

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Dottorato di Ricerca in
Ematologia Clinica e Sperimentale ed Ematopatologia
Ciclo XXI

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: Med08

**ANALISI GENETICO-MOLECOLARE DEI
LINFOMI A CELLULE T PERIFERICHE**

Presentata da: Dr.ssa Anna Gazzola

Coordinatore del Dottorato
Chiar.mo Prof. Stefano A. Pileri

Relatore
Gent.mo Dott.
Pier Paolo Piccaluga

Esame finale anno 2009

INDICE

<u>INTRODUZIONE</u>	pag 4
Linfomi a cellule T periferiche	pag 5
Profilo fenotipico dei PTCL/NOS	pag 8
Profilo genico dei PTCL/NOS	pag 10
<i>PDGFRα</i>	pag 14
Nuclear factor-kappa B	pag 17
<i>CDKN1B</i>	pag 19
<i>PTEN</i>	pag 21
Obiettivi dello studio	pag 23
<u>MATERIALI E METODI</u>	pag 24
Gene expression profiling	pag 25
Tissue microarrays	pag 26
Analisi immunohistochimica	pag 26
Estrazione del DNA	pag 28
PCR del gene di controllo <i>PLZF</i>	pag 29
PCR e sequenziamento	pag 29
Analisi statistiche	pag 31
Elisa (Enzyme – linked immuno assay)	pag 32
Neutralizzazione del PDGF-AA	pag 33
Valutazione del PDGFR α e del p-PDGFR α	pag 33
Identificazione di miRNA	pag 34
Estrazione di RNA e Real-time PCR	pag 35
Linea cellulare, nucleoporazione e immunofluorescenza	pag 35

<u>RISULTATI</u>	pag 37
<i>PTEN</i> è fisiologicamente espresso nei PTCL/NOS	pag 38
<i>CDKN1B/p27</i> non sembra essere de-regolato nel PTCL/NOS	pag 41
L'espressione di molecole NF-kB correlate differenzia i PTCL/NOS in due sottogruppi	pag 46
RELA, RELB e REL sono frequentemente down-regolati nel PTCL/NOS	pag 48
Correlazione tra l'espressione di NF-kB e l' overall survival	pag 50
<i>PDGFRα</i> è over-espresso e costantemente attivato nel PTCL/NOS	pag 52
Il locus genico del <i>PDGFRα</i> non è alterato	pag 53
Il miRNA-152 è implicabile nell'overespressione del <i>PDGFRα</i>	pag 55
Loop autocrino: probabile causa dell'alterato stato di attivazione del <i>PDGFRα</i>	pag 59
<u>DISCUSSIONE</u>	pag 65
PTEN e p27	pag 67
Pathway di NF-kB	pag 70
<i>PDGFRα</i>	pag 72
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	pag 77
<u>APPENDICE</u>	pag 85
Appendice 1	pag 86
Appendice 2	pag 92

INTRODUZIONE

Linfomi a cellule T periferiche

I linfomi a cellule T periferiche e a cellule NK (PTCLs) rappresentano circa il 12% delle neoplasie linfoidi. La loro incidenza varia a seconda della posizione geografica e dell'origine etnica della popolazione: in Asia, in alcuni stati degli USA e nel bacino del Mar dei Caraibi, infatti, risulta più elevata in relazione alla diffusione endemica del virus onco-trasformante HTLV-1 ¹.

I PTCLs costituiscono un gruppo eterogeneo di neoplasie: la classificazione REAL/WHO li distingue in forme specifiche e non specifiche (NOS: not otherwise specified; NAS: non altrimenti specificabili); mentre le prime sono entità ben definite, ma piuttosto rare, le seconde sono relativamente più frequenti e non possono essere suddivise in ulteriori sottogruppi in base alla morfologia, al fenotipo ed alle tradizionali indagini molecolari ^{2, 3, 4}.

I PTCL/NOS costituiscono il 40-50% dei linfomi T periferici e il 3.7% di tutti i linfomi non Hodgkin. L'esordio della malattia avviene frequentemente nella VI-VII decade di vita, anche se sono stati riportati in letteratura casi pediatrici, e colpisce in eguale percentuale uomini e donne ^{5, 6}.

I pazienti possono mostrare un coinvolgimento nodale o extranodale, rispettivamente nel 22% e nel 16% dei casi, ma più frequentemente (62%) vi è un contemporaneo interessamento a livello sia nodale che extranodale ^{5, 6}. Al momento della diagnosi, la malattia è spesso disseminata (stadio III-IV) con linfadenopatie diffuse, superficiali e profonde, infiltrazione epatica e/o splenica, interessamento extranodale (con localizzazione midollare e cutanea) e possibile sindrome leucemica ^{5, 6}.

Il 45% dei pazienti mostra, come sintomi e segni sistemici, prurito diffuso, febbre, astenia e sudorazioni notturne; il Performance Status è in genere scadente. Relativamente frequente è l'insorgenza