

Aberrant Expression of HOXA9, DEK, CBL and CSF1R in Acute Myeloid Leukemia

SÍLVIA CASAS^{a,b}, BÁLINT NAGY^a, ERKKI ELONEN^c, ANNA AVENTÍN^b, MARCELO L. LARRAMENDY^{a,d}, JORGE SIERRA^b, TAPANI RUUTU^c and SAKARI KNUUTILA^{a,*}

^aDepartments of Pathology and Medical Genetics, Haartman Institute and Helsinki University Central Hospital, University of Helsinki, Helsinki, Finland; ^bDepartment of Hematology, Hospital Sant Pau-Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain; ^cDepartment of Medicine, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland; ^dLaboratorio de Citogenética y Cátedra de Citología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina

(Received 10 April 2003)

Previous gene function analyses have indicated that *HOXA9*, *CSF1R*, *CBL* and *DEK* are aberrantly expressed in acute myeloid leukemia (AML). We analyzed the expression of these genes in a series of 41 adult patients with AML using quantitative real-time RT-PCR, and tested the association of the expression with the following hematologic and clinical parameters: age, FAB, immunophenotype and karyotype aberrations. A high proportion of the patients showed over- or underexpression of the analyzed genes. *DEK* was overexpressed in 98% of the cases, whereas *CBL*, *CSF1R* and *HOXA9* were either overexpressed in 20, 17 and 78% or underexpressed in 20, 42 and 15% of the cases, respectively. Patients whose karyotype contained t(8;21)(q22;q22), showed lower relative expression of *HOXA9* at a statistically significant level ($p < 0.05$). Bone marrow samples without expression of CD34 antigen were associated with either overexpression of *DEK* or *HOXA9*. Furthermore, an association was found between the AML-M2 subtype and lower expression of *CBL*, *CSF1R* or *HOXA9*, and between the AML-M5 subtype and *CBL* or *CSF1R* overexpression.

Keywords: Quantitative real-time RT-PCR; Acute myeloid leukemia; Gene expression; Array-based methods

INTRODUCTION

The array-based methods have revealed a great amount of new information of genes expressed in acute myeloid leukemia (AML) [1,2]. In this study, we selected four genes that were previously detected to be aberrantly expressed in AML by array techniques: homeobox protein *hox-a9* (*HOXA9*), *dek* oncogene (*DEK*), macrophage colony stimulating factor I receptor precursor (*CSF1R*) and *c-cbl* protooncogene (*CBL*) (Table I).

HOXA9 is a transcriptional factor potentially associated in myeloid differentiation. The chromosomal translocation t(7;11)(p15;p15), which involves a fusion between *HOXA9* and the nucleoporin *NUP98* resulting in the inhibition function of *HOXA9*, is present in a small subset of AML patients with poor prognosis [3,4].

DEK is a nuclear protein, with both RNA and DNA binding properties, expressed in many tissues [5,6]. This gene is implicated in a subset of AML carrying the t(6;9)(p23;q34) in which the *DEK-CAN* protein confers poor prognosis [7,8].

CBL protooncogene product participates in signal transduction of hematopoietic cells [9]. *CBL* generates negative regulation of CSF-1 by binding and stimulating *CSF1R* ubiquitination, which increases the endocytic rate of *CSF1R* and reduces the signal of activated receptors on cell membrane [10].

The expression of the four genes in 41 AML patients at diagnosis was studied using quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (QRT-PCR). Furthermore, we analyzed whether aberrant expression of these genes was associated with hematologic, cytogenetic or clinical parameters.

*Corresponding author. Address: Department of Medical Genetics, POB 21 (Haartmaninkatu 3, 4th floor), FIN-00014 University of Helsinki, Helsinki, Finland. Tel.: +358-9-191-26527. Fax: +358-9-191-26788. E-mail: sakari.knuutila@helsinki.fi

TABLE I Features of genes included in quantitative expression analysis

Genes	mRNA Gene Bank accession number	Chromosomal location
Blood disorder proteins		
DEK protein	X64229	6p23
Oncogenes and protein kinases activated in hematopoietic cells		
C-cbl protooncogene	X57110	11q23.3
Macrophage colony stimulating factor I receptor precursor (<i>CSF-1-R</i>)	X03663	5q33.3-35
Transcriptor factor		
Homeobox protein hox-a9 (<i>HOXA9</i>)	U82759	7p15-p14
Housekeeping gene		
Cytoplasmatic beta-actin (<i>ACTB</i>)	X00351	7p15-p12

MATERIALS AND METHODS

Patients

Bone marrow samples were obtained from 41 adult patients with AML at the time of diagnosis. Fourteen of the 41 patients (patients 1–14) belonged to the AML-99 protocol of the Catalan Group of Study and Treatment of AML (CETLAM). The remaining 27 patients (patients 15–41) were diagnosed and treated according to the protocol of the Department of Medicine, Helsinki University Central Hospital. Patients nos 15–29 had previously undergone cDNA array analysis as reported by Larramendy *et al.* [2] Table II summarizes the laboratory and clinical data of the patients. Two bone marrow aspirates from healthy donors were included as controls.

RNA Extraction

Total RNA was extracted from bone marrow samples according to standard protocol, as described previously [2]. DNase treatment of total RNA was performed according to the Atlas cDNA expression array's user manual (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA). The quality and the integrity of the RNA were checked on 1% agarose gel after electrophoresis.

cDNA Synthesis

cDNA synthesis was performed from total RNA by using 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Real-time Quantitative RT-PCR

The oligonucleotide primers were designed and produced by TIB MolBiol (Berlin, Germany) (Table III). Primers were tested *versus* the BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) to confirm the specific amplified product.

Quantitative gene expression analysis of four AML-related genes and one housekeeping gene, beta-actin

(*ACTB*) was performed. QRT-PCR was carried out using LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I and LightCycler Instrument (Roche), as described previously [2]. Four dilutions of beta-globulin gene (DNA Control kit; Roche), from 0.015 to 15 ng/ μ l, were used to acquire the standard curve in each experiment. In every assay, runs were independently repeated two times and a negative control was included. The amplification of PCR products was verified using the melting curve analysis option. Data analysis was performed using the Light-Cycler Software Version 3.5.

The housekeeping gene *ACTB* was used as reference against which the expression level of the transcript genes of interest was normalized. For every sample, the target mRNA copy number was divided by the *ACTB* mRNA copy number to obtain a normalized target/*ACTB* value. This value was then divided by the average normalized target/*ACTB* value of the normal bone marrow samples to obtain the relative target value [11]. Relative expression levels higher than 3 were considered to indicate overexpression, and lower than 0.3 underexpression.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS for Windows (Version 10.0). After the normalization of expression values, the Kaplan–Meier analysis was used to estimate survival distributions, and log-rank test to evaluate significant differences among survival curves [12]. Clinical and biological parameters were compared using the Mann–Whitney *U* Test. The chosen level of significance was 0.05, unless otherwise indicated.

RESULTS

HOXA9, *DEK*, *CSF1R* and *CBL* quantification data obtained using the LightCycler software were normalized using the *ACTB* housekeeping gene. Gene expression in the AML patients was compared to that in the normal bone marrow samples (Table IV).

TABLE II Biological and clinical data of 41 AML patients

	Sex	Age	Date of diagnosis	FAB	Karyotype	Immunophenotype	Blasts in BM (%)	WBC ($\times 10^9/l$)
1	M	34	9/05/01	M4	46,XY	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64-,CD14-,CD7-,CD19-,CD2-,CD117+	43	1.6
2	F	51	12/06/01	M4	46,XX,t(3;12)(q12;q24),t(8;21)(q22;q22)/46,XX	CD13+,CD33+,CD34+,CD56+,CD64-,CD14-,CD7-,CD19-,CD2-,CD117+	74	18
3	M	58	29/06/01	M5b	46,XY	CD13+,CD33+,CD34-,CD56-,CD64-,CD14-,CD7-,CD19-,CD2-,CD117+	96	14.6
4	F	57	13/07/01	M5b	46,XX	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64+,CD14-,CD7-,CD19+,CD2-,CD117+	60	31.2
5	F	60	9/08/01	M5b	ND	CD13+,CD33+,CD34+,CD56+,CD64+,CD14+,CD7+,CD19-,CD2-,CD117+	44	26
6	F	26	20/08/01	M2	48,XX,t(8;21)(q22;q22),del(11)(q21q23),+15,+21c	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64-,CD7-,CD19-,CD2-,CD117+	60	94
7	M	53	22/08/01	M5	45,XY,t(5;19)(q11;p12),der(7)t(7;?)p(15;?),der(12)t(12;18)(q?;q?),del(16)(q13),-17,der(18)t(17;18)(q21;q?),dup(22)(q?)	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64+,CD14+,CD7-,CD19+,CD2-,CD117+	76	61
8	F	58	4/09/01	M5b	46,XX	CD13+,CD33+,CD34+,CD56+,CD64+,CD14+,CD7-,CD19+,CD2-,CD117+	52	37.8
9	F	40	9/10/01	M2	46,XX	CD13-,CD33+,CD34+,CD56+,CD64-,CD14-,CD7+,CD19-,CD2-,CD117+	30	12
10	F	36	17/10/01	M1	47,XX,+4	CD13+,CD33+,CD34-,CD56-,CD64-,CD14-,CD7-,CD19-,CD2-,CD117+	65	28.6
11	F	59	22/10/01	M2	ND	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64-,CD14-,CD7-,CD19-,CD2-,CD117+	60	1.26
12	M	38	4/11/01	M1	47,XXYc	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64+,CD14-,CD7+,CD19+,CD2+,CD117+	70	5
13	M	35	2/11/01	M5	45,XY,-7	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64-,CD14-,CD7+,CD19+,CD2+,CD117+	92	73
14	F	46	1/11/01	M2	46,XX,inv(11)(p15q23)	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64-,CD14-,CD7-,CD19-,CD2-,CD117+	58	110
15	F	50	5/06/99	M2	46,XX,t(8;21)(q22;q22)	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64+,CD7+,CD13+,CD14-,CD33+,CD34+,CD56-,CD64+	50	105.2
16	M	21	2/11/98	M4	46,XY	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64+	90	6.9
17	M	66	12/03/99	M4	46,XY,inv(16)(p13q22)	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64+	50	85.8
18	F	30	18/09/98	M1	46,XX	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64-	91	43.3
19	F	61	13/03/98	M2	46,XX	CD13-,CD33+,CD34+,CD56-,CD64-	75	80.9
20	F	52	30/01/98	M5	46,XX	CD13+,CD33+,CD34+,CD56+,CD64+	85	94.4
21	F	46	18/08/99	M4	46,XX	CD13+,CD33+,CD34+,CD56+,CD64+	50	185.7
22	M	51	16/07/99	M2	46,XX,t(8;21)(q22;q22)	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64+	40	31
23	F	65	5/05/99	M2	45,XX,dup(1)(p?),del(5q)t(14;19),-17,inc*	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64+	60	2.2
24	M	67	9/09/99	M2	46,XY	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64-	75.1	75.1
25	M	52	11/10/99	M2	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64-	80	4.6
26	M	60	3/03/00	M1	46,XX	CD13+,CD33+,CD34+,CD56+,CD64+	90	132
27	F	66	4/02/00	M2	46,XX	CD13+,CD33+,CD34+,CD56+,CD64+	80	206
28	M	53	29/12/99	M2	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)	CD13+,CD33+,CD34+,CD56+,CD64+	90	8.6
29	M	65	9/06/00	M4	47,X,Y,del(9q?),+8/46,X,Y,del(9q?)46,XY	CD13+,CD34-,CD56+,CD64+	80	37.5
30	F	72	29/06/00	M1	46,XX	CD13+,CD14-,CD33+,CD34-,CD56+,CD64+	90	158
31	M	50	19/04/00	M5	46,XY	CD13+,CD14+,CD33+,CD34-,CD56+,CD64+	95	58.5
32	M	44	12/09/00	M2	46,XY,inv(11)(p15q23)	CD13+,CD33+,CD34-,CD56-,CD64-	45	2.7
33	F	35	1/09/00	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q11-12)	CD13+,CD33+,CD34-,CD56-,CD117+	90	1.2

TABLE II — continued

Sex	Age	Date of diagnosis	FAB	Karyotype	Immunophenotype	Blasts in BM (%)	WBC ($\times 10^9/l$)
F	26	14/02/00	M3	46,XX	CD13+,CD33+,CD34-	75	2.4
M	23	20/08/99	M2	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)	CD13+,CD33+,CD34+,CD56+,CD64+	65	41.4
F	51	3/11/00	M2	46,XX,t(3;10)(7;15)*	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-,CD64-,CD117+	70	3.4
M	61	8/12/99	M4	46,XY	CD13+,CD14+,CD33+,CD34+,CD56+,CD64+	90	80.2
F	68	13/12/99	M5	46,XX	CD13+,CD14+,CD33+,CD34-,CD56+,CD64+	50	100.6
F	51	2/02/00	M4	46,XX	CD13+,CD14+,CD33+,CD34-,CD56-,CD64+	35	10.4
F	67	24/03/00	M0	45,XX,-3,del(5)(q72),add(7)(q73.2),-10,del(12)(q22),add(18)(p11),+2mar	CD7+,CD13+,CD33+,CD34-,CD56+,CD64-,CD117+	70	1.3
M	48	30/12/99	M2	46,XY	CD13+,CD33+,CD34+,CD56-	35	5.5

M, male; F, female; WBC, white blood cell count; ND, not done; BM, bone marrow.

*Karyotype described by multicolor *in situ* hybridization.

HOXA9 was overexpressed in 32 cases (78%) and underexpressed in 6 patients (14.6%), whereas no altered expression was observed in the remaining 3 patients (7.3%). All but one of the patients (97.6%) showed overexpression of *DEK*. Overexpression of *CSF1R* was seen in 7 patients (17.1%), underexpression in 17 samples (41.5%) and normal expression in 17 patients (41.5%). *CBL* was overexpressed in 8 patients (19.5%) and underexpressed in 8 patients (19.5%), whereas no altered expression was observed in the remaining 25 patients (61%).

Patients with t(8;21)(q22;q22) showed decreased expression of *HOXA9* ($p = 0.004$). An association was found between CD34- bone marrow samples and overexpression of *DEK* ($p = 0.01$) and *HOXA9* ($p = 0.005$). When FAB subtypes were considered, M2 was associated with lower expression levels of *CBL* ($p = 0.034$), *CSF1R* ($p = 0.034$) and *HOXA9* (0.045). In the M5 subtype, both *CBL* and *CSF1R* were overexpressed ($p = 0.012$ and $p = 0.021$, respectively). No further association was seen between gene expression and clinical-pathological parameters (Table V). Nevertheless, statistically significant associations were observed between decreased expression of *CBL* and age older than 60 years ($p = 0.034$).

DISCUSSION

Gene expression profiles of *HOXA9*, *DEK*, *CSF1R* and *CBL* studied by real-time QRT-PCR showed expression changes in 92.7, 97.6, 58.5 and 39% of the cases, respectively, confirming previous cDNA microarray results [1,2].

Overexpression of *HOXA9* transcript was observed in nearly 80% of cases. This result verifies several previous findings demonstrating enhanced expression of *HOXA9* in bone marrow AML samples [1,13-15]. As overexpression of the gene does not seem to be present in acute lymphoblastic leukemia [16], it may be considered as a genetic marker for AML. Detection of *HOXA9* overexpression was an independent event from the presence of t(7;11)(p15;p15), since none of the 41 patients included in the analysis showed this chromosomal rearrangement.

The present results reveal the overexpression of *DEK* transcripts in the majority of AML cases (97.6%). This finding confirms our previous results by cDNA array [2]. The results from the present study highlight the potential role of *DEK* as a genetic marker in the initiation and progression of AML. As none of the patients presented t(6;9)(p23;q34) in their karyotype, the overexpression of the gene resulted from a mechanism other than translocation, as recently proposed by Larramendy *et al.* [2].

Underexpression of *CBL* or overexpression of *CSF1R* increases the ratio of activated receptors on cell membrane [10]. Either under- or overexpression of

TABLE III Primers

Gene	Sequence 5'-3' F R	Position	Length (pb)	CG (%)	Tm (°C)	Product size (bp)
ACTB	AgCCTCgCCTTTgCCgA	23F	17	64.7	68.5	174
	CTggTgCCTggggCg	196R	15	80.0	64.1	
DEK	gTgggTCAgTTCAGTggC	412F	18	61.1	61.9	291
	AggACATTTggTTCgCTTAg	702R	20	45.0	60.7	
CSF1R	CACCAAgCTCgCAATCCCTC	1015F	20	60.0	63.7	169
	CTCTACCACCCggAAgAACA	1183R	20	55.5	63.9	
CBL	ATgTCCCAAAGCCACCTg	2472F	18	55.6	63.6	217
	gCAggACCACTACCTTgCT	2688R	19	57.9	61.9	
HOXA9A	AAAAATCTACCTgTTCCTgAC	1174F	21	38.1	56.3	236
	CTATCTTCCACAATCACAATggg	1409F	23	43.5	64.1	

F, forward; R, reverse; Tm, melting temperature.

CBL or *CSF1R* was seen in 34% of the patients. This group of patients may have an increased proliferation signal to CSF1 stimulation [17]. An association was observed between lower expression levels of *CBL* and patient age older than 60 years. The increased expression levels of *CBL* or *CSF1R* in the M5 subtype, the monocytic AML, is interesting as its expression is normal in the myelomonocytic AML and decreased in the M2 subtype.

Sauvageau *et al.* [18] demonstrated for the first time that homeobox A genes are expressed in human CD34+ cells and underexpressed in CD34- cells in normal bone marrow samples. Kawagoe *et al.* [13] found consistent results in normal bone marrow samples, but no difference in *HOXA9* expression between CD34+ and CD34- cells was detected in AML bone marrow samples. According to these previous reports, the present observation of higher *HOXA9* overexpression in CD34- AML samples than in CD34+ AML samples may indicate deregulation of *HOXA9* expression during leukemogenesis. In contrast, little is known about the phenotypic expression of *DEK* in myeloid cells. Our CD34- AML samples showed higher *DEK* expression than CD34+ AML samples, providing a clue to understand its patterns of activation during leukemic cell differentiation.

Lower relative amounts of *HOXA9* were detected in patients with t(8;21)(q22;q22) ($p = 0.004$). Similarly, Drabkin *et al.* [15] detected low homeobox (*HOX*) gene expression in cases with prognostically favorable cytogenetic features. This association suggests that oncogenic proteins produced by a chromosomal translocation, such as AML1-ETO in t(8;21)(q22;q22), affect *HOX* gene expression, altering the transcription function and disrupting myeloid cell differentiation at different lineages [19].

Although *HOXA9* overexpression has been shown to correlate with treatment failure in AML [1], extended studies have not been able to reveal any significant associations with complete response rates or event-free survival [15]. Whether the expression status of *HOXA9* in our patients has any prognostic value is an issue that we will study once the follow-up time is long enough to provide statistical power to the analysis.

Acknowledgements

Supported by: Generalitat de Catalunya in Spain. Grant number 00285 FI/FIAP; Sigrid Jusélius Foundation in Finland; National Council of Scientific and Technological Research and the National University of La Plata in Argentina. Grant No.11/N325.

TABLE IV QRT-PCR results as relative expression level

Relative expression level*	DEK n (%)	CBL n (%)	CSF1R n (%)	HOXA9 n (%)
Overexpression	40 (97.6)	8 (19.5)	7 (17.1)	32 (78)
3 to 10	2 (4.9)	6 (14.6)	4 (9.7)	2 (4.9)
11 to 100	14 (34.1)	2 (4.9)	1 (2.4)	4 (9.7)
101 to 1000	13 (31.7)	-	2 (4.9)	15 (36.6)
1001 to 10000	10 (24.4)	-	-	6 (14.6)
10001 to 100000	1 (2.4)	-	-	6 (14.6)
> 100000	-	-	-	1 (2.4)
Normal expression	1 (2.4)	25 (61)	17 (41.5)	3 (7.3)
Underexpression	-	8 (19.5)	17 (41.5)	6 (14.6)
0.3 to 0.1	-	6 (14.6)	12 (29.3)	2 (4.9)
0.09 to 0.01	-	2 (4.9)	4 (9.7)	2 (4.9)
0.009 to 0.001	-	-	1 (2.4)	2 (4.9)

Bold type, high frequencies for each gene.

*Relative expression level >3 was considered to indicate overexpression and <0.3 underexpression.

