

EMPLEO DE NUEVAS TECNOLOGÍAS EN EL DIAGNÓSTICO ONCOHEMATOLÓGICO

Inés Gómez Seguí^a

Fechas de recepción y aceptación: 20 de abril de 2012, 12 de mayo de 2012

Resumen: En las últimas décadas, gracias al empleo de nuevas tecnologías como los microarrays o la secuenciación masiva, hemos presenciado un notable avance en el conocimiento del origen y la evolución de las neoplasias hematológicas. El presente artículo pretende analizar el papel que desempeñan estas tecnologías en el campo de la investigación oncohematológica y su potencial aplicación en la práctica clínica habitual.

Palabras clave: diagnóstico, oncohematología, microarrays, secuenciación masiva.

Abstract: Thanks to the use of new technologies such as microarrays or next-generation sequencing, we have witnessed over the last decade a huge improvement in the knowledge of the origin and evolution of hematologic neoplasms. This article analyses the role of these technologies in the hemato-oncology research, as well as its potential application in the routine clinical practice.

Keywords: diagnosis, hemato-oncology, microarrays, next-generation sequencing.

INTRODUCCIÓN

A principios del siglo pasado, el diagnóstico de las neoplasias hematológicas se realizaba básicamente con el examen al microscopio del frotis de sangre periférica, de médula

^a Department of Translational Hematology and Oncology Research, Taussig Cancer Center, Cleveland, OH, USA.

E-mail: gomez@ccf.org.



ósea y/o del ganglio linfático, apoyados en la exploración y anamnesis del paciente. En 1960, Hungerford y Howel describieron por primera vez la presencia de un diminuto cromosoma en las células sanguíneas de los pacientes con leucemia mieloide crónica como causante de esta enfermedad, el “cromosoma Philadelphia” (1). Trece años después se supo que este cromosoma supernumerario era fruto de una traslocación entre el brazo largo del cromosoma 9 y el brazo largo del cromosoma 22 (2). En 1983 se describió el gen de fusión fruto de esta traslocación, *BCR-ABL*, y su proteína quimérica correspondiente, que resulta ser una proteína con actividad tirosín-cinasa constitutivamente activada (3). En poco tiempo la industria desarrolló fármacos inhibidores de tirosín-cinasas que han demostrado una enorme eficacia en el control de la proliferación desmesurada de las células mieloides en esta enfermedad y que son, hoy en día, el tratamiento de elección de primera línea (4).

Esta es la historia de una de las primeras “terapias diana” de la historia de la medicina y es la trayectoria deseada para toda enfermedad. Otro ejemplo similar en hematología es la leucemia promielocítica aguda, un subtipo de leucemia mieloblástica caracterizada por la traslocación $t(15;17)(q24;q21)$ y su correspondiente gen de fusión *PML-RARA*. En este caso, se utiliza el ácido transretinoico para desbloquear el *stop* madurativo que produce esta alteración en los promielocitos. La incorporación de este fármaco al tratamiento de esta enfermedad ha conseguido que se obtengan tasas de curación en torno al 90% de los pacientes, convirtiéndola en la leucemia aguda de mejor pronóstico en la edad adulta (5).

Estos dos ejemplos resaltan la importancia de conocer cuáles son los mecanismos por los que se desarrolla una determinada neoplasia y de refinar el diagnóstico de cada una de las subentidades, ya que cada lesión génica dará lugar a un determinado fenotipo y a una potencial diana terapéutica.

En este sentido, el refinamiento que ha experimentado el diagnóstico hematológico en las últimas décadas ha sido notable. En 1976, se publicó el primer sistema de clasificación internacional para las neoplasias hematológicas, la clasificación FAB (French-American-British), realizada por un comité de expertos según los hallazgos citomorfológicos y las primeras alteraciones citogenéticas conocidas (6). Desde entonces, gracias a la mejora tecnológica y a su incorporación a la batería diagnóstica, se ha perfeccionado en gran medida esta clasificación, como refleja la Organización Mundial de la Salud en su última clasificación de tumores hematológicos publicada en el 2008, en la cual la caracterización de cada subentidad refleja más bien el origen biológico de esta (7).

El presente artículo pretende analizar el papel que desempeñan las nuevas tecnologías en el campo de la investigación oncohematológica y su potencial aplicación en la práctica clínica habitual.



