Du chromosome aux SNPs : le caryotype du futur dans le diagnostic oncologique

From chromosomes to SNP : caryotype 2.0 in oncology diagnostics

Auteur



Sophie COTTERET
PharmD,PhD.
Praticien Spécialiste des CLCC.

Expertise :
Cytogénétique oncologique et Séquençage haut-débit.

Liens d'intérêts :
l'auteur déclare ne pas avoir de liens d'intérêts.

Correspondance :
Service de Génétique des Tumeurs .
Laboratoire de Cytogénétique et de séquençage des Tumeurs Solides
Gustave Roussy, 114 Rue Edouard Vaillant,
94800 Villejuif
sophie.cotteret@gustaveroussy.fr

Le caryotype oncologique a été pendant des décennies la référence pour l'étude des anomalies chromosomiques des tumeurs. Cependant, le besoin de descendre à l'échelle du microsegment voire du gène a entraîné le développement de techniques de cytogénétique moléculaire. Les SNP arrays sont utilisés couramment pour le diagnostic des tumeurs solides et plus modérément dans le diagnostic des hémopathies, plutôt en complément du caryotype, qui reste la référence pour la recherche de translocations.

Karyotyping has been the reference analysis for decades to study chromosomal abnormalities. But the need to explore deeper chromosome rearrangements, at the microsegment and even at the gene level has prompted scientists to develop new molecular technologies. SNP arrays are commonly used in the diagnosis of solid tumors, and are developping in hemopathies, in addition to the karyotype, which remains indispensable to search for translocations.

Mots clés

caryotype, SNP arrays, transactions, perte d'heterozygotie, aneuploidie.

Key words

Karyotype. SNP arrays. cnLOH. Translocations. Aneuploidy.

Introduction

Pendant de très nombreuses années, depuis les années 1950-60, le caryotype a représenté la seule méthode, peu coûteuse pour étudier les chromosomes et déterminer les anomalies des cellules germinales (cytogénétique constitutionnelle) ou tumorales (cytogénétique oncologique).

L'un des apports fondamentaux du caryotype, grâce à la mise au point de la culture cellulaire, a été de déterminer combien de chromosomes constituent une cellule normale. Ce qui paraît banal de nos jours est en fait le point de départ de toute la biologie et de la génétique. Le fait de savoir qu'une cellule normale comporte 46 chromosomes[1] a permis de déterminer le caractère anormal d'une cellule tumorale par son nombre de chromosomes. Puis les différences homme-femme ont été mises en évidence par la découverte des chromosomes dits sexuels, on a ensuite vu que certains individus possèdent un chromosome surnuméraire ou au contraire ont perdu un chromosome sexuel.

Ensuite, la découverte de facteurs de croissance a permis de stimuler la croissance des cellules lymphoïdes et de réaliser un caryotype pour toutes les hémopathies lymphoïdes.

La découverte du chromosome Philadelphie en 1960 par Nowell[2] dans la leucémie myéloïde chronique est un exemple de ce que le caryotype a pu apporter comme aide au diagnostic, et la preuve qu'une anomalie chromosomique peut être la cause d'une pathologie. Bien plus tard, l'avènement du marquage des chromosomes appelé le banding permit en 1973 à Janet Rowley de découvrir que le chromosome Philadelphie résultait de la translocation t(9;22)[3]. L'identification moléculaire des gènes impliqués dans cette translocation (*BCR* et *ABL1*) a suivi très rapidement[4].

Depuis plus de 1200 tumeurs comportant des anomalies clonales ont été rapportées, notamment plus de 30 altérations récurrentes dans les hémopathies et les tumeurs solides. L'étude de plusieurs centaines de tumeurs a permis d'établir que les anomalies sont de deux types :

- des anomalies récurrentes non aléatoires impliquant des chromosomes particuliers ;
- des anomalies multiples non récurrentes affectant plusieurs chromosomes ou tous les chromosomes.

Au final, l'identification de translocations récurrentes associées à l'essor de l'analyse moléculaire des gènes a permis de comprendre les mécanismes de transformation liés à ces translocations.