TABLE V Relationship between relative gene expression level and standard clinical and biological factors

Grouping variable	n (%)	DEK*	p [†]	HOXA9*	p [†]	CBL*	p [†]	CSF1R*	p [†]
Age (years)									
≤ 60	31 (75.6)	1697.5 ± 1287.7	NS	3372 ± 4851.4	NS	4.9 ± 5.5	0.034	9.8 ± 11.9	NS
> 60	10 (24.4)	608.8 ± 692.1		1848 ± 2707.9		0.7 ± 0.7		0.5 ± 0.5	
WBC									
< 30 × 10 ⁹ /l	22 (53.6)	1800.4 ± 1678.3	NS	4635.9 ± 6905	NS	6.1 ± 7.83	NS	13.1 ± 5.8	NS
≥ 30 × 10 ⁹ /l	19 (46.3)	1005.4 ± 989.8		1106.4 ± 1346.4		1.3 ± 0.77		1.1 ± 0.9	
Blasts in BM									
≤ 70%	23 (56)	777.1 ± 505.1	NS	1356.3 ± 2035.1	NS	1.8 ± 1.2	NS	7.1 ± 11.6	NS
> 70%	18 (44)	2229.2 ± 2020.9		5100.8 ± 7673.4		6.5 ± 9		8.1 ± 13.5	
Karyotype									
Normal	21 (51.2)	1756.1 ± 1779.1	NS	3693.9 ± 6630.8	NS	5.5 ± 7.8	NS	6.9 ± 11.7	NS
Abnormal	18 (43.9)	1153.8 ± 805.2		1020.7 ± 1306.3		1.3 ± 0.8		1.2 ± 1	
Karyotype t(8:21)(q22;q22)									
Absent	34 (82.9)	1555.1 ± 1182.9	NS	3612.5 ± 4464.5	0.004	4.5 ± 5	NS	9 ± 10.9	NS
Present	7 (17.1)	833.8 ± 1189.6		26.9 ± 48.7		0.9 ± 0.7		0.4 ± 0.4	
Immunophenotype									
CD56+	15 (36.6)	1299.8 ± 1154.5	NS	2868 ± 3691	NS	1.7 ± 1.8	NS	9.5 ± 19.7	NS
CD34+	25 (61)	754.7 ± 585	0.01	3575.9 ± 6637		5.68 ± 7.8		7.58 ± 11.7	
CD34-	16 (39)	2783.1 ± 2408.6		1199.3 ± 1975.6	0.005	2.4 ± 1.3	NS	7 ± 11.2	NS
CD64+	18 (44)	1050.1 ± 991.2	NS	5814.4 ± 9353.4		6.2 ± 11.1	NS	8.3 ± 13.2	NS
CD64-	15 (36.6)	750.2 ± 771.2		2258 ± 3062.1	NS	2.4 ± 1.7	NS	9.1 ± 15.8	NS
FAB									
MI	5 (12.2)	1052.8 ± 2432	NS	5137 ± 10054.8	NS	7.1 ± 21.4	NS	9.5 ± 17.7	NS
Other subtypes	36 (87.8)	1484.6 ± 1098.4		562.6 ± 712.7		2.5 ± 3.2		0.97 ± 1.5	
M2	16 (39)	935 ± 742.1	NS	3338.8 ± 4181.4	0.045	4.1 ± 4.7	0.034	8.4 ± 10.2	0.034
Other subtypes	25 (61)	1750 ± 1575.4		388.7 ± 413.9		0.8 ± 0.38		0.5 ± 0.5	
M4	8 (19.5)	562.2 ± 792.2	NS	4617.7 ± 6072.3	NS	5.8 ± 6.9	NS	12 ± 14.8	NS
Other subtypes	33 (80.5)	1642.8 ± 1211.9		1789.8 ± 3572.8		1.2 ± 0.9		0.6 ± 0.6	
M5	9 (30)	1094.2 ± 2003	NS	3293.8 ± 4522.1	NS	4.5 ± 5.2	NS	9.2 ± 11.2	NS
Other subtypes	32 (70)	1527 ± 1177		10925 ± 18246.7		13.3 ± 20.7	0.012	32.2 ± 43	0.021
				771.3 ± 791.4		1.2 ± 0.5		0.6 ± 0.3	

WBC, white blood cell count; NS not significant.
 * Mean ± 0.05 confidence interval.
 † Mann-Whitney U test.

References

- [1] Golub, T.R., Slonim, D.K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., Coller, H., Loh, M.L., Downing, J.R., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D. and Lander, E.S. (1999) "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring", *Science* **286**, 531–537.
- [2] Larramendy, M.L., Niini, T., Elonen, E., Nagy, B., Ollila, J., Vihinen, M. and Knuutila, S. (2002) "Overexpression of translocation-associated fusion genes of *FGFR1*, *MYC*, *NPM1*, and *DEK*, but absence of translocations in acute myeloid leukemia. A microarray analysis", *Haematologica* **87**, 569–577.
- [3] Borrow, J., Shearman, A.M., Stanton, V.P. Jr, Becher, R., Collins, T., Williams, A.J., Dube, I., Katz, F., Kwong, Y.L., Morris, C., Ohyashiki, K., Toyama, K., Rowley, J. and Housman, D.E. (1996) "The t(7:11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9", *Nat. Genet.* **12**, 159–167.
- [4] Nakamura, T., Largaespada, D.A., Lee, M.P., Johnson, L.A., Ohyashiki, K., Toyama, K., Chen, S.J., Willman, C.L., Chen, I-M., Feinberg, A.P., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. and Shaughnessy, J.D. (1996) "Fusion of nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7:11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia", *Nat. Genet.* **12**, 154–158.
- [5] McGarvey, T., Rosonina, E., McCracken, S., Li, Q., Arnaout, R., Mientjes, E., Nickerson, J.A., Awrey, D., Greenblatt, J., Grosveld, G. and Blencowe, B.J. (2000) "The acute myeloid leukemia-associated protein, DEK, forms a splicing-dependent interaction with exon-product complexes", *J. Cell. Biol.* **150**, 309–320.
- [6] Kappes, F., Burger, K., Baack, M., Fackelmayer, F.O. and Gruss, C. (2001) "Subcellular localization of the human proto-oncogene protein DEK", *J. Biol. Chem.* **276**, 26317–26323.
- [7] Soekarman, D., von Lindern, M., Daenen, S., de Jong, B., Fonatsch, C., Heinze, B., Bartram, C., Hagemeijer, A. and Grosveld, G. (1992) "The translocation t(6:9)(p23;q34) shows consistent rearrangement of two genes and defines a myeloproliferative disorder with specific clinical features", *Blood* **79**, 2990–2997.
- [8] von Lindern, M., Fornerod, M., van Baal, S., Jaegle, M., de Wit, T., Buijs, A. and Grosveld, G. (1992) "The translocation (6;9), associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes, *dek* and *can*, and the expression of a chimeric, leukemia-specific *dek-can* mRNA", *Mol. Cell Biol.* **12**, 1687–1689.
- [9] Langdon, W.Y., Hartley, J.W., Klinken, S.P. and Ruscetti, S.K. (1989) "Mouse HC 3rd. v-cbl, an oncogene from a dual-recombinant murine retrovirus that induces early B-lineage lymphomas", *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 1168–1172.
- [10] Lee, P.S., Wang, Y., Dominguez, M.G., Yeung, Y.G., Murphy, M.A., Bowtell, D.D. and Stanley, E.R. (1999) "The Cbl proto-oncoprotein stimulates CSF-1 receptor multiubiquitination and endocytosis, and attenuates macrophage proliferation", *EMBO J.* **18**, 3616–3628.
- [11] Bieche, I., Laurendeau, I., Tozlu, S., Olivi, M., Vidaud, D., Lidereau, R. and Vidaud, M. (1999) "Quantitation of MYC gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-PCR assay", *Cancer Res.* **59**, 2759–2765.
- [12] Kaplan, E.L. and Meier, P. (1958) "Nonparametric estimation from incomplete observations", *J. Am. Stat. Assoc.* **53**, 457–481.
- [13] Kawagoe, H., Humphries, R.K., Blair, A., Sutherland, H.J. and Hogge, D.E. (1999) "Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells", *Leukemia* **13**, 687–698.
- [14] Lawrence, H.J., Rozenfeld, S., Cruz, C., Matsukuma, K., Kwong, A., Komuves, L., Buchberg, A.M. and Largman, C. (1999) "Frequent co-expression of the HOXA9 and MEIS1 homeobox genes in human myeloid leukemias", *Leukemia* **13**, 1993–1999.
- [15] Drabkin, H.A., Parsy, C., Ferguson, K., Guihot, F., Lacotte, L., Roy, L., Zeng, C., Baron, A., Hunger, S.P., Varela-Garcia, M., Gemmill, R., Brizard, F., Brizard, A. and Roche, J. (2002) "Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myeloid leukemia", *Leukemia* **16**, 186–195.
- [16] Niini, T., Vettenranta, K., Hollmén, J., Larramendy, M.L., Aalto, Y., Wikman, H., Nagy, B., Seppänen, J.K., Salvador Ferrer, A., Mannila, H., Saarinen-Pihkala, U.M. and Knuutila, S. (2002) "Expression of myeloid-specific genes in childhood acute lymphoblastic leukemia—a cDNA array study", *Leukemia* **16**, 2213–2221.
- [17] Roth, P. and Stanley, E.R. (1992) "The biology of CSF-1 and its receptor", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **181**, 141–167.
- [18] Sauvageau, G., Lansdorf, P.M., Eaves, C.J., Hogge, D.E., Dragowska, W.H., Reid, D.S., Largman, C., Lawrence, H.J. and Humphries, R.K. (1994) "Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells", *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 12223–12227.
- [19] Look, A.T. (1997) "Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias", *Science* **278**, 1059–1064.

4 Discussió

4.1 Caracterització d'alteracions genètiques en l'estudi diagnòstic de la leucèmia mieloide aguda

La identificació d'alteracions genètiques és considerat un factor diagnòstic i pronòstic important en la LMA, ja que certes anomalies s'han associat a determinats trets clínics i biològics, arribant a poder influenciar en l'estratègia de tractament del pacient. En aquest sentit, és indicat realitzar un diagnòstic genètic combinant l'ACC amb el resultat de tècniques de biologia molecular, com la RT-PCR i el Southern-blot, i de citogenètica molecular, com la FISH, la CGH i la M-FISH. A continuació es discutiran els aspectes metodològics de les tècniques de diagnòstic més destacades, i la seva aplicació per l'estudi genètic de la LMA.

4.1.1 Hibridació in situ fluorescent

En l'estudi diagnòstic de la LMA, la FISH s'utilitza com a suport de la citogenètica convencional en casos indicatius de ser portadors de translocacions subtils, així com per a la identificació d'alteracions genètiques críptiques a la resolució del cariotip per bandes G. La utilització de sondes WCP és útil per confirmar citogenèticament anomalies cromosòmiques estructurals o numèriques, destacant que l'anàlisi és només informatiu en cèl.lules en metafase. Així mateix, la tècnica de FISH permet mapar regions genòmiques concretes mitjançant la combinació de diferents sondes LSI. No obstant, la FISH ens servirà per investigar regions

cromosòmiques amb sospita prèvia de la seva participació. Per exemple, en l'Estudi I es va hibridar amb la sonda WCP-11 utilitzant la informació de l'ACC. No obstant, davant una alteració cromosòmica que no ha estat caracteritzada per ACC, i per tant, on l'elecció del tipus de sonda a utilitzar sigui difícil, l'anàlisi per M-FISH serà l'estratègia diagnòstica més indicada. Un exemple n'és el cas 84 de l'Estudi IV que citogenèticament presentava el cariotip 46,XY,t(9;11)(p12;q23),add(9)(q32), i on el perfil de CGH era normal. Al no disposar d'indicació per tal de realitzar la FISH convencional, l'origen del material cromosòmic addicional es va estudiar per M-FISH. Alhora, el resultat de CGH permet dirigir en certes ocasions la FISH. Per exemple, en el cas 18 de l'Estudi IV es va escollir la sonda WCP-21 en base al resultat de CGH, doncs el patró de bandes del cromosoma marcador no era informatiu.

4.1.1.1 Alteracions genètiques identificades mitjançant hibridació in situ fluorescent i el seu interès clínic (I a III)

- a) Trisomia parcial del cromosoma 11 associada a duplicació parcial en tàndem del gen *MLL*

Mitjançant ACC es van descriure dos casos que presentaven material cromosòmic addicional al cromosoma 16p i 18p, respectivament. Així, els cariotips proposats van ésser 46,XY,add(16)(p13) i 46,XX,add(18)(p11.2). El resultat de FISH emprant la sonda WCP-11 va permetre diagnosticar el material addicional dels cromosomes der(16) i der(18) com una trisomia parcial del cromosoma 11, la qual no s'havia pogut observar mitjançant ACC. Així, l'Estudi I mostra com una de les aplicacions de les sondes WCP és la caracterització de material cromosòmic addicional.

Alhora, una aplicació de la FISH és la localització de seqüències en una regió cromosòmica, procés que implica majoritàriament la utilització de sondes no comercials (de tipus PAC, YAC o BAC) que hibridin específicament sobre la regió diana a estudiar [per revisió veure (Wilkinson,

1999)]. La precisió del mètode depèn del disseny posicional de sondes, les quals poden arribar a ser adjacents. El temps que es requereix per a realitzar els diferents experiments d'hibridació fins a l'anàlisi global de la regió a mapar, es redueix si s'utilitzen cohibridacions amb sondes marcades diferencialment. Malgrat que la FISH és actualment el sistema més directe per realitzar un mapatge cromosòmic, la resolució d'aquest mètode és inferior a la que s'obté mitjançant sistemes d'anàlisi físics, com el PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) (Schwart i Cantor, 1984; den Dunnen i van Ommen, 1991). L'Estudi I mostra un exemple de l'aplicació del mapatge genètic en el diagnòstic d'alteracions cromosòmiques, en els dos casos que citogenèticament presentaven trisomia parcial del cromosoma 11, mitjançant la combinació de diferents sondes LSI de la regió 11q22-qter, majoritàriament de tipus PAC, es va poder definir la regió cromosòmica de desequilibri a 11q23-qter en el cas 1, i a 11q22-qter en el cas 2.

Tanmateix, emprant la sonda dual LSI-MLL en l'Estudi I, la FISH es va aplicar per tal d'estudiar els dos casos amb trisomia parcial del cromosoma 11 i que presentaven reordenament del gen *MLL* per Southern-blot. En ambdós casos es van detectar tres còpies del gen *MLL* corresponents a les tres senyals d'hibridació observades. No obstant, no es va confirmar la fusió del gen *MLL* ja que les tres senyals d'hibridació conservaven el patró normal o dual. Així doncs, la FISH va demostrar que el reordenament del gen *MLL* no es donava pel mecanisme de fusió amb un cromosoma *partner*, suggerint la presència de la DPT del gen *MLL*.

La DPT del gen *MLL* es va descriure per primera vegada en pacients de LMA que presentaven un cariotip normal, o una trisomia del cromosoma 11 com a anomalia única (Caligiuri et al., 1994). La presència d'aquesta alteració s'ha associat amb un pronòstic desfavorable de la malaltia. Així, s'ha observat que els pacients amb DPT presenten una disminució del temps en remissió completa en relació als pacients amb cariotip normal (Caligiuri et al., 1998). Posteriorment, s'ha confirmat el pronòstic desfavorable de la DPT al estudiar una sèrie més extensa, on s'ha pogut observar que aquesta

alteració de *MLL* no tan sols es dona en cariotips normals o en casos de trisomia 11 (Schnittger et al., 2000).

En l'Estudi I la RT-PCR va confirmar que el reordenament del gen *MLL* observat en el Southern-blot era originat per una DPT del propi gen. Així, s'ha identificat la associació entre DPT del gen *MLL* i trisomia parcial del cromosoma 11 (de 11q23-qter i 11q22-qter) originada per una translocació desequilibrada. En els casos estudiats, la translocació desequilibrada causa alhora deleció de 16p13-pter i 18p11.2-pter, respectivament. En general, les translocacions desequilibrades es consideren anomalies genètiques secundàries relacionades amb progressió tumoral (Johansson et al., 1996). Els dos casos estudiats, junt amb la descripció prèvia de dos pacients de LMA que presentaven al diagnòstic la DPT del gen *MLL* associada a anomalies cromosòmiques desequilibrades (Schnittger et al., 2000), indiquen que la DPT del gen *MLL* seria la lesió molecular primària, la qual induiria el procés de transformació neoplàsic. A més, aquesta observació es troba recolzada pel fet que en els dos casos de l'Estudi I es detecta el mateix gen de fusió en el moment del diagnòstic i en la recaiguda.

Si s'analitza la història clínica dels dos pacients es comprova que van presentar una evolució crítica, amb un període de remissió inferior als 9 mesos, resistència al tractament, i mort abans dels 14 mesos des del diagnòstic. Així doncs es demostra, que la DPT del gen *MLL* associada a una trisomia parcial del cromosoma 11 és una alteració genètica atribuïda a un pronòstic desfavorable, i davant de la qual, el transplantament al·logènic de cèl·lules progenitores hematopoètiques s'hauria de considerar com una estratègia de tractament important després de la remissió del pacient (per protocol terapèutic veure Estudi 0).

b) Inversió del cromosoma 16 associada a translocació

La FISH amb sondes LSI s'utilitza per complementar el diagnòstic de la citogenètica convencional en casos indicatius de ser portadors de

d'alteracions importants en el diagnòstic de la LMA, com la $inv(16)(p13q22)$ o $t(16;16)(p13;q22)$. Diversos estudis de FISH en pacients de LMA han permès descriure cariotips amb translocació $t(v;16)(v;p13)$ o $t(v;16)(v;q22)$ que emmascaraven una $inv(16)$. Com a resultat d'aquesta translocació, i segons la grandària del material intercanviat, el cromosoma $der(16)$ recorda a una $del(16)$ o a un $add(16)$, i per tant la $inv(16)$ és difícil d'observar per ACC (Berger et al., 1995; Dierlamm et al., 1998; Reddy et al., 2000).

En l'Estudi II es van realitzar hibridacions amb la sonda dual LSI-CBFB per complementar el diagnòstic citogenètic de 40 casos suggestius a presentar $inv(16)(p13q22)$ o $t(16;16)(p13;q22)$. L'anàlisi de FISH va identificar dos casos de $inv(16)$ associades a translocacions, ja que la part 3' del gen *CBFB* es localitzava a 1p36 i 10p13, respectivament (Fig 1, Estudi II). En ambdós casos la grandària del material cromosòmic intercanviat en la translocació era similar, i per tant el $der(16)$ recordava a una $inv(16)$. Així doncs, ni la $t(10;16)(p13;q22)$ ni la $t(1;16)(p36;q22)$ es van identificar per ACC, ja que el $der(16)$ es va diagnosticar com una $inv(16)$ sense translocació associada. Cal destacar que aquests són els primers casos de $inv(16)$ associada a la translocació de les regions 10p13 i 1p36 (Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer, <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>).

Els dos pacients es van incloure al protocol de tractament LAM-99, i van seguir la pauta terapèutica designada pel subgrup de pacients amb alteracions genètiques de bon pronòstic (per protocol terapèutic veure Estudi 0). Després d'un cicle de tractament, ambdós pacients van assolir la remissió completa, i segueixen vius després de 41 i 6 mesos des del diagnòstic, respectivament (Taula 1, Estudi II). Així es pot considerar que ambdós pacients són de bon pronòstic. No obstant, a causa de la baixa recurrència en LMA de les $inv(16)$ associades a translocacions, actualment no es disposa de suficient informació per establir la possible diferència de pronòstic respecte a les $inv(16)$. El fet que algunes d'elles siguin alteracions subtils per ACC

explicaria la baixa freqüència en LMA, la qual cosa justifica la necessitat de realitzar sistemàticament experiments de FISH complementaris.

c) Translocació t(5;11)(q35;p15.5)

Recentment s'ha descrit la translocació t(5;11)(q35;p15.5) mitjançant M-TEL en dos casos d'una sèrie de 30 pacients de LMA pediàtrics que presentaven un cariotip aparentment normal (Brown et al., 2002). Aquesta translocació havia estat identificada amb anterioritat en casos de LMA pediàtrica associada a cariotips amb deleció del cromosoma 5q (Jaju et al., 2001). El gen de fusió que es produeix en la translocació és el resultat de la unió del gen *NSDI*, localitzat a 5q35, amb el gen *NUP98*, a 11p15.5. La t(5;11)(q35;p15.5) es pot considerar una alteració cromosòmica críptica, ja que a causa de la grandària del material intercanviat, dona un patró de bandes que pot passar desapercbut mitjançant ACC, i com que es tracten de regions subtelomèriques, tampoc es detecta per M-FISH (Brown et al., 2002). Actualment en les neoplàsies hematològiques s'han descrit almenys vuit reordenaments cromosòmics diferents de 11p15.5 que produeixen gens de fusió amb *NUP98* [per revisió veure (Lam i Aplan, 2001)], totes identificades mitjançant ACC excepte la t(5;11)(q35;p15.5) (Brown et al., 2002). La identificació de reordenaments de 11p15.5 és important en el diagnòstic de la LMA ja que és un factor indicador de pronòstic desfavorable (Borrow et al., 1996; Nakamura et al., 1996). Inicialment es va suggerir que els agents quimioteràpics podien desenvolupar un paper important com inductors genotòxics d'aquest tipus d'alteracions, ja que molts dels reordenaments de 11p15.5 es detecten en pacients de t-LMA (Nishiyama et al., 1999). No obstant, cada vegada existeixen més evidències que demostren com els reordenaments de 11p15.5 són crítics en LMA, ja que la presència d'aquesta lesió genètica contribuiria en l'origen del procés neoplàsic (Kroon et al., 2001).

Així, l'aplicació de la FISH es va plantejar en l'Estudi III per investigar la presència de la translocació t(5;11)(q35;p15.5) en casos amb cariotips

aparentment normals per ACC i M-FISH, mitjançant la cohibridació amb les sondes TEL 5q i 11p. En la sèrie de 40 pacients analitzada no es va detectar cap cas portador de la translocació. Aquest resultat contrasta amb l'estudi realitzat en 30 casos de LMA pediàtriques, on la translocació es va identificar en dos pacients amb cariotip normal (Brown et al., 2002). D'altra banda, la nostra sèrie corrobora els resultats presentats per Brown et al., on tampoc els 39 pacients adults de LMA estudiats eren portadors de la t(5;11)(q35;p15.5) (Brown et al., 2002). No obstant, amb els estudis realitzats no es pot descartar que la formació del gen de fusió *NSDI/NUP98* es produeixi per un mecanisme independent a la translocació. Queda per tant obert l'interès de realitzar l'estudi molecular de la fusió *NSDI/NUP98* en el subgrup de pacients de LMA amb cariotip normal.