TECNOLOGÍA CONVENCIONAL

Para realizar un correcto diagnóstico a día de hoy, el laboratorio de oncohematología emplea las siguientes técnicas:

- El microscopio óptico, con diversas tinciones para observar la morfología de las células tumorales (tinciones de Wright y May-Grünwald-Giemsa), determinar los depósitos de hierro (tinción de Perls) o elucidar la estirpe celular [tinción de mieloperoxidasa (MPO) para las células mieloides, tinción de Schiff-ácido periódico (PAS) para la serie linfoide y tinción alfa-naftil-acetato-esterasa (ANAE) con inhibición de fluoruro sódico para la serie monocítica]. Sin embargo, el citómetro de flujo es mucho más preciso a la hora de determinar la estirpe y el grado de maduración celular, por lo que algunas de estas técnicas se emplean con menor frecuencia actualmente.
- El citómetro de flujo, que permite medir la dispersión que genera cada célula al pasar, de una en una, por un haz de luz, generando una medición del tamaño y complejidad celular. Además, utilizando anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo dirigidos contra algún antígeno celular, se puede precisar qué tipo de célula estamos estudiando, su estadio de diferenciación, de activación inmunológica, la mono o policlonalidad, etc. Tradicionalmente, se han utilizado los citómetros con captación de 4 espectros de luz diferentes, que permitían la medición simultánea de cuatro antígenos en una célula. En los últimos años, los citómetros de 6 y 8 colores se están incorporando al diagnóstico, ya que permiten caracterizar mejor la célula tumoral, algo necesario especialmente en la detección de la enfermedad mínima residual (EMR), medición muy útil en la monitorización y medición de respuesta al tratamiento de los pacientes. Otra de las aplicaciones del citómetro es la separación de un determinado tipo celular, de manera que se enriquece la muestra sobre la que se realizan estudios citogenéticos o de secuenciación. Es el caso del mieloma múltiple, enfermedad en la que el porcentaje de células plasmáticas puede no ser muy elevado, de manera que, sin previa selección celular, no se detectan anomalías citogenéticas.
- El cariotipado mediante citogenética convencional, habitualmente de bandas G, complementado con hibridación in situ con fluorescencia (FISH). La observación de los cromosomas en el momento de la metafase nos informa de la dotación cromosómica de las células cultivadas. A diferencia de los tumores sólidos, las traslocaciones son hallazgos relativamente frecuentes en las neoplasias hematológicas. Las aneuploidías (ganancias o pérdidas de cromosomas o de parte de ellos) son también frecuentes, pero en general no con la complejidad con la que

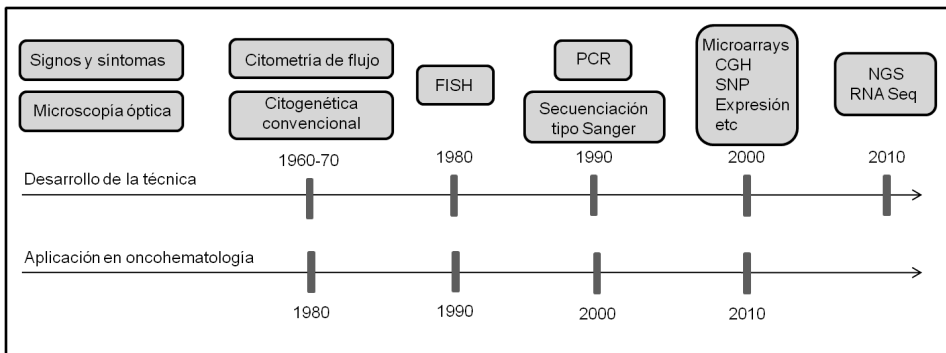


se encuentran en los cánceres sólidos. Una de las limitaciones de esta técnica es, además de la necesidad de conseguir células en división, que la anomalía debe ser superior a 20-30 megabases, en los mejores casos. Para solventar este problema, se utilizan sondas con fluorescencia (FISH) que hibridan con regiones en las que se encuentran alteraciones recurrentemente, aumentando la sensibilidad y resolución de la citogenética.

