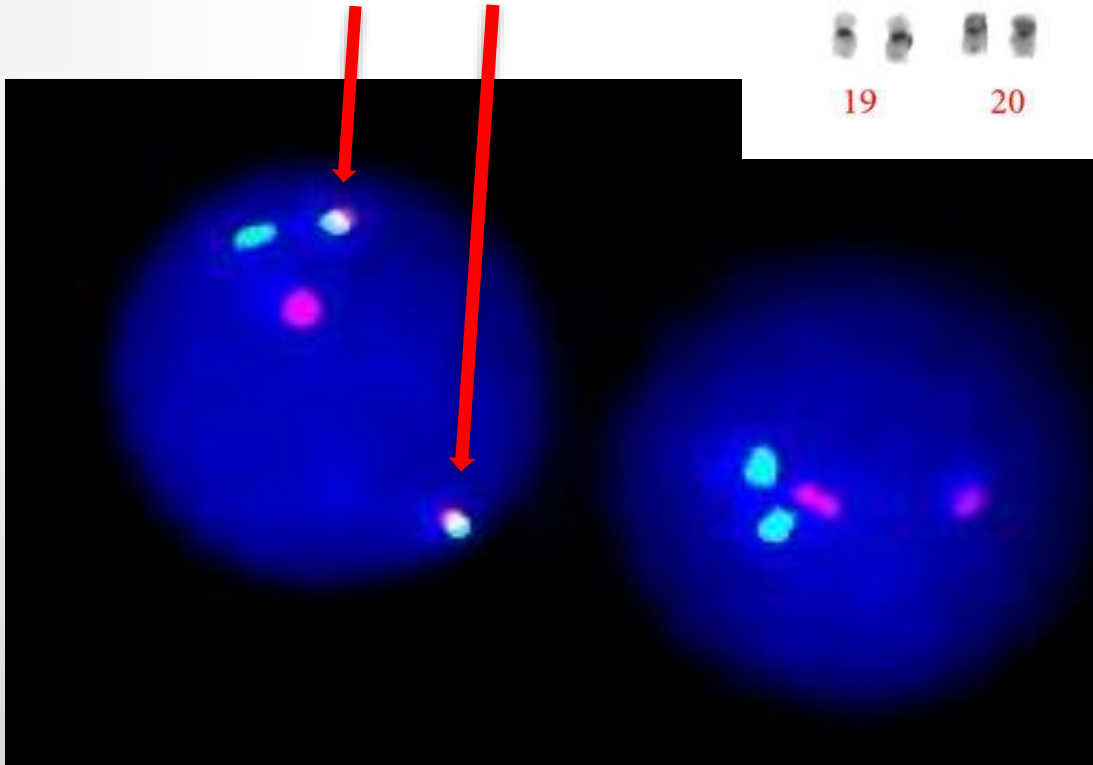
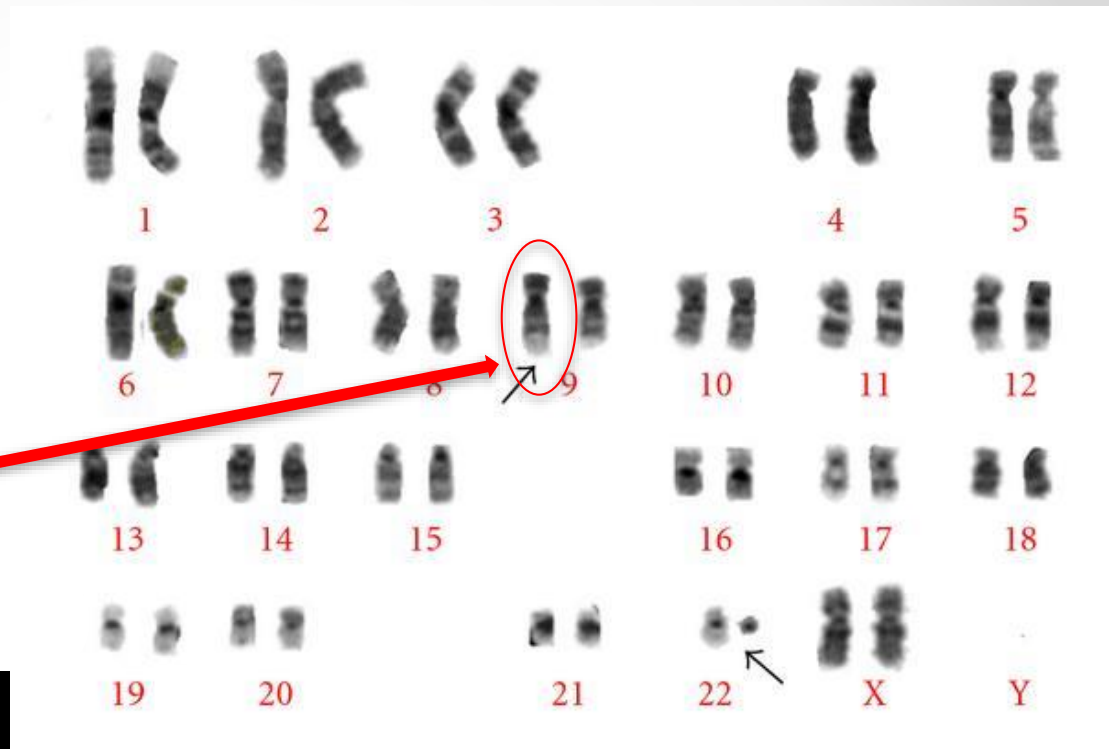
p210 (CML, raramente LAL)

p230 (CML)





Cromosoma Philadelphia



Si analizza
successivamente in
biologia molecolare,
sia per caratterizzare
che per quantificare.

t(1;19)(q23;p13.3)

E2A-PBX1

E2A: proteina helix-loop-helix. Codifica per 2 isoforme. Svolge un ruolo chiave nel commissionamento delle cellule della linea B, già negli stadi primari, e nei riarrangiamenti delle Ig.

PBX1: homeodomain protein. Non espressa dalla linea linfoide.

PROGNOSI: negativa

La traslocazione ha due effetti:

Rompe un gene di E2A

- Interrompe la maturazione delle cellule della linea linfoide B
- Stop all'inibizione e al controllo di alcune cicline



Espande i progenitori indifferenziati

L
E
U
C
E
M
O
G
E
N
E
S
I

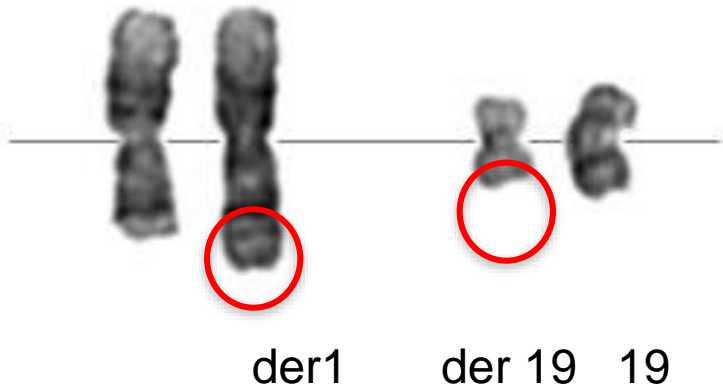
Crea una proteina chimerica.