4.1.2 *Hibridació in situ fluorescent múltiple*

La tècnica de M-FISH permet identificar translocacions cromosòmiques simples i complexes, monosomies i trisomies, cromosomes *dm* i marcadors en un únic experiment, podent ajudar a l'ACC, principalment en la resolució de cariotips complexes (Speicher et al., 1996). En les neoplàsies hematològiques, la tècnica de M-FISH s'ha aplicat de manera extensa, degut al fet que la detecció de reordenaments cromosòmics condiciona la identificació de gens amb importància patogènica (Schrock i Padilla-Nash, 2000).

4.1.2.1 *Aspectes metodològics*

Un factor determinant per tenir una bona hibridació és la qualitat de les extensions. Les extensions s'han d'haver envellit a TA durant el temps recomanat en el protocol comercial (3 a 4 dies), sense restes citoplasmàtiques a les metafases, amb els cromosomes ben estesos i amb el mínim de encreuaments entre cromosomes.

Les possibles restes citoplasmàtiques en les metafases s'eliminen mitjançant el pretractament enzimàtic. No obstant, és molt important

controlar el temps d'actuació de la pepsina, ja que existeix el perill de degradar també els cromosomes metafàsics i els nuclis interfàsics (Wilkinson, 1999). En aquest sentit és aconsellable observar l'aspecte de l'extensió, tant alhora de realitzar les extensions, com al localitzar les metafases després de l'envelliment, i sobretot després del pretractament.

Per tal de valorar la influència de l'envelliment de les extensions en la M-FISH, es van realitzar simultàniament dues hibridacions utilitzant extensions procedents del mateix cas envellides durant 3 i 4 dies, respectivament. Comparant ambdós experiments es va observar una certa millora en la qualitat de la hibridació en l'extensió de 4 dies en relació a la de 3 (resultats no mostrats). Pel què fa a la morfologia dels cromosomes, tant en els experiments realitzats amb 3 dies d'envelliment, com en els de 4 dies, es van obtenir cromosomes adequats, per poder-los cariotipar per bandes DAPI revers.

Per l'anàlisi de M-FISH es capturen de 5 a 20 metafases que presentin el mínim de *background* de fluorescència i amb una intensitat i especificitat d'hibridació adequada. No obstant, s'ha observat que freqüentment no tots els fluorocroms marquen al hibridar amb la mateixa intensitat de fluorescència. Així, el SpectrumGold™ tendeix a ser fluix, els SpectrumGreen™ (o FITC en la sonda 24Xcyte) i SpectrumFRed™ (o Cy™5 en el cas de la sonda 24Xcyte) donen hibridació inespecífica, i el SpectrumRed™ (o TexasRed® en el cas de la sonda 24Xcyte) té a vegades un aspecte granulós.

És difícil quantificar la sensibilitat del mètode de M-FISH en nombre absolut, sobretot perquè és influenciat pel grau de condensació cromosòmica i per la composició de fluorescència dels dos cromosomes implicats en la translocació (Uhrig et al., 1999). En aquest sentit, per tal de tenir una primera aproximació de la sensibilitat de detecció de la tècnica de M-FISH, es van incloure com a controls positius dos casos que citogenèticament presentaven la t(6;11)(q27;q23) i la t(9;11)(p22;q23), respectivament (casos 51 i 52, Estudi IV). La hibridació M-FISH va detectar sense dificultats la t(9;11)(p22;q23), no obstant, el diagnòstic de la t(6;11)(q27;q23) no era tant

evident. Destacar, que en certes metafases on els cromosomes presentaven un índex mitòtic inferior, en la t(6;11)(q27;q23) no es detectava canvi de color en el der(11). Si es compara la grandària dels dos fragments cromosòmics intercanviats s'observa que 6q27 és quantitativament inferior a 11q23-qter, i alhora correspon a una banda terminal. Per tant, es podria considerar la grandària de 6q27 com la sensibilitat màxima de detecció de la M-FISH.

Alhora es va tenir en compte que, petites delecions i duplicacions no es poden detectar per M-FISH (Law i Jalal, 2000). Aquesta limitació diagnòstica s'observa per exemple en el cas 28 de l'Estudi IV, el cariotip del qual és 46,XY,del(6)(q15q22),der(11)del(11)(p11p14)del(11)(q11q22),del(13)(q12q22),del(16)(p13), on la del(16)(p13) es va identificar per CGH però no per M-FISH (Taula 1). De manera semblant, mitjançant CGH en el cas 19 es van identificar guanys i pèrdues cromosòmiques no observades per M-FISH (Taula 1). Aquest fet demostra la major sensibilitat de la CGH respecte a la M-FISH en la detecció de delecions i duplicacions.

Tanmateix, com a control positiu de la tècnica es va utilitzar la línia cel·lular KIS I que presenta un cariotip complex. Es va observar que al analitzar cromosomes amb un grau de condensació elevada pot aparèixer un color addicional al punt on es dona la translocació. La falsa inserció es dona com a conseqüència de la barreja de colors per interferència de fluorescència en la unió dels cromosomes implicats (Fig. 14). Aquest color desapareix al analitzar cromosomes més estesos, o quan la composició de fluorescència de les dues parts implicades en la translocació només difereixen en un fluorocrom. El mateix problema apareix quan dos cromosomes s'encreuen o els seus extrems es toquen, fet que es considera una limitació de la tècnica (Speicher et al., 1996).

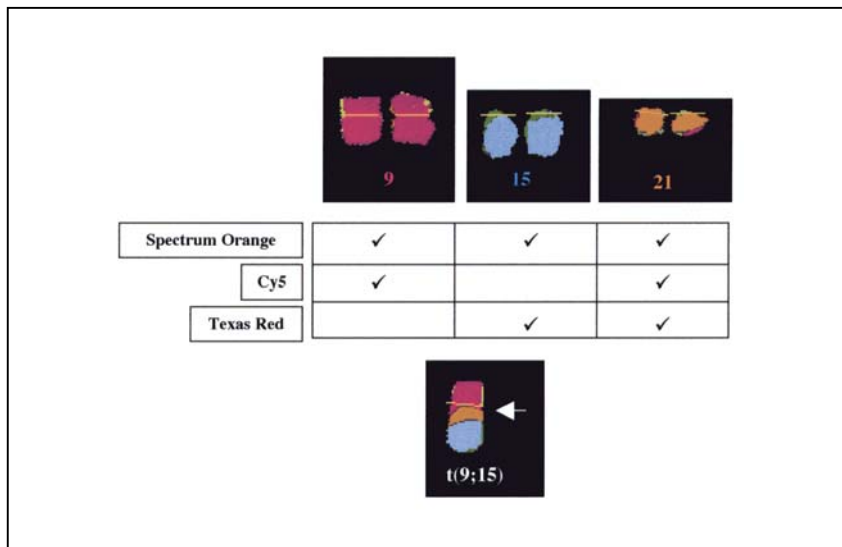


Figura 14. La línia cel.lular KIS I presenta un der(9)t(9;15). La M-FISH detecta la translocació, però en el punt de fusió apareix un color addicional corresponent al cromosoma 21. En aquest punt la composició del cromosoma 9 (SpectrumOrange/Cy5) es suma amb la del cromosoma 15 (SpectrumOrange/TexasRed) donant una falsa inserció del cromosoma 21 (SpectrumOrange/Cy5/TexasRed).

Alhora, davant d'una translocació subtil es poden donar confusions d'assignació, per exemple, classificar com a cromosoma-*a-b-c* el cromosoma-*a* translocat en el cromosoma-*b-c*. Tanmateix, amb la línia cel.lular KIS I es va comprovar que s'han d'analitzar amb cura petites translocacions ja que poden ser indetectables, sobretot en els casos on la composició de fluorescència del cromosoma derivatiu contingui tots els fluorocroms dels cromosomes translocats. Un exemple d'aquest fet es donaria quan un cromosoma marcat amb el fluorocrom *a* (per exemple SpectrumOrangeTM, en el cas del cromosoma 5) es transloqués a un cromosoma marcat amb els fluorocroms *a* i *b* (per exemple SpectrumOrangeTM i FITC, en el cas del cromosoma 12) (Fig. 15). Tal i com ha estat proposat amb anterioritat (Law and Jalal, 2000), en aquests casos és indicat la comprovació per FISH amb sondes WCP específiques (Fig. 15).

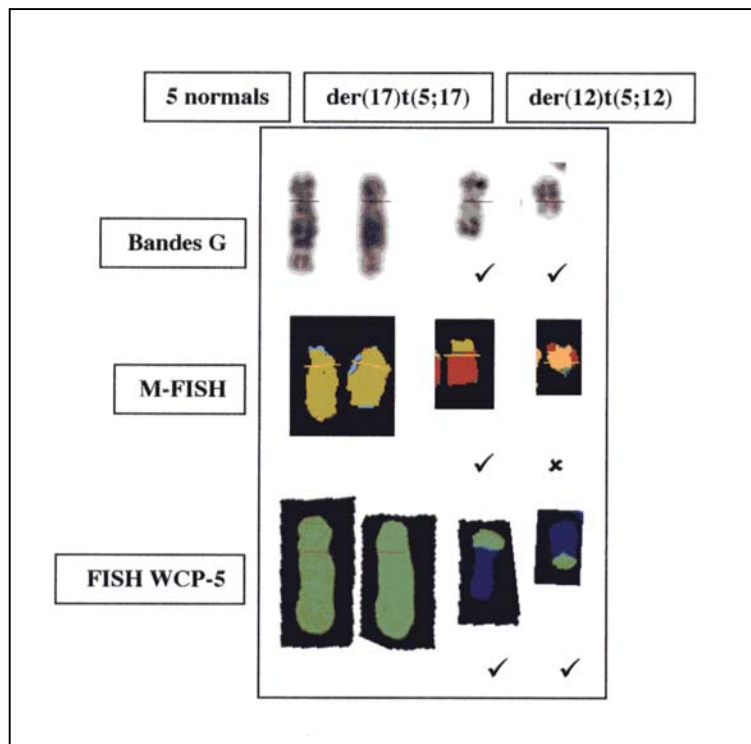


Figura 15. La línia cel·lular KIS I presenta dos cromosomes 5 normals, un der(12)t(5;12) i un der(17)t(5;17). Tant per bandes-G com per FISH amb sonda WCP-5 es detecten ambdues translocacions desequilibrades. No obstant, per M-FISH només s'observa canvi de color en el der(17)t(5;17). El cromosoma 5 és marcat amb SpectrumOrange™ i el cromosoma 12 amb FITC/SpectrumOrange™, i per tant, en el der(12)t(5;12) no es detecta canvi de composició de fluorescència. Això no passa en el der(17)t(5;17), ja que el cromosoma 17 té una composició diferent de fluorocroms.

Finalment destacar que la tècnica de M-FISH no és prou sensitiva per les translocacions subtelomèriques (Jalal et al., 2001), les quals poden ser presents en cariotips normals, com la t(5;11)(q35;p15.5) (Brown et al., 2002).

4.1.2.2 *Alteracions genètiques identificades mitjançant hibridació in situ fluorescent múltiple (III i IV)*

a) Pacients amb cariotip normal

Els pacients de LMA amb cariotip normal s'inclouen en el subgrup de pacients amb pronòstic mitjà, el qual és més heterogeni i menys definit respecte als altres subgrups. Una hipòtesis àmpliament acceptada que explicaria aquest fet és que cariotips diagnosticats com a normals siguin portadors d'alteracions genètiques subtils o críptiques per la resolució de l'ACC, les quals determinarien de diferent manera l'evolució de cada pacient. En aquest sentit, els avantatges que presenten les tècniques de multicolor-FISH, com la M-FISH i el SKY, respecte de l'ACC es poden utilitzar per recaracteritzar citogenèticament cariotips normals (Kakazu et al., 1999; Uhrig et al., 1999).

En LMA, la M-FISH i el SKY han permès la identificació d'alteracions cromosòmiques no detectades prèviament per citogenètica convencional, algunes d'elles recurrents, com la translocació t(11;19)(q23;p13) (Zhang et al., 2000; Hilgenfeld et al., 2001; Brown et al., 2002). No obstant, en l'Estudi III on es van estudiar 40 casos amb cariotip normal mitjançant M-FISH no s'han identificat intercanvis cromosòmics, coincidint així amb el diagnòstic previ de citogenètica. Alhora, aquest resultat concorda també amb l'Estudi IV, on en la sèrie de 45 pacients amb cariotip normal analitzada per CGH només es va detectar el guany de 9p23 en un pacient (Taula 1). Malgrat tot, davant la limitació diagnòstica de la M-FISH i la CGH en la detecció d'alteracions cromosòmiques que afectin a bandes subtelomèriques, no es pot descartar la presència d'aquest tipus de reordenament en els pacients estudiats, on l'anàlisi per M-TEL seria l'adequada (Brown et al., 2001).

b) Pacients amb cariotip complex

Cariotips complexes s'identifiquen en el 10 i 30 % de pacients de LMA i SMD, respectivament, així com en el 50 % de casos de t-LMA i t-SMD (Fenaux et al., 1996; Grimwade et al., 1998), i suposa un factor de pronòstic desfavorable (Grimwade et al., 1998; Schoch et al., 2001). El diagnòstic citogenètic de cariotips complexes mitjançant l'ACC és en molts casos difícil, ja sigui per la qualitat de les metafases, el baix índex mitòtic o la complexitat dels reordenaments cromosòmics. En aquests casos la FISH com a tècnica complementària no és un mètode viable, ja que es fonamenta en un anàlisi dirigit per regions cromosòmiques que prèviament es coneix la seva implicació en el reordenament. A més, en un cariotip complex són moltes les regions cromosòmiques afectades, i per tant s'haurien de combinar masses hibridacions per arribar a resoldre el cariotip. En aquests casos l'estudi per M-FISH seria l'indicat. Concretament, els estudis realitzats de SKY i M-FISH en LMA han permès la caracterització detallada de cariotips anormals i complexos (Stark et al., 2000; Miyagi et al., 2002; Schoch et al., 2002a). En aquests pacients, s'han detectat un gran nombre de translocacions cromosòmiques críptiques que ha portat a la identificació de nous reordenaments cromosòmics recurrents associats a LMA (Mohr et al., 2000; Hilgenfeld et al., 2001; Kerndrup i Kjeldsen, 2001; van Limbergen et al., 2002). Destacar també, que d'entre l'heterogenitat a nivell d'alteracions cromosòmiques que presenten els cariotips complexos, s'han pogut definir subclasses citogenètiques emprant la M-FISH (van Limbergen et al., 2002).

En l'Estudi IV es va aplicar la M-FISH com a tècnica complementària a l'ACC i a la CGH, en sis pacients amb cariotip anormal o complex, on en general s'ha observat una bona correlació entre ambdues tècniques. En la majoria dels casos es van identificar les alteracions cromosòmiques proposades per ACC, ajudant alhora a caracteritzar cromosomes derivatius, cromosomes marcadors i material cromosòmic addicional (Taula 1). Així mateix, en certs casos la M-FISH va ésser més informativa que l'ACC. Per exemple, en el cas 84 que presentava el cariotip

46,XY,t(9;11)(p12;q23),add(9)(q32), la M-FISH va identificar una t(9;11)(q21~q22;q23) i no la t(9;11)(p12;q23) prèviament proposada, mentre que el suposat add(9)(q32) era en realitat una t(9;17)(?p;q?). Al tractar-se de dues translocacions equilibrades el resultat de M-FISH va confirmar el perfil normal de la CGH, ajudant alhora al diagnòstic citogenètic d'ambdues alteracions subtils.

4.1.3 *Hibridació genòmica comparada*

La CGH detecta guanys i pèrdues de material genòmic alhora que mapa la seva localització exacta mitjançant el càlcul de la proporció d'intensitat de fluorescència entre els dos ADN cohibridats al llarg de l'eix dels cromosomes (Kallionemi et al., 1992).

4.1.3.1 *Aspectes metodològics*

Una de les avantatges de la tècnica de CGH ha estat obtenir informació d'alteracions cromosòmiques processant material biològic sense necessitat d'estimular-lo a la divisió, podent utilitzar així indiferentment ADN genòmic extret de mostra fresca, congelada o fixada. Així, el resultat de CGH en l'Estudi IV ha estat important en els casos on no s'havien pogut observar mitosis en l'ACC, on ha permès descriure alteracions importants pel pronòstic de la LMA, com la deleció a 7q, la monosomia 7 o el guany de 8q. En els casos 33, 35 i 36, les alteracions identificades per CGH al diagnòstic es van confirmar per ACC en un estudi posterior durant el seguiment de la malaltia. L'avantatge d'estudiar casos sense necessitat d'obtenir cèl.lules en divisió és compartida per la FISH interfàsica. No obstant, mentre la CGH permet un anàlisi global de les possibles alteracions desequilibrades, la FISH interfàsica serà un anàlisi dirigit proporcionant només informació de l'alteració genètica específica a estudiar.

Una limitació de la tècnica de CGH, és que no detecta alteracions presents en una proporció baixa de cèl.lules a la mostra. El percentatge mínim de cèl.lules portadores necessari per identificar l'alteració depèn dels

límits dels llindars de detecció que s'estableixin. En general, per una població cel·lular diploide on el 50 % de cèl·lules presenten l'anomalia s'estableix que els llindars de detecció per guanys i pèrdues són 1,25 i 0,75, respectivament (du Manoir et al., 1995). Per aquest motiu, subclones cel·lulars portadores d'alteracions generades per evolució clonal no es detectarien per aquest mètode. En l'Estudi IV, al analitzar els casos on el resultat de la CGH ha estat menys informatiu que l'ACC (casos 75 a 83, Taula 2) s'observa que la majoria de discrepàncies es relacionen amb l'esmentada limitació de la tècnica de CGH. Per exemple, el percentatge de blastes a MO en els casos 82 i 83 era inferior al 28 % (Taula 2), i en els casos 75 a 80 (Taula 2), la proporció de cèl·lules portadores de l'alteració genètica desequilibrada respecte la població cel·lular total era inferior al 50 % (Taula 2).

Així, per poblacions neoplàsiques amb >50 % de cèl·lules portadores de l'anomalia, el límit de detecció per guanys i pèrdues de material genètic mitjançant CGH s'estima que és de 5-10 Mb (Kallionemi et al, 1994b; Bentz et al., 1998), tot i que delecions de 3 Mb s'han detectat utilitzant intervals de referència estàndards (Kirchhoff et al., 1999). D'altra banda, el límit de sensibilitat de l'ACC es considera la grandària equivalent a una banda cromosòmica, tot i que varia en funció de la morfologia cromosòmica que s'aconsegueixi i de la regió cromosòmica on es localitzi l'alteració. Així, amb l'aplicació de la CGH complementària a l'ACC s'esperaria poder arribar a caracteritzar alteracions genètiques críptiques, entre les quals es troben les microduplicacions i les microdelecions. Aquest fet s'ha confirmat en la sèrie analitzada (Estudi IV), on mitjançant CGH es van identificar alteracions genètiques críptiques i subtils ocultes en el cariotip.

En quan a l'assignació de punts de reordenament cromosòmic, la sensibilitat de la CGH és semblant a la que presenta l'ACC. No obstant, la falta de precisió entre ambdós mètodes pot ser deguda a la variació en el grau de condensació en certes regions cromosòmiques (du Manoir et al., 1995). En aquest sentit, els experiments de CGH es van dur a terme

mitjançant la utilització d'extensions comercials, les quals garanteixen una densitat de mitosis adequada amb un grau òptim de condensació cromosòmica. A més, durant l'anàlisi es va tenir en compte d'incloure metafases que presentessin un grau similar de condensació cromosòmica.

En els casos on la clona cel·lular anòmala evoluciona en subclones amb alteracions genètiques diferents, per CGH es detectaran només aquelles canvis genètics més representats. Per exemple, el cas 28 de l'Estudi IV presenta una subclona menys nombrosa que es diferencia de la primària per presentar un cromosoma marcador addicional diagnosticat com a +del(22)(q?) per M-FISH. En aquest cas la CGH va permetre identificar les alteracions genètiques associades a la subclona principal, com la deleció dels cromosomes 6 i 11 entre altres, mentre que no va detectar el guany del cromosoma 22 associat al +del(22)(q?) de la subclona secundària. Una situació semblant es va plantejar en el cas 25 per la detecció del cromosoma *dm*, així com en el cas 30 per la identificació de la monosomia 13 i el cromosoma der(3) (Taula 1). Aquest fet s'accentua al incrementar-se el nombre de subclones diferents, per exemple, en el cas 31 (Taula 1). En aquests casos el resultat de CGH proporciona informació sobre els guanys i pèrdues de material genètic en el conjunt de la població cel·lular. En aquest sentit, la CGH ha estat una tècnica àmpliament aplicada en neoplàsies hematològiques per complementar el diagnòstic citogenètic de cariotips complexos (Kim et al., 2001; Lindvall et al., 2001; Verdorfer et al., 2001). No obstant, per tal de definir el cariotip final serà interessant, com es demostra en l'Estudi IV, de complementar l'estudi mitjançant M-FISH.

4.1.3.2 Identificació de guanys i pèrdues de material genètic mitjançant hibridació genòmica comparada (IV)

En els casos on s'ha aplicat la CGH com a tècnica complementària a l'ACC pel diagnòstic d'alteracions genètiques associades a la LMA (Bentz et al., 1995; Wilkens et al., 1998; Castuma et al., 2000; Lichter et al., 2000; Kim et al., 2001; Verdorfer et al., 2001) la concordança entre ambdues

tècniques és elevada (Bentz et al., 1995; Wilkens et al., 1998; Castuma et al., 2000). En l'Estudi IV, on s'han estudiat un total de 121 pacients mitjançant ambdós mètodes, s'observa una correlació de resultats del 62,8 %. En els casos restants, la CGH va aportar informació addicional respecte l'ACC en un 17,3 %, mentre que en un 9,1 % va ésser menys informativa.

