



# Il laboratorio di diagnostica citogenetica-molecolare in Ematologia

Maria Antonella Bardi

Dipartimento Medicina Specialistica UO Ematologia

16 Dicembre 2017

## Peter C. Nowell (1928–2016)

Tumor biologist who set the stage for precision medicine

By Mark I. Greene and Jonal S. Moore

**P**eter C. Nowell, a cancer researcher whose contributions to the field of tumor biology formed the basis of much of today's precision medicine, died in the early hours of 26 December 2016. He was 88 years old. With his passing, the scientific community lost a gifted scholar, a dedicated teacher and mentor, a true gentleman, and a good friend.

Nowell was born and spent virtually his entire life near Philadelphia, Pennsylvania. He studied biology and chemistry, earning his bachelor's degree from Wesleyan University in 1948 and his medical degree from the University of Pennsylvania in 1952. After a residency in pathology at Presbyterian Hospital in Philadelphia, Nowell spent 2 years at the U.S. Naval Radiological Defense Laboratory in San Francisco, California. In 1956, he returned to the University of Pennsylvania, where he remained until his retirement. We had the privilege of working closely with Nowell as a colleague (M.I.G.) and as a student and colleague (J.S.M.) for more than 25 years.

Nowell is best known for his co-discovery of the Philadelphia chromosome in 1960 with David Hungerford, a graduate student at the Institute for Cancer Research at Fox Chase in Philadelphia. At the time, Nowell was exploring the role of chromosomes in tumors, an area filled with speculation, but little evidence. Nowell and Hungerford observed the frequent occurrence of a minute chromosome in patients with chronic myelogenous leukemia. Early studies could not identify whether it was a translocation or a deletion. The true nature of the Philadelphia chromosome was demonstrated in the 1970s, with the evolution of chromosomal banding techniques, by Janet Rowley of the University of Chicago, who identified it as a translocation of genetic material between chromosomes 22 and 9. The translocation essentially leads to unregulated cell proliferation and defective DNA repair.

This translocation is often referred to as the first genetic link to cancer. Later, Brian Druker of Oregon Health and Science University demonstrated that a targeted inhibitor could effectively inhibit the translocation's effect. This was the basis of Gleevec (marketed by Novartis), one of the first of this new class of targeted cancer therapeutics. Nowell and Hungerford's work, along with Rowley's later analysis, served as the precursor to today's expanding field of cancer genomics, and it earned them the Lasker Award in 1998, often referred to as "America's Nobel Prize."

One of Nowell's most important contributions was his proposal that cancer



evolved through multiple genetic stages, indicating that tumor heterogeneity may ultimately require individualized therapy. In a 1976 Review in *Science*, he described evidence to support the clonal evolution model of tumor progression, which was at odds with the prevailing idea that tumors evolved through somatic mutation. His ideas were met with some skepticism at the time, but sequential changes in tumors are now understood to result from genetic instability, which is a part of the neoplastic process. This observation has become increasingly appreciated as we understand the critical importance of personalized genomic diagnostics as the basis for precision

therapy for malignancies.

Clearly he was a forward thinker and a brilliant scientist, but Nowell cited his role as a mentor and teacher as the most rewarding aspect of his career. On a weekly basis, his lab would fill with students ranging from elementary school children to visiting scientists. His door was always open to discuss any late-breaking scientific finding (he always knew the current topics). Physicians from many specialties in the Hospital of the University of Pennsylvania would drop by to explore ideas and to learn, but his favorite time was spent with young scientists. At a time when the scientific community is devising programs to encourage STEM interest, Nowell's enthusiastic sharing of his knowledge with budding scientists should serve as a model.

Nowell was an icon in science, but to many, he was a cherished mentor and dear friend. He often reminded those of us who worked closely with him that "we made the boxes; biology did not." Trainees in his lab were always pushed to think outside of the boxes of current scientific dogma, and no hypothesis was too outrageous as long as you could devise an approach to test it. His lab meetings often resembled think tank sessions rather than detailed presentations of data. His laboratory was his scientific family, embraced as both friends and colleagues. He understood early on the importance of work-life balance and encouraged those of us who trained with him to be more than a "lab rat." Home and family always came first to Nowell, and he encouraged that in all who shared the journey with him.

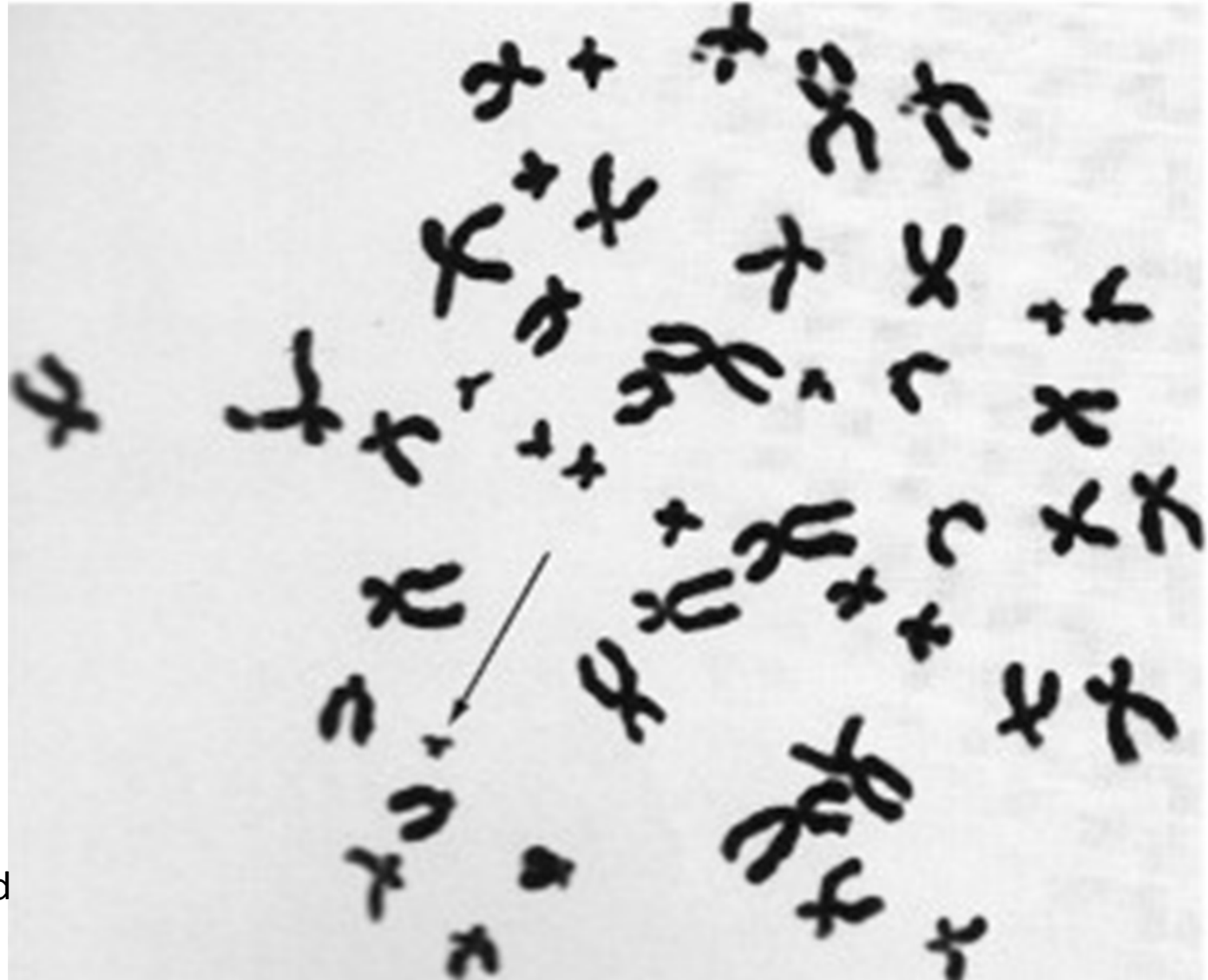
A true "renaissance scientist," Nowell had the rare ability to see the big picture. A visionary for the future of oncology research, he recognized the importance of genomic alterations in tumorigenesis and as a target for therapy, predicted how biological processes such as tumor clonal evolution and regulation of lymphocyte proliferation would function, and devised approaches to prove his hypotheses, even to the point of creating new technology. Today's world of very focused research, necessitated by the current funding environment, is difficult terrain for broad-thinking scientists made in the mold of Nowell. The biomedical community owes much to him for his scientific achievements, especially his role as one of the fathers of precision diagnostics, but his most important contribution is serving as a role model for future generations. It is scientists like Nowell who will ensure the future of biomedical scientific advancement. ■