- Por último, las técnicas de biología molecular, básicamente derivadas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permiten detectar, entre otras alteraciones, genes de fusión fruto de una traslocación. De hecho, con la incorporación de la PCR en tiempo real o RT-PCR, se consigue realizar una medición no solo cualitativa sino también cuantitativa, lo que ha sido muy útil para la monitorización de la respuesta al tratamiento y detección precoz de recaídas en patologías con genes de fusión como BCR-ABL o PML-RARA. Para la detección de mutaciones recurrentes se emplea secuenciación convencional tipo Sanger o, en el caso de mutaciones canónicas, técnicas más sencillas y económicas, como la ARMS-PCR o PCR alelo-específica.

Estas técnicas, que revolucionaron hace unas décadas el mundo de la biología, se han ido incorporando con mayor o menor rapidez al diagnóstico hematológico, tal y como se refleja en la figura 1.

FIGURA 1
Cronograma de la aparición de nuevas tecnologías y su posterior aplicación al diagnóstico oncohematológico



FISH: Hibridación in situ con fluorescencia. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. CGH: Hibridación genómica comparada. SNP: polimorfismo de un único nucleótido. NGS: secuenciación de nueva generación. RNA Seq: secuenciación masiva del transcriptoma.



Sin embargo, son muchos los casos en los que no se detecta ninguna de las anomalías recurrentes conocidas, o aunque sí se demuestren desconocemos si existen otras lesiones que contribuyan al fenotipo neoplásico. En este sentido, los avances tecnológicos han buscado dar respuesta a los principales inconvenientes de las técnicas convencionales a la hora de dilucidar la patogénesis tumoral: por un lado, la baja resolución de la citogenética convencional y, por otro, la detección exclusiva de alteraciones conocidas con la FISH o la PCR.

NUEVAS TECNOLOGÍAS

Microarrays de SNP

La primera técnica de alto rendimiento que se ha introducido con facilidad en el campo de la investigación hematológica es la técnica de microarrays. Un array consiste en un soporte sólido sobre el que se han fijado millones de sondas específicas, donde se hibridará la muestra de estudio. Existen diversos tipos de arrays. Los que han encontrado mayor aceptación en hematología son los arrays de SNP (polimorfismo de un único nucleótido), ya que permiten realizar un “cariotipado molecular” del paciente, esto es, definir las variaciones en el número de copias (CNV), pérdidas o ganancias, que han ocurrido en la transformación neoplásica. Además, y como ventaja adicional a los arrays de CGH (hibridación genómica comparada) empleados previamente, los arrays de SNP permiten detectar regiones de disomía uniparental (UPD), también llamadas regiones de pérdida de heterocigosidad sin cambios en el número de copias (CNLOH). La UPD es un mecanismo de reparación que posee la célula para compensar las pérdidas de material genómico, de manera que se duplica la hebra no perdida para volver a conseguir una dotación diploide. Sin embargo, se ha visto que algunas mutaciones puntuales aprovechan este mecanismo para establecerse en homocigosidad y causar patología. Algunos ejemplos de mutaciones halladas en regiones de UPD en neoplasias hematológicas son las mutaciones del gen *JAK2* en el cromosoma 9p (8), *TET2* en 4q (9) o *EZH2* en 7q (10). Es importante resaltar que existen variaciones en el número de copias y UPD en sujetos sanos y que representan polimorfismos hallados con mayor o menor frecuencia en la población. Para establecer que una variación es somática, es decir, adquirida en el clon neoplásico, la mejor metodología es el análisis en paralelo de muestra de tejido sano (biopsia cutánea, por ejemplo). Sin embargo, cuando esto no es posible, se pueden utilizar las bases de datos de CNV conocidas, como la *Database of Genomic Variations* (<http://projects.tcag.ca/variation/>) para descartar que la variación encontrada haya sido