Le résultat des translocations réciproques (échange de matériel réciproque entre 2 chromosomes) est la dérégulation, le plus souvent sous la forme d'une surexpression, d'un gène situé au niveau du point de cassure sur un des chromosomes (activation de *MYC* dans le lymphome de Burkitt par juxtaposition de *MYC* avec le promoteur d'un gène des immunoglobulines, [6] ou la création d'un gène chimérique résultant de la fusion de deux gènes mis en contiguïté par la translocation (activation de la kinase ABL1 résultant du gène chimérique *BCR-ABL*).

L'expérience a montré que tous les réarrangements conduisent à l'un ou l'autre de ces phénomènes. Plus tard d'autres mécanismes ont été mis en évidence : insertions, inversions, délétions.

Cependant, le caryotype standard comporte des inconvénients, notamment la faible résolution, limitante pour explorer de manière approfondie les causes moléculaires des pathologies et les anomalies géniques ou chromosomiques. L'analyse du caryotype permet une résolution de 300 à 400 bandes voire de 500 bandes, mais ce niveau de résolution ne permet de voir que des anomalies supérieures à 10 Mb. De plus, il nécessite la culture des cellules tumorales, qui n'aboutit pas toujours à l'obtention de métaphases [7].

Les deux décennies de 1980 à 2000 jusque vers 2010 ont vu le développement de nouvelles techniques

d'analyse moléculaires telles que l'hybridation *in situ* fluorescente (fluorescence *in situ* hybridization (FISH)), la FISH multicouleur, et la CGH (*comparative Genomic Hybridization*) ou les micro-arrays (BAC arrays, oligo-arrays ou SNP arrays) [7]. Ces techniques ont permis l'essor de la cytogénétique moléculaire en augmentant la résolution des analyses, la sensibilité et la caractérisation plus fine de remaniements complexes. Ces analyses ont permis d'étudier les pathologies en passant de l'échelle chromosomique à l'échelle du gène voire du nucléotide, à l'aide sondes qui couvrent des loci spécifiques et de comprendre les mécanismes impliqués dans la tumorigenèse, en découvrant des marqueurs associés aux pathologies ou des anomalies « drivers », directement causales de la pathologie (amplification de *MYCN*, remaniements du gène *EWSR1* dans les sarcomes, amplification d'*HER2* dans certains cancers du sein).

La FISH améliore la sensibilité et la spécificité pour détecter des anomalies telles que les translocations, l'aneuploïdie, les délétions, les inversions et les amplifications en utilisant des sondes ADN spécifiques. Elle peut être utilisée pour vérifier une anomalie observée sur un caryotype, rechercher une anomalie spécifique sans passer par le caryotype (trisomie, t(9 ;22) ou t(15 ;17) par exemple ou confirmer une altération vue sur un micro-array. Elle permet de descendre la sensibilité de détection à quelques centaines de kb, mais elle est très ciblée et ne permet pas de rechercher des anomalies inconnues ou des remaniements qui affectent un segment chromosomique.

La CGH permet l'analyse à haut débit du génome tumoral entier pour identifier des altérations numériques (trisomie ou monosomie par exemple) ou segmentaires (altération n'affectant qu'un fragment du chromosome : délétion du 17p ou gain du 17q). On parle de CNV (*copy number variation*) ou CNA (*copy number aberration*) dans le cadre des tumeurs par opposition au CNC (*copy number change*) strictement réservé à l'analyse constitutionnelle.La sensibilité de la CGH permet de détecter des altérations qui ne sont pas visibles sur le caryotype ou par FISH, et la résolution est de 100kb. Les nouvelles analyses appelées SNP array permettent de descendre à 30-35 kb.

CGH et micro-array

Les anomalies génétiques sont classées en plusieurs catégories [8]:

- les translocations, amplifications, pertes alléliques, perte d'hétérozygotie, délétions détectées en cytogénétique moléculaire ;
- les mutations, et les modifications épigénétiques comprenant notamment la méthylation de l'ADN qui affectent à la fois les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur détectées par séquençage.