Department of Pathology and Laboratory Medicine, Perelman School of Medicine of the University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104-4238, USA.  
Email: [markgre@mail.med.upenn.edu](mailto:markgre@mail.med.upenn.edu)

Peter  
Nowell



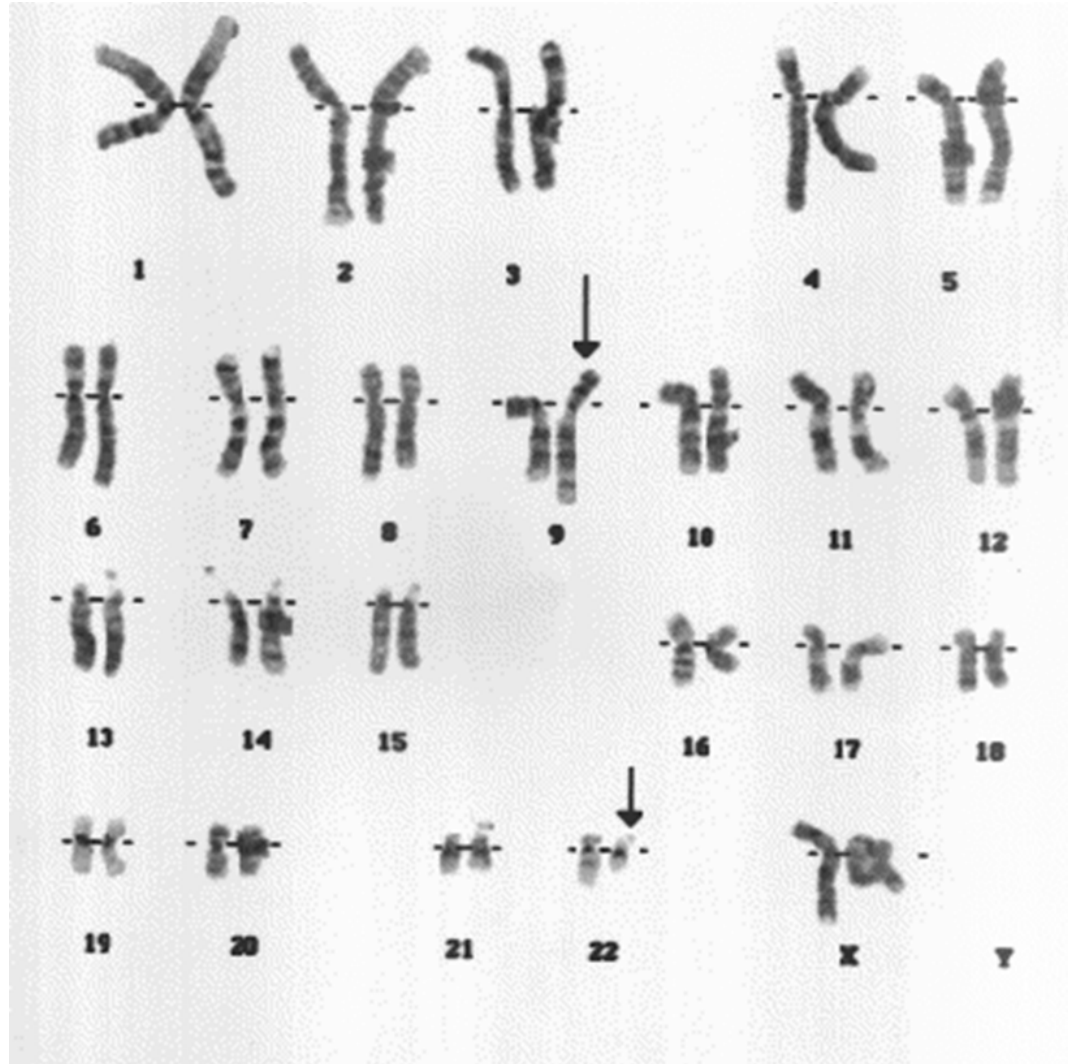
David  
Hungerford



**1960**



Janet Rowley  
**1973**



*.....nel 1980 si capì che tale anomalia dava come risultato un gene aberrante che codificava per una onco-proteina anomala che conferiva un vantaggio proliferativo alle cellule che la esprimevano*

## **Anni di Ricerca.....**

FARMACO : ***anti-Tyrosine Kinase***



bersaglio molecolare ***Tyrosine Kinase*** espressa  
costitutivamente per effetto della anomalia  
cromosomica



CURA MIRATA per pazienti con  
***LMC presentanti l'anomalia  
cromosomica***

## ***Rivoluzione nella storia della Medicina***

Approccio di studio  
delle anomalie  
genetiche è stato esteso  
successivamente a  
molte patologie onco-  
ematologiche