- Dominio transattivatore di E2A e l'homeodomain di PBX1
- Funge da forte attivatore trascrizionale grazie al dominio di PBX1



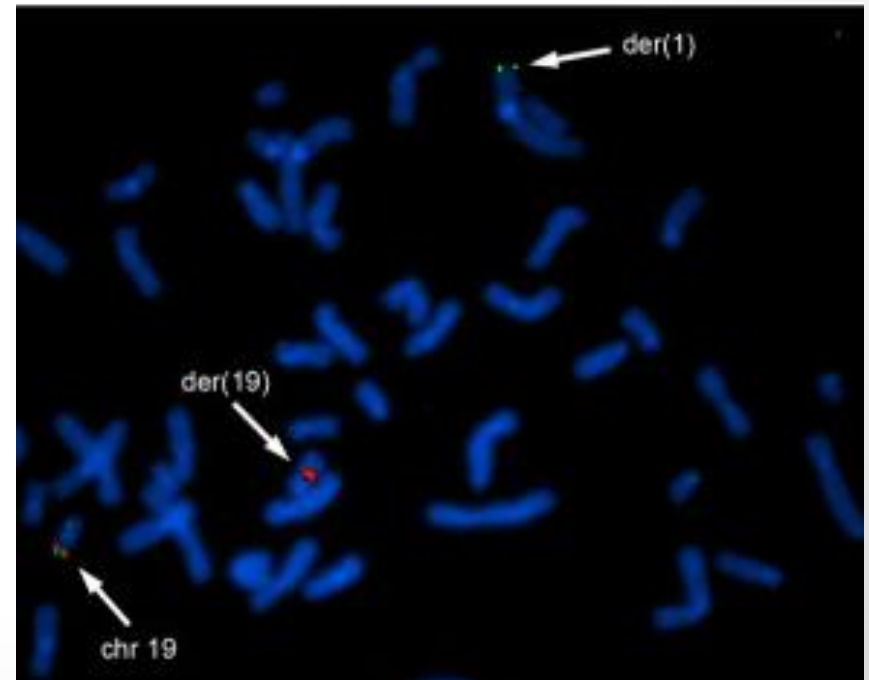
Divisione cellulare incontrollata

t(1;19)(q23;p13.3)



La traslocazione
rilevata con il
bandeggio G

La traslocazione
rilevata con la
FISH



t(12;21)(p13;q22)

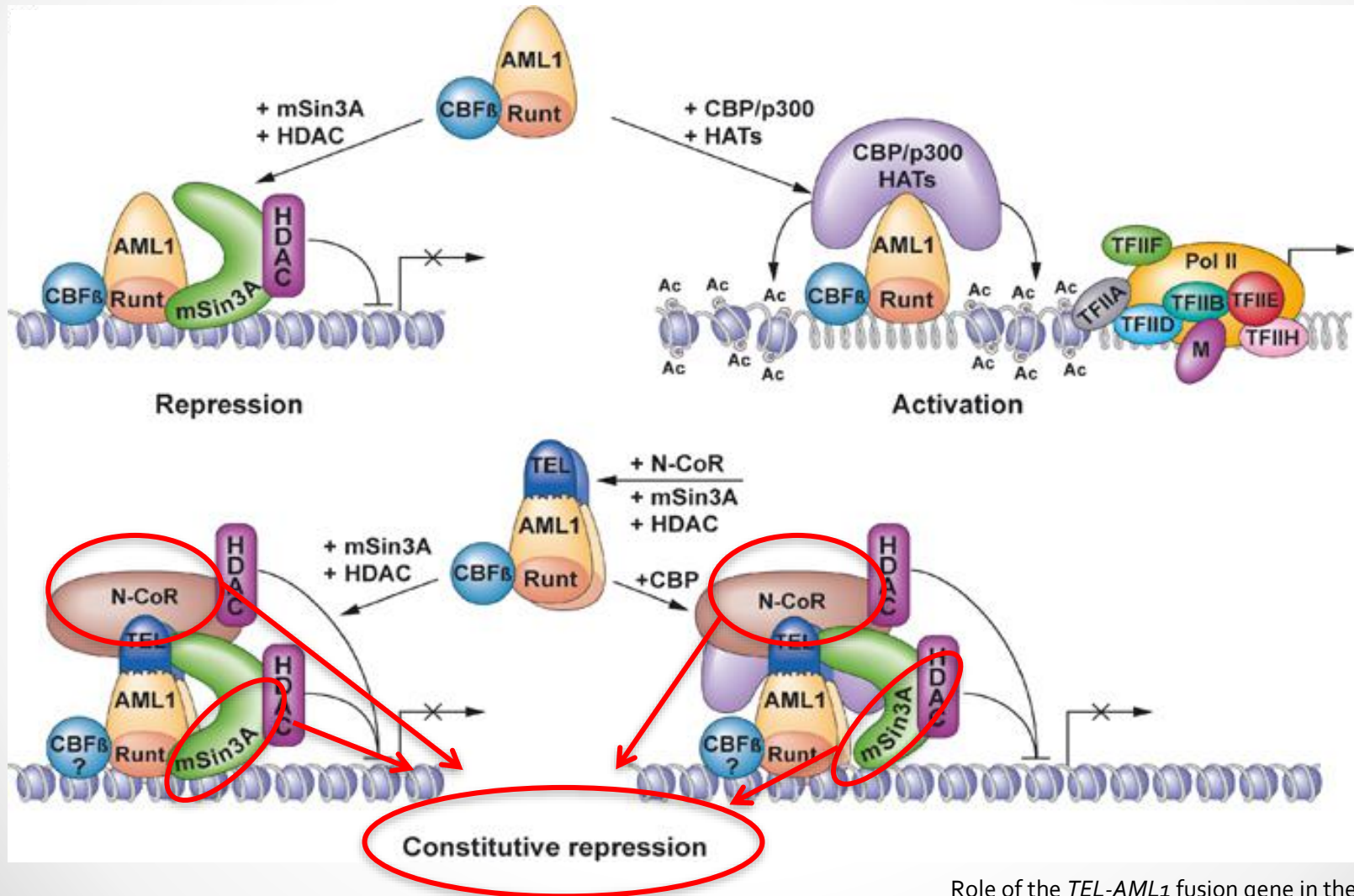
TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)

TEL o ETV6: fattore trascrizionale con dominio legante DNA.