La CGH et les arrays sont des outils efficaces pour étudier les déséquilibres chromosomiques et ont entrainé le développement des tests génétique dans des nombreux domaines où le diagnostic était limité ; ce sont tous les syndromes de déficience intellectuelle ou de malformations qui étaient inexpliqués par le caryotype. Ces indications peuvent maintenant être évaluées avec une méthode très sensible pour expliquer les problèmes génétiques sous-jacents. Ces méthodes sont parties prenante du diagnostic de certaines tumeurs solides. La CGH correspond au mélange d'un ADN tumoral mélangé à un ADN contrôle normal, le tout est hybridé sur des métaphases de sujets sains sur des lames. Chaque ADN est marqué avec un fluorochrome différent, par exemple les séquences contrôles d'ADN sont marquées avec un fluorochrome A (vert) et l'ADN tumoral est marqué avec un autre fluorochrome B (rouge) (**figure 1**). Les deux types d'ADN vont entrer en compétition pour l'hybridation. Les lames sont scannées et les intensités de fluorescence sont mesurées par un logiciel informatique spécifique qui permet de définir le nombre d'altérations et le type d'altération : les écarts constituent des gains (plus d'intensité de fluorescence pour l'ADN tumoral) ou des pertes (plus d'intensité de fluorescence pour l'ADN normal). La CGH, bien que peu coûteuse, a progressivement été remplacée par des micro-arrays : ils sont constitués de séquences d'ADN plus ou moins grandes : les BACs (*bacterial articial chromosome*) couvrent 1Mb sur le génome, les oligonucléotides couvrent 100 kb et les SNP (*single nucléotides polymorphims*) couvrent 30 à 35kb. Le principe est le même que pour la CGH, les séquences contrôles d'ADN marquées avec un fluorochrome A (vert) et l'ADN tumoral est marqué avec un autre fluorochrome B (rouge) sont déposées sur une lame. Seuls les gains et les pertes sont analysables par CGH ou sur ces arrays, les remaniements équilibrés, de type translocation réciproque, ne sont pas visibles puisque il n'y a pas de perte de matériel génétique, seulement une répartition différente. Il est possible de fixer sur les lames, des oligonucléotides contenant des «*Single Nucleotide Polymorphims*» ou SNPs. Ce sont des variations portant sur une seule paire de base, et distribuées uniformément dans le génome humain. On estime le nombre de SNPs à plus de 10 millions avec une répartition d'un SNP tous les 100 à 1 000 paires de bases (1kb). La carte des SNPs étant établie, différents procédés ont été mis au point pour synthétiser des oligonucléotides contenant pour un locus donné les 2 allèles du SNP.

Pour les SNP arrays, il n'y a pas d'hybridation sur un contrôle normal. L'ADN du patient est hybridé sur l'array (qui ne ressemble plus à une lame, il s'agit d'une puce qui comporte des millions de sondes fluorescentes). Les changements de nombre de copies se traduisent par des