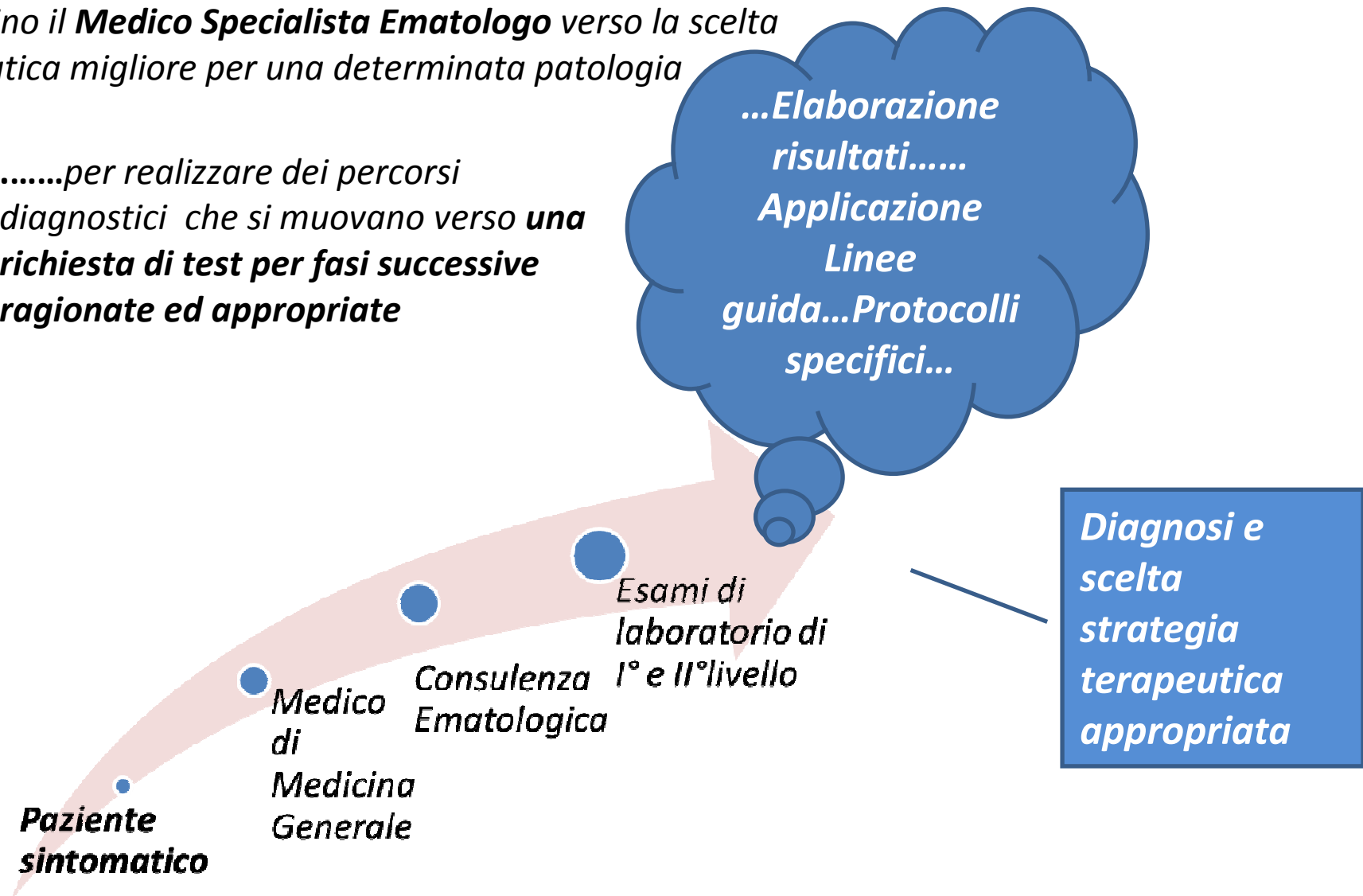


***Nuova frontiera  
della Medicina di  
Precisione nel  
trattamento di  
pazienti con  
emopatie  
maligne***

## **Qual è lo scenario in cui si muove il Laboratorio di II livello dell'Ematologia ?**

*.....alla ricerca di quei marcatori cromosomici e molecolari che indirizzino il **Medico Specialista Ematologo** verso la scelta terapeutica migliore per una determinata patologia*

*.....per realizzare dei percorsi diagnostici che si muovano verso **una richiesta di test per fasi successive** ragionate ed appropriate*



## ***Le tecniche utilizzate nel laboratorio di diagnostica citogenetica-molecolare***

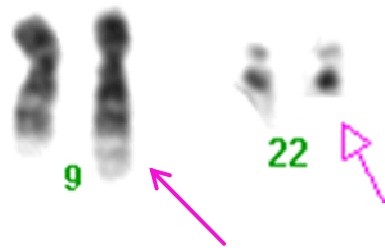
*L'Ematologia è una disciplina clinica e di laboratorio; nello studio di laboratorio si utilizzano strumenti e conoscenze classiche quali la morfologia, i conteggi degli elementi, le colorazioni speciali e strumenti più specifici come :*

- **Studio dell'immunofenotipo -Citofluorimetria**
- **Citogenetica Convenzionale (CC)**
- **Ibridazione In Situ Fluorescente (FISH)**
- **PCR e RT-PCR qualitativa e quantitativa (RQ-PCR), Sequenziamento genico metodo Sanger o New Generation Sequencing (NGS)**

**Sottolineo  
l'importanza  
dell'integrazione  
tra le varie  
metodiche ai fini  
diagnostici e di  
ricerca nelle  
emopatie  
maligne**

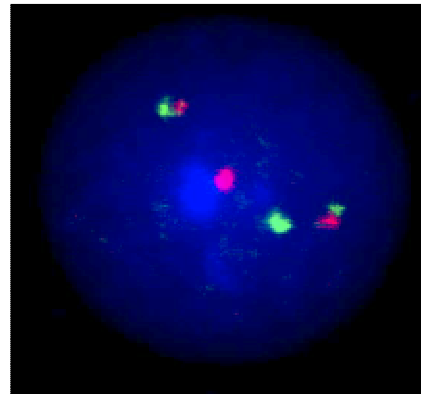
***Le varie tecniche utilizzate nel laboratorio assolvono la funzione di individuare le anomalie sulla base della loro grandezza :***