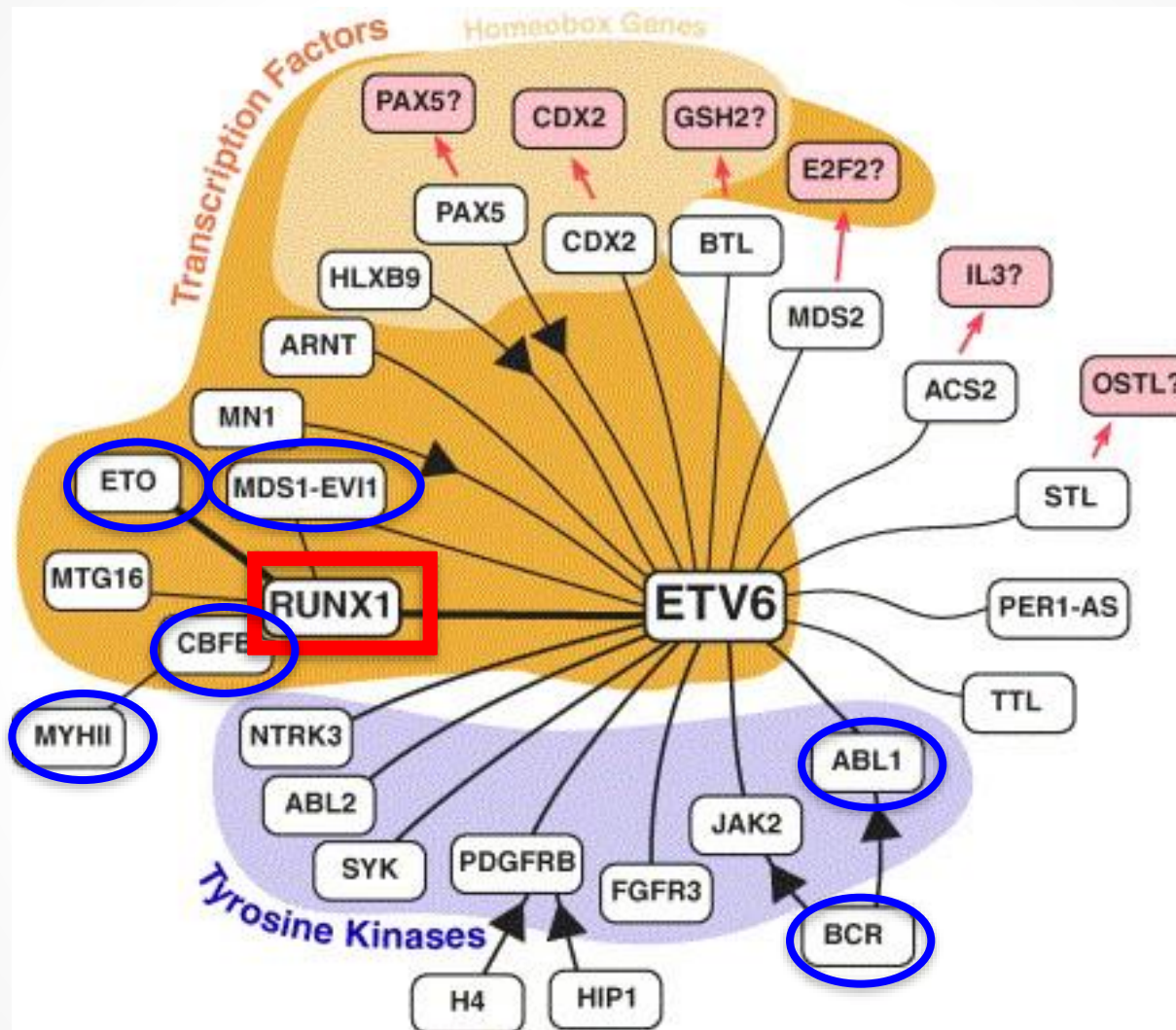
AML1: subunità del AML1-Core Binding Factor.

PROGNOSI: positiva

L'espressione di ETV6 è completamente assente

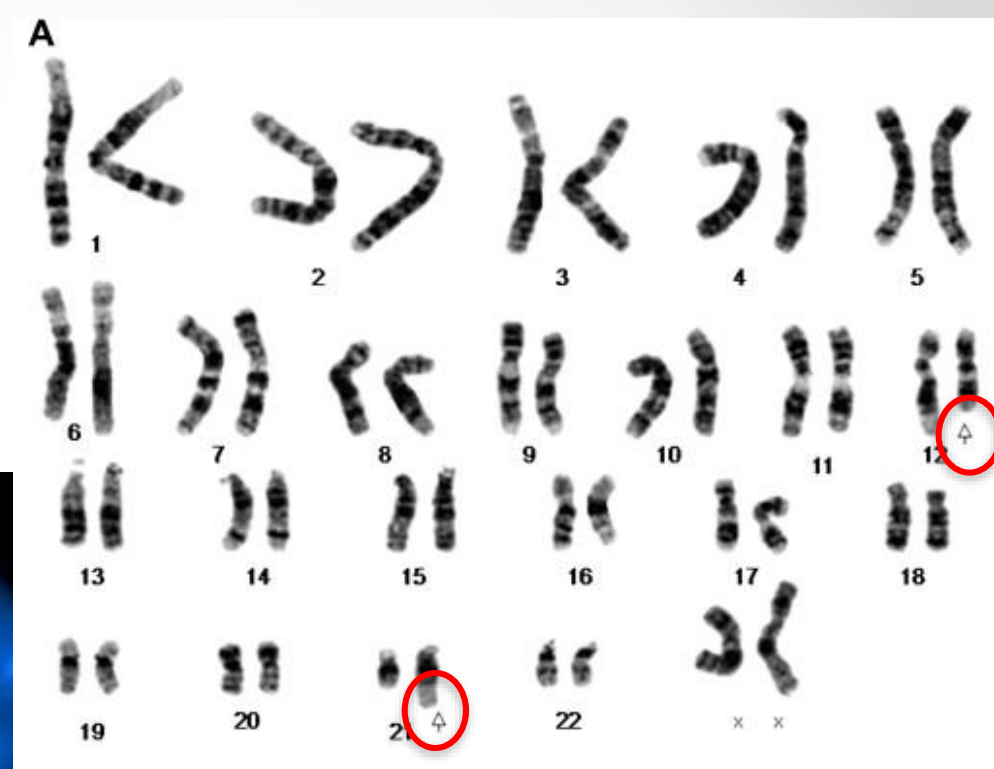
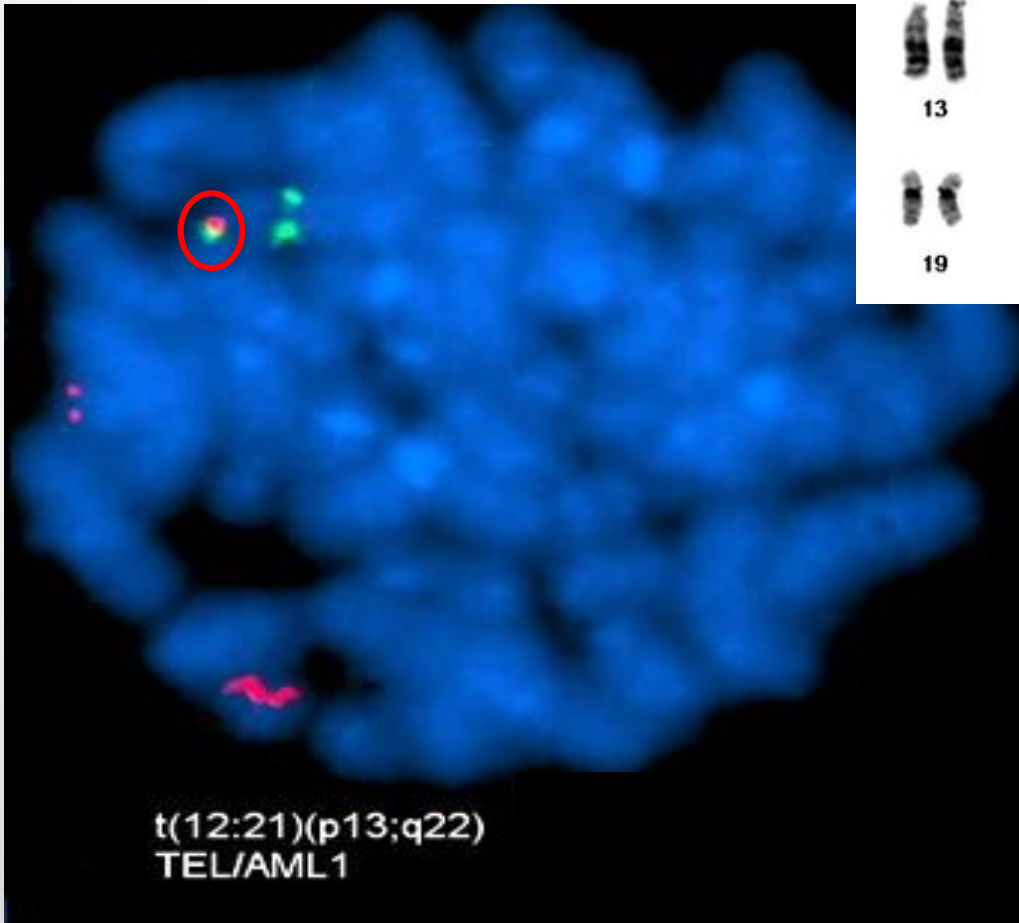


t(12;21)(p13;q22)