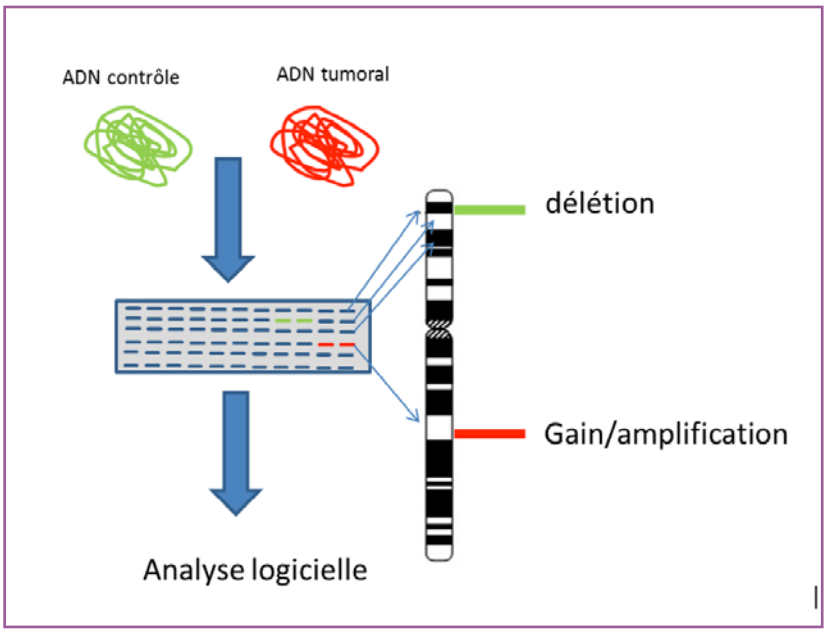


Figure 1 : principe de la CGH et des micro-arrays. L'ADN du patient est marqué avec un fluorochrome (rouge par exemple). L'ADN normal à quantité égale est marqué avec un flurochrome de couleur différente (vert). Ces ADN sont mélangés et hybridés sur une lame sur laquelle a été déposée une métaphase contrôle. Une compétition se produit entre les 2 ADN pour l'hybridation et une variation d'intensité de fluorescence peut être mesurée qui est proportionnelle à la quantité d'ADN fixé, le rapport des 2 fluorescence est calculé informatiquement et est exprimé en logarithme. Un log de 0 correspond a la même quantité d'ADN pour chaque échantillon, une valeur négative correspond à une perte de matériel et une valeur positive à un gain, des valeurs seuils spécifiques ont été établies pour l'interprétation des données.

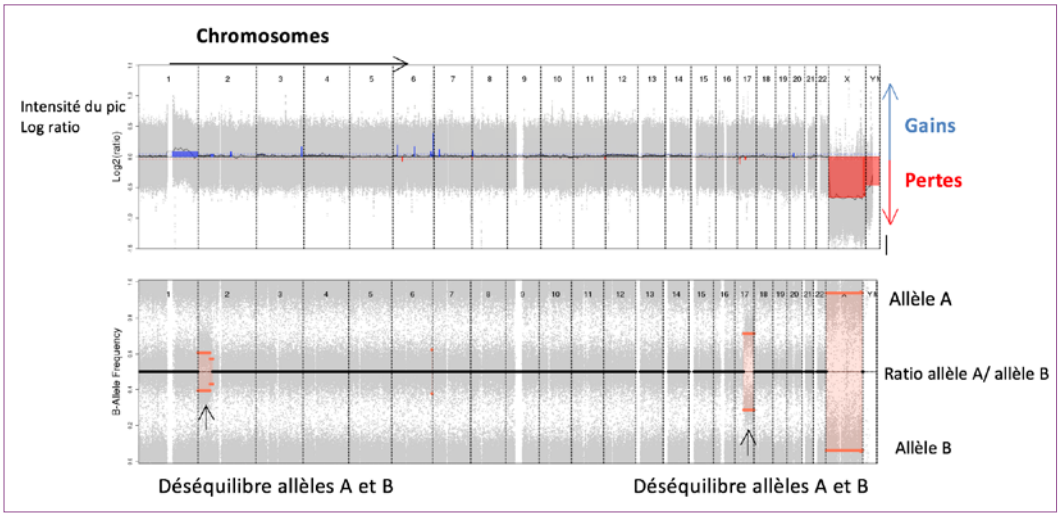


Figure 2 : SNP array. Analyse réalisée au laboratoire de Cytogénétique de Gustave Roussy.

variations d'intensité de fluorescence par rapport à un pool de sondes d'individus sains.
Les SNP arrays permettent d'obtenir deux types de données (**figure 2**).

1. Un profil génomique exprimé sous forme de log R qui est utilisé pour normaliser tous les signaux de fluorescence et de mettre en évidence les variations de nombre de copies.
2. Une représentation des fréquences alléliques en mesurant les signaux d'intensité pour chaque allèle représenté sous forme de ratio entre les allèles A et B.

On obtient ainsi 3 bandes : la bande du milieu représente l'hétérozygotie : il existe un allèle A maternel et un allèle B paternel, la bande du haut représente l'allèle A et la bande du bas l'allèle B.

Les arrays ont cependant des limites : ils ne détectent pas les translocations équilibrées ni les inversions, et ne permettent pas d'identifier de sous-clones. Le caryotype oncologique permet de mettre en évidence des anomalies clonales, en permettant la croissance des cellules tumorales aux dépens de celle des cellules normales, et de mettre ainsi en évidence des sous-clones potentiels, qui ont une valeur pronostique quant à l'évolution ultérieure de la tumeur. Il permet et ainsi déterminer quel est le clone fondateur ou s'il existe un sous-clone minoritaire susceptible d'entraîner la rechute.