Tecnica di CC ha una risoluzione



circa 3-5 Mb

Risoluzione mediante FISH



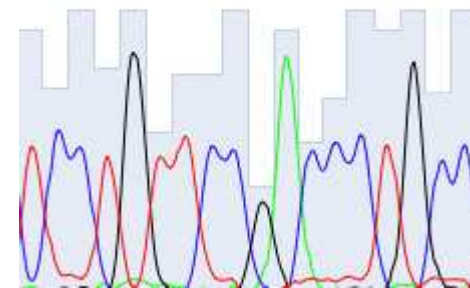
circa 40-100 Kb

Risoluzione mediante tecniche su base-PCR o Sequenziamento genico



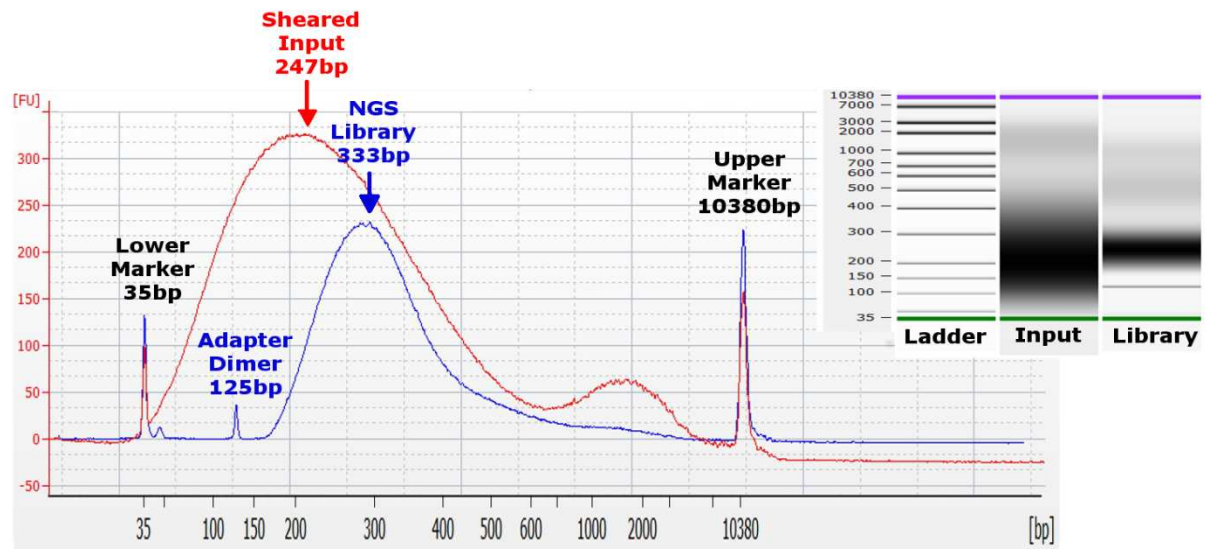
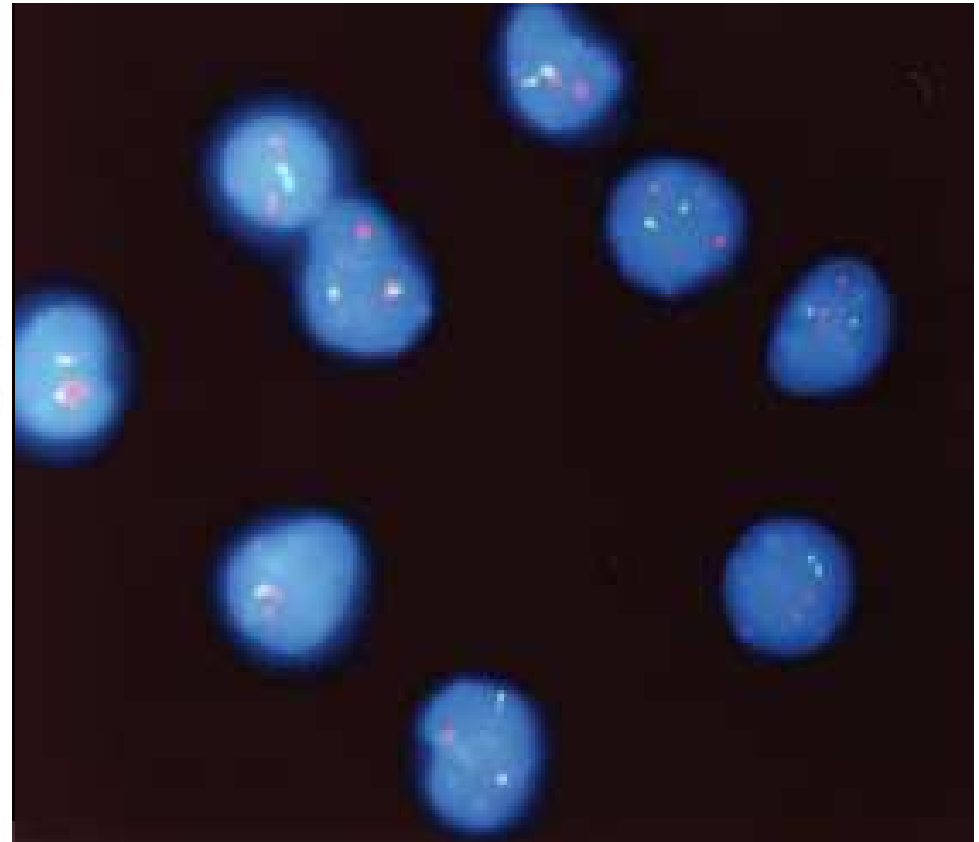
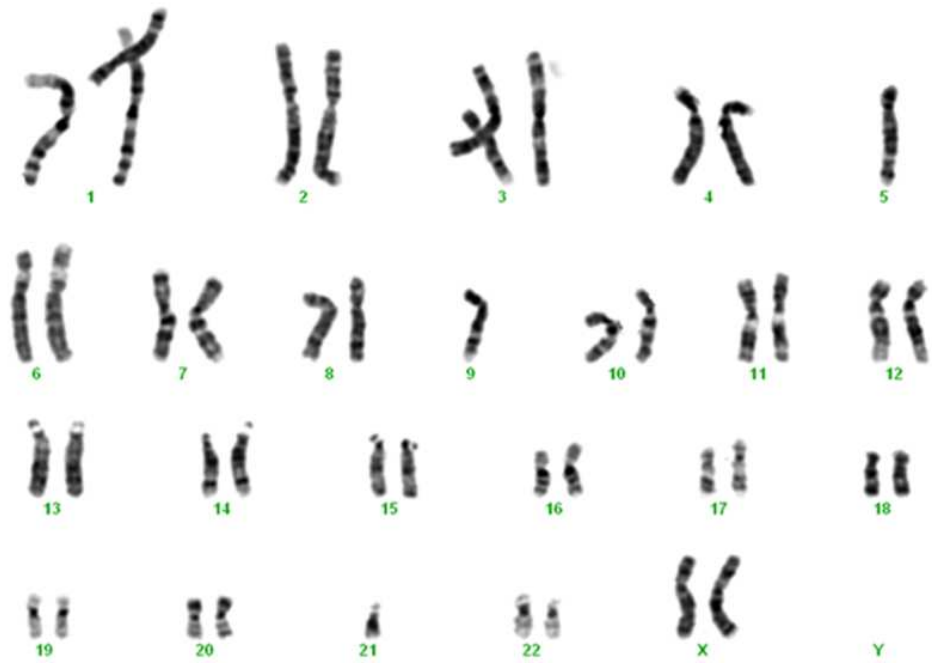
1cellula  
patologica/ 10<sup>5</sup>-  
10<sup>6</sup> cellule totali

T C C T G T T C C G A C C C T G C C  
640 650



Sequenziamento genico  
NGS : **sostituzione di 1 base, variazione di 1 nucleotide**

GAC**G**TACGATCAG  
GAC**T**TACGATCAG



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

<b>CC :</b> ✓ <b>vantaggio:</b> unico esperimento assetto cromosomico completo -evidenza cloni distinti ed anomalie dell'evoluzione clonale ✓ <b>svantaggio:</b> scarsa sensibilità per anomalie criptiche -richiede cellule proliferanti -tecnica laboriosa e che richiede molta esperienza	<b>FISH:</b> ✓ <b>vantaggio :</b> evidenza 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 - ✓ <b>svantaggio:</b> scarsa disponibilità di sonde per uso diagnostico - utilizzo di 1-3max sonde in esperimenti di coibridazione per esperimento	<b>PCR:</b> ✓ <b>vantaggio:</b> alta sensibilità della tecnica -quando applicabile la RQ-PCR fornisce risultati abbastanza standardizzati ed in tempi rapidi ✓ <b>svantaggio:</b> applicabile solo nei casi in cui il trascritto ibrido o il gene alterato è conosciuto -NGS tecnica laboriosa che prevede esperienza e tecnologia avanzata, oltre ad un approccio bioinformatico consolidato per l'analisi dei risultati. Il costo relativamente elevato ma nel breve tempo sarà destinato a ridursi.
---	--	---

Le aberrazioni citogenetiche/molecolari costituiscono attualmente  
il ***più importante fattore prognostico***  
delle emopatie neoplastiche e la loro determinazione  
è di fondamentale importanza