Pannello dei possibili fusion gene partner di ETV6 riscontrati in patologie onco-ematologiche

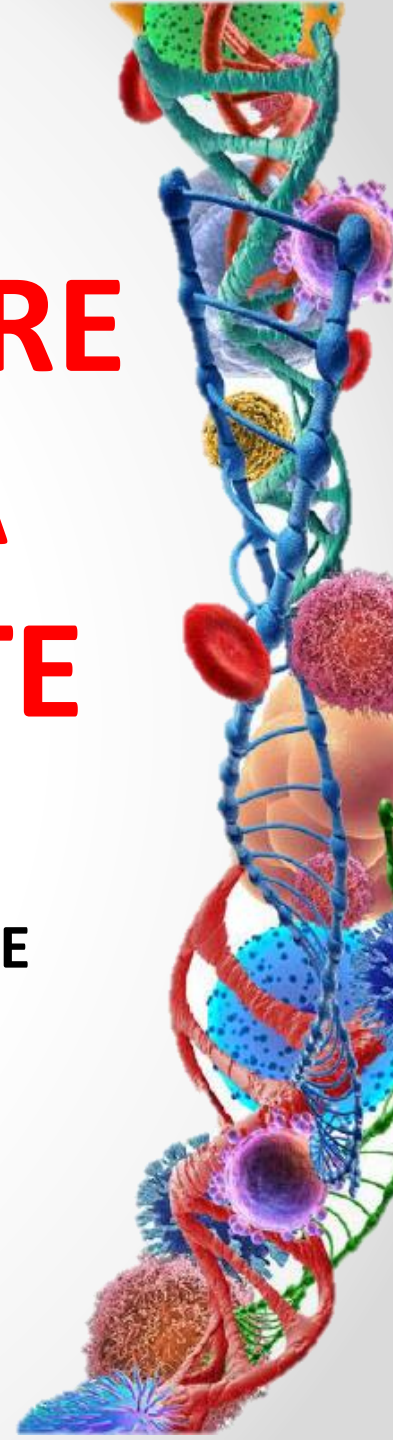
t(12;21)(p13;q22)



Si ricerca raramente in citogenetica, poichè è visivamente complessa. Si analizza preferibilmente in biologia molecolare. •

BIOLOGIA MOLECOLARE per la DIAGNOSTICA delle LEUCEMIE ACUTE

PARTE 1: LE LEUCEMIE ACUTE LINFOBLASTICHE



ALL: diagnosi molecolare

BCR-ABL1

**Conferma
alterazioni
citogenetiche**



Analisi eseguite su cDNA

NOTCH
IKZF1

**Altre
alterazioni
molecolari**



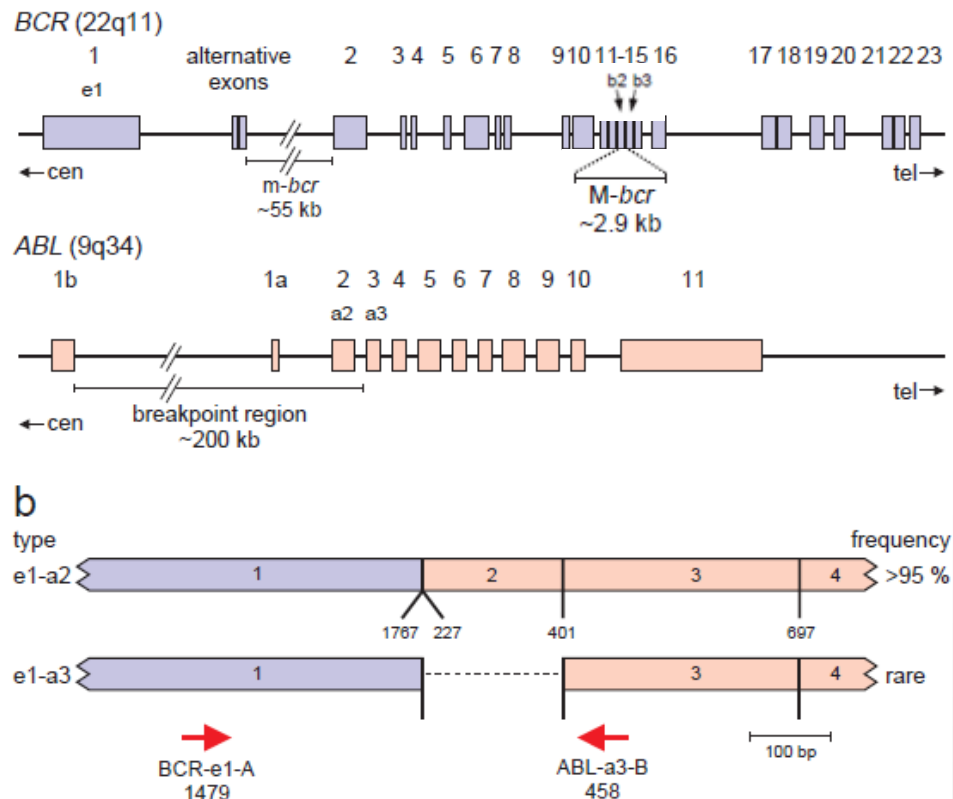
Analisi eseguite su DNA o cDNA

BCR-ABL1

Nella leucemia acuta linfoblastica Ph⁺ è presente il trascritto di fusione derivante dal riarrangiamento tra BCR e ABL1.

La lunghezza del gene di fusione dipende dal breckpoint sui due geni partner.

L'analisi qualitativa viene eseguita su cDNA, mediante PCR e corsa su gel d'agarosio.