De plus, certains chromosomes extrêmement remaniés visibles sous la forme d'un chromosome marqueur sur le caryotype ne peuvent être identifiés par SNP array. Bien évidemment les arrays ne permettent pas de mettre en évidence les mutations ponctuelles.
Cependant, l'avantage majeur des micro-arrays est l'affranchissement total de la culture cellulaire et la possibilité de travailler sur des cellules non cultivées issues d'un tissu frais, congelé ou inclus en paraffine pour les tumeurs solides, un culot cellulaire correspondant à des cellules triées ou des cellules totales pour les hémopathies car l'ADN total est extrait (y compris l'ADN non tumoral). Autre avantage, la très faible quantité de matériel requise, de 100 à 250 ng).
L'analyse est donc réalisée avec une grande précision dans le cas des SNP arrays. Notamment, la mise en évidence de la perte d'hétérozygotie qui est invisible sur un caryotype. Celle-ci joue un rôle majeur dans la tumorigenèse et est de plus en plus prise en compte dans les analyses et pour interpréter les résultats de NGS. Par exemple, on voit deux chromosomes 3 sur un caryotype alors qu'en fait ces 2 chromosomes sont une même copie : il y a perte du chromosome 3 paternel et duplication du chromosome 3 maternel. Bien que 2 chromosomes 3 soient visibles, il y a en réalité une monosomie 3 due à une inactivation d'un chromosome liée à la perte, ce qui est vrai également pour les gènes situés sur ce chromosome. On parle de cnLOH (*copy neutral loss*

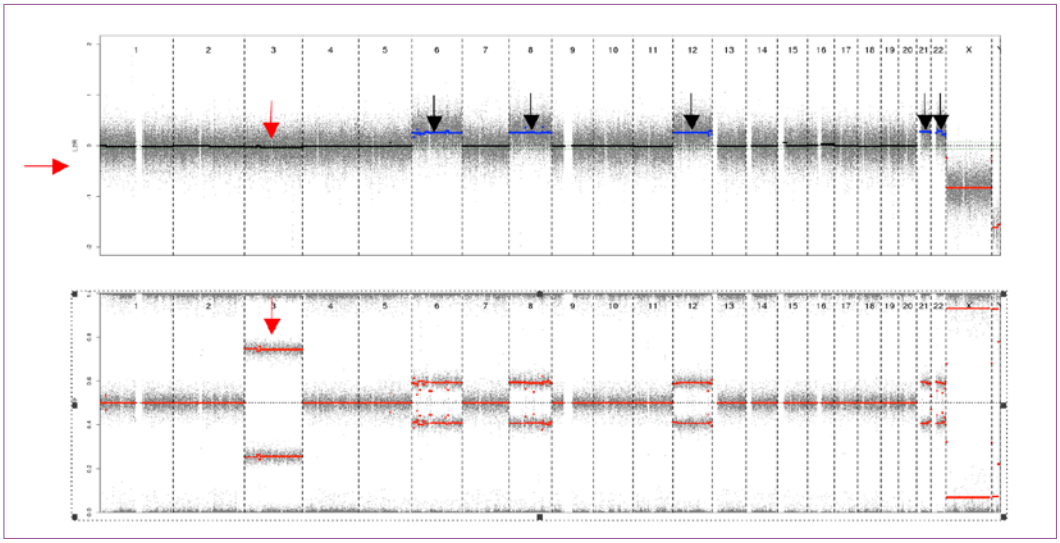


Figure 3 : perte d'hétérozygotie sur le chromosome 3. Comme indiqué sur le graphique du haut par les deux flèches rouges, la ligne de base noire (flèche horizontale) indique qu'il y a deux chromosomes 3 (flèche verticale) par opposition aux flèches noires qui indiquent qu'il y a un gain de chromosomes 6,8,12,21,22. La flèche rouge sur le graphique du bas indique une perte d'hétérozygotie sur le chromosome 3 car un déséquilibre entre l'allèle A et l'allèle B est observé, représentée par les lignes rouges qui se détachent de la ligne basale. Analyse réalisée au laboratoire de Cytogénétique de Gustave Roussy.

of heterozygosity) aussi appelé *somatic uniparental disomy* (UPD, en référence au même type d'anomalie rencontrée en cytogénétique constitutionnelle) (**figure 3**). Ainsi, si un gène est muté sur un allèle A, et s'il s'agit d'une mutation délétère, et que l'allèle B est perdu parce qu'il existe une LOH, on parlera d'une inactivation totale du gène *A*. Les monosomies 7 sont des facteurs pronostiques défavorables dans les leucémies aigües myéloïdes et les syndromes myélodysplasiques. Le caryotype peut montrer une disomie 7 alors que les SNP arrays montreront un cnLOH.