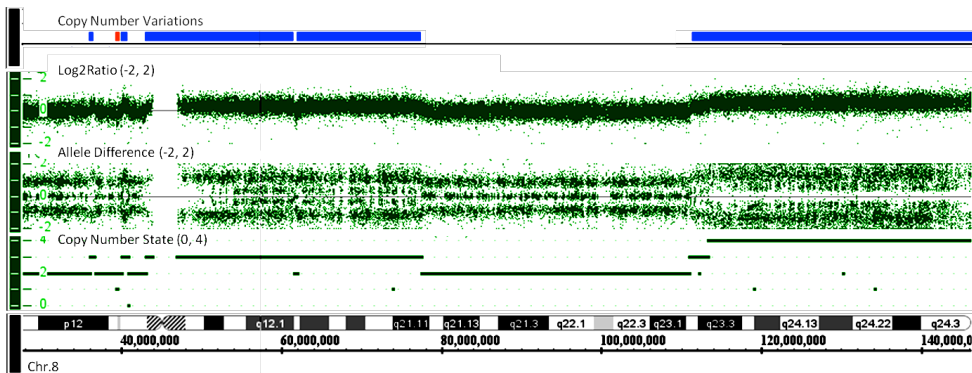


descrita en población sana. Para las UPD, se sabe que aquellas teloméricas y de gran tamaño (>25Mb) es muy probable que hayan sido adquiridas en el proceso tumoral, mientras que las intersticiales y <25 Mb se encuentran con frecuencia en sujetos sanos y es probable que sean de la línea germinal (11).

En la figura 2 se representa el caso de una leucemia mieloblástica aguda en la que el estudio citogenético no reveló ninguna anomalía. Sin embargo, el análisis mediante array de SNP mostró una gran desestructuración en el cromosoma 8, que contenía varias regiones de ganancias de uno de los alelos y una gran región telomérica de tetrasomía uniparental (UPT), es decir, cuatro copias de un mismo alelo. Si bien la trisomía 8 es una alteración recurrente en prácticamente todas las neoplasias mieloides, no es frecuente encontrar UPT ni ganancias parcheadas.

FIGURA 2

Representación gráfica de las sondas de SNP y de CN (número de copias) de parte del cromosoma 8 en un paciente con leucemia mieloblástica aguda cuya muestra ha sido hibridada en el array SNP 6.0 de Affymetrix



Las alteraciones en el número de copias se marcan en la primera línea en azul (ganancias), o en rojo (pérdidas) en la segunda línea, expresada como log₂, donde la dotación diploide estaría en el eje del 0, y en la cuarta línea como estado del número de copias, donde la normalidad sería 2. En la tercera línea se representa la intensidad de la señal para las sondas de SNP, llamada diferencia alélica, que representa el estado homocigoto (AA o BB) u heterocigoto (AB) de cada loci. En esta imagen se observa una triploidia parcheada a lo largo del cromosoma 8, concretamente en 8p12, en 8p11 y en 8p11.21q21.1. Curiosamente, la ganancia observada en la porción distal del brazo largo del cromosoma, además de ser tetraploide, ha perdido la heterocigosidad, tal y como refleja la ausencia de puntos en la línea central de la diferencia alélica, constituyendo una tetrasomía uniparental (UPT).



Microarrays de expresión y otros arrays

Los microarrays de expresión génica son arrays en los que se hibrida cDNA (RNA retrotranscrito) para estudiar el conjunto de genes que se están expresando en un tipo celular concreto en una situación determinada, esto es, el transcriptoma. Han sido también muchas las publicaciones derivadas de estos estudios en el campo de la hematología, la mayoría de ellas encaminadas a describir el perfil de expresión de una determinada patología que lo diferencie del tejido sano y de otras patologías. En el caso de la leucemia mieloblástica aguda con t(15;17), t(8;21) o inv(16), la leucemia linfática crónica o la leucemia linfoblástica aguda pro-B con t(11q23) se ha encontrado una firma característica e inequívoca con 100% de sensibilidad y especificidad mediante el empleo de estos arrays (12), lo que significa que estas alteraciones definen subentidades bien diferenciadas dentro de las leucemias. Si bien esta técnica sería potencialmente una buena herramienta para incorporar en el diagnóstico oncohematológico, algunos inconvenientes hacen que aún hoy se utilice tan solo con fines de investigación, como por ejemplo la necesidad de disponer de una cohorte de validación para extrapolar la expresión de cada gen, la relativa falta de estandarización interlaboratorio y la escasa traslación clínica de los hallazgos a día de hoy (13). Sin embargo, su utilidad en la definición de nuevas subentidades ha sido y es notable (14) y ofrece excelentes resultados a mejor precio que la RNA-Seq o secuenciación de nueva generación de RNA.