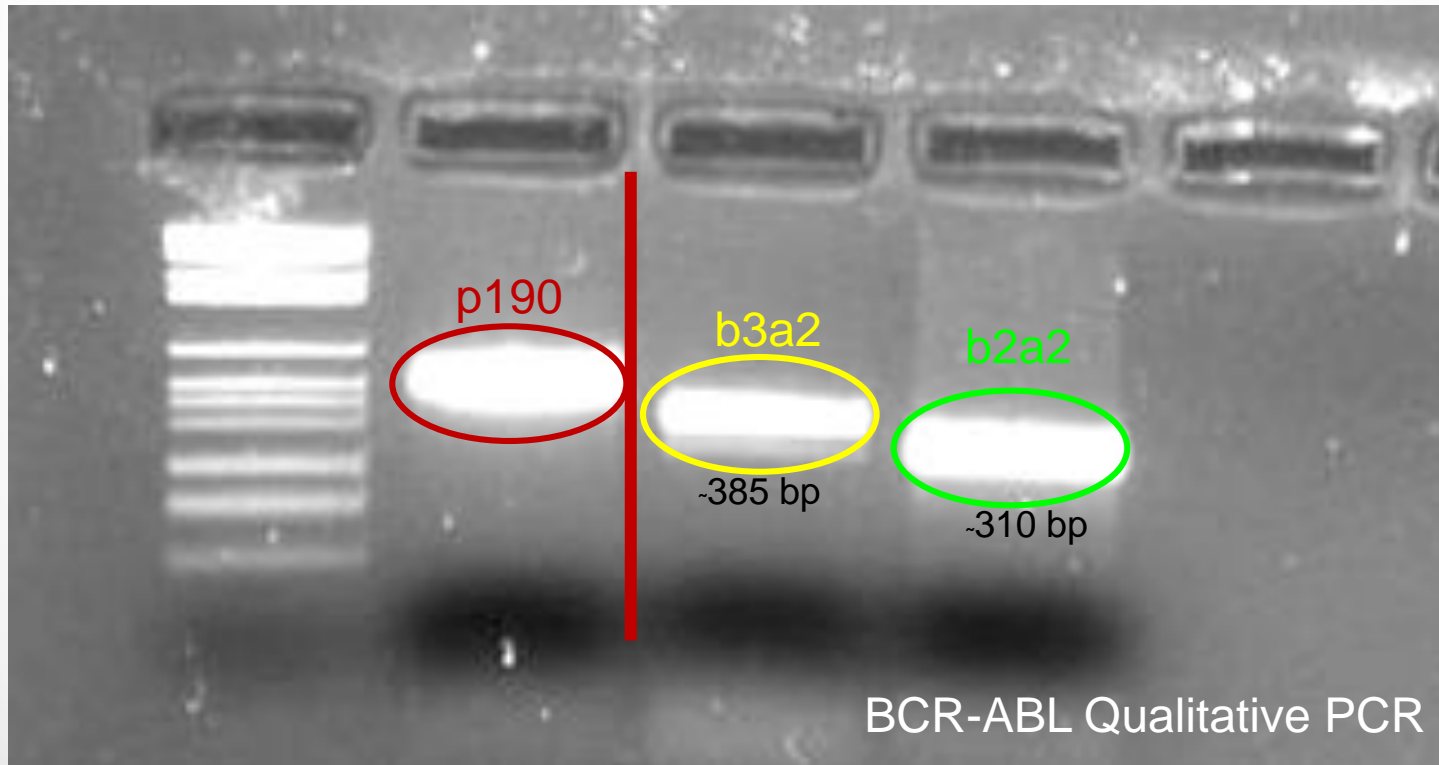


BCR-ABL1

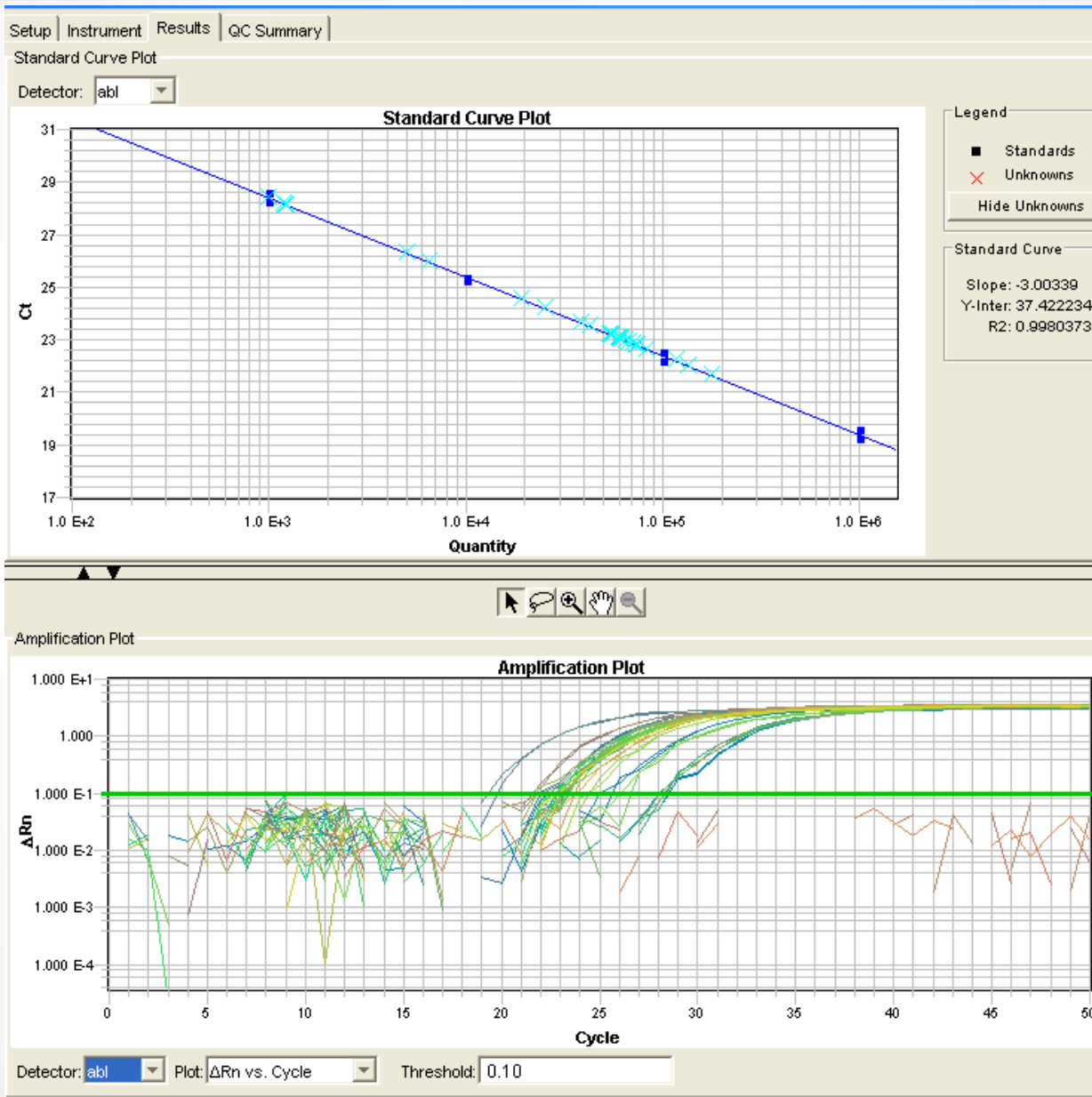
Nella leucemia acuta linfoblastica Ph+ è presente il trascritto di fusione derivante dal riarrangiamento tra BCR e ABL1.

La lunghezza del gene di fusione dipende dal breckpoint sui due geni partner.