Exemples d'utilisation des SNP arrays

Dans les tumeurs solides, la réalisation du caryotype n'est pas possible car la culture des cellules tumorales est délicate et les anomalies génétiques sont si bien caractérisées qu'il n'est pas nécessaire de réaliser un caryotype, on recherche des anomalies spécifiques, par exemple la recherche d'une amplification du gène *HER2 (ERBB2)* dans le cancer du sein (**figures 4A et 4B**), ou des gènes *MYCN* dans le neuroblastome ou *MDMD2* dans les liposarcomes. À noter que l'on recherche ces anomalies en priorité par FISH, mais que celles-ci n'est pas toujours réalisable.

Le diagnostic du neuroblastome comprend impérativement l'analyse par SNP array en plus de la FISH pour détecter les anomalies segmentaires qui ont une valeur hautement pronostique [9].

Certains cas de discordance entre le diagnostic histologique et la FISH peuvent nécessiter une analyse complémentaire par SNP array.

SNP array en hématologie

Les SNP arrays ont leur utilité dans les hémopathies, bien qu'il n'y ait pas de recommandations particulières pour son utilisation. La classification OMS des hémopathies reste basée sur le caryotype. En hématologie, l'intérêt de la CGH réside dans la caractérisation d'anomalies en cas d'échec du caryotype (absence de métaphases chez des patients cytopéniques ou caryotype ininterprétable) ou pour rechercher des anomalies chromosomiques spécifiques. La CGH a prouvé son utilité dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et dans les syndromes myélodysplasiques (SMD), surtout dans les myélodysplasies, lorsque les autres analyses ne permettent pas la mise en évidence des anomalies.

Dans les LAL, un certain nombre de gènes impliqués dans la leucémogenèse et insoupçonnés tant que le seul caryotype était réalisé ont été découverts grâce aux SNP arrays.

L'étude de Mullighan en 2007 [10] portant sur 242 cas de LAL B et T pédiatriques a mis en évidence 54 régions récurrentes affectées par des délétions focales (<1Mb, donc invisibles sur un caryotype) et 24 délétions comportant un seul gène. La découverte la plus importante a été que les gènes régulant le développement des cellules B étaient délétés dans 40% des cas de LAL B, principalement *PAX5*, responsable de la différenciation des cellules B, qui est altéré dans 30% des LAL B (perte et ou remaniement). D'autres gènes contrôlant le développement des cellules sont délétés : *EBF1, TCF3, LEF1, IKZF1 (IKAROS), and IKZF3 (AIOLOS).* Il ne s'agit donc pas d'instabilité génomique à proprement parler mais de perte récurrente de gènes fondamentalement nécessaires a la régulation de la prolifération des cellules B. La perte d'hétérozygotie (cnLOH) joue un rôle majeur dans les LAL, elle permet de mettre en évidence la perte d'un allèle des gènes *CDKN2A* et *ETV6* [11].

Dans les syndromes myélodysplasiques, seuls 30 à 40% des caryotypes comportent des anomalies, les autres sont

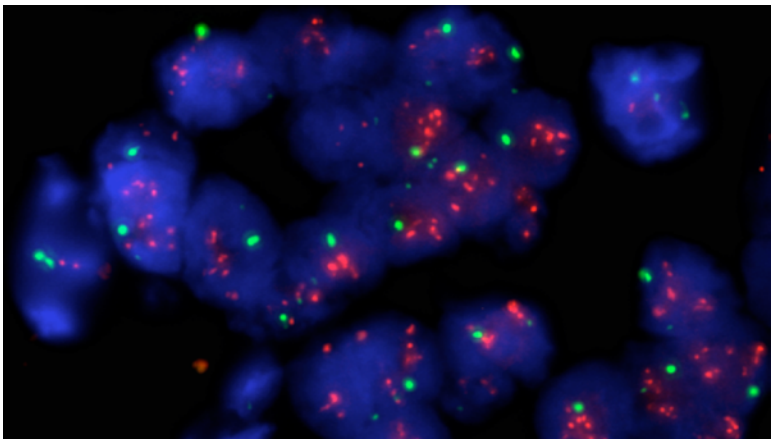


Figure 4A : amplification du gène *HER2* par FISH: le gène *HER2* est en rouge et le gène de référence (centromère) est en vert : on observe un nombre élevé de signaux rouges par rapport au signaux verts.