En l'Estudi IV mitjançant CGH s'han diagnosticat cromosomes marcadors (indicats en subratllat, Taula 1), cromosomes derivatius (indicats en cursiva, Taula 1) i materials cromosòmics addicionals en cariotips patològics (indicats en gris, Taula 1), que per la seva morfologia, no havien pogut classificar-se mitjançant ACC. El resultat de CGH en aquest casos ha estat útil per resoldre el cariotip prèviament proposat. Cal assenyalar que a diferència de la FISH, l'aplicació de la CGH és independent del resultat previ d'ACC. En la sèrie analitzada en l'Estudi IV es va obtenir una bona correlació en l'assignació de bandes per CGH respecte l'ACC. Alhora, en certes ocasions el resultat de CGH va complementar el cariotip proposat per ACC, ajudant així a definir punts de trencament.

Per altra banda, una limitació que presenta la tècnica de CGH és la no detecció d'alteracions cromosòmiques equilibrades, com la majoria de translocacions i inversions, ja que no causen alteracions en el nombre de còpies d'ADN. Aquest fet s'observa en l'Estudi IV, on es va observar un perfil normal en l'estudi de CGH dels casos 41 a 55 que presentaven cariotips amb alteracions cromosòmiques equilibrades, descartant alhora la presència d'alteracions desequilibrades afegides (Taula 2).

En l'Estudi IV la CGH ha permès detectar alteracions subtils no caracteritzades completament per ACC, com les corresponents a les delecions associades a translocacions múltiples, per exemple les que afecten a 5q13-q33 i 13q14-q21 identificades en els casos 18 i 19, respectivament (Taula 1). Alhora, en els casos 26 i 27 que presentaven cariotip complex, el resultat de CGH va ser útil per caracteritzar translocacions desequilibrades, les quals havien estat diagnosticades com a simples delecions o cromosomes derivatius (Taula 1). D'altra banda, les alteracions cromosòmiques

desequilibrades proposades per l'ACC en els casos 23, 24 i 84, no es van observar per CGH, fet que va permetre identificar la presència de translocacions equilibrades subtils, les quals van ser comprovades posteriorment per FISH o M-FISH (Taula 1). Finalment destacar la detecció de la pèrdua de 16p13 observada per CGH en el cas 28 (Taula 1), la qual no s'havia identificat per ACC ni per M-FISH, i la qual es podria considerar críptica.

En la sèrie de 45 pacients amb cariotip normal, la CGH ha identificat un cas amb un guany a 9p23, no diagnosticat prèviament per ACC (cas 40, Taula 2). Aquesta observació, junt amb la detecció de la deleció 16p13 del cas 28, recalquen les limitacions de les tècniques de diagnòstic genètic basades en l'anàlisi en metafase, com és l'ACC o la M-FISH. La baixa freqüència de guanys i pèrdues en el subgrup de pacients amb cariotip normal concorda amb el resultat d'altres treballs publicats en LMA (Bentz et al., 1995; El-Rifai et al., 1997; Wilkens et al., 1998; Huhta et al., 1999; Dalley et al., 2003). No obstant, cal assenyalar que desequilibris cromosòmics inferiors a 3~10 Mb, o els que afectin a regions subtelomèriques, no es poden detectar per CGH (Kallionemi et al., 1994b; Bentz et al., 1998; Kirchhoff et al., 1999). En aquest sentit, la possibilitat que aquests tipus d'alteracions subtils siguin presents en la nostra sèrie s'hauria d'estudiar mitjançant tècniques complementàries, com la M-TEL (Brown et al., 2001) o la CGH-array (Solinas-Toldo et al., 1997).

Al igual que la FISH, la tècnica de CGH permet també mapar regions genòmiques per tal de caracteritzar alteracions genètiques específiques. Tot i això, mentre que per CGH s'analitza pràcticament la totalitat del genoma, l'estudi de FISH s'acostuma a aplicar per tal d'analitzar una regió cromosòmica concreta. Per exemple, la trisomia parcial del cromosoma 11 en el cas 2 de l'Estudi I, es va mapar mitjançant FISH i CGH en l'Estudi I i IV, respectivament. Cal assenyalar que en diversos treballs on s'han combinat ambdues tècniques pel mapatge del nombre de còpies de regions genètiques desequilibrades es demostra una major resolució de la FISH en

relació a la CGH. Per exemple, l'anàlisi mitjançant FISH posicional de la deleció de la regió 11q22~23, en casos de limfomes de cèl.lules del mantell i en leucèmies cròniques limfoblàstiques, demostra una discontinuïtat de pèrdues de còpies de seqüències d'ADN, les quals no havien estat detectades per CGH (Monni et al., 1998; Zhu et al., 1999). Així doncs, en l'Estudi s'hauria de considerar la possibilitat que les alteracions genètiques observades per CGH siguin discontinues.

Alhora, la tècnica de CGH s'ha aplicat per detectar guanys i pèrdues de material genètic recurrents associats a la LMA. Els resultats de CGH en la sèrie de 128 pacients analitzada mostren que la pèrdua parcial de regions cromosòmiques és l'alteració genètica més característica de LMA (Estudi IV, Fig. 1). Aquesta observació és en concordança amb els resultats presentats amb anterioritat per El-Rifai et al. en una sèrie de 25 casos de LMA refractaris (El-Rifai et al., 1997).

Monosomies del cromosoma 7 i delecions a 7q/5q, són alteracions recurrents en LMA que, tot i que es donen en una certa freqüència, no s'associen significativament a cap subgrup morfològic de LMA (Second MIC Cooperative Study Group, 1988). Recentment s'ha descrit una major freqüència d'aquestes anomalies cromosòmiques desequilibrades en pacients de LMA que presentaven cariotip complex (Lindvall et al., 2001; Verdorfer et al., 2001). En la sèrie de 128 pacients de LMA analitzada per CGH les pèrdues més freqüents es localitzen a 5q (9 casos), 7 (9 casos), 7q (6 casos) i 17p (5 casos) (Fig. 1, Estudi IV), i en la majoria dels casos, es detecten acompanyades d'altres canvis cromosòmics. Així mateix, en la nostra sèrie aquestes pèrdues s'han observat majoritàriament en pacients refractaris al tractament o amb una evolució clínica desfavorable, fet que confirma la importància d'aquestes alteracions com a factors indicadors de pronòstic desfavorable en LMA (Grimwade et al., 1998; Mrozek i Bloomfield, 1998).

En la LMA, la pèrdua típica de 16q afecta a la regió 16q22-qter, la qual s'associa a un pronòstic menys favorable en relació a altres alteracions de 16q22 freqüents en LMA, com són la *inv(16)(p13q22)* o la

t(16;16)(p13;q22) (Betts et al., 1992; Marlton et al., 1995). Tot i que no es coneix amb tant de detall la implicació d'altres anomalies de 16q, la del(16)(q11) s'ha descrit recentment com una nova alteració genètica recurrent en LMA, la qual podria presentar un paper important en l'evolució clonal, i per tant en la progressió tumoral (Yamamoto et al., 2001). En l'estudi IV, 3 dels 5 casos amb deleció a 16q presentaven pèrdua de 16q11-pter (Fig. 1, Estudi IV), fet que confirmaria la seva recurrència en LMA. Les anomalies genètiques associades a evolució clonal en LMA són típicament reordenaments desequilibrats que en general es detecten com a alteracions secundàries a reordenaments equilibrats (Johansson et al., 1996). En aquest sentit, la possible implicació en l'evolució clonal de les delecions a 16q estaria en concordança amb els nostres resultats, ja que aquestes s'han identificat acompanyades d'altres anomalies o en cariotips complexes, destacant un cas on es va detectar junt a una t(10;11)(p15;q22~q23).

En l'Estudi IV s'han caracteritzat guanys freqüents dels cromosomes 8 i 22. La trisomia del cromosoma 8 i 22 són alteracions secundàries associades a la LMA (Langerbeer et al., 1998) fet que explicaria els nostres resultats. Així, el guany del cromosoma 22 s'observa majoritàriament associat a l'inv(16)(p13q22), però també s'ha detectat en cariotips complexes (Taula 1). A més, cal destacar l'evident diferència en com el guany del cromosoma 22 detectat per CGH es manifesta, en els cariotips amb inv(16)(p13q22) s'identifica com una trisomia 22, i en els cariotips complexes s'observa com a una dup(22q).

Diferents alteracions del cromosoma 21 (Roumier et al., 2003) que impliquin ampliació del locus 21q22.3 poden donar l'activació de l'oncogen *AML1*(*RUNX1*) (Avramopoulos et al., 1992; Erickson et al., 1992). La ampliació de *AML1* s'ha descrit en un cert nombre de casos de LLA (Larramendy et al., 1998b; Niini et al., 2000; Alvarez et al., 2003; Harewood et al., 2003) i de LMA (Streubel et al., 2001). En el cas 18, el guany de varies còpies del cromosoma marcador caracteritzat com a tas(21;21)(q22;q22) podria ser un mecanisme d'activació de l'oncogen

AMLI, destacant que les associacions telomèriques s'han descrit com un mecanisme d'instabilitat cromosòmica (Riboni et al., 1997).

Les amplificacions en canvi són lesions genètiques poc freqüents en LMA (Bentz et al., 1995; El-Rifai et al., 1997; Huhta et al., 1999), però la seva caracterització per CGH permet delimitar una regió de desequilibri més estreta, la qual pot localitzar un oncogen (Mohamed et al., 1993; Crossen et al., 1999). D'entre les escasses amplificacions descrites en pacients de LMA, algunes s'han relacionat amb episodis previs de teràpia antineoplàsica o amb exposició a agents potencialment carcinogènics (Cooperman i Klinger, 1981; Rechavi et al., 1990). En l'Estudi IV és de destacar la identificació d'un cas amb amplificació de 13q12-q21 (Taula 1, cas 32).

Al examinar l'amplificació de 13q12-q21 es van diferenciar en l'imatge d'hibridació dues zones separades d'amplificació, una a 13q12 i l'altra a 13q21.1 (Fig. 2A, Estudi IV), mentre que el perfil de CGH indicava una amplificació global de 13q13-q21.1 (Fig. 2B, Estudi IV). Mitjançant FISH amb la sonda LSI-D13S25 que hibrida sobre el locus 13q14.3 es va investigar si el perfil d'amplificació d'aquesta zona era causada per la suma del perfil de les dues amplificacions, o en realitat era una amplificació. El 17 % i el 83 % de cèl.lules amb 3 i 2 senyals d'hibridació respectivament, va confirmar la primera hipòtesis plantejada (Fig. 2C, Estudi IV). Casos d'amplificacions independents s'han descrit també a 17q (Barlund et al., 1997) i a 20q (Tanner et al., 1996), tot i que inicialment Kallionemi et al. havien considerat aquesta última com a una única amplificació (Kallionemi et al., 1994a).

Tant 13q12 com 13q21.1 són bandes cromosòmiques que presenten una elevada densitat gènica, i per tant, és difícil proposar l'efecte molecular de les amplificacions detectades. Si s'examinen els gens localitzats a 13q12 o a 13q21.1 és de destacar *FLT3*, gen que la seva alteració molecular s'ha associat recentment al desenvolupament de la LMA (Kiyoi et al., 1998). Malgrat tot, no es va disposar d'ADN suficient per confirmar la possible amplificació de *FLT3*. Així mateix, no es pot descartar la participació

d'altres oncogens localitzats tant a 13q12 com a 13q21.1. És per tant necessari identificar casos semblant de LMA per tal de poder definir la base molecular d'aquestes amplificacions, i així establir el seu paper pronòstic i diagnòstic en la LMA.

4.2 Caracterització de perfils de desregulació de l'expressió gènica en la leucèmia mieloide aguda

La tècnica d'ADN array permet l'anàlisi d'expressió d'un elevat nombre de gens en un sol experiment, generant un llistat de gens d'interès en funció del disseny experimental, mentre que en una reacció de QRT-PCR a temps real s'avalua l'expressió d'un únic gen en diverses mostres biològiques. Així doncs, partint del resultat previ d'ADN array, és interessant aplicar la QRT-PCR a temps real per estudiar l'expressió de gens concrets en una sèrie més extensa de mostres, a la vegada que s'obté una quantificació més precisa. Aquest tipus d'anàlisi permet classificar els pacients en funció dels nivells d'expressió, que podran ser utilitzats en estudis comparatius per a la identificació d'associacions entre expressió gènica i paràmetres clínic-biològics. A continuació es discuteixen els aspectes metodològics d'ambdues metodologies i la seva aplicació en l'anàlisi de l'expressió gènica en la LMA.

4.2.1 cADN array

L'avantatge principal de la metodologia de cADN array és l'anàlisi ràpid de l'expressió de centenars a milers de gens en un únic experiment (Schena et al., 1995). Si es treballa en array de filtre de niló, l'ARN s'extreu de les mostres test i de la referència, i es marca radioactivament alhora que es transcriu reversament a cADN. A continuació, cada sonda s'hibrida per separat amb un array idèntic, que conté una sèrie extensa de diferents gens representats per fragments de cADN. Al comparar el senyal d'hibridació de cada fragment de cADN de l'array es determina si el gen corresponent

presenta diferents nivells d'expressió en la mostra test respecte a la mostra de referència (Fig. 10).

4.2.1.1 Aspectes metodològics

Tècnicament la metodologia de cADN array inclou una sèrie de passos que poden ésser susceptibles a variabilitat, com la fabricació de l'array, la transcripció inversa o diferències en la hibridació. En aquest sentit, metodològicament es duen a terme una sèrie de passos i existeixen diversos controls per assegurar que els resultats de l'array reflexin els propis canvis en els perfils d'expressió gènica, i reduir la possible variabilitat introduïda. Així, cada array inclou fragments de cADN de gens no humans com a controls negatius, els quals són utilitzats per controlar els nivells de *background* en la hibridació. Alhora, els fragments de cADN de gens *housekeeping* permeten mesurar la variabilitat entre mostres, i són controls positius per la normalització dels valors d'expressió, la qual anul·la les possibles diferències de quantitat i puresa entre els cADN estudiats. Pel que fa al tractament dels arrays, és important utilitzar-los del mateix lot de fabricació, reutilitzar un màxim de tres vegades el mateix filtre i comprovar en cada cas que la petjada anterior d'hibridació desaparegui completament. En quan a l'exposició dels filtres hibridats a la placa d'imatge, és aconsellable escanejar-los passat el mateix temps, i les imatges obtingudes s'escalen per tal d'igualar el contrast i el soroll de fons.

Per l'anàlisi de les dades, no existeix encara un consens general en els paràmetres per definir quan un gen es troba sobre- o sotaexpressat. Així, alguns treballs han establert una diferència en el nivell d'expressió de dos ordres com a significativa, mentre que d'altres utilitzen com a criteri de representació una diferència de 4 ordres [per revisió veure (Tefferi et al., 2002)]. Concretament, en l'Estudi V es va establir el nivell de significació en 2,5 ordres de diferència (-1,32 i +1,32 en base \log_2), considerant només aquells gens que es trobaven desregulats almenys en tres pacients.

El resultat de cADN array de la població cel.lular de la MO és diferent si s'analitza l'expressió de cèl.lules mieloides purificades. Diferències de llinatge donarien canvis d'expressió a causa de diferències en la proporció o quantitat absoluta de cèl.lules entre mostra de MO sana i patològica. Per exemple, la sotaexpressió de determinats gens es relacionaria amb una menor quantitat relativa de cèl.lules no mieloides en la MO dels pacients de LMA, més que per la pròpia neoplàsia (Larramendy et al., 2002). Així, es podria donar el cas d'una pseudosotaexpressió de gens específics de llinatge limfoide, o una pseudosobreexpressió de gens específics de llinatge mioide (Miyazato et al., 2001).

En aquest sentit, la purificació de cèl.lules mieloides CD34+ (Virtaneva et al., 2001) o CD133+ (Miyazato et al., 2001) és aconsellable per l'anàlisi de l'expressió gènica en neoplàsies mieloides. No obstant, aquest procés requereix partir d'una gran quantitat de mostra per tal d'extreure quantitats suficients d'ARN sense necessitat d'una amplificació posterior. Aquesta limitació es fa més evident en el cas de mostres de MO d'individus sans. En el disseny de l'Estudi V es va proposar la utilització de cèl.lules mononucleades aïllades de la mostra de MO sense un pas posterior de purificació. Per aquest motiu, es va comprovar que els canvis identificats en l'expressió dels gens no es relacionessin amb diferències de llinatge o d'estat de diferenciació de la població hematopoètica entre les mostres de MO procedents de pacients de LMA o d'individus sans.

Els fragments de cADN immobilitzats en l'array comercial estan dissenyats per tal de reduir problemes d'hibridacions no específiques ja que són seqüències curtes de 200 a 600 pb que s'han amplificat d'un segment del mARN fora de la regió poli-A, d'elements repetitius o de seqüències homòlogues. Així, al hibridar el filtre de niló amb la sonda de cADN marcada amb P³², s'aconsegueixen poques hibridacions inespecífiques que permeten la detecció de gens amb expressió mínima a la mostra. En concret, la casa comercial estableix el límit de sensibilitat en 10-20 còpies d'un

mARN per cèl.lula, abundància equivalent al 0,0025 % (The Atlas cDNA Expression Array's User Manual, Clontech Laboratories Inc.).

Tot i que la intensitat del senyal d'hibridació es relaciona linealment amb els nivells d'expressió gènica de la mostra analitzada, una mateixa concentració d'ARN pot mostrar senyals amb una certa variació en quan a ordres d'intensitat (The Atlas cDNA Expression Array's User Manual, Clontech Laboratories Inc.). En aquest sentit, els resultats d'hibridació es consideren semiquantitatius, ja que la intensitat del senyal permet només realitzar una aproximació del nivell d'abundància d'un cADN. Una estimació aproximada s'obté al comparar els senyals d'hibridació de cada cADN amb la senyal corresponent a gens *housekeeping* de concentració coneguda i que s'inclouen com a controls positius en cada filtre (Fig. 15). No obstant, per tal d'obtenir una valoració quantitativa es calculen les intensitats dels cADN utilitzant un programa informàtic específic segons la imatge obtinguda en l'escàner Phosphorimager.

Quan es treballa amb cADN array de filtre de niló, en el marcatge de la sonda es pot utilitzar el P^{32} o el P^{33} . El mètode més indicat dependrà del tipus de disseny experimental que es vagi a dur a terme. El P^{32} és el més utilitzat ja que presenta una major sensibilitat. D'altra banda, amb el P^{33} s'aconsegueix una major resolució en el senyal d'hibridació, i per tant assegura que no existeixi interferència entre les intensitats de dos pouets pròxims. Aquest isòtop s'utilitza quan es pretén evaluar gens sobreexpressats a la mostra. En el nostre cas es va decidir utilitzar el P^{32} ja que presenta un 75 % de sensibilitat de detecció més elevada en relació al P^{33} .

El temps d'aparició del senyal d'hibridació del filtre en la placa d'imatge durant l'exposició és inversament proporcional a la qualitat de l'ARN. Al cap de poques hores d'exposició apareix el marcatge dels cADN d'expressió normal o abundant, i els cADN poc representats després d'exposicions més llargues. Així, es va establir que el temps mínim per aparèixer la marca d'hibridació era d'un dia, destacant que es poden realitzar exposicions de 7 dies.

4.2.1.2 Anàlisi del perfil d'expressió genètica d'apoptosi en la leucèmia mieloide aguda (V)

La biologia de la LMA està associada a l'alteració de la funció de gens relacionats amb el control de la proliferació, diferenciació i apoptosi d'una cèl.lula immadura de llinatge mieloide (Alcalay et al., 2001; Scandura et al., 2002). La implicació de l'apoptosi en la patogènesis de la LMA és un fet àmpliament documentat (Klampfer et al., 1996; Britos-Bray et al., 1998; Pandolfi, 2001). No obstant, es coneix poc sobre els gens apoptòtics o sobre les vies de senyalització relacionades amb l'apoptosi associats al desenvolupament de la LMA. L'anàlisi de l'apoptosi és interessant en LMA, ja que alteracions en la funció cel.lular d'apoptosi s'han relacionat amb resistència al tractament (Smith et al., 1998; Marie, 2001). Així mateix, els resultats dels estudis a nivell de regulació de l'apoptosi en LMA seran importants per identificar noves dianes terapèutiques i podran contribuir al disseny de tractaments alternatius.

La regulació de l'apoptosi però, és una funció complexa, que inclou un gran nombre de proteïnes i vies de senyalització cel.lular. En aquest sentit, al analitzar-se l'expressió de varis gens en un sol experiment, la utilització de la tècnica de cADN array permet l'estudi de gens o de perfils d'expressió genètica associats a canvis en les vies de senyalització cel.lular (Zhao et al., 2000). Així, en l'Estudi V s'ha aplicat la tècnica de cADN array per l'estudi de la funció d'apoptosi en 10 pacients de LMA utilitzant el filtre AtlasTM Human Apoptosis Array (Clontech Laboratories Inc.). Cada filtre de niló conté fragments de cADN de 217 gens per duplicat, que inclou nou gens humans *housekeeping*, tres gens no humans i 205 gens amb relacionats amb el cicle cel.lular i l'apoptosi. Posteriorment els resultats es van validar mitjançant QRT-PCR a temps real allargant la sèrie a 15 pacients (veure 4.2.2.2). Donat el baix nombre de mostres, els resultats de l'Estudi V no ens van permetre realitzar correlacions clíniques.