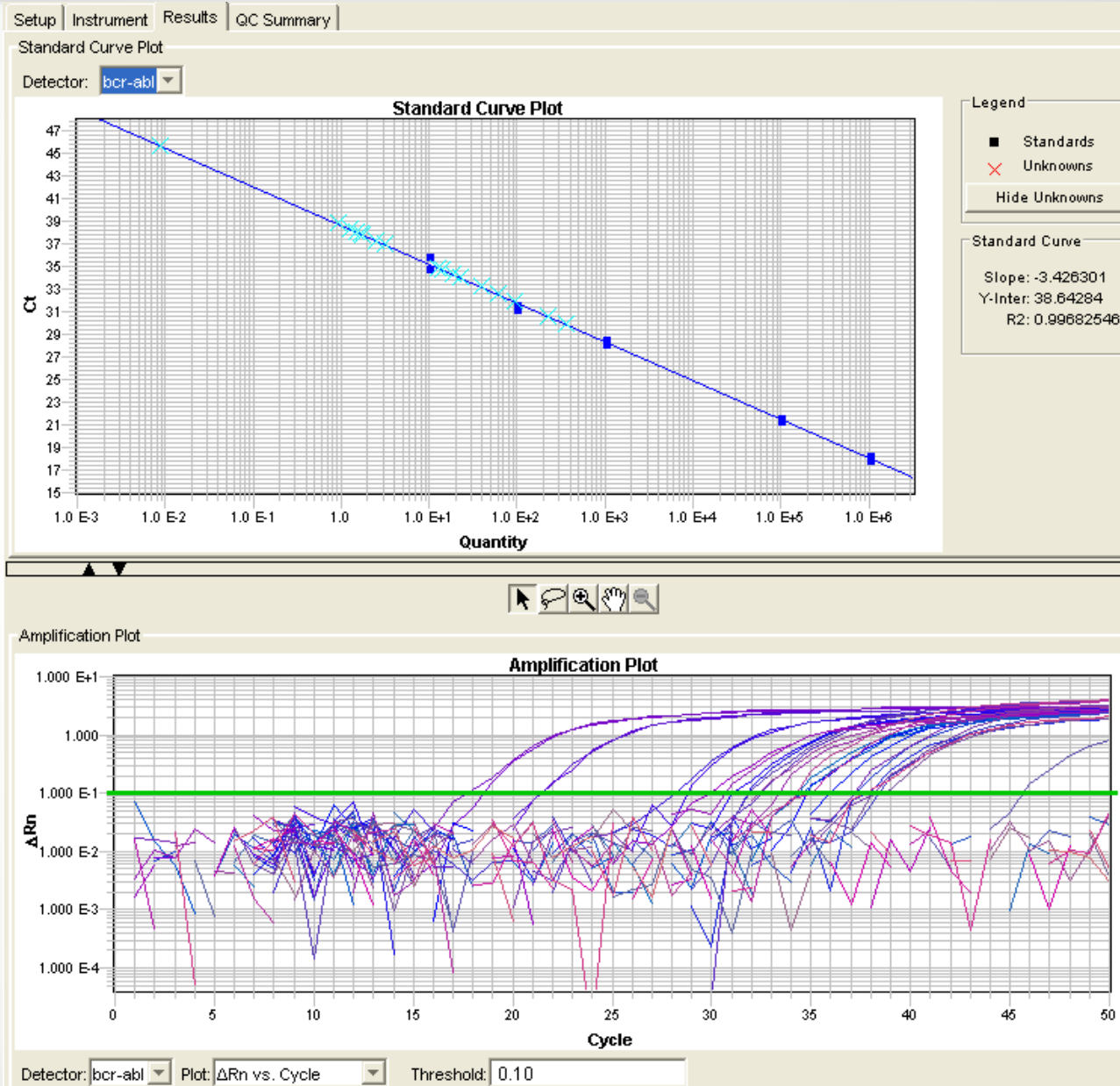
L'analisi qualitativa viene eseguita su cDNA, mediante PCR e corsa su gel d' agarosio.



Quantificazione del trascritto



Quantificazione del trascritto



IKZF1

Il gene IKZF1 codifica per IKAROS che è un fattore trascrizionale importante per la proliferazione e il differenziamento delle cellule emopoietiche normali, soprattutto della linea linfoide.

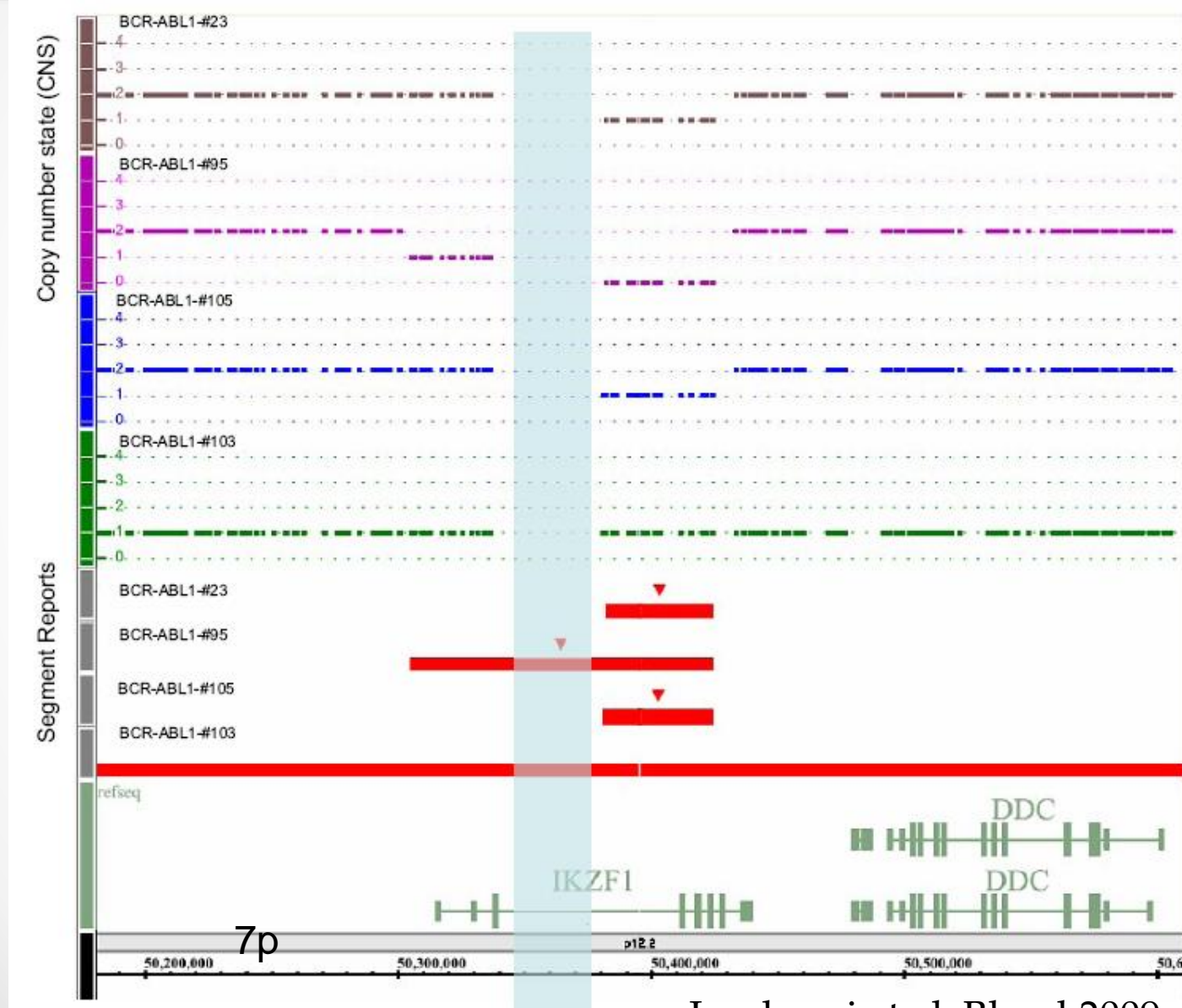
IKZF1

Il gene IKZF1 codifica per IKAROS che è un fattore trascrizionale importante per la proliferazione e il differenziamento delle cellule emopoietiche normali, soprattutto della linea linfoide.