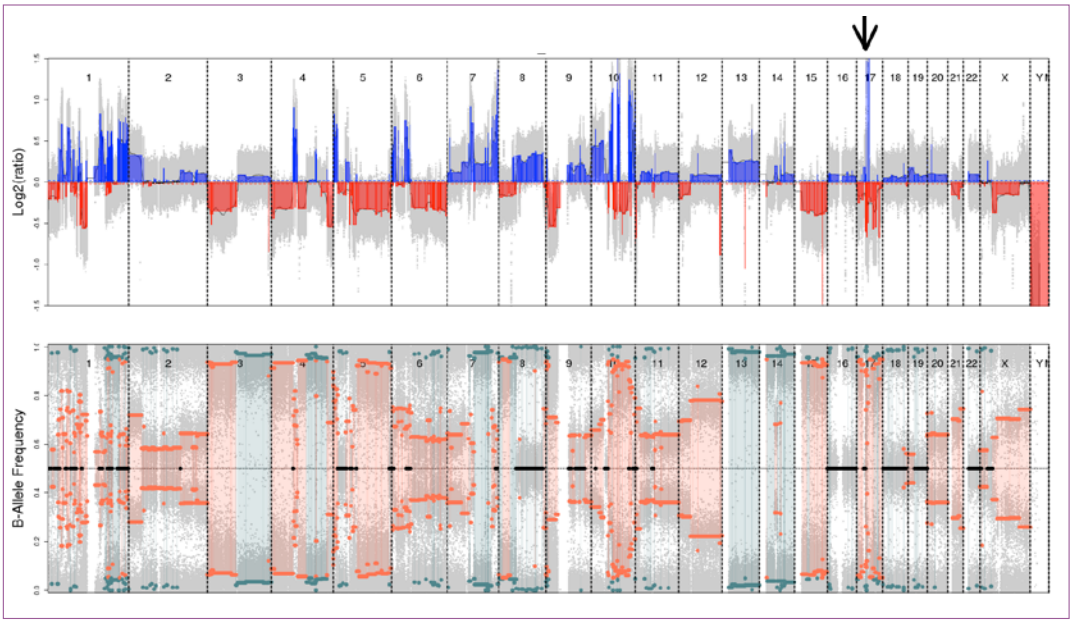


Figure 4B : amplification du gène *HER2* par SNP array, indiquée par la flèche, dans un cancer du sein métastatique. De très nombreuses autres altérations sont associées, visibles sous la forme de pics rouges et bleus correspondant à des pertes de segment ou des gains, respectivement. Analyse réalisée au laboratoire de Cytogénétique de Gustave Roussy.

considérés « normaux » alors qu'il existe certainement des pertes d'hétérozygotie ou des délétions invisibles sur le caryotype.
Dans les SMD, Gondek et al. [12] ont réalisé des SNP arrays chez 140 patients ayant un SMD et ont mis en évidence des anomalies chromosomiques chez 80% de ces patients dont 68% avaient un caryotype initial normal. La plupart comportaient surtout des délétions de petite taille et des cnLOH.
Tiu [13] a montré que la présence de ces altérations détectées uniquement par SNP array est prédictive d'un mauvais pronostic. C'est grâce aux SNP qu'on a découvert le rôle joué par *TET2* et *EZH2* dans la genèse de ces hémopathies : les loci contenant ces 2 gènes étaient délétés dans un grand nombre de SMD ; le séquençage a par la suite permis de mettre en exergue des mutations récurrentes sur ces gènes.
Ces études et d'autres ont montré l'utilité des SNParray pour détecter des altérations chromosomiques en complément du caryotype, et peuvent aider à la stratification pronostique des patients.
Dans les SMD/SMP de type LMMC, les SNP arrays ont identifié des altérations chez 60% of patients notamment des CN-LOH in 71% and micro-délétions in 45% cases. Les pertes d'hétérozygotie affectent plus particulièrement le 7q (*EZH2*), le 11q (*CBL*), le 4q (*TET2*). La présence de ces multiples anomalies détectées par SNP array est associée à une survie globale et une réponse partielle inférieures et un taux de rémission plus bas [14]. Ces analyses permettent une meilleure stratification des patients CMML.
Les SNP ont été utilisés dans de nombreuses autres hémopathies, notamment pour chercher de nouvelles altérations génétiques, pour chercher des altérations récurrentes ou pour enrichir les connaissances sur ces pathologies en étudiant de grandes cohortes. C'est le cas du lymphome de Hodgkin (HL) ou des prolifération de cellules B matures. Dans les lymphomes de Hodgkin, une perte d'hétérozygotie en 14q a été mise en évidence, elle est associée à une inactivation du gène *TRAF3* et un gain du nombre de copies de *MAP3K14*. Ces deux gènes régulent la voie NF-kB qui est activée dans les HL [15].
Les SNP arrays sont utilisées ponctuellement dans les lymphomes B lorsque l'analyse par FISH ne peut être réalisée.