ai fini

✓ ***Classificativi***

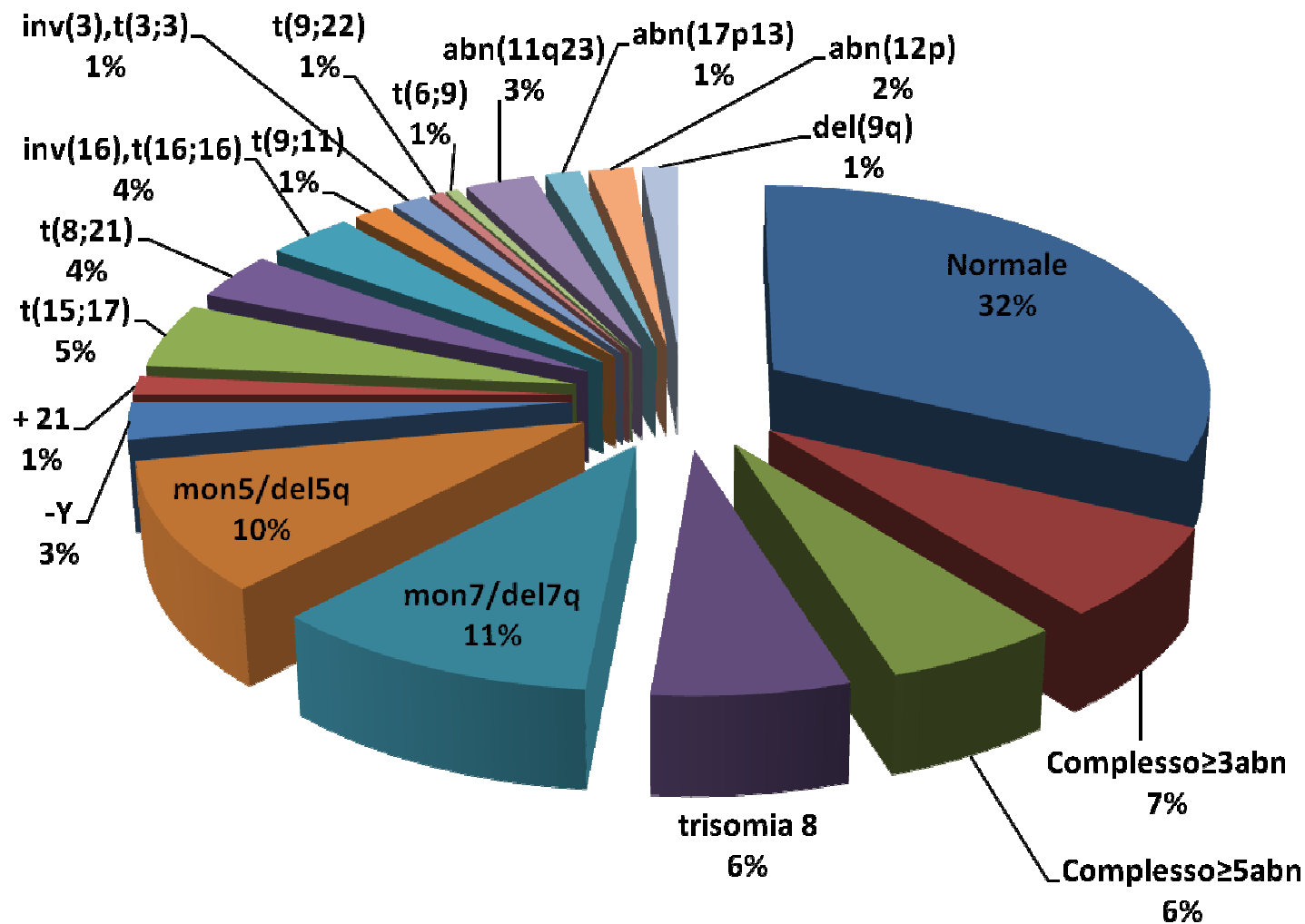
la classificazione dei Tumori secondo la World Health Organization (WHO) incorpora le aberrazioni cromosomiche insieme alla morfologia , all'immunofenotipo e alle caratteristiche cliniche, nella classificazione delle leucemie e dei linfomi(WHO 2016).

✓ ***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.

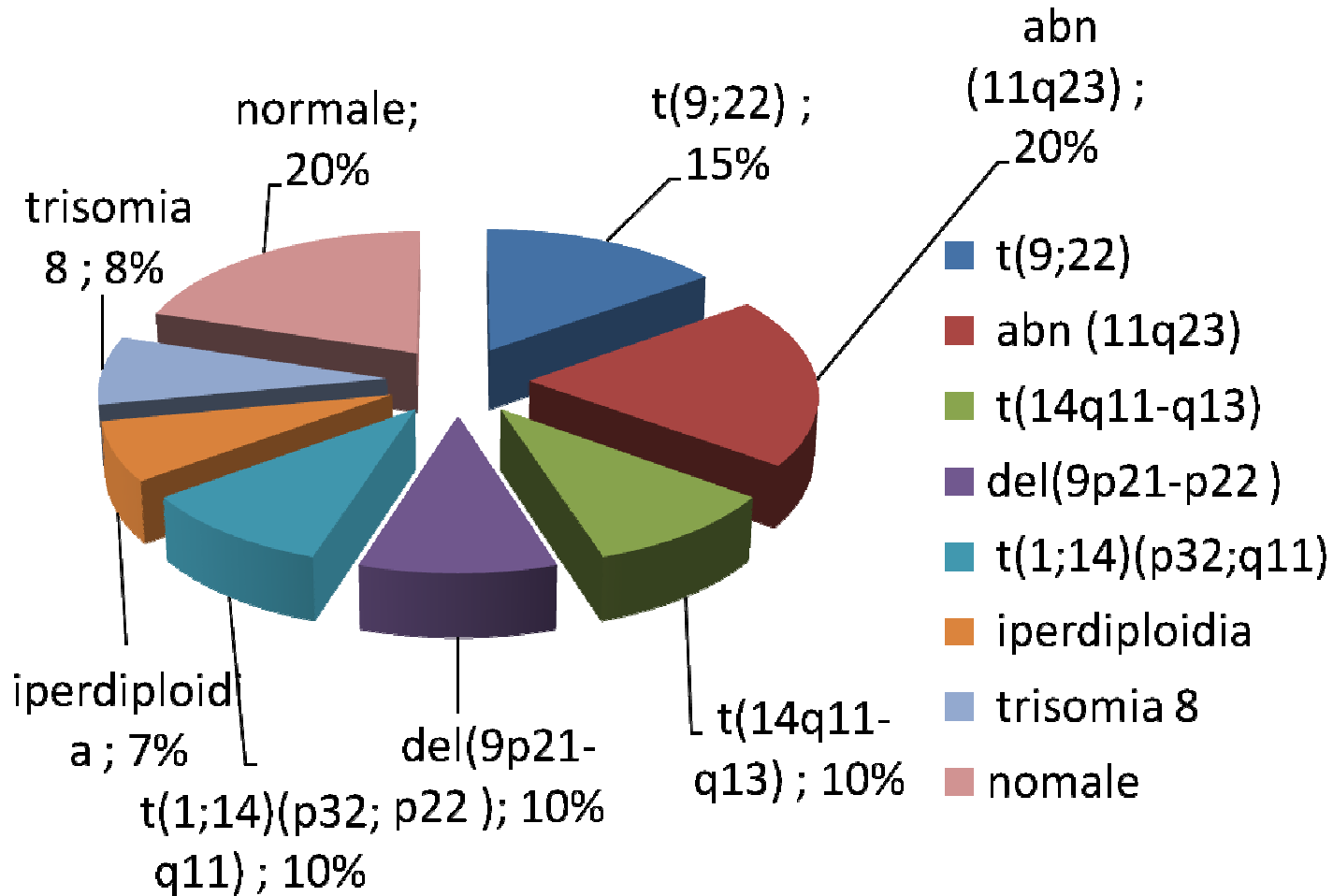
Gli studi delle aberrazioni citogenetiche/molecolari sono raccomandate alla diagnosi e ad intervalli regolari secondo linee guida specifiche



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%.