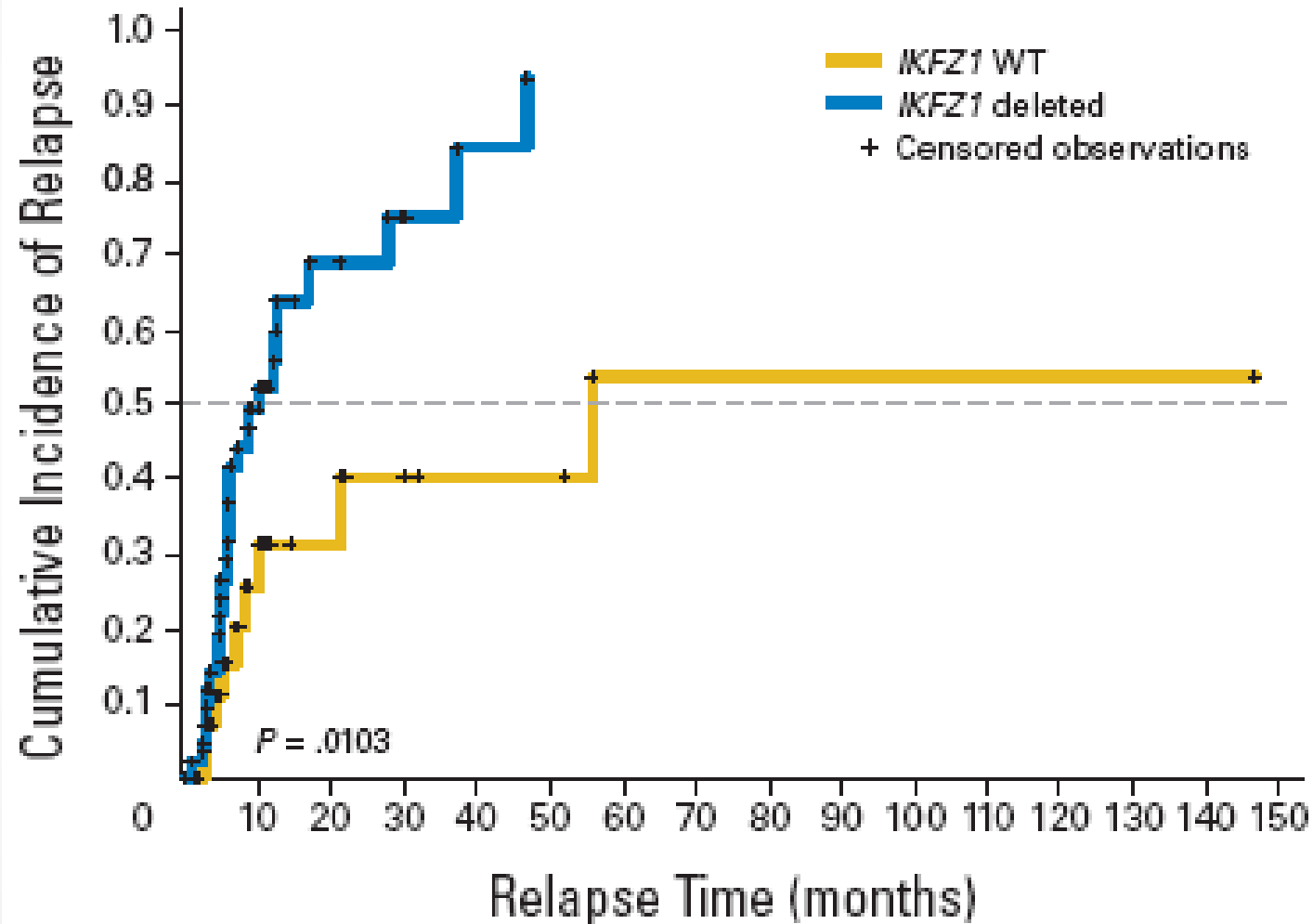
La delezione di Ikaros induce un blocco della differenziazione della linea linfoide B e in associazione con il riarrangiamento BCR-ABL1 contribuisce alla patogenesi della leucemia acuta linfoblastica B Ph positiva.

 Ruolo prognostico

Delezione del gene IKZF1

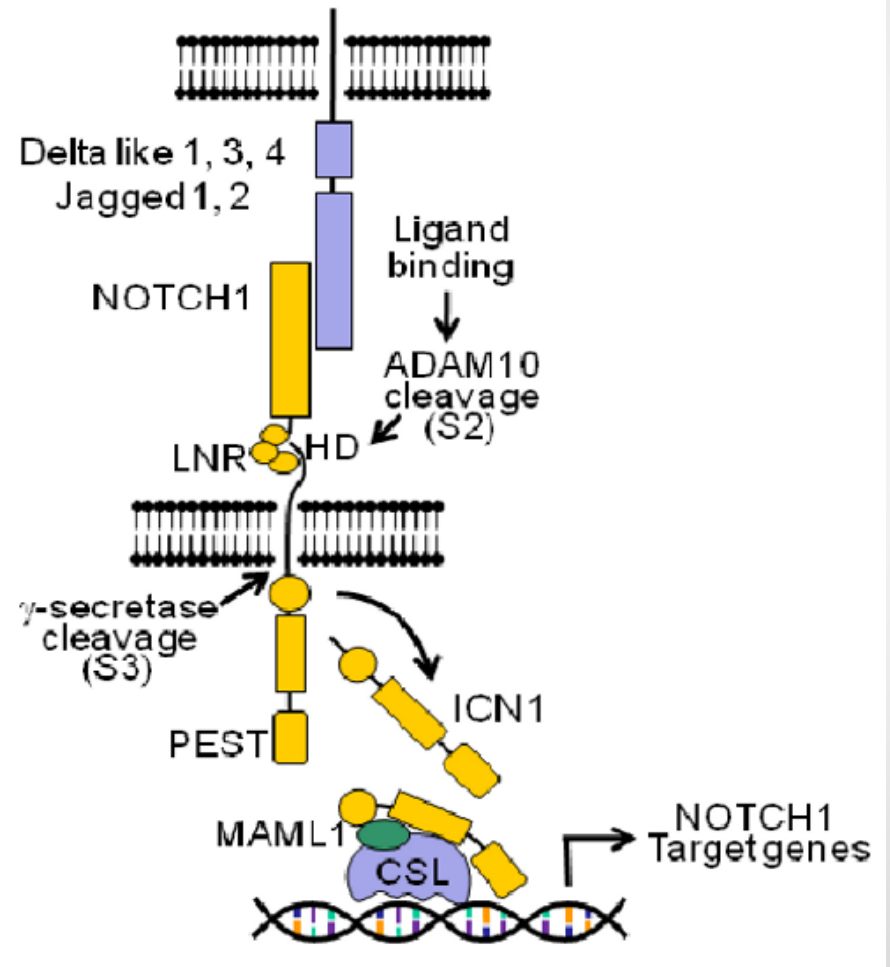
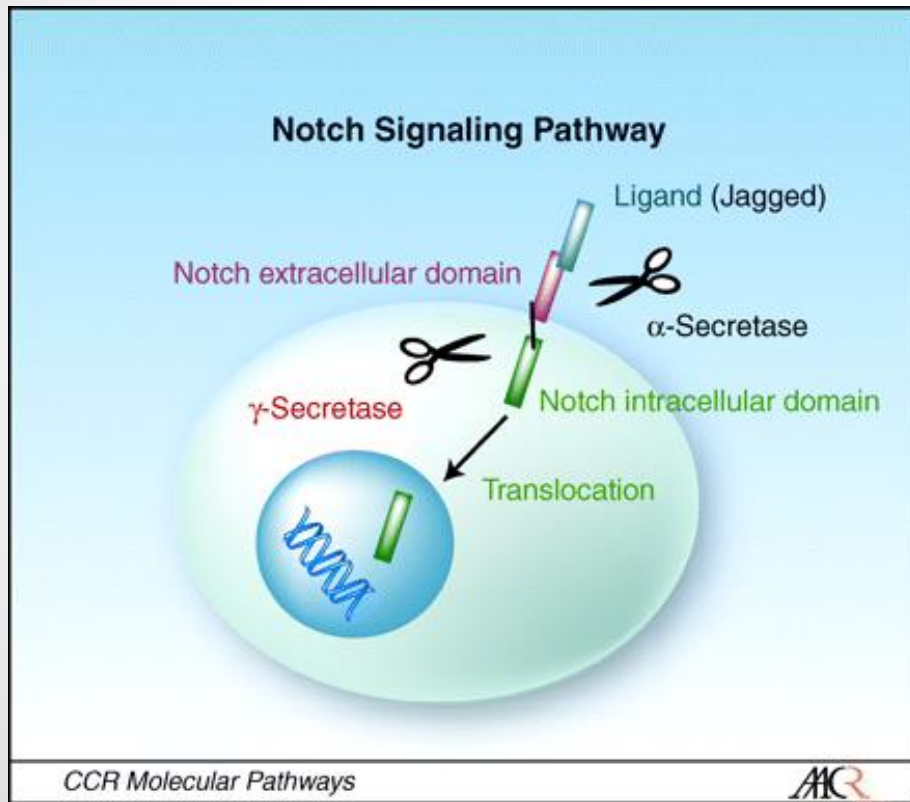