Conclusion

Les analyses par SNP array ont largement contribué à la compréhension des anomalies génomiques des hémopathies. Plusieurs oncogènes ont été identifiés et ont montré leur importance dans les applications cliniques (cibles thérapeutiques ou facteurs pronostiques, ou facteur causal de la maladie). Bien qu'il y ait un formidable essor du séquençage à haut débit (NGS), la cytogénétique moléculaire apporte une contribution non négligeable dans la prise en charge diagnostique des tumeurs. Le couplage des SNP arrays avec du RNAseq permet de pallier l'absence de détection des translocations qui représentent les anomalies les plus importantes en hématologie et qui restent du domaine du caryotype. La classification OMS des hémopathies est d'ailleurs basée en partie sur le caryotype.
Certaines puces en développement permettent de coupler la recherche de mutations, le *copy number* (équivalent du SNP array mais sur quelques segments ciblés et la recherche de translocations). Ces technologies seront sans doute les plus utilisées à l'avenir, à moins que le *Whole Exome Sequencing* devienne la règle pour tous les patients.

Références

1. **Tjio JH, Levan A**. *The chromosome number of man. Hereditas. 42 :1-16. 1956.*
2. **Nowell P**., *Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science. 1960;132:1497.*
3. **Rowley J**.*D. Ph1-positive leukaemia, including chronic myelogenous leukaemia. Haematol. 1980;9:55–86.*
4. **Groffen J**., *et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. Cell. 1984;36:93–99.*
5. **Heim S and Mitelman F**. *Cancer Cytogenetics. New York: Alan R. Liss, 1987; 2nd printing 1989.*
6. **Manolov G, Manolova Y** *(1972): Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas. Nature 237:33–34.*
7. **Kearney L, Horsley** *SW (2005): Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. Chromosoma 114:286–294.*
8. **Hahn W**.*C., Weinberg R.A. Rules for making human tumor cells. N. Engl. J. Med. 2002, 347, 1593–1603.*
9. **Ambros IM, Brunner C, Abbasi R, Frech C, Ambros P**.*F. Ultra-High Density SNParray in Neuroblastoma Molecular Diagnostics. Front Oncol. 2014; 4: 202.*
10. **Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB et al**. *Genome-wide analysis of genetic alte rations in acute lymphoblastic leukaemia. Nature 2007, 446, 758–764.*
11. **Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, Yamatomo G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, et al**. *Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. Blood 2008, 111, 776–784.*
12. **Gondek LP, Tiu R, Haddad AS, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP**. *Single nucleotide polymorphism arrays complement metaphase cytogenetics in detection of new chromosomal lesions in MDS. Leukemia 2007, 21, 2058–2061.*
13. **Tiu RV, Gondek LP, O'Keefe CL, Huh J, Sekeres MA, Elson P, McDevitt MA, Wang XF, Levis MJ, Karp JE et al**. *New lesions detected by single nucleotide polymor phism array-based chromosomal analysis have important clinical impact in acute myeloid leukemia. J. Clin. Oncol. 2009, 27, 5219–5226.*
14. **Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, Szpurka H, Huang Y, Traina F, Visconte V, Sugimoto Y, Prince C, O'Keefe C et al**. *Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, AND DNMT3A. Blood 2011, 118, 3932–3941.*
15. **Otto C, Giefing M, Massow A, Vater I, Gesk S, Schlesner M, Richter J, Klapper W, Hansmann ML, Siebert R, et al**. *Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical hodgkin lymphoma. Br. J. Haematol. 2012, 157, 702–708.*