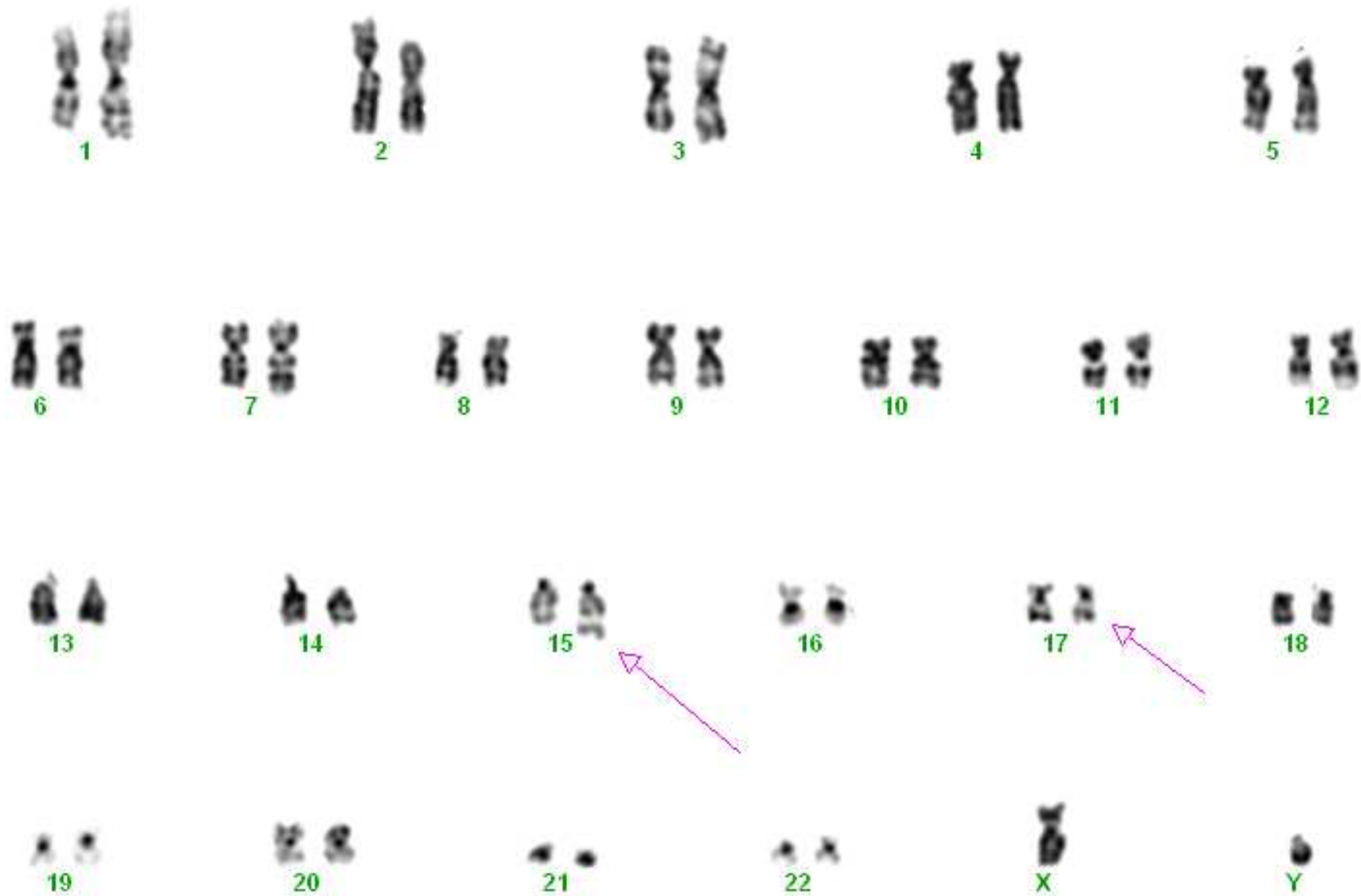
## ***.....e se il cariotipo è Normale ?***

.....**nelle LAM** i pazienti con cariotipo normale vengono assegnati al gruppo di prognosi intermedia, che rappresenta in realtà un gruppo molto eterogeneo in cui nel corso degli ultimi anni, sono state identificate delle mutazioni genetiche relative ad alcuni geni come FLT3, MLL, NPM, CEBP $\alpha$  con significativo impatto prognostico.

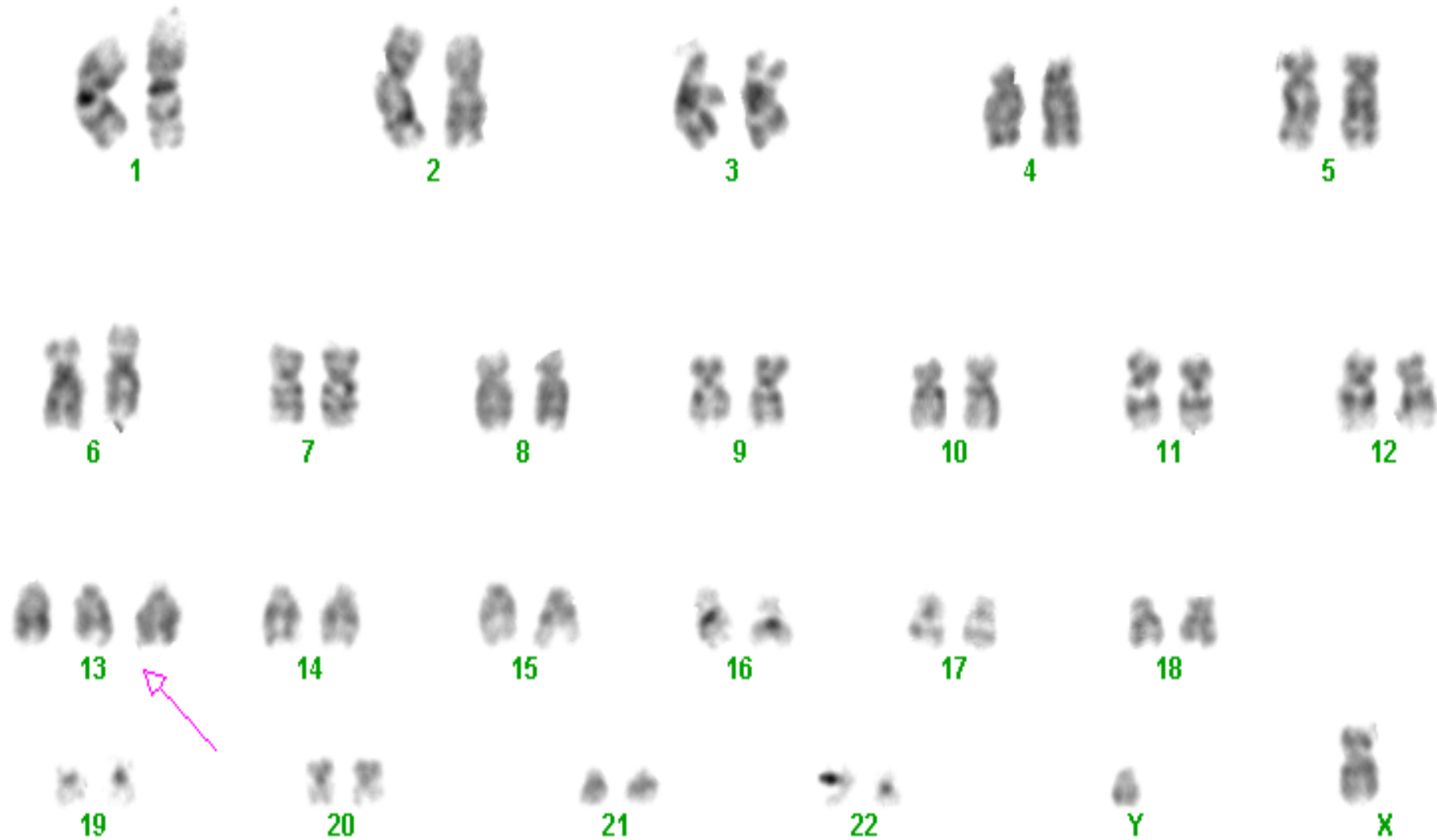
..... **nelle LAL** non esiste una classificazione così stratificata ma alcune traslocazioni sono associate ad una prognosi più severa: t(9;22); abn 11q23, t(8; 14) e varianti.