Delezione del gene IKZF1

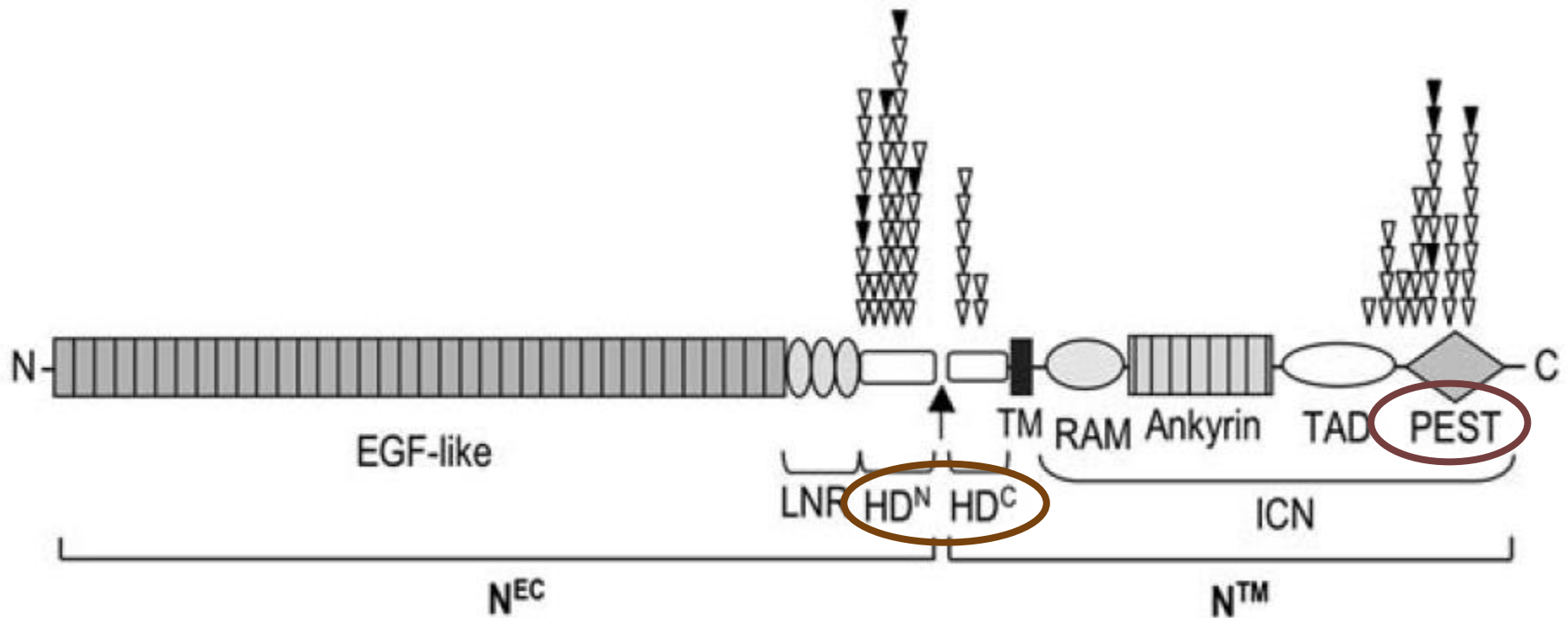


NOTCH

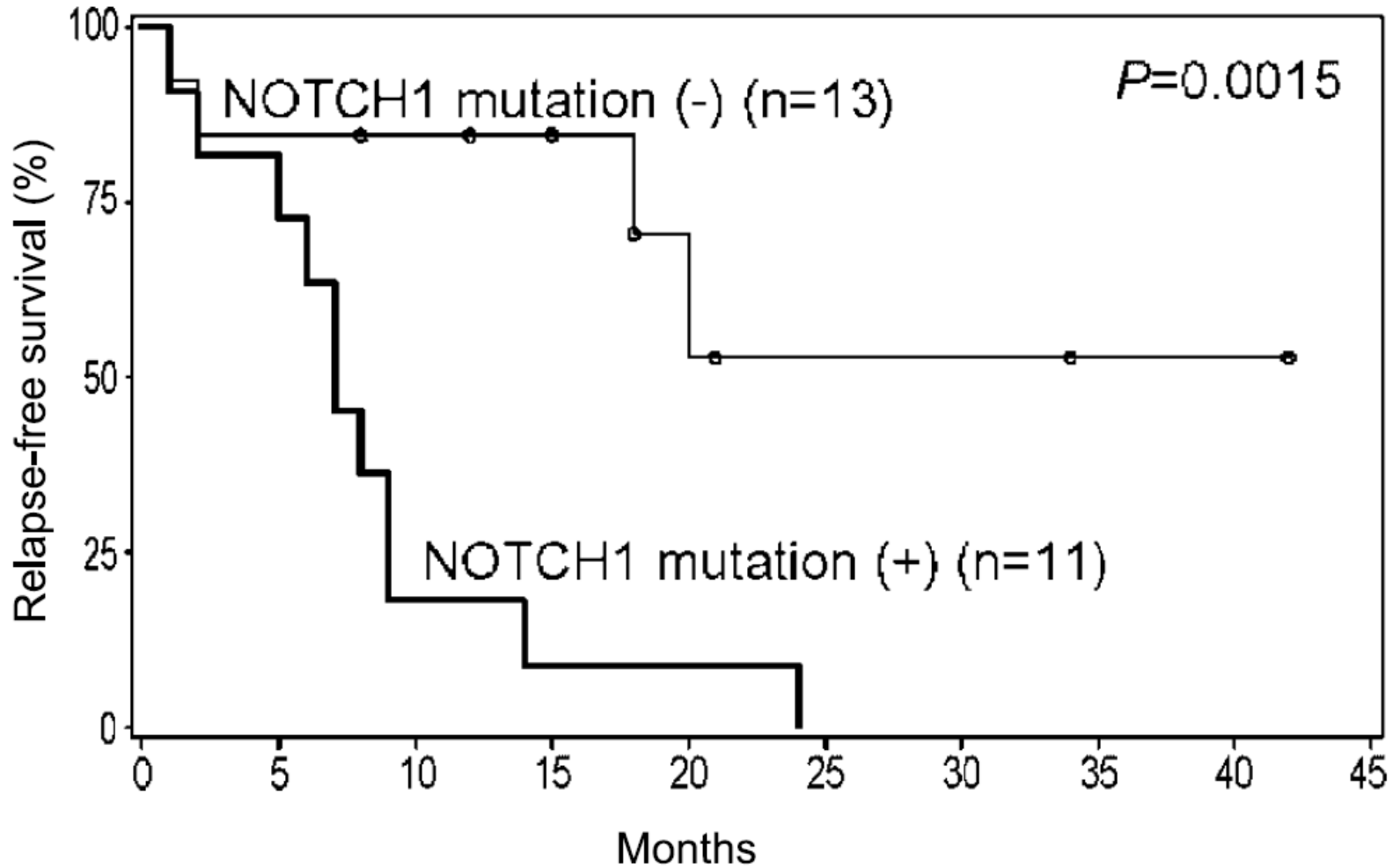
Codifica per un recettore transmembranario che è richiesto per il commissionamento dei progenitori pluripotenti verso la linea T e poi per l'assemblaggio del complesso del pre-TCR sui timociti immaturi.



NOTCH



NOTCH



Patients older than 18 years (n=24)