Existen otros tipos de arrays que están aportando grandes contribuciones a la oncohematología, especialmente aquellos que estudian la epigenética, es decir, aquellos factores que modifican la transcripción del ADN. Algunos de ellos son los arrays de microRNAs (que miden la expresión de estas pequeñas moléculas silenciadoras), los arrays de metilación (que determinan el grado de metilación de cada gen, estableciendo si está silenciado o no epigenéticamente por este mecanismo) o los Chip-on-Chip (que miden la interacción entre proteínas y los sitios de unión al ADN, como los factores de transcripción, islas promotoras, etc.). El hecho de que se disponga de fármacos hipometilantes que están ya en uso en diversas neoplasias mieloides con relativo éxito hace pensar que en un futuro este tipo de estudios puedan tener cabida en el diagnóstico rutinario (15).

Secuenciación de nueva generación (NGS)

Aunque la secuenciación tipo Sanger sigue siendo el *gold standard* para la detección de mutaciones, las nuevas tecnologías de secuenciación masiva han conseguido



mejorar en eficiencia y eficacia a esta técnica, ya que permiten secuenciar en paralelo unos 500.000 fragmentos de DNA a un coste al menos cien veces menor y en tan solo pocos días (16). Con los primeros individuos secuenciados, se vio que la presencia de variaciones en el genoma humano es enorme, no solo de SNP o CNV, de las que ya hemos hablado anteriormente, sino también pequeñas inserciones, deleciones e incluso inversiones y traslocaciones (17), lo que obliga, cuando se trabaja en cáncer, a emplear de manera rutinaria una muestra pareada de tejido sano. Hace apenas cinco años se publicó el primer genoma completo de un individuo con cáncer, y este fue el de una leucemia mieloblástica aguda (LMA) (18). Tras él han sido muchas las publicaciones que han aportado nuevas mutaciones recurrentes en el campo de la LMA, como por ejemplo *DNMT3* (19), *IDH1* (20) y *BCOR* (21) y en otras patologías hematológicas como la leucemia linfática crónica (22) o los síndromes mielodisplásicos (23), por ejemplo. Otro abordaje más económico y que ofrece muy buenos resultados con menor dificultad de análisis es la secuenciación masiva exómica (*Whole Exome Sequencing*, WES), esto es, secuenciar tan solo la parte que se transcribe de cada gen, los exones. O incluso se puede seleccionar un grupo de genes de conocido interés para escrutarlos en profundidad en una cohorte amplia de pacientes: la llamada secuenciación masiva dirigida. Esta última técnica parece haber sido el primer uso traslacional de NGS al establecer un determinado pronóstico para cada uno de los genes estudiados, de manera que pudiera ser la primera versión aplicable al diagnóstico hematológico (24).

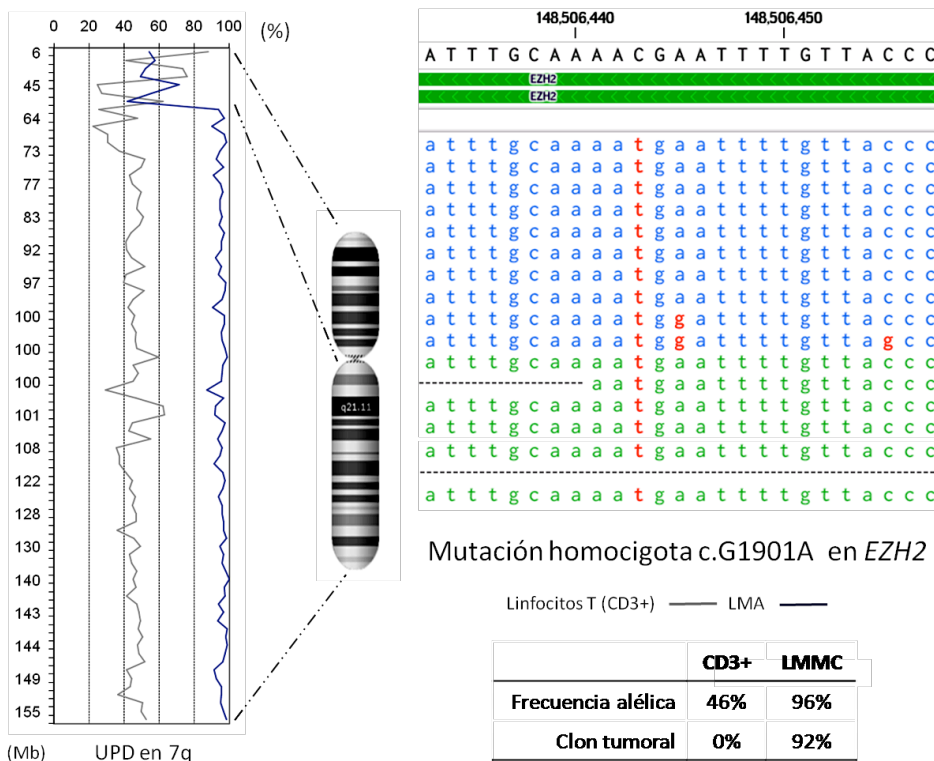
Además de la detección de nuevas mutaciones, la NGS se puede utilizar para establecer el tamaño del clon neoplásico y trazar el modelo de adquisición de eventos que conllevan progresión de enfermedad (25) (26). La modalidad de NGS que permite este análisis con precisión es la *deep-sequencing* o secuenciación en profundidad, con más de 1.000 lecturas para cada secuencia. Los potenciales usos de esta aplicación, además de conocer la fisiopatología neoplásica, son la predicción precoz de evolución hacia leucemia aguda de las neoplasias crónicas o establecer la parte del clon que responderá a una terapia dirigida y la parte que potencialmente quedará sin tratar.