***La rilevanza della CC nella diagnostica delle LAM anomalie ad  
indice prognostico favorevole:***

***t(15;17)(q22;q21)***

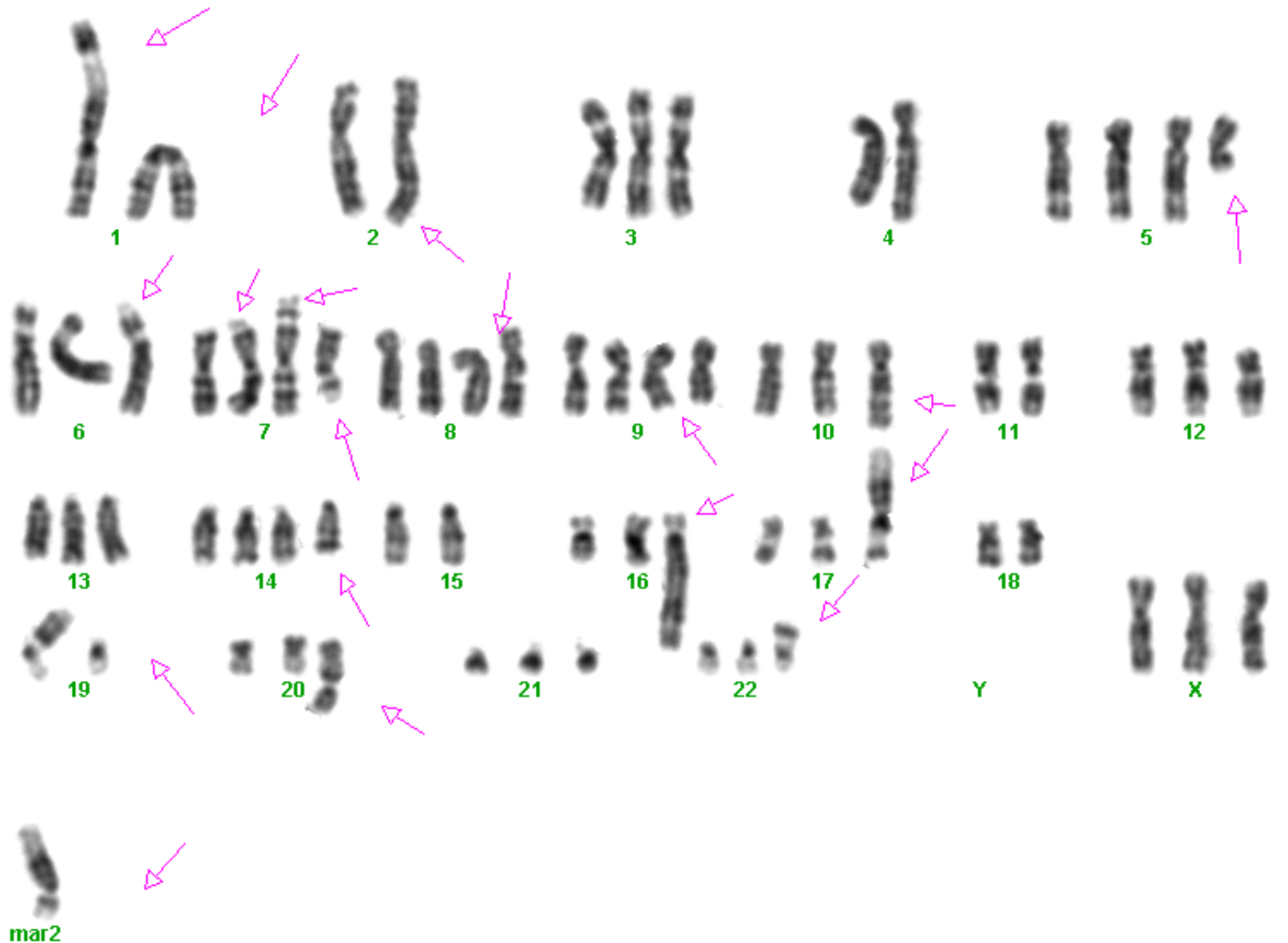


***La rilevanza della CC nella diagnostica delle LAM: anomalie ad indice prognostico intermedio:***

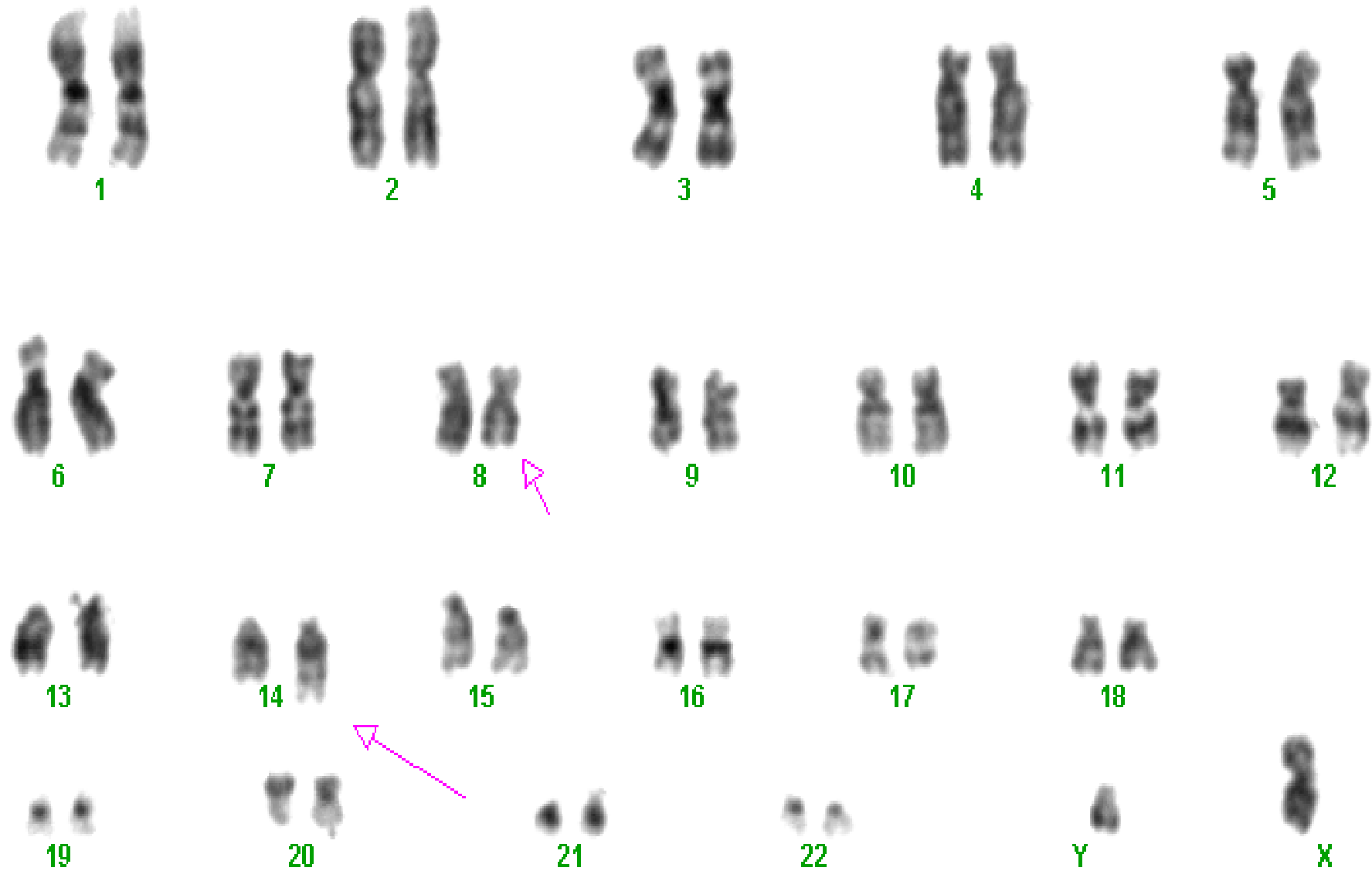


trisomia 13

***La rilevanza della CC nella diagnostica delle LAM: anomalie ad indice prognostico sfavorevole:***



***La rilevanza della CC nella diagnostica delle LAL: anomalie ad indice prognostico sfavorevole:***

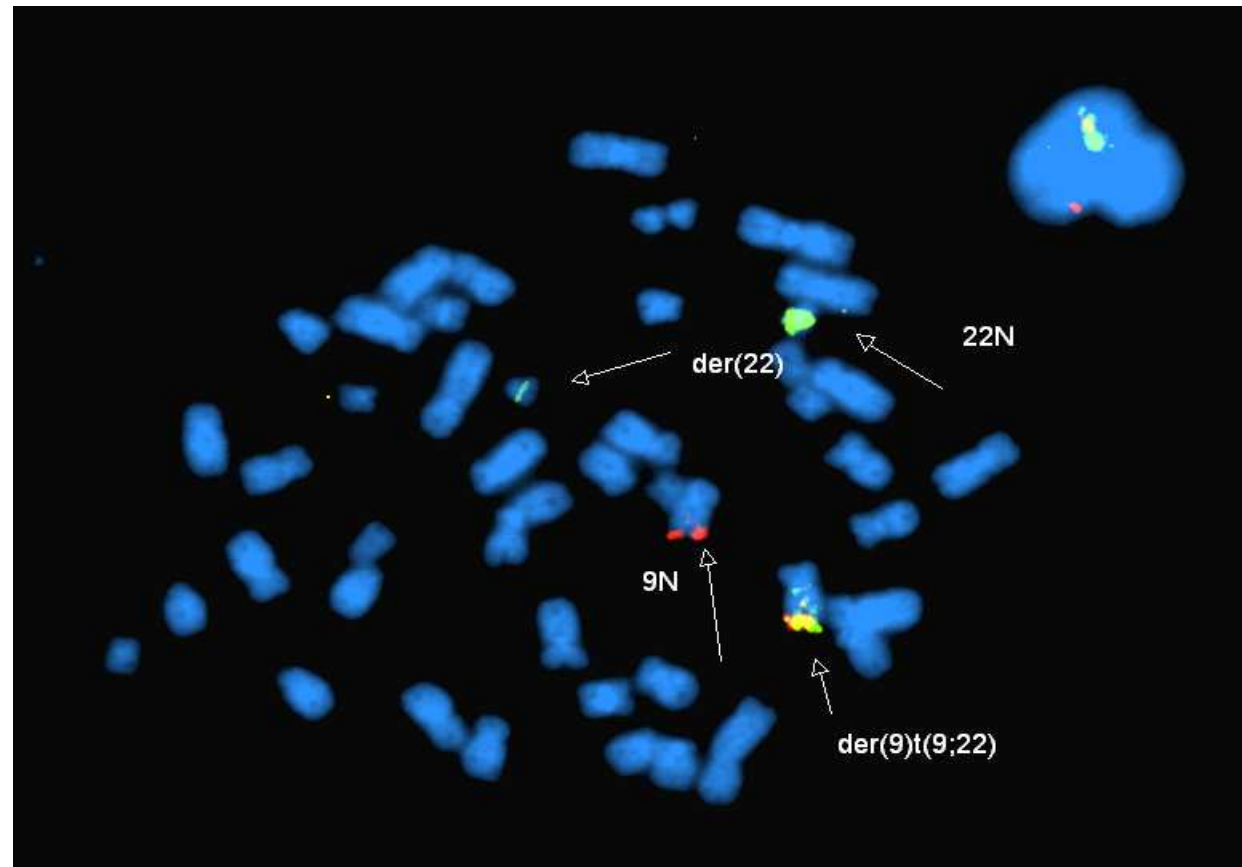


t(8;14)(q24;q32)

## La rilevanza della CC e FISH nella diagnostica della LMC:

paz. B.F. leucocitosi,  
quadro clinico e  
morfologico  
suggestivo per  
diagnosi di LMC  
Eseguito cariotipo

Approfondimento  
FISH con sonda  
specifica per la  
t(9;22)



9q34 ABL rosso/22q11 BCR verde

Risultato  
atteso

Se Normale 2 segnali R e 2 segnali V  
Se Anomalo 1 segnali R , 1 segnali V e 2  
segnali di fusione R/V (Giallo)

Risultato  
ottenuto

1 segnali R , 1 segnali V ,  
1 segnali di fusione R/V  
(Giallo) e 1 segnali V  
dim

Possibile inserzione di BCR(22q) su ABL(9q).  
Terapia identica alla LMC classica

## ***Le applicazioni degli studi di BIOLOGIA MOLECOLARE***

- ✓ ***Nella diagnosi delle LAM a cariotipo normale*** la valutazione di marcatori molecolari ad impatto prognostico rilevante quali: FLT3, NPM1