Dels 205 gens inclosos en l'array es van identificar 34 gens amb una expressió anòmala, dels quals 22 eren sotaexpressats i 12 sobreexpressats

(Taula 3 i Fig. 2, Estudi V). D'aquests, es van excloure de l'anàlisi 7 gens ja que la seva desregulació podia estar relacionada amb diferències de llinatge cel·lular entre la mostra de referència i la leucèmica. El gen *NF-ATC1* (Horsley i Pavlath, 2002), el qual s'expressa majoritàriament en limfòcits i que en l'anàlisi s'identificava com a sotaexpressat. De manera semblant, tot i que la via de senyalització de TNF induïx apoptosi en d'altres tipus cel·lulars (Ashkenazi i Dixit, 1998), aquesta s'expressa majoritàriament en macròfags i en cèl·lules T activades davant de respostes immunològiques, i per tant els gens relacionats amb aquesta via, com *ADAM17*, *RIPK1*, *TNFSF5*, *TNFA*, *NSMAF* i *LTB*, es van considerar pseudoexpressats (Fig. 3, Estudi V).

Després d'excloure els gens pseudoexpressats, 27 van ser els gens apoptòtics amb una expressió significativament diferent en els pacients de LMA en relació a les mostres procedents d'individus sans. Aquests eren els gens suggestius a representar un paper important en la regulació de l'apoptosi, i consegüentment, en la patogènesi de la LMA. Al agrupar els 27 gens apoptòtics segons la seva funció es van identificar diverses alteracions en les vies de senyalització de l'apoptosi i del cicle cel·lular en relació a la LMA.

* Via de senyalització de IGF (*insulin-like growth factor*)

Pel que fa a les vies de senyalització extrínseques, destacar la via de IGF (Fig. 4, Estudi V), la qual regula la proliferació i diferenciació de les cèl·lules hematopoètiques, induïnt una senyal mitogènica i de protecció contra l'apoptosi (Baserga, 2000; Valentis i Baserga, 2001; Zumkeller, 2002).

▪ *IGF2* i *IGF1R*

En les mostres analitzades, es va observar desregulació d'aquesta via per sotaexpressió tant del lligand *IGF2*, com del receptor *IGF1R*. Destacar que prèviament en LMA s'han descrit casos de pèrdua d'*imprinting* en *IGF2* (Wu et al., 1997), mentre que casos de leucèmies agudes infantils s'han associat a nivells baixos d'expressió de *IGF1R* (Eshet et al., 2000).

- *GRB10*

Alhora, es va detectar sobreexpressió de *GRB10*, la qual cosa indicaria una activació d'aquest oncogen. *GRB10* és una proteïna de senyalització citoplasmàtica que interfereix en la senyal proliferativa de IGF al interaccionar amb IGF1R, i que presenta funció antiapoptòtica al interaccionar amb proteïnes BCL2 (Han et al., 2001). *GRB10* s'havia relacionat anteriorment amb les neoplàsies hematològiques ja que es va observar que interaccionava amb la proteïna de fusió BCR/ABL1 (Nantel et al., 1998; Han et al., 2001).

- *IBFBP3* i *IGFBP5*

Tant *IBFBP3* com *IGFBP5* estan significativament sotaexpressats en les mostres estudiades. Les IGFBPs són transportadors de IGFs a la circulació, mentre que a nivell cel·lular passen a nucli on modulen la senyalització de IGF (Baxter, 2001). Destacar que *IGFBP3* actua com a inhibidor mentre que *IGFBP5* és un activador. A part de la seva funció en la regulació de la via de senyalització de IGF, *IGFBP3* exerceix efectes antiproliferatius a través de la via de senyalització de P53, o independentment de P53 a través de la interacció amb proteïnes de tipus BCL2 (Baxter, 2001). És important d'assenyalar que els resultats obtinguts relacionen per primera vegada l'alteració d'ambdós gens amb la LMA. Els estudis d'aquests gens en LLA mostren, una sobreexpressió de *IGFBP5* (Vorwerk et al., 2002), mentre que la sotaexpressió de *IGFBP3* s'ha identificat com un factor associat a bon pronòstic (Petridou et al., 2001). Així doncs, els resultats obtinguts en LLA indicarien la necessitat en LMA d'estudis d'expressió de *IGFBP3* més extensos, ja que podria ser un nou factor amb valor pronòstic. Així mateix, l'expressió diferencial que presenta *IGFBP5* en LMA respecte en LLA suggeriria la consideració d'aquest gen com a factor associat a llinatge no descrit fins ara (Golub et al., 1999).

- * Via de destoxificació per GSH (*glutathione*)

S'ha identificat sotaexpressió de *GPX1*, *GSR*, *GSTM1*, *GSTP1* i *MGST1*, els quals són gens codificants per enzims de la via de destoxificació

de GSH (Fig. 5, Estudi V). Aquesta via és necessària per eliminar els xenobiòtics que entren a la cèl.lula i que d'altra banda podrien ser tòxics, contribuint així a reduir l'estrès cel.lular. La sotaexpressió dels gens mencionats anteriorment, podrien donar una reducció dels nivells cel.lulars de GSH, i per tant, una menor resposta en LMA davant de xenobiòtics. Aquesta hipòtesis estaria recolzada pel fet que alteracions en la via de GSH s'han relacionat amb una major susceptibilitat a t-AML després d'un període de quimioteràpia citotòxica (Rollinson et al., 2000; Allan et al., 2001). Atès que l'estrès cel.lular es considera un inhibidor de supervivència, la reducció dels nivells de GSH incrementaria la sensibilitat cel.lular a l'apoptosi (Voehinger et al., 2000).

* Vies de senyalització mitocondrials

▪ *Caspases*

Pel que fa a les vies de senyalització intrínseques, s'ha detectat sobreexpressió de *CASP8*, un inductor essencial en la reacció de les caspases i el destí final de diferents vies de senyalització de receptors de membrana (Fig. 6, Estudi V).

▪ *Gens de la família BCL2*

Alhora, s'ha observat l'expressió anòmala de diversos gens codificadors per proteïnes de la família BCL2, les quals regulen la reacció de les caspases (Gross et al., 1999) (Fig. 6, Estudi V). L'estudi del balanç entre els senyals proapoptòtics i antiapoptòtics a nivell de mitocondria és important ja que s'ha identificat com un factor pronòstic i condicionant de tractament en LMA (Kornblau et al., 1999b; Del Poeta et al., 2003). Els resultats obtinguts destaquen una senyalització general a inhibir l'apoptosi a mitocondria per sobreexpressió dels gens antiapoptòtics *BCL2A1* (Lin et al., 1993) i *BAG-1* (Takayama et al., 1995), i per la sotaexpressió del gen proapoptòtic *NIP3* (Boyd et al., 1994).

▪ *DADI*

Finalment esmentar la sotaexpressió del gen antiapoptòtic *DADI*, el qual codifica per una proteïna que interacciona amb una proteïna de la

família BCL2, MCL1 (Nakashima et al., 1993). L'expressió alterada de *DADI* en LMA es correlaciona amb els resultats per ADN array anteriorment publicats (Virtaneva et al., 2001).

* Vies de senyalització de reticle endoplàsmic

Els resultats mostren també la desregulació de l'apoptosi en LMA a nivell de reticle endoplàsmic. En aquest cas en detecta sotaexpressió de *POR*, gen que és també deficient en diversos tipus cel.lulars tumorals (Bustamante et al., 2002). Alhora cal esmentar el fet que *POR* s'ha considerat com a possible candidat per teràpia gènica en càncer (Waxman et al., 1999).

* Vies de senyalització per mantenir la integritat de l'ADN

Un resultat a destacar és la identificació d'alteracions en la via de senyalització que assegura la integritat del genoma, per sotaexpressió de *P53* i *CSEIL*, i per sobreexpressió de *GADD45A* (Fig. 7A, Estudi V).

▪ *P53*

En la majoria de càncers el supressor de tumors P53 té inhibida la seva funció, la qual assegura que es reparin les possibles lesions a l'ADN abans que la cèl.lula continuï en cicle cel.lular o indueix l'apoptosi (Levine et al., 1991; Harris i Hollstein, 1993). Delecions de 17p així com mutacions de P53 són menys freqüents en LMA en comparació en tumors sòlids (Fenaux et al., 1991; Hu et al., 1992). Mencionar per exemple el 4 % de delecio de 17p identificat per CGH en la sèrie de LMA de l'Estudi IV (Fig. 1, Estudi IV). No obstant, en l'Estudi V, on en només un pacient s'havia observat pèrdua de 17p (cas n°5), observem una sotaexpressió generalitzada de *P53* en totes les mostres analitzades (Fig 1., Estudi V). Aquest tipus d'observació, la qual ja ha estat descrita amb anterioritat (Schottelius et al., 1994), es podria explicar per la presència de mutacions en P53, per canvis en el patró de metilació del gen o per alteracions en els seus factors de transcripció.

▪ *CSEIL*

CSEIL, transportador nuclear, té una funció relacionada amb el control de la progressió del cicle cel.lular i apoptosi, ja que s'ha vist que importa a

nucli proteïnes importants com P53 i RB1 (Brinkmann et al., 1995). Assenyalar que l'Estudi V és el primer treball on es relaciona l'alteració de l'expressió de CSE1L amb la LMA.

- *GADD45A*

Finalment destacar la sobreexpressió de *GADD45A*, gen que actua en la via de P53 com a proteïna amb funció pont entre el punt de control de cycle cel.lular i la reparació de lesions en l'ADN (Smith et al., 1994). A més, també actua induint apoptosi en resposta a estrès cel.lular a través de la via de senyalització MAPK14/JNK (Takekawa i Saito, 1998). Fins al moment, l'associació de *GADD45A* amb la LMA només s'havia descrit en línies cel.lulars (Chin et al., 1997; Santucci et al., 1999).

- * Vies de senyalització en relació al cycle cel.lular

En relació a la progressió del cycle cel.lular els resultats mostren sobreexpressió de *RBBP4* (Fig. 7B, Estudi V). Alhora, s'observa alteració en el punt de control de cycle cel.lular G1/M per sobreexpressió de *CDC37* i sotaexpressió de *CDKN2A*, així com en G2/M per sobreexpressió de *NEDD5*.

- * Via de senyalització a través de proteïnes MAP quinases i factors de transcripció

- *MAPK*

El destí de la major part de les vies de senyalització és l'activació de la transcripció de determinats gens (Figs. 3 a 5, Estudi V). La via de senyalització a través de proteïnes MAP quinases s'activa per diferents factors externs i transdueix l'estímul fins a factors de transcripció que regulen, per exemple, proliferació o apoptosi (Chang i Karin, 2001). En l'anàlisi de cADN array s'ha detectat sotaexpressió de *MAPK7*, la qual cosa suggeriria una supressió parcial de la transducció de senyal a través de MAP quinases que podria influenciar en l'aplicació de noves teràpies de tractament en LMA (Milella et al., 2001).

- *Factors de transcripció*

Pel què fa als factors de transcripció, es va observar sobreexpressió de *JUN* i *E2F5*. En aquest sentit mencionar, els efectes proapoptòtics de *JUN* a través de la via de senyalització de TNF (Fig. 3, Estudi V) (Ashkenazi i Dixit, 1998), i la funció de *E2F5* com a regulador de la transcripció de gens implicats en progressió i transformació tumoral a partir de la transducció de TGF (Chen et al., 2002).

- * Desregulació de *CLU* (*clusterin*)

Finalment, en l'anàlisi de cADN array es va observar sotaexpressió de *CLU* en la majoria de mostres analitzades (Fig.1, Estudi V). Cal assenyalar, que tot i que el descobriment de la funció proapoptòtica de *CLU* és molt recent (Jones i Jomary, 2002; Trougakos i Gonos, 2002), la desregulació en l'expressió d'aquest gen s'ha detectat mitjançant ADN array com un factor important en LMA (Schoch et al., 2002b). Els resultats de l'Estudi V confirmen doncs que la sotaexpressió de *CLU* durant l'hematopoesi podria contribuir al desenvolupament d'una població neoplàsica amb resistència a l'apoptosi.

4.2.2 *Transcriptasa inversa quantitativa-reacció en cadena de la polimerasa a temps real*

Per estudis d'expressió, la QRT-PCR a temps real representa la tècnica quantitativa disponible més sensible per determinar canvis de concentracions de mRNA d'una manera ràpida i reproduïble. Aquestes característiques fan de la QRT-PCR a temps real una tècnica eficaç per la validació de l'anàlisi d'expressió obtingut a partir dels estudis de cADN array. Així, alhora que es realitza la validació del cADN array, un pot confirmar la desregulació en l'expressió dels gens candidats (Welsh et al., 2001).

4.2.2.1 *Aspectes metodològics*

L'aplicació de les metodologies de biologia molecular basades en l'anàlisi d'expressió gènica, com la QRT-PCR depenen de l'obtenció

d'ARN de qualitat. L'ARN que s'utilitza ha de ser totalment lliure de contaminació d'ADN genòmic. En cas contrari, es podrien generar durant la PCR amplifacions de producte corresponents a falsos positius, les quals es poden evitar purificant l'ARN de restes d'ADN amb ADNasa I lliure d'ARNasa.

La RT és un pas important en la QRT-PCR que determina en gran part la sensibilitat del mètode, ja que la síntesi del cADN ha de representar acuradament la població d'ARN (Bustin, 2002). Existeixen dues estratègies per dur a terme la RT-PCR, en una es realitza una única reacció que inclou dues ADN polimerases, ARN- i ADN-depenents, reduint el temps experimental, manipulació i risc de contaminació (Bustin, 2000). En l'altra, les reaccions de RT i PCR es realitzen per separat, donant un cADN més estable (Bustin, 2000) i una major sensibilitat (Battaglia et al., 1998). Per aquest motiu, la RT-PCR de l'Estudi I i la QRT-PCR a temps real de l'Estudi V i VI es van dur a terme en dues reaccions.

Les dues transcriptases inverses més utilitzades són la AMV-RT i la MMLV-RT. La RT-PCR (Estudi I) i la QRT-PCR (Estudis V i VI) es van dur a terme amb *kits* comercials que incorporaven l'AMV-RT. En relació a la MMLV-RT, l'AMV-RT és un enzim més eficient, el qual manté la síntesi a temperatures superiors a 55°C, eliminant així els problemes associats a les estructures secundàries (Brooks et al., 1995; Freeman et al., 1996). D'altra banda, la MMLV-RT presenta una activitat ARNasa H menor i per tant conserva més intacte l'ARN (Gerard et al., 1997).

Un aspecte important a considerar és l'elecció dels *primers* per dur a terme la RT, els quals poden ser *primers* específics, *primers* random hexanucleòtids [p(dN)₆] o *primers* oligo-p(dT)₁₅. Els *primers* específics es solen utilitzar en experiments diagnòstics ja que la reacció es dona només per la seqüència d'interès. Una avantatge afegida és que produeixen nivells de *background* mínims. Els *primers* random s'uneixen a varis llocs complementaris de l'ARN i donen cADN parcials. Els *primers* oligo-p(dT)₁₅ s'uneixen a la regió 3' poli-A+ de l'ARN generant cADN

complets. Aquest fet permet augmentar el nombre de mARN que s'analitzen a partir de quantitats reduïdes d'ARN. En la RT-PCR (Estudi I) i la QRT-PCR (Estudis V i VI) es van utilitzar *primers* random ja que redueixen els problemes associats a la presència d'estructures secundàries dels ARN, alhora que transcriuen més eficientment la part 5' de l'ARN. No obstant, cal assenyalar que l'utilització de qualsevol dels *primers* introdueix variació alhora de quantificar els nivells d'ARN. Per exemple, els *primers* random poden sobrevalorar 10 vegades més la quantitat de mARN respecte al valor que s'obtidria mitjançant *primers* específics (Zhang i Byrne, 1999).

En el pas d'amplificació de la RT-PCR intervé l'enzim termoestable ADN polimerasa ADN-depenent. En la RT-PCR (Estudi I) i la QRT-PCR (Estudis V i VI) es va utilitzar la Taq polimerasa, la qual té activitat nucleasa 5'-3' i carència d'activitat exonucleasa 3'-5'. Aquestes característiques fan que sigui un enzim amb una polimerització menys fidel en relació a polimerases que conserven l'activitat exonucleasa 3'-5' (Cline et al., 1996), però d'altra banda presenta una major eficiència en la temperatura d'unió del *primer* (Bustin, 2000).

L'especificitat del pas de PCR depèn majoritàriament dels *primers* utilitzats (Zhang i Byrne, 1999), i per tant és important aconseguir-ne un disseny òptim. La llargada, la seqüència, la proporció de bases G/C i la Tm són factors a tenir en compte per tal d'escollir la parella de *primers* més adient. Tot i que el disseny es pot dur a terme manualment, existeixen programes informàtics que per una seqüència donada llisten els *primers* més preferents. Per exemple, els *primers* utilitzats en la QRT-PCR (Estudis V i VI) van ser dissenyats i sintetitzats per la casa comercial TIB MolBiol (Berlin, Germany), mentre que els *primers* pel gen *MLL* en la RT-PCR (Estudi I) van ésser els publicats amb anterioritat (Schnittger et al., 2000).

Tanmateix, un factor que influeix en l'especificitat i eficiència de la reacció de PCR és la concentració de Mg^{2+} i dNTP. El Mg^{2+} és el cofactor de l'enzim Taq polimerasa i per tant influeix directament en l'activitat de

l'enzim, mentre que desajusts en la proporció dels dNTP redueix el grau de fidelitat en la polimerització (Eckert i Kunkel, 1991). De fet, el MgCl₂ genera complexes solubles amb dNTP que és el substrat que reconeix l'enzim. Així, concentracions elevades de MgCl₂ estableixen les cadenes dobles d'ADN, la qual cosa evita hibridacions entre *primers* i dona desnaturalitzacions incompletes de la seqüència d'ADN durant la reacció (augment de T_m). D'altra banda, una concentració elevada de dNTP interfereix l'activitat polimerasa ja que redueix la proporció de Mg²⁺ lliure i afecta la unió dels *primers* amb la seqüència diana (Bustin, 2000). En aquest sentit, es va optimitzar específicament per cada parella de *primers* la concentració de MgCl₂ i dNTP en funció del rang recomanat pels *kits* comercials utilitzats (Estudi I, V i VI).

El seguiment de la fluorescència en cada cicle de PCR és el principi de la quantificació del nombre inicial de còpies d'una seqüència d'àcid nucleic. En funció de cada experiment existeixen diferents estratègies per dur a terme l'anàlisi quantitatiu (Meuer et al., 2001; Gloffke, 2003). La majoria d'aplicacions requereixen només la utilització de molècules fluorescentes d'unió a ADN de doble cadena, com el SYBR Green I. Alhora, la utilització d'una molècula fluorescent redueix els costos i problemes associats a la síntesi de sondes. No obstant, d'altres aplicacions on es busca una especificitat de seqüència elevada, per exemple en anàlisis mutacionals, requereixen la utilització de sondes marcades fluorescentment pel seguiment de la reacció de PCR. Entre aquestes s'inclouen sondes exonucleases (anomenades *Taqman*) i sondes d'hibridació, les quals permeten detectar el canvi en la seqüència d'un únic nucleòtid. L'estratègia seguida en l'Estudi V i VI ha estat la utilització de SYBR Green I ja que l'objectiu principal era la quantificació dels nivells d'expressió més que l'anàlisi de la seqüència en concret.

La llargada òptima de producte de QRT-PCR és de menys de 200 pb, tot i que en l'Estudi V i VI es demostra que mitjançant el sistema LightCycler (Roche Diagnostics) s'han arribat a amplificar seqüències de

fins a 291 pb. No obstant, s'ha observat que les seqüències curtes s'amplifiquen més fàcilment que seqüències llargues alhora que presenten una major adaptació a diferents condicions de reacció. Aquest fet és degut a que les seqüències curtes es desnaturalitzen més fàcilment durant la fase de 90-95°C de la PCR, i per tant permeten que els *primers* hibridin millor (Bustin, 2000). A més, com que l'extensió de la Taq polimerasa és de 30 a 70 bases per segon, per una seqüència curta serà suficient polimeritzacions inferiors als 15 segons que alhora reduiran la possibilitat de contaminacions per amplificació d'ADN genòmic (Bustin, 2000).

En cada experiment de QRT-PCR a temps real s'introdueixen dilucions seriades d'una mostra anomenada calibrador, de la qual se'n coneix la concentració. Així, durant la reacció de PCR es compara el punt de encreuament de la mostra problema amb els corresponents de la recta de referència, obtenint així per extrapolació la concentració inicial a la mostra (veure 1.3.2.1a). La recta de referència es va construir amb quatre dilucions del gen de la beta-globulina entre 0,015 i 15 ng/µl. Una estratègia diferent és l'anomenada quantificació absoluta, on la recta de referència és específica pel gen que es vol quantificar. Aquest sistema presenta una sensibilitat de detecció de 50-500 còpies de mARN (Bustin, 2000), i s'aplica en estudis diagnòstics d'alteracions genètiques conegudes.

4.2.2.2 Anàlisi d'expressió dels gens apoptòtics *MCLI*, *MYC*, *BAX* i *DAPK1* (V)

En l'Estudi V es comparen els resultats obtinguts mitjançant les tècniques de cADN array i QRT-PCR a temps real per l'expressió de 4 gens relacionats amb l'apoptosi (*MCLI*, *MYC*, *BAX* i *DAPK1*). Els valors de QRT-PCR es correlacionaven amb els obtinguts mitjançant cADN array (Fig. 8, Estudi V). Aquest fet s'observa també en diversos treballs publicats, on amb una freqüència d'entre el 70 i el 100 % es confirmen els nivells d'expressió (Rajeevan et al., 2001; Virtaneva et al., 2001; Niini et al., 2002). Rajeevan et al. demostren com el percentatge de confirmació de nivells

d'expressió per QRT-PCR a temps real augmenta al augmentar el valor de significació que s'estableix en l'anàlisi de cADN array. Així, s'obté una correlació del 71 % per una diferència d'expressió de dos ordres, mentre que al utilitzar una diferència de quatre ordres, la freqüència augmenta fins a un 88 % (Rajeevan et al., 2001). S'ha suggerit que les discordances observades entre ambdós mètodes són majoritàriament a causa de la major sensibilitat de detecció de la QRT-PCR a temps real en relació al cADN array. Per exemple, es poden donar casos on en una mostra s'identifiqui un nivell d'expressió normal per un gen determinat, mentre que per QRT-PCR aquest mateix gen es detecti sobreexpressat. Tanmateix, és freqüent observar nivells majors de desregulació mitjançant QRT-PCR respecte als determinats per cADN array (Rajeevan et al., 2001; Niini et al., 2002). Aquest últim fet es demostra també en l'Estudi VI, on els gens *MCL1*, *MYC*, *BAX* i *DAPK1* presentaven nivells d'expressió no superiors a 1,32 en escala \log_2 mitjançant cADN array, mentre que per QRT-PCR a temps real superaven nivells d'expressió de 3 en escala \log_2 .