También es posible utilizar los datos generados por NGS para cariotipar a un paciente, si la cobertura y profundidad de lecturas es suficiente. Básicamente, se utilizarían las lecturas de SNP a modo de un microarray. La resolución de este cariotipado es menor que la de un array y no posee parámetro cuantitativo, por lo que no es la técnica de elección si es esa la finalidad del estudio, pero puede ayudar a interpretar correctamente el espectro de alteraciones del caso estudiado sin la necesidad de emplear más recursos. Es el caso de la figura 3, en la que se presenta una mutación en *EZH2* en estado homocigoto debido a la ocurrencia de una UPD en el brazo largo del cromosoma 7 en un paciente con leucemia mielomonocítica crónica.



FIGURA 3

Mutación c.G1901A en el gen EZH2 localizado en el cromosoma 7q en el caso de un paciente con leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) con cariotipo normal en el estudio citogenético convencional



En la imagen de la izquierda se representa la frecuencia alélica de los SNP heterocigotos hallados en NGS. La muestra de línea germinal (linfocitos T CD3+) contiene estos SNP en una media de 46% de lecturas (heterocigosidad), mientras que la muestra tumoral contiene estos SNP en un 96% de las lecturas, lo que se traduce en una pérdida de heterocigosidad en el 92% de las células del clon tumoral, probablemente una UPD a lo largo del brazo largo del cromosoma 7. La secuenciación reveló una mutación en el gen EZH2, que gracias a la UPD se había establecido en homocigosidad.

RNA-Seq y otras modalidades de secuenciación masiva

La RNA-Seq o secuenciación masiva del transcriptoma permite obtener, con una elevada cobertura y resolución, información sobre la expresión diferencial de genes, inclu-



yendo las diferentes isoformas de cada uno de ellos, RNA no codificantes, mutaciones postranscripcionales o genes de fusión. Chip-Seq o secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina representa la evolución de los Chip-on-Chip, permitiendo una visión más amplia y robusta de las proteínas que interaccionan con el DNA para regular la expresión génica. Ambas técnicas se están aplicando en la investigación oncohematológica (27) (28), si bien su complejidad y precio hacen que su uso aún no sea tan extendido como otras técnicas.

DISCUSIÓN

En menos de una década, las nuevas tecnologías comentadas en este artículo han permitido una increíble mejora en el conocimiento de los mecanismos que conllevan la aparición de cánceres hematológicos con la descripción de nuevas rutas alteradas como por ejemplo el spliceosoma (23) o la epigenética (19). La combinación de todas estas técnicas de alto rendimiento nos permite estudiar el genoma, el transcriptoma y el epigenoma de una misma enfermedad, con lo que se consigue un abordaje integral de la célula neoplásica. Se definen nuevos subgrupos diagnósticos, lo que conlleva una menor heterogeneidad a la hora de estudiar respuestas a tratamientos. Se descubren potenciales dianas terapéuticas para las que la industria farmacéutica puede diseñar fármacos dirigidos. Se pueden monitorizar cuantitativamente las lesiones de cada individuo para controlar evolutivamente las respuestas a la terapia y detectar de manera precoz las recaídas.