  - ✓ ***Alla diagnosi delle Sindromi Mieloproliferative Croniche*** la valutazione delle mutazioni Jak2 e CALRETICULINA
    - ✓ ***Alla diagnosi delle LAL per*** la valutazione del trascritto ibrido p190 o p210
- ✓ ***Monitoraggio della malattia minima residua nei pazienti con LAP***
  - ✓ ***Monitoraggio della malattia minima residua nei pazienti con LMC p210***
- ✓ ***Nella stratificazione del rischio prognostico della LLC*** si valuta la presenza di mutazioni 17p13 TP53 con tecnica di sequenziamento NGS e lo stato mutazionale di IGVH con amplificazione e riarrangiamento clonale VDJ e sequenziamento con metodo Sanger.

.....condizione fondamentale al fine di ottenere un risultato utile per il paziente è **lo stretto scambio di conoscenze interdisciplinari che legano**

**Laboratorista**  **Medico Ematologo**

La **Comunicazione** tra il laboratorio e il medico Ematologo è molto importante ogni volta che viene inviato al laboratorio un campione per indagine genetica

- per confermare che i requisiti dei campioni siano soddisfatti ( ad es. il tipo di tessuto e l'anticoagulante appropriati)
- per ottenere una indicazione sul sospetto diagnostico
- per eventuali dettagli per i tempi di consegna del referto
- per verificare la scelta del metodo di analisi per lo studio delle anomalie che dipende dal quesito diagnostico che deve essere affrontato

**Anche se a volte può essere difficile da ottenere, la comunicazione è comunque cruciale per ottenere un risultato utile**