4.2.2.3 Anàlisi d'expressió dels gens relacionats amb la leucèmia mieloide aguda (*HOXA9*, *DEK*, *CBL* i *CSF1R*) (VI)

En l'Estudi VI es va quantificar en una sèrie de 41 pacients l'expressió de gens suggestius a tenir un paper important en la LMA, escollits en funció d'estudis anteriors d'ADN array (Golub et al., 1999; Larramendy et al., 2002). Concretament es va realitzar l'estudi d'oncogens i proteïnes quinases associats a cèl.lules hematopoètiques (*CBL* i *CSF1R*), de gens per proteïnes de desordre sanguini (*DEK*) i gens per factors de transcripció (*HOXA9*) (Taula 1).

HOXA9 és un factor de transcripció associat a la diferenciació mieloide. En la $t(7;11)(p15;p15)$ es produeix la fusió entre els gens *HOXA9* i *NUP98*, la qual inactiva la funció de *HOXA9*. La $t(7;11)(p15;p15)$ s'identifica en un subgrup reduït de pacients de LMA i és indicativa d'un pronòstic desfavorable (Borrow et al., 1996; Nakamura et al., 1996).

DEK és una proteïna nuclear que s'expressa en diferents teixits i presenta propietats d'unió tant a ARN com a ADN (McGarvey et al., 2000; Kappes et al., 2001). Aquest gen s'ha relacionat amb el subgrup de pacients de LMA amb pronòstic desfavorable que presenten la translocació t(6;9)(p23;q34) on es dona la fusió entre els gens *DEK* i *CAN(NUP214)* (Soekarman et al., 1992; von Lindern et al., 1992).

Pel que fa a CBL, aquesta és una proteïna de senyalització intracel·lular que s'expressa en les cèl·lules hematopoètiques (Langdon et al., 1989). CBL és alhora un inhibidor de la senyal que indueix CSF-1 a les cèl·lules ja que s'uneix al receptor CSF1R i n'estimula la seva degradació per ubiquitinització. La seva acció genera doncs un increment de la vacuolització endocítica de CSF1R i una reducció de la proporció de receptor activat a membrana cel·lular (Lee et al., 1999).

a) Quantificació dels nivells d'expressió

La detecció de sobreexpressió de *HOXA9* en un 80 % dels casos assenyalava, tal i com han demostrat també altres estudis previs, un augment característic de l'expressió d'aquest gen en mostres de MO de pacients de LMA (Golub et al., 1999; Kawagoe et al., 1999; Lawrence et al., 1999; Drabkin et al., 2002). Donat que aquest fet no s'ha observat en LLA (Ninni et al., 2002), la sobreexpressió de *HOXA9* es podria considerar un factor indicador de LMA. Així mateix, la desregulació de *HOXA9* s'ha de considerar independent a la presència de t(7;11)(p15;p15), ja que cap del 41 pacients inclosos presentaven aquesta translocació al cariotip. Aquest seria també el cas de *DEK*, ja que la majoria de casos analitzats presentaven sobreexpressió del gen (97,6 %) sense identificar-se la t(6;9)(p23;q34).

D'altra banda, la inactivació de CBL o l'activació de CSF1R s'ha relacionat amb la patologia de la LMA, ja que incrementen la proporció de receptor CSF1R actiu a la membrana del mieloblast (Lee et al., 1999). Sotaexpressió de *CBL* o sobreexpressió de *CSF1R* s'ha observat en el 34 %

dels casos. Aquest grup de pacients presentarien un increment del senyal proliferatiu induït per CSF1R (Roth i Stanley, 1992).

b) Anàlisi d'associació entre expressió gènica i paràmetres d'interès

La importància de la identificació de desregulació de l'expressió gènica es basa en el fet que certes alteracions genètiques es troben associades a determinats trets morfològics. A més, la detecció d'anomalies genètiques en pacients de LMA és també un factor indicador del pronòstic de la malaltia (Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982, 1984). L'associació clínica i morfològica de les diferents alteracions genètiques es dur a terme mitjançant l'estudi estadístic de sèries llargues de pacients. Els anàlisis estadístics aplicats en la sèrie de 41 pacients adults de LMA va permetre identificar certes associacions entre expressió gènica i paràmetres d'interès.

▪ *Immunofenotip*

Cal destacar la major sobreexpressió de *HOXA9* en mostres CD34- respecte a les que expressen el marcador. Sauvageau et al. al estudiar mostres de MO normals va observar que els gens de classe homeobox A s'expressaven en cèl.lules CD34+ i que se sotaexpressaven en cèl.lules CD34- (Sauvageau et al., 1994). Aquestes observacions es van confirmar anys més tard, però en canvi no es va poder comprovar una diferència d'expressió en mostres de pacients de LMA al comparar cèl.lules CD34+ i CD34- (Kawagoe et al., 1999). Davant aquests estudis, els resultats mostren per primera vegada una diferència d'expressió de *HOXA9* entre mostres de pacients de LMA CD34- i CD34+ ($p=0,005$). D'altra banda, mentre es té menys informació sobre l'expressió de *DEK* en relació al marcador CD34, els resultats mostren una associació d'expressió semblant a *HOXA9* ($p=0,01$). Així doncs, la major expressió de *HOXA9* i *DEK* en mostres CD34- assenyala un augment de l'expressió dels gens en relació al grau de diferenciació de les cèl.lules leucèmiques.

- *Cariotip*

En la sèrie estudiada s'ha identificat una menor expressió de *HOXA9* en pacients amb t(8;21)(q22;q22) al cariotip (p=0,004). En aquest sentit destacar que nivells inferiors de gens homeobox s'han relacionat recentment amb trets citogenètics de pronòstic favorable (Drabkin et al., 2002). Aquesta associació reafirmaria el fet que proteïnes oncogèniques produïdes per un reordenament cromosòmic, com la proteïna de fusió AML1(RUNX1)/ETO en la t(8;21)(q22;q22), modulen l'expressió de gens homeobox, alterant la seva funció normal en la transcripció, i per tant, afectant a la diferenciació mieloide en diferents llinatges (Look, 1997).

- *Edat i subtipus FAB*

Es va identificar associació entre nivells inferiors d'expressió de *CBL* i pacients majors de 60 anys (p=0,034). Finalment destacar la sobreexpressió de *CBL* (p=0,012) i *CSF1R* (p=0,021) en les LMA de tipus M5, ja que els nivells d'aquests gens es van detectar normals en M4, i significativament inferiors en M2 (p=0,034).

- *Pronòstic*

D'altra banda, la sobreexpressió de *HOXA9* s'ha descrit en LMA com un factor indicador de pronòstic desfavorable (Golub et al., 1999). No obstant, en la sèrie estudiada no s'ha identificat una associació prou significativa (p>0,05) entre sobreexpressió del gen i taxes de remissió completa o temps lliure de malaltia (resultats no mostrats). Així doncs, s'espera confirmar el valor pronòstic de *HOXA9* al realitzar l'estudi d'associació passat un temps més llarg de seguiment dels pacients.

El fet que la sotaexpressió de *CBL* o la sobreexpressió de *CSF1R* es relacioni amb un increment de la proliferació de les cèl.lules leucèmiques, ens va portar a realitzar estudis d'associació clínica. Així, es va comparar la supervivència entre pacients que presentessin tant sotaexpressió de *CBL* com sobreexpressió de *CSF1R*, pacients amb sotaexpressió de *CBL* o sobreexpressió de *CSF1R* i pacients que no presentessin ni sotaexpressió de *CBL* ni sobreexpressió de *CSF1R*. Malgrat que s'observava una tendència a

menor supervivència dels primers dos grups respecte el tercer, aquesta no va ser significativa ($p>0,05$) (resultats no mostrats).

5 Conclusions

- La trisomia parcial del cromosoma 11, produïda per una translocació desequilibrada de la regió 11q22~23-qter, s'ha identificat com una nova alteració cromosòmica recurrent associada a la duplicació parcial en tàndem del gen *MLL*, la qual induiria el procés de transformació neoplàsic i és de pronòstic desfavorable.
- En el subgrup de pacients de LMA amb *inv(16)(p13q22)* s'han identificat mitjançant FISH dues translocacions emmascarades associades a la *inv(16)*, no descrites prèviament:
 $t(10;16)(p13;q22)inv(16)(p13q22)$ i $t(1;16)(p36;q22)inv(16)(p13q22)$.
- En les sèrie de 40 pacients adults amb cariotip normal estudiada no s'ha observat per FISH la presència de la $t(5;11)(q35;p15.5)$ a diferència de les sèries de LMA pediàtriques.
- Els resultats de CGH i M-FISH suggereixen que el subgrup de LMA de ≤ 60 anys i cariotip normal no es caracteritza per la presència significativa d'anomalies genètiques.
- En el subgrup de pacients de LMA amb cariotip anòmal, l'anàlisi de CGH ha proporcionat informació complementària a la citogenètica convencional:
 - Identificant alteracions genètiques més complexes

- Caracteritzant l'origen de cromosomes marcadors, derivatius, *dm* i materials cromosòmics afegits
 - Demostrant que l'alteració genètica desequilibrada més freqüent és la pèrdua parcial de regions cromosòmiques (54 %), les quals es localitzen majoritàriament als cromosomes 5q, 7q, 7, 16q i 17p, essent també recurrents els guanys dels cromosomes 8 i 22.
- L'anàlisi del perfil d'expressió per cADN array ha identificat 27/205 gens apoptòtics desregulats. Es destaquen *IGFBP3*, *IGFBP5*, *CLU*, *GADD45A* i gens codificants per enzims de detoxificació per glutatió, com nous gens implicats en l'alteració de les vies de senyalització de l'apoptosi en LMA.
- L'estudi de quantificació de l'expressió, mitjançant QRT-PCR a temps real, dels gens implicats en la LMA -*HOXA9*, *DEK*, *CSF1R* i *CBL*- ha demostrat les següents associacions significatives:
- Sotaexpressió de *HOXA9* en LMA amb t(8;21)(q22;q22) (p=0,004)
 - Sobreexpressió de *DEK* i *HOXA9* en LMA sense expressió de l'antigen CD34 (p=0,001; p=0,005)
 - Sotaexpressió de *CSF1R* i *HOXA9* en LMA-M2 (p=0,034, p=0,045)
 - Sobreexpressió de *CBL* i *CSF1R* en LMA-M5 (p=0,012, p=0,021)
 - Sotaexpressió de *CBL* en pacients amb LMA de >60 anys (p=0,034).

6 Referències

Adams MD, Kerlavage AR, Fields C, Venter JC. 3,400 new expressed sequence tags identify diversity of transcripts in human brain. *Nat Genet* 1993;4(3):256-67.

Adler HT, Chinery R, Wu DY, Kussick SJ, Payne JM, Fornace AJ Jr, Tkachuk DC. Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins. *Mol Cell Biol* 1999;19(10):7050-60.

Albertson DG, Ylstra B, Se Graves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW, Pinkel D. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet* 2000;25(2):144-6.

Alcalay M, Orleth A, Sebastiani C, Meani N, Chiaradonna F, Casciari C, Scirpi MT, Gelmetti V, Riganelli D, Minucci S, Fagioli M, Pelicci PG. Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Oncogene* 2001;20(40):5680-94.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503-11.

Alizadeh AA, Ross DT, Perou CM, van de Rijn M. Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns. *J Pathol* 2001;195(1):41-52.

Alvarez S, MacGrogan D, Calasanz MJ, Nimer SD, Jhanwar SC. Frequent gain of chromosome 19 in megakaryoblastic leukemias detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32(3):285-93.

Alvarez Y, Coll MD, Bastida P, Ortega JJ, Caballin MR. AML1 amplification in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;140(1):58-61.

Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5350-4.

Allan JM, Wild CP, Rollinson S, Willett EV, Moorman AV, Dovey GJ, Roddam PL, Roman E, Cartwright RA, Morgan GJ. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11592-7.

Andreeff M, Jiang S, Zhang X, Konopleva M, Estrov Z, Snell VE, Xie Z, Okcu MF, Sanchez-Williams G, Dong J, Estey EH, Champlin RC, Kornblau SM, Reed JC, Zhao S. Expression of Bcl-2-related genes in normal and AML progenitors: changes induced by chemotherapy and retinoic acid. *Leukemia* 1999;13(11):1881-92.

Armengol G, Capella G, Farre L, Peinado MA, Miro R, Caballin MR. Genetic evolution in the metastatic progression of human pancreatic cancer studied by CGH. *Lab Invest* 2001;81(12):1703-7.

Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, Sallan SE, Lander ES, Golub TR, Korsmeyer SJ. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002;30(1):41-7.

Ashkenazi A and Dixit VM. Death receptors: signalling and modulation. *Science* 1998;281:1305-8.

Aventin A, La Starza R, Nomdedeu J, Brunet S, Sierra J, Mecucci C. Typical CBFbeta/MYH11 fusion due to insertion of the 3'-MYH11 gene into 16q22 in acute monocytic leukemia with normal chromosomes 16 and trisomies 8 and 22. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;123(2):137-9.

Avramopoulos D, Cox T, Blaschak JE, Chakravarti A, Antonarakis SE. Linkage mapping of the AML1 gene on human chromosome 21 using a DNA polymorphism in the 3' untranslated region. *Genomics* 1992;14(2):506-7.

Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A, Reichman J, Schuffenhauer S, Speicher MR. An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH. *Am J Hum Genet* 2000;66(5):1684-8.

Baltimore D. Our genome unveiled. *Nature* 2001;409:814-6.

Banker DE, Radich J, Becker A, Kerkof K, Norwood T, Willman C, Appelbaum FR. The t(8;21) translocation is not consistently associated with high Bcl-2 expression in de novo acute myeloid leukemias of adults. *Clin Cancer Res* 1998;4(12):3051-62.

Barlund M, Tirkkonen M, Forozan F, Tanner MM, Kallioniemi O, Kallioniemi A. Increased copy number at 17q22-q24 by CGH in breast cancer is due to high-level amplification of two separate regions. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20(4):372-6.

Baserga R. The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Oncogene* 2000;19:5574-81.

Battaglia M, Pedrazzoli P, Palermo B, Lanza A, Bertolini F, Gibelli N, Da Prada GA, Zambelli A, Perotti C, Robustelli della Cuna G. Epithelial tumour cell detection and the unsolved problems of nested RT-PCR: a new sensitive one step method without false positive results. *Bone Marrow Transplant* 1998;22(7):693-8.

Baxter RC. Signalling pathways involved in antiproliferative effects of IGFBP-3: a review. *Mol Pathol* 2001;54:145-8.

Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998;72:141-96.

Beghini A, Magnani I, Ripamonti CB, Larizza L. Amplification of a novel c-Kit activating mutation Asn(822)-Lys in the Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-Kit mutant model for acute myeloid leukemia. *Hematol J* 2002;3(3):157-63.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33(4):451-8.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103(4):620-5.

Bentz M, Dohner H, Huck K, Schutz B, Ganser A, Joos S, du Manoir S, Lichter P. Comparative genomic hybridization in the investigation of myeloid leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12(3):193-200.

Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21(2):172-5.

Berger R, Derre J, Le Coniat M, Hebert J, Romana PS, Jonveaux P. Inversion-associated translocations in acute myelomonocytic leukemia with eosinophilia. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12(1):58-62.

Betts DR, Rohatiner AZ, Evans ML, Rassam SM, Lister TA, Gibbons B. Abnormalities of chromosome 16q in myeloid malignancy: 14 new cases and a review of the literature. *Leukemia* 1992;6(12):1250-6.

Bezrookove V, Hansson K, van der Burg M, van der Smagt JJ, Hillhorst-Hofstee Y, Wiegant J, Beverstock GC, Raap AK, Tanke H, Breuning MH, Rosenberg C. Individuals with abnormal phenotype and normal G-banding karyotype: improvement and limitations in the diagnosis by the use of 24-colour FISH. *Hum Genet* 2000;106(4):392-8.

Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, Patil SR, Davey FR, Berg DT, Schiffer CA, Arthur DC, Mayer RJ. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* 1998;58(18):4173-9.

Borrow J, Shearman AM, Stanton VP Jr, Becher R, Collins T, Williams AJ, Dube I, Katz F, Kwong YL, Morris C, Ohyashiki K, Toyama K, Rowley J, Housman DE. The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat Genet* 1996;12:159-167.

Boyd JM, Malstrom S, Subramanian T, Venkatesh LK, Schaeper U, Elangovan B, D'Sa-Eipper C, Chinnadurai G. Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell* 1994;79:341-51.

Brinkmann U, Brinkmann E, Gallo M, Pastan I. Cloning and characterization of a cellular apoptosis susceptibility gene, the human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10427-31.

Britos-Bray M, Ramirez M, Cao W, Wang X, Liu PP, Civin CI, Friedman AD. CBFbeta-SMMHC, expressed in M4eo acute myeloid leukemia, reduces p53 induction and slows apoptosis in hematopoietic cells exposed to DNA-damaging agents. *Blood* 1998;92:4344-52.

Brooks EM, Sheflin LG, Spaulding SW. Secondary structure in the 3' UTR of EGF and the choice of reverse transcriptases affect the detection of message diversity by RT-PCR. *Biotechniques* 1995;19(5):806-12, 814-5.

Brown J, Saracoglu K, Uhrig S, Speicher MR, Eils R, Kearney L. Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). *Nat Med* 2001;7(4):497-501.

Brown J, Jawad M, Twigg SR, Saracoglu K, Sauerbrey A, Thomas AE, Eils R, Harbott J, Kearney L. A cryptic t(5;11)(q35;p15.5) in 2 children with acute myeloid leukemia with apparently normal karyotypes, identified by a multiplex fluorescence in situ hybridization telomere assay. *Blood* 2002;99(7):2526-31.

Bumol TF, Watanabe AM. Genetic information, genomic technologies, and the future of drug discovery. *JAMA* 2001;285(5):551-5.

Bustamante J, Bersier G, Badin RA, Cymeryng C, Parodi A, Boveris A. Sequential NO production by mitochondria and endoplasmic reticulum during induced apoptosis. *Nitric Oxide* 2002;6:333-41.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25(2):169-93.

Bustin, SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002;29(1):23-39.

Caligiuri MA, Schichman SA, Strout MP, Mrozek K, Baer MR, Frankel SR, Barcos M, Herzig GP, Croce CM, Bloomfield CD. Molecular rearrangement of the ALL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations. *Cancer Res* 1994;54(2):370-3.

Caligiuri MA, Strout MP, Lawrence D, Arthur DC, Baer MR, Yu F, Knuutila S, Mrozek K, Oberkircher AR, Marcucci G, de la Chapelle A, Elonen E, Block AW, Rao PN, Herzig GP, Powell BL, Ruutu T, Schiffer CA, Bloomfield CD. Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Cancer Res* 1998;58(1):55-9.

Carnicer MJ, Nomdedeu JF, Lasa A, Bellido M, Aventin A, Baiget M, Sierra J. AML-1 mutations outside the RUNT domain: description of two cases in myeloid malignancies. *Leukemia* 2002;16(11):2329-32.

Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 1968;49(1):219-22.

Castilla LH, Garrett L, Adya N, Orlic D, Dutra A, Anderson S, Owens J, Eckhaus M, Bodine D, Liu PP. The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia. *Nat Genet* 1999;23(2):144-6.

Castuma MV, Rao PH, Acevedo SH, Larripa IB. Comparative genomic hybridization study of de novo myeloid neoplasia. *Acta Haematol* 2000;104(1):25-30.

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001;410:37-40.

Chen CR, Kang Y, Siegel PM, Massague J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF-beta receptor to c-myc repression. *Cell* 2002;110:19-32.

Chim CS, Tam CY, Liang R, Kwong YL. Methylation of p15 and p16 genes in adult acute leukemia: lack of prognostic significance. *Cancer* 2001;91(12):2222-9.

Chin PL, Momand J, Pfeifer GP. In vivo evidence for binding of p53 to consensus binding sites in the p21 and GADD45 genes in response to ionizing radiation. *Oncogene* 1997;15:87-99.

Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol* 2001;19(5):1405-13.

Chudoba I, Plesch A, Lorch T, Lemke J, Claussen U, Senger G. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1999;84(3-4):156-60.

Cimino G, Rapanotti MC, Biondi A, Elia L, Lo Coco F, Price C, Rossi V, Rivolta A, Canaani E, Croce CM, Mandelli F, Greaves MF. Infant acute leukemias show the same biased distribution of ALL1 gene breaks as topoisomerase II related secondary acute leukemias. *Cancer Res* 1997;57:2879-83.

Clark J, Edwards S, Feber A, Flohr P, John M, Giddings I, Crossland S, Stratton MR, Wooster R, Campbell C, Cooper CS. Genome-wide screening for complete genetic loss in prostate cancer by comparative hybridization onto cDNA microarrays. *Oncogene* 2003;22(8):1247-52.

Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 1996;24(18):3546-51.