Sin embargo, estas tecnologías aún no cumplen todos los requisitos necesarios para incorporarse a la batería diagnóstica en oncohematología. La necesidad de softwares bioinformáticos de difícil manejo, la falta de estandarización intra e interlaboratorio de los resultados obtenidos y la aún no establecida importancia pronóstica, diagnóstica y terapéutica de las alteraciones halladas son algunas de ellas.

No es previsible, al menos en un futuro próximo, que las técnicas actuales de diagnóstico sean sustituidas por las comentadas en este artículo. Hoy por hoy, la secuenciación Sanger, la PCR cuantitativa y la citogenética siguen siendo las técnicas de referencia sobre las que se validan estas nuevas tecnologías. Sin embargo, el abaratamiento de estas y la creación de softwares accesibles ya están propiciando el empleo de algunas de ellas como apoyo al diagnóstico tradicional en aquellos casos complejos. Además, es probable que en los próximos años se diseñen paneles específicos de mutaciones analizados por NGS o arrays "a la carta" para ver perfiles de expresión y se empleen, paralelamente a la citogenética, los arrays de SNP para el cariotipado de alta resolución.



BIBLIOGRAFÍA

1. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960; 132: 1497.
2. Rowley JD. A new consistent abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature*. 1973; 243: 290-293.
3. Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR, *et al.* Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukemia. *Nature*. 1983; 306: 239-242.
4. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001; 344(14): 1031-7.
5. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH *et al.* Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2009; 113(9): 1875-91.
6. Bennett J, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick H *et al.* "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group". *Br J Haematol*. 1976. 33 (4): 451-8.
7. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th edn. IARC: Lyon, France, 2008.
8. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR *et al.* A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352(17): 1779-90.
9. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, *et al.* Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009; 360(22): 2289-301.
10. Jerez A, Sugimoto Y, Makishima H, Verma A, Jankowska AM, Przychodzen B *et al.* Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: clinical associations and genomic pathogenesis. *Blood*. 2012; 119: 6109-17.
11. O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood*. 2010; 115(14): 2731-9.
12. Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S, Dugas M, Hiddemann W, Kern W, *et al.* Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. *Blood*. 2005; 106(4): 1189-98.
13. Kohlmann A, Kipps TJ, Rassenti LZ, Downing JR, Shurtleff SA, Mills *et al.* An international standardization programme towards the application of gene expression profiling in routine leukaemia diagnostics: the Microarray Innovations in LEukemia study prephase. *British Journal of Haematology*. 2008; 142: 802-7.



14. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, Tzankov A *et al.* Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia*. 2012. [Epub ahead of print]
15. Amir T. Fathi and Omar Abdel-Wahab. “Mutations in Epigenetic Modifiers in Myeloid Malignancies and the Prospect of Novel Epigenetic-Targeted Therapy”. *Adv Hematol*. 2012; 2012: 469-592.
16. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008; 26(10): 1135-45.
17. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, *et al.* The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature*. 2008; 452(7189): 872-6.
18. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K *et al.* DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008 Nov 6; 456(7218): 66-72.
19. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE *et al.* DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010; 363(25): 2424-33.
20. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K *et al.* Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009 Sep 10; 361(11): 1058-66.
21. Grossmann V, Tiacci E, Holmes AB, Kohlmann A, Martelli MP, Kern W *et al.* Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*. 2011;118 (23): 6153-63.
22. Doménech E, Gómez-López G, González-Peña D, López M, Herreros B, Menezes J *et al.* New mutations in chronic lymphocytic leukemia identified by target enrichment and deep sequencing. *PLoS One*. 2012; 7(6): e38158.
23. Graubert TA, Shen D, Ding L, Okeyo-Owuor T, Lunn CL, Shao J *et al.* Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2011; 44(1): 53-7.
24. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J *et al.* Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012; 366(12): 1079-89.
25. Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K *et al.* Clonal Architecture of Secondary Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2012; 366: 1090-8.



26. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS *et al.* Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012; 481(7382): 506-10.
27. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD *et al.* Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011; 476(7360): 298-303.
28. Seitz V, Butzhammer P, Hirsch B, Hecht J, Gütgemann I, Ehlers A *et al.* Deep sequencing of MYC DNA-binding sites in Burkitt lymphoma. *PLoS One*. 2011; 6(11): e26837.