Cooperman BS, Klinger HP. Double minute chromosomes in a case of acute myelogenous leukemia resistant to chemotherapy. *Cytogenet Cell Genet* 1981;30(1):25-30.

Cox JM. Applications of nylon membrane arrays to gene expression analysis. *J Immunol Methods* 2001;250(1-2):3-13.

Crans HN, Sakamoto KM. Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia. *Leukemia* 2001;15(3):313-31.

Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet* 1988;80(3):235-46.

Crossen PE, Morrison MJ, Rodley P, Cochrane J, Morris CM. Identification of amplified genes in a patient with acute myeloid leukemia and double minute chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;113(2):126-33.

Cuneo A, Bigoni R, Cavazzini F, Bardi A, Roberti MG, Agostini P, Tammiso E, Ciccone N, Mancini M, Nanni M, De Cuia R, Divona M, La Starza R, Crescenzi B, Testoni N, Rege Cambrin G, Mecucci C, Lo Coco F, Saglio G, Castoldi G. Incidence and significance of cryptic chromosome aberrations detected by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leukemia* 2002;16(9):1745-51.

Dainiak N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. *Exp Hematol* 2002;30(6):513-28.

Dalley CD, Neat MJ, Foot NJ, Burridge M, Byrne L, Amess JA, Rohatiner AZ, Lister A, Young BD, Lillington DM. Comparative genomic hybridization and multiplex-fluorescence in situ hybridization: an appraisal in elderly patients with acute myelogenous leukemia. *Hematol J* 2002;3(6):290-8.

den Dunnen JT i van Ommen GJB. Pulsed-field gel electrophoresis. In *Protocols in Human Molecular Genetics Methods in Molecular Biology* 9, Mathew, C. G., eds. Humana Press, Clifton 1991;169-182.

Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, Maurillo L, Buccisano F, Tamburini A, Cox MC, Franchi A, Bruno A, Mazzone C, Panetta P, Suppo G, Masi M, Amadori S. The amount of spontaneous apoptosis detected by bax/bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2003;101(6):2125-31.

DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 1996;14(4):457-60.

DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 1997;278(5338):680-6.

Deyholos MK, Galbraith DW. High-density microarrays for gene expression analysis. *Cytometry* 2001;43(4):229-38.

Diehn M, Eisen MB, Botstein D, Brown PO. Large-scale identification of secreted and membrane-associated gene products using DNA microarrays. *Nat Genet* 2000;25(1):58-62.

Dierlamm J, Wlodarska I, Michaux L, La Starza R, Zeller W, Mecucci C, Van den Berghe H. Successful use of the same slide for consecutive fluorescence in situ hybridization experiments. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;16(4):261-4.

Dierlamm J, Stul M, Vranckx H, Michaux L, Weghuis DE, Speleman F, Selleslag D, Kramer MH, Noens LA, Cassiman JJ, Van den Berghe H, Hagemeijer A. FISH identifies *inv(16)(p13q22)* masked by translocations in three cases of acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;22(2):87-94.

Dopazo J, Zanders E, Dragoni I, Amphlett G, Falciani F. Methods and approaches in the analysis of gene expression data. *J Immunol Methods* 2001;250(1-2):93-112.

Drabkin HA, Parsy C, Ferguson K, Guilhot F, Lacotte L, Roy L, Zeng C, Baron A, Hunger SP, Varella-Garcia M, Gemmill R, Brizard F, Brizard A, Roche J. Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2002;16(2):186-95.

du Manoir S, Schrock E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T. Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995;19(1):27-41.

Eckert KA, Kunkel TA. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl* 1991;1(1):17-24.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(25):14863-8.

El-Rifai W, Elonen E, Larramendy M, Ruutu T, Knuutila S. Chromosomal breakpoints and changes in DNA copy number in refractory acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997;11(7):958-63.

Erickson P, Gao J, Chang KS, Look T, Whisenant E, Raimondi S, Lasher R, Trujillo J, Rowley J, Drabkin H. Identification of breakpoints in *t(8;21)* acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to *Drosophila* segmentation gene, runt. *Blood* 1992;80(7):1825-31.

Eshet R, Silbergeld A, Zaizov R, Stark B, Freud E, Laron Z, Shamai Y. Decreased insulin-like growth factor-I receptor sites on circulating mononuclear cells from children with acute leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2000;17(3):253-60.

Felix CA. Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* 1998;1400(1-3):233-55.

Fenaux P, Jonveaux P, Quiquandon I, Lai JL, Pignon JM, Loucheux-Lefebvre MH, Bauters F, Berger R, Kerckaert JP. P53 gene mutations in acute myeloid leukemia with 17p monosomy. *Blood* 1991;78(7):1652-7.

Fenaux P, Morel P, Lai JL. Cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* 1996;33(2):127-38.

Florijn RJ, Bonden LA, Vrolijk H, Wiegant J, Vaandrager JW, Baas F, den Dunnen JT, Tanke HJ, van Ommen GJ, Raap AK. High-resolution DNA Fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes. *Hum Mol Genet* 1995;4(5):831-6.

Forbes LV, Gale RE, Pizzey A, Pouwels K, Nathwani A, Linch DC. An activating mutation in the transmembrane domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor in patients with acute myeloid leukemia. *Oncogene* 2002;21(39):5981-9.

Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982. A prospective study on acute non-lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1984;11:249-360.

Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 1997;13(10):405-9.

Fraser JK, Guerra JJ, Nguyen CY, Indes JE, Gasson JC, Nimer SD. Characterization of a cell-type-restricted negative regulatory activity of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. *Mol Cell Biol* 1994;14(3):2213-21.

Freeman WM, Vrana SL, Vrana KE. Use of elevated reverse transcription reaction temperatures in RT-PCR. *Biotechniques* 1996;20(5):782-3.

Fuller GN, Rhee CH, Hess KR, Caskey LS, Wang R, Bruner JM, Yung WK, Zhang W. Reactivation of insulin-like growth factor binding protein 2 expression in glioblastoma multiforme: a revelation by parallel gene expression profiling. *Cancer Res* 1999;59(17):4228-32.

Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969;63:378-83.

Gari M, Goodeve A, Wilson G, Winship P, Langabeer S, Linch D, Vandenberghe E, Peake I, Reilly J. c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1999;105(4):894-900.

Gerard GF, Fox DK, Nathan M, D'Alessio JM. Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Mol Biotechnol* 1997;8(1):61-77.

Giege P, Konthur Z, Walter G, Brennicke A. An ordered *Arabidopsis thaliana* mitochondrial cDNA library on high-density filters allows rapid systematic analysis of plant gene expression: a pilot study. *Plant J* 1998;15(5):721-6.

Gloffke W. Quantitative PCR update. Reviewing the latest trends and applications in quantitative, real time PCR. *The Scientist* 2003;17(8):41-3.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286(5439):531-7.

Gozzetti A, Le Beau MM. Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000;37(4):320-33.

Gray JW, Collins C, Henderson IC, Isola J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Nakamura H, Pinkel D, Stokke T, Tanner M, et al. Molecular cytogenetics of human breast cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994;59:645-52.

Grignani F, Valtieri M, Gabbianelli M, Gelmetti V, Botta R, Luchetti L, Masella B, Morsilli O, Pelosi E, Samoggia P, Pelicci PG, Peschle C. PML/RAR alpha fusion protein expression in normal human hematopoietic progenitors dictates myeloid commitment and the promyelocytic phenotype. *Blood* 2000;96(4):1531-7.

Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998;92(7):2322-33.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899-911.

Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, Croce CM, Canaani E. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias involves fusion between ALL-1 gene encoding a protein with homologies to Drosophila trithorax gene and a gene AF4 on chromosome 4. *Cell* 1992;71:701-8.

Han DC, Shen TL, Guan JL. The Grb7 family proteins: structure, interactions with other signaling molecules and potential cellular functions. *Oncogene* 2001;20:6315-21.

Harewood L, Robinson H, Harris R, Al-Obaidi MJ, Jalali GR, Martineau M, Moorman AV, Sumption N, Richards S, Mitchell C, Harrison CJ. Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. *Leukemia* 2003;17(3):547-53.

Harris CC and Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;329:1318.

Heiskanen M, Peltonen L, Palotif A. Visual mapping by high resolution FISH. *Trends Genet* 1996;12(10):379-82.

Hemminki A, Tomlinson I, Markie D, Jarvinen H, Sistonen P, Bjorkqvist AM, Knuutila S, Salovaara R, Bodmer W, Shibata D, de la Chapelle A, Aaltonen LA. Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis. *Nat Genet* 1997;15(1):87-90.

Heselmeyer K, Schrock E, du Manoir S, Blegen H, Shah K, Steinbeck R, Auer G, Ried T. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(1):479-84.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992;10(4):413-7.

Hilgenfeld E, Padilla-Nash H, McNeil N, Knutsen T, Montagna C, Tchinda J, Horst J, Ludwig WD, Serve H, Buchner T, Berdel WE, Schrock E, Ried T. Spectral karyotyping and fluorescence in situ hybridization detect novel chromosomal aberrations, a recurring involvement of chromosome 21 and amplification of the MYC oncogene in acute myeloid leukaemia M2. *Br J Haematol* 2001;113(2):305-17.

Hilsenbeck SG, Friedrichs WE, Schiff R, O'Connell P, Hansen RK, Osborne CK, Fuqua SA. Statistical analysis of array expression data as applied to the problem of tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(5):453-9.

Hing S, Lu YJ, Summersgill B, King-Underwood L, Nicholson J, Grundy P, Grundy R, Gessler M, Shipley J, Pritchard-Jones K. Gain of 1q is associated with adverse outcome in favorable histology Wilms' tumors. *Am J Pathol* 2001;158(2):393-8.

Holinski-Feder E, Reyniers E, Uhrig S, Golla A, Wauters J, Kroisel P, Bossuyt P, Rost I, Jedele K, Zierler H, Schwab S, Wildenauer D, Speicher MR, Willems PJ, Meitinger T, Kooy RF. Familial mental retardation syndrome ATR-16 due to an inherited cryptic subtelomeric translocation, t(3;16)(q29;p13.3). *Am J Hum Genet* 2000;66(1):16-25.

Horiike S, Misawa S, Kaneko H, Sasai Y, Kobayashi M, Fujii H, Tanaka S, Yagita M, Abe T, Kashima K, Taniwaki M. Distinct genetic involvement of the TP53 gene in therapy-related leukemia and myelodysplasia with chromosomal losses of Nos 5 and/or 7 and its possible relationship to replication error phenotype. *Leukemia* 1999;13(8):1235-42.

Horsley V and Pavlath GK. NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J Cell Biol* 2002;156:771-4.

- Horwitz M. The genetics of familial leukemia. *Leukemia* 1997;11(8):1347-59.
- Hu G, Zhang W, Deisseroth AB. P53 gene mutations in acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1992;81:489-94.
- Hughes TR, Marton MJ, Jones AR, Roberts CJ, Stoughton R, Armour CD, Bennett HA, Coffey E, Dai H, He YD, Kidd MJ, King AM, Meyer MR, Slade D, Lum PY, Stepaniants SB, Shoemaker DD, Gachotte D, Chakraburty K, Simon J, Bard M, Friend SH. Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* 2000;102(1):109-26.
- Huhta T, Vettenranta K, Heinonen K, Kanerva J, Larramendy ML, Mahlamaki E, Saarinen-Pihkala UM, Knuutila S. Comparative genomic hybridization and conventional cytogenetic analyses in childhood acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 1999;35(3-4):311-5.
- Issa JP, Zehnauer BA, Civin CI, Collector MI, Sharkis SJ, Davidson NE, Kaufmann SH, Baylin SB. The estrogen receptor CpG island is methylated in most hematopoietic neoplasms. *Cancer Res* 1996;56(5):973-7.
- Jaju RJ, Fidler C, Haas OA, Strickson AJ, Watkins F, Clark K, Cross NC, Cheng JF, Aplan PD, Kearney L, Boulwood J, Wainscoat JS. A novel gene, NSD1, is fused to NUP98 in the t(5;11)(q35;p15.5) in de novo childhood acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;98(4):1264-7.
- Johansen LM, Iwama A, Lodie TA, Sasaki K, Felsner DW, Golub TR, Tenen DG. c-Myc is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis. *Mol Cell Biol* 2001;21(11):3789-806.
- Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities--balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 1996;16(3):155-63.
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969;223:582-7.
- Jones LK, Saha V. Chromatin modification, leukaemia and implications for therapy. *Br J Haematol* 2002;118(3):714-27.
- Jones SE and Jomary C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:427-31. Trougakos I and Gonos E. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:1430-48.
- Joos S, Scherthan H, Speicher MR, Schlegel J, Cremer T, Lichter P. Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Hum Genet* 1993;90(6):584-9.
- Kakazu N, Taniwaki M, Horiike S, Nishida K, Tatekawa T, Nagai M, Takahashi T, Akaogi T, Inazawa J, Ohki M, Abe T. Combined spectral karyotyping and DAPI banding analysis of chromosome abnormalities in myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;26(4):336-45.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258(5083):818-21.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J, Tanner M, Stokke T, Chen L, Smith HS, Pinkel D, Gray JW, Waldman FM. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994a;91(6):2156-60.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994b;10(4):231-43.

Kappes F, Burger K, Baack M, Fackelmayer FO, Gruss C. Subcellular localization of the human proto-oncogene protein DEK. *J Biol Chem* 2001;276:26317-23.

Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 1999;13(5):687-98.

Kearney L. Molecular cytogenetics. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14(3):645-69.

Kerndrup GB, Kjeldsen E. Acute leukemia cytogenetics: an evaluation of combining G-band karyotyping with multi-color spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;124(1):7-11.

Kim MH, Stewart J, Devlin C, Kim YT, Boyd E, Connor M. The application of comparative genomic hybridization as an additional tool in the chromosome analysis of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;126(1):26-33.

King-Underwood L, Renshaw J, Pritchard-Jones K. Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. *Blood* 1996;87(6):2171-9.

Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose H, Bentz M, Dohner H, Lundsteen C. Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25(4):410-3.

Kitada S, Pedersen IM, Schimmer AD, Reed JC. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 2002;21(21):3459-74.

Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, Naoe T. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 1998;12(9):1333-7.

Klampfer L, Zhang J, Zelenetz AO, Uchida H, Nimer SD. The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(24):14059-64.

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68(4):820-3.

Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y. DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 1998;152(5):1107-23.

Knuutila S, Aalto Y, Autio K, Bjorkqvist AM, El-Rifai W, Hemmer S, Huhta T, Kettunen E, Kiuru-Kuhlefelt S, Larramendy ML, Lushnikova T, Monni O, Pere H, Tapper J, Tarkkanen M, Varis A, Wasenius VM, Wolf M, Zhu Y. DNA copy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol* 1999;155(3):683-94.

Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S, Karaskova J, Minkin S, Lipton J, Squire JA. Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood* 2001;97(11):3581-8.

Kornblau SM, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis regulating proteins as targets of therapy for haematological malignancies. *Expert Opin Investig Drugs* 1999a;8(12):2027-57.

Kornblau SM, Thall PF, Estrov Z, Walterscheid M, Patel S, Theriault A, Keating MJ, Kantarjian H, Estey E, Andreeff M. The prognostic impact of BCL2 protein expression in acute myelogenous leukemia varies with cytogenetics. *Clin Cancer Res* 1999b;5:1758-66.

Kroon E, Thorsteinsdottir U, Mayotte N, Nakamura T, Sauvageau G. NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *EMBO J* 2001;20(3):350-61.

Krug U, Ganser A, Koeffler HP. Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* 2002;21(21):3475-95.

Kuukasjarvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Visakorpi T, Isola J. Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;18(2):94-101.

Lai JL, Preudhomme C, Zandeki M, Flactif M, Vanrumbeke M, Lepelley P, Wattel E, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of P53 mutations. *Leukemia* 1995;9(3):370-81.

Lam DH, Aplan PD. NUP98 gene fusions in hematologic malignancies. *Leukemia* 2000;15(11):1689-95

Langabeer SE, Grimwade D, Walker H, Rogers JR, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. A study to determine whether trisomy 8, deleted 9q and trisomy 22 are markers of cryptic rearrangements of PML/RARalpha, AML1/ETO and CBFβ/MYH11 respectively in acute myeloid leukaemia. MRC Adult Leukaemia Working Party. Medical Research Council. *Br J Haematol* 1998;101(2):338-40.

Langabeer SE, Gale RE, Rollinson SJ, Morgan GJ, Linch DC. Mutations of the AML1 gene in acute myeloid leukemia of FAB types M0 and M7. Mutations of the AML1 gene in acute myeloid leukemia of FAB types M0 and M7. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34(1):24-32.

Langdon WY, Hyland CD, Grumont RJ, Morse HC 3rd. The c-cbl proto-oncogene is preferentially expressed in thymus and testis tissue and encodes a nuclear protein. *J Virol* 1989;63(12):5420-4.

Larramendy ML, El-Rifai W, Knuutila S. Comparison of fluorescein isothiocyanate- and Texas red-conjugated nucleotides for direct labeling in comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1998a;31(3):174-9.

Larramendy ML, Huhta T, Vettentranta K, El-Rifai W, Lundin J, Pakkala S, Saarinen-Pihkala UM, Knuutila S. Comparative genomic hybridization in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1998b;12(10):1638-44.

Larramendy ML, Virolainen M, Tukiainen E, Elomaa I, Knuutila S. Chromosome band 1q21 is recurrently gained in desmoid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1998c;23(2):183-6.

Larramendy ML, Niini T, Elonen E, Nagy B, Ollila J, Vihinen M, Knuutila S. Overexpression of translocation-associated fusion genes of FGFR1, MYC, NPM1, and DEK, but absence of the translocations in acute myeloid leukemia. A microarray analysis. *Haematologica* 2002;87(6):569-77.

Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, Brown PO, Davis RW. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(24):13057-62.

Law M, Jalal SM. M-FISH Technique: How to set up and analyze. *The Journal of the Association of Genetic Technologists* 2000;26(2):51-3.

Lawrence HJ, Rozenfeld S, Cruz C, Matsukuma K, Kwong A, Komuves L, Buchberg AM, Largman C. Frequent co-expression of the HOXA9 and MEIS1 homeobox genes in human myeloid leukemias. *Leukemia* 1999;13(12):1993-9.

Lee PS, Wang Y, Dominguez MG, Yeung YG, Murphy MA, Bowtell DD, Stanley ER. The Cbl protooncoprotein stimulates CSF-1 receptor multiubiquitination and endocytosis, and attenuates macrophage proliferation. *EMBO J* 1999;18(13):3616-28.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991;351:453.

Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 1988;80(3):224-34.

Lichter P, Joos S, Bentz M, Lampel S. Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000;37(4):348-57.

Lin EY, Orlofsky A, Berger MS, Prystowsky MB. Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol* 1993;151:1979-88.

Lindvall C, Nordenskjold M, Porwit A, Bjorkholm M, Blennow E. Molecular cytogenetic characterization of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes with multiple chromosome rearrangements. *Haematologica* 2001;86(11):1158-64.

Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 1999;21(1 Supl):20-4.

Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997;278(5340):1059-64.

Majka M, Baj-Krzyworzeka M, Kijowski J, Reza R, Ratajczak J, Ratajczak MZ. In vitro expansion of human megakaryocytes as a tool for studying megakaryocytic development and function. *Platelets* 2001;12(6):325-32.

Marie JP. Drug resistance in hematologic malignancies. *Curr Opin Oncol* 2001;13(6):463-9.

Marlton P, Keating M, Kantarjian H, Pierce S, O'Brien S, Freireich EJ, Estey E. Cytogenetic and clinical correlates in AML patients with abnormalities of chromosome 16. *Leukemia* 1995;9(6):965-71.

Marx J. Medicine. DNA arrays reveal cancer in its many forms. *Science* 2000;289(5485):1670-2.

McCulloch RK, Choong CS, Hurley DM. An evaluation of competitor type and size for use in the determination of mRNA by competitive PCR. *PCR Methods Appl* 1995;4(4):219-26.

McGarvey T, Rosonina E, McCracken S, Li Q, Arnaout R, Mientjes E, Nickerson JA, Awrey D, Greenblatt J, Grosveld G, Blencowe BJ. The acute myeloid leukemia-associated protein, DEK, forms a splicing-dependent interaction with exon-product complexes. *J Cell Biol* 2000;150:309-20.

Meuer S, Witwer C, Nakagawara K. Rapid cycle real-time PCR. Springer-Verlag, Berlin 2001.

Milella M, Kornblau SM, Estrov Z, Carter BZ, Lapillonne H, Harris D, Konopleva M, Zhao S, Estey E, Andreeff M. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia *J Clin Invest* 2001;108:851-9.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.

Miyagi J, Kakazu N, Masuda M, Miyagi T, Toyohama T, Nakazato T, Tomoyose T, Shinjyo T, Nagasaki A, Taira N, Ohki M, Abe T, Takasu N. Acute myeloid leukemia (FAB-M2) with a masked type of t(8;21) translocation revealed by spectral karyotyping. *Int J Hematol* 2002;76(4):338-43.

Miyazato A, Ueno S, Ohmine K, Ueda M, Yoshida K, Yamashita Y, Kaneko T, Mori M, Kirito K, Toshima M, Nakamura Y, Saito K, Kano Y, Furusawa S, Ozawa K, Mano H. Identification of

myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 2001;98(2):422-7.

Mizuki M, Schwaeble J, Steur C, Choudhary C, Agrawal S, Sargin B, Steffen B, Matsumura I, Kanakura Y, Boehmer FD, Mueller-Tidow C, Berdel WE, Serve H. Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific FIt3 mutations. *Blood* 2003;101(8):3164-73.

Mizutani S. Recent advances in the study of the hereditary and environmental basis of childhood leukemia. *Int J Hematol* 1998;68(2):131-43.

Mohamed AN, Macoska JA, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman F, Ratanatharathorn V, Wolman SR. Extrachromosomal gene amplification in acute myeloid leukemia; characterization by metaphase analysis, comparative genomic hybridization, and semi-quantitative PCR. *Genes Chromosomes Cancer* 1993;8(3):185-9.

Mohr B, Bornhauser M, Thiede C, Schakel U, Schaich M, Illmer T, Pascheberg U, Ehninger G. Comparison of spectral karyotyping and conventional cytogenetics in 39 patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2000;14(6):1031-8.

Monni O, Oinonen R, Elonen E, Franssila K, Teerenhovi L, Joensuu H, Knuutila S. Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21(4):298-307.

Moos PJ, Raetz EA, Carlson MA, Szabo A, Smith FE, Willman C, Wei Q, Hunger SP, Carroll WL. Identification of gene expression profiles that segregate patients with childhood leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8(10):3118-30.

Morgan GJ, Smith MT. Metabolic enzyme polymorphisms and susceptibility to acute leukemia in adults. *Am J Pharmacogenomics* 2002;2(2):79-92.

Mortreux F, Gabet AS, Wattel E. Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo. *Leukemia* 2003;17(1):26-38.

Mrozek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations in de novo acute myeloid leukemia in adults AND: clinical implications. *Rev Clin Exp Hematol* 1998;5:44-67.

Muller S, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Wienberg J. Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. *Cytometry* 1998;33(4):445-52.

Nacheva E, Grace C, Holloway TL, Green AR. Comparative genomic hybridization in acute myeloid leukemia. A comparison with G-banding and chromosome painting. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;82(1):9-16.

Nakamura T, Largaespada DA, Lee MP, Johnson LA, Ohyashiki K, Toyama K, Chen SJ, Willman CL, Chen I-M, Feinberg AP, Jenkins NA, Copeland NG, Shaughnessy JD. Fusion of nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nat Genet* 1996;12:154-8.

Nakashima T, Sekiguchi T, Kuraoka A, Fukushima K, Shibata Y, Komiyama S, Nishimoto T. Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Mol Cell Biol* 1993;13:6367-74.

Nantel A, Mohammad-Ali K, Sherk J, Posner BI, Thomas DY. Interaction of the Grb10 adapter protein with the Raf1 and MEK1 kinases. *J Biol Chem* 1998;273:10475-84.

Niini T, Kanerva J, Vettenranta K, Saarinen-Pihkala UM, Knuutila S. AML1 gene amplification: a novel finding in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2000;85(4):362-6.

Niini T, Vettenranta K, Hollmen J, Larramendy ML, Aalto Y, Wikman H, Nagy B, Seppanen JK, Ferrer Salvador A, Mannila H, Saarinen-Pihkala UM, Knuutila S. Expression of myeloid-specific genes in childhood acute lymphoblastic leukemia - a cDNA array study. *Leukemia* 2002;16(11):2213-21.

Nilson I, Lochner K, Siegler G, Greil J, Beck JD, Fey GH, Marschalek R. Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *Br J Haematol* 1996;93(4):966-72.

Nishiyama M, Arai Y, Tsunematsu Y, Kobayashi H, Asami K, Yabe M, Kato S, Oda M, Eguchi H, Ohki M, Kaneko Y. 11p15 translocations involving the NUP98 gene in childhood therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;26(3):215-20.

Nomdedeu JF, Lasa A, Ubeda J, Saglio G, Bellido M, Casas S, Carnicer MJ, Aventin A, Sureda A, Sierra J, Baiget M. Interstitial deletions at the long arm of chromosome 13 may be as common as monosomies in multiple myeloma. A genotypic study. *Haematologica* 2002; 87(8):828-35.

Nowell PC, Hugerford DA. A minute chromosome in chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1497.

Ogawa S, Kurokawa M, Tanaka T, Mitani K, Inazawa J, Hangaishi A, Tanaka K, Matsuo Y, Minowada J, Tsubota T, Yazaki Y, Hirai H. Structurally altered Evi-1 protein generated in the 3q21q26 syndrome. *Oncogene* 1996;13(1):183-91.

Okuda T, Cai Z, Yang S, Lenny N, Lyu CJ, van Deursen JM, Harada H, Downing JR. Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. *Blood* 1998;91(9):3134-43.

Osato M, Asou N, Abdalla E, Hoshino K, Yamasaki H, Okubo T, Suzushima H, Takatsuki K, Kanno T, Shigesada K, Ito Y. Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. *Blood* 1999;93(6):1817-24.

Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2001;27(3):263-70.

Padro T, Bieker R, Ruiz S, Steins M, Retzlaff S, Burger H, Buchner T, Kessler T, Herrera F, Kienast J, Muller-Tidow C, Serve H, Berdel WE, Mesters RM. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cellular receptor KDR (VEGFR-2) in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002;16(7):1302-10.

Pallisgaard N, Hokland P, Riishoj DC, Pedersen B, Jorgensen P. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood* 1998;92(2):574-88.

Pandolfi PP. Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Hum Mol Genet* 2001;10(7):769-75.

Perrillat F, Clavel J, Jaussent I, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, Philippe N, Schaison G, Sommelet D, Vilmer E, Bonaiti-Pellie C, Hemon D. Family cancer history and risk of childhood acute leukemia (France). *Cancer Causes Control* 2001;12(10):935-41.

Petridou E, Skalkidou A, Dessypris N, Moustaki M, Mantzoros C, Spanos E, Trichopoulos D. Insulin-like growth factor binding protein-3 predicts survival from acute childhood leukemia. *Oncology* 2001;60:252-7.

Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998;20(2):207-11.

Pinkel D. Fluorescence in situ hybridization. Introduction to fluorescence in situ hybridization, Principles and Clinical Applications. Andreeff M and Pinkel D Ed., Wiley-Liss, New York 1999.

Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995;19(1):10-26.

Pogoda JM, Preston-Martin S, Nichols PW, Ross RK. Smoking and risk of acute myeloid leukemia: results from a Los Angeles County case-control study. *Am J Epidemiol* 2002;155(6):546-53.

Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999;23(1):41-6.

Preudhomme C, Warot-Loze D, Roumier C, Grardel-Duflos N, Garand R, Lai JL, Dastugue N, Macintyre E, Denis C, Bauters F, Kerckaert JP, Cosson A, Fenaux P. High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. *Blood* 2000;96(8):2862-9.

Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* 2001;25(4):443-51.

Ramaswamy S, Golub TR. DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol* 2002;20(7):1932-41.

Rechavi G, Berkowicz M, Rosner E, Neuman Y, Ben-Bassat I, Ramot B. Chromosomal aberrations suggestive of mutagen-related leukemia after 21 years of "therapeutic" radon exposure. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;48(1):125-30.

Reddy KS, Wang S, Montgomery P, Grove W, Robertson LE. Fluorescence in situ hybridization identifies inversion 16 masked by t(10;16)(q24;q22), t(7;16)(q21;q22), and t(2;16)(q37;q22) in three cases of AML-M4Eo. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;116(2):148-52.

Ribera JM, Ortega J, Sierra J, Sanz MA, Rozman C. Leucemias agudas. *Hematología (Sección 14) Medicina Interna*. Farreras-Rozman eds. Ediciones Harcourt S.A., Madrid, 2000;1693-4.

Riboni R, Casati A, Nardo T, Zaccaro E, Ferretti L, Nuzzo F, Mondello C. Telomeric fusions in cultured human fibroblasts as a source of genomic instability. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;95(2):130-6.

Ried T, Schrock E, Ning Y, Wienberg J. Chromosome painting: a useful art. *Hum Mol Genet* 1998;7(10):1619-26.

Rigolin GM, Bigoni R, Milani R, Cavazzini F, Roberti MG, Bardi A, Agostini P, Della Porta M, Tieghi A, Piva N, Cuneo A, Castoldi G. Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia* 2001;15(12):1841-7.

Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 2001;20(24):3139-55.

Robertson SC, Tynan J, Donoghue DJ. RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends Genet* 2000;16(8):368.

Rollinson S, Roddam P, Kane E, Roman E, Cartwright R, Jack A, Morgan GJ. Polymorphic variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukaemia. *Carcinogenesis* 2000;21:43-7.

Ross JA, Kasum CM, Davies SM, Jacobs DR, Folsom AR, Potter JD. Diet and risk of leukemia in the Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(8):777-81.

Roth P, Stanley ER. The biology of CSF-1 and its receptor. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;181:141-67.

Roumier C, Fenaux P, Lafage M, Imbert M, Eclache V, Preudhomme C. New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies. *Leukemia* 2003;17(1):9-16.

Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 2001;20(24):3156-65.

Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243(5405):290-3.

Rush LJ, Dai Z, Smiraglia DJ, Gao X, Wright FA, Fruhwald M, Costello JF, Held WA, Yu L, Krahe R, Koltz JE, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Plass C. Novel methylation targets in de novo acute myeloid leukemia with prevalence of chromosome 11 loci. *Blood* 2001;97(10):3226-33.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239(4839):487-91.

Sandler DP, Ross JA. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Semin Oncol* 1997;24(1):3-16.

Santucci MA, Ripalti A, di Paola MC, Mianulli AM, Iacurti E, Campanini F, Gamberi B, Tura S. Procedure for the quantification of Gadd45 expression levels in clonal hematopoietic progenitor cells by competitive polymerase chain reaction. *Clin Biochem* 1999;32:1-8.

Sauerbrey A, Stammler G, Zintl F, Volm M. Expression of the retinoblastoma tumor suppressor gene (RB-1) in acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998;28(3-4):275-83.

Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, Largman C, Lawrence HJ, Humphries RK. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(25):12223-7.

Scandura JM, Boccuni P, Cammenga J, Nimer SD. Transcription factor fusions in acute leukemia: variations on a theme. *Oncogene* 2002;21(21):3422-44.

Scheijen B, Griffin JD. Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene* 2002;21(21):3314-33.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270(5235):467-70.

Schnittger S, Kinkel U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, Buchner T, Wormann B, Hiddemann W, Griesinger F. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia* 2000;14(5):796-804.

Schoch C, Haferlach T, Haase D, Fonatsch C, Löffler H, Schlegelberger B, Staib P, Sauerland MC, Heinecke A, Buchner T, Hiddemann W; German AML Cooperative Study Group. Patients with de novo

acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. *Br J Haematol* 2001;112(1):118-26.

Schoch C, Haferlach T, Bursch S, Gerstner D, Schnittger S, Dugas M, Kern W, Löffler H, Hiddemann W. Loss of genetic material is more common than gain in acute myeloid leukemia with complex aberrant karyotype: a detailed analysis of 125 cases using conventional chromosome analysis and fluorescence in situ hybridization including 24-color FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 2002a;35(1):20-9.

Schoch C, Kohlmann A, Schnittger S, Brors B, Dugas M, Mergenthaler S, Kern W, Hiddemann W, Eils R, Haferlach T. Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002b;99(15):10008-13.

Schottelius A, Brennscheidt U, Ludwig W-D, Mertelsmann RH, Herrmann F, Lübbert M. Mechanisms of p53 alteration in acute leukemias. *Leukemia* 1994;8:1673-81.

Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;273(5274):494-7.

Schrock E, Padilla-Nash H. Spectral karyotyping and multicolor fluorescence in situ hybridization reveal new tumor-specific chromosomal aberrations. *Semin Hematol* 2000;37(4):334-47.

Schwartz DC i Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gel electrophoresis. *Cell* 1984;37:67-75.

Second MIC Cooperative Study Group. Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukemias. Report of the Workshop held in Leuven, Belgium, September 15-17, 1986. Second MIC Cooperative Study Group. *Cancer Genet Cytogenet* 1988;30(1):1-15.

Shalon D, Smith SJ, Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 1996;6(7):639-45.

Shikami M, Miwa H, Nishii K, Takahashi T, Sekine T, Mahmud N, Nishikawa M, Shiku H, Kamada N, Kita K. Low BCL-2 expression in acute leukemia with t(8;21) chromosomal abnormality. *Leukemia* 1999;13(3):358-68.

Shimada H, Ichikawa H, Ohki M. Potential involvement of the AML1-MTG8 fusion protein in the granulocytic maturation characteristic of the t(8;21) acute myelogenous leukemia revealed by microarray analysis. *Leukemia* 2002;16(5):874-85.

Shimizu K, Kitabayashi I, Kamada N, Abe T, Maseki N, Suzukawa K, Ohki M. AML1-MTG8 leukemic protein induces the expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor through the up-regulation of CCAAT/enhancer binding protein epsilon. *Blood* 2000;96(1):288-96.

Smith BD, Bambach BJ, Vala MS, Barber JP, Enger C, Brodsky RA, Burke PJ, Gore SD, Jones RJ. Inhibited apoptosis and drug resistance in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1998;102(4):1042-9.

Smith ML, Chen IT, Zhang Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 1994;266:1376-80.

Soekarman D, von Lindern M, Daenen S, de Jong B, Fonatsch C, Heinze B, Bartram C, Hagemeijer A, Grosveld G. The translocation t(6;9)(p23;q34) shows consistent rearrangement of two genes and defines a myeloproliferative disorder with specific clinical features. *Blood* 1992;79:2990-7.

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20(4):399-407.

Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, Ratajczak J, Resende IC, Haworth C, Hock R, Loh M, Felix C, Roy DC, Busque L, Kurnit D, Willman C, Gewirtz AM, Speck NA, Bushweller JH, Li FP, Gardiner K, Poncz M, Maris JM, Gilliland DG. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999;23(2):166-75.

Southern EM. An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Anal Biochem* 1974;62(1):317-8.

Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996;12(4):368-75.

Stark B, Jeison M, Gobuzov R, Finkelshtein S, Ash S, Avrahami G, Cohen IJ, Stein J, Yaniv I, Zaizov R, Bar-Am I. Apparently unrelated clones shown by spectral karyotyping to represent clonal evolution of cryptic t(10;11)(p13;q23) in a patient with acute monoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;120(2):105-10.

Steinman RA. Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene* 2002;21(21):3403-13.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000;69:217-45.

Streubel B, Valent P, Lechner K, Fonatsch C. Amplification of the AML1(CBFA2) gene on ring chromosomes in a patient with acute myeloid leukemia and a constitutional ring chromosome 21. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;124(1):42-6.

Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 1995;80:279-84.

Takekawa M and Saito H. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* 1998;95:521-30.

Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, Lander ES, Golub TR. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(6):2907-12.

Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Isola J, Kuukasjarvi T, Collins C, Kowbel D, Guan XY, Trent J, Gray JW, Meltzer P, Kallioniemi OP. Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer. *Cancer Res* 1996;56(15):3441-5.

Tavazoie S, Hughes JD, Campbell MJ, Cho RJ, Church GM. Systematic determination of genetic network architecture. *Nat Genet* 1999;22(3):281-5.

Tefferi A, Bolander ME, Ansell SM, Wieben ED, Spelsberg TC. Primer on medical genomics. Part III: Microarray experiments and data analysis. *Mayo Clin Proc* 2002;77(9):927-40.

Testa U, Riccioni R, Militi S, Coccia E, Stellacci E, Samoggia P, Latagliata R, Mariani G, Rossini A, Battistini A, Lo-Coco F, Peschle C. Elevated expression of IL-3Ralpha in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis. *Blood* 2002;100(8):2980-8.

Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioniemi OP. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21(3):177-84.

Tosi P, Visani G, Ottaviani E, Manfori S, Zinzani PL, Tura S. Fludarabine + Ara-C + G-CSF: cytotoxic effect and induction of apoptosis on fresh acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 1994;8(12):2076-82.

Trask B, Pinkel D, van den Engh G. The proximity of DNA sequences in interphase cell nuclei is correlated to genomic distance and permits ordering of cosmids spanning 250 kilobase pairs. *Genomics* 1989;5(4):710-7.

Trougakos IP, Gonos ES. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(11):1430-48.

Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik C, Cohen M, Muller-Navia J, Cremer T, Murken J, Speicher MR. Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet* 1999;65(2):448-62.

Valentis B and Baserga R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol Pathol* 2001;54(3):133-7.

van Limbergen H, Poppe B, Michaux L, Herens C, Brown J, Noens L, Berneman Z, De Bock R, De Paepe A, Speleman F. Identification of cytogenetic subclasses and recurring chromosomal aberrations in AML and MDS with complex karyotypes using M-FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33(1):60-72.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995;270(5235):484-7.

Veldman T, Vignon C, Schrock E, Rowley JD, Ried T. Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nat Genet* 1997;15(4):406-10.

Venter JC et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291(5507):1304-51.

Verdorfer I, Brecevic L, Saul W, Schenker B, Kirsch M, Trautmann U, Helm G, Gramatzki M, Gebhart E. Comparative genomic hybridization-aided unraveling of complex karyotypes in human hematopoietic neoplasias. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;124(1):1-6.

Virtaneva K, Wright FA, Tanner SM, Yuan B, Lemon WJ, Caligiuri MA, Bloomfield CD, de La Chapelle A, Krahe R. Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(3):1124-9.

Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvanen AC, Hyytinen ER, Karhu R, Tammela T, Isola JJ, Kallioniemi OP. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1995;55(2):342-7.

Voehringer DW, Hirschberg DL, Xiao J, Lu Q, Roederer M, Lock CB, Herzenberg LA, Steinman L, Herzenberg LA. Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(6):2680-5.

von Lindern M, Fornerod M, van Baal S, Jaegle M, de Wit T, Buijs A, Grosveld G. The translocation (6;9), associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes, *dek* and *can*, and the expression of a chimeric, leukemia-specific *dek-can* mRNA. *Mol Cell Biol* 1992;12:1687-9.

Vorwerk P, Wex H, Hohmann B, Mohnike K, Schmidt U, Mittler U. Expression of components of the IGF signalling system in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Mol Pathol* 2002;55:40-5.

Wang T, Fan L, Watanabe Y, McNeill PD, Moulton GG, Bangur C, Fanger GR, Okada M, Inoue Y, Persing DH, Reed SG. L523S, an RNA-binding protein as a potential therapeutic target for lung cancer. *Br J Cancer* 2003;88(6):887-94.

Waxman DJ, Chen L, Hecht JE, Jounaidi Y. Cytochrome P450-based cancer gene therapy: recent advances and future prospects. *Drug Metab Rev* 1999;31(2):503-22.

Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapinoso LM, Kern SG, Behling CA, Monk BJ, Lockhart DJ, Burger RA, Hampton GM. Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(3):1176-81.

Werner M, Wilkens L, Aubele M, Nolte M, Zitzelsberger H, Komminoth P. Interphase cytogenetics in pathology: principles, methods, and applications of fluorescence in situ hybridization (FISH). *Histochem Cell Biol* 1997;108(4-5):381-90.

Whitmire CE, Salerno RA, Rabstein LS, Huebner RJ. RNA tumor virus antigen expression in chemically-induced tumors. Significance of specific chemical carcinogens to the derepression of the C-type RNA viro gene and oncogene expressions. *Bibl Haematol* 1973;39:574-88.

Wiegant J, Bezrookove V, Rosenberg C, Tanke HJ, Raap AK, Zhang H, Bittner M, Trent JM, Meltzer P. Differentially painting human chromosome arms with combined binary ratio-labeling fluorescence in situ hybridization. *Genome Res* 2000;10(6):861-5.

Wilkens L, Tchinda J, Burkhardt D, Nolte M, Werner M, Georgii A. Analysis of hematologic diseases using conventional karyotyping, fluorescence in situ hybridization (FISH), and comparative genomic hybridization (CGH). *Hum Pathol* 1998;29(8):833-9.

Wilkinson DG. *In situ hybridization, a practical approach*. 2nd ed., Oxford University Press, Oxford 1999.

Wittwer CT, Fillmore GC, Hillyard DR. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. *Nucleic Acids Res* 1989;17(11):4353-7.

Wittwer CT, Garling DJ. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques* 1991;10(1):76-83.

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22(1):130-8.

World Health Organization. *Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 1st ed., IARC Press, Lyon 2001.

Wu HK, Weksberg R, Minden MD, Squire JA. Loss of imprinting of human insulin-like growth factor II gene, IGF2, in acute myeloid leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231(2):466-72.

Wu TD. Analysing gene expression data from DNA microarrays to identify candidate genes. *J Pathol* 2001;195(1):53-65.

Yamamoto K, Nagata K, Kida A, Hamaguchi H. Deletion of 16q11 is a recurrent cytogenetic aberration in acute myeloblastic leukemia during disease progression. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;131(1):65-8.

Yergeau DA, Hetherington CJ, Wang Q, Zhang P, Sharpe AH, Binder M, Marin-Padilla M, Tenen DG, Speck NA, Zhang DE. Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene. *Nat Genet* 1997;15(3):303-6.

Zembutsu H, Ohnishi Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Katagiri T, Ueyama Y, Tamaoki N, Nomura T, Kitahara O, Yanagawa R, Hirata K, Nakamura Y. Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs. *Cancer Res* 2002;62(2):518-27.

Zhang FF, Murata-Collins JL, Gaytan P, Forman SJ, Kopecky KJ, Willman CL, Appelbaum FR, Slovak ML. Twenty-four-color spectral karyotyping reveals chromosome aberrations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28(3):318-28.

Zhang J, Byrne CD. Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochem J* 1999;337 (Pt 2):231-41.

Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* 2000;14(8):981-93.

Zhu H-m, Lee ML, Finkernagel SW, Sciorra LJ. Sequential G banding and non-radioactive in situ hybridization. *Applied Cytogenetics* 1993;19(2):33-5.

Zhu Y, Monni O, El-Rifai W, Siitonen SM, Vilpo L, Vilpo J, Knuutila S. Discontinuous deletions at 11q23 in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1999;13(5):708-12.

Zumkeller W. The insulin-like growth factor system in hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma* 2002;43(3):487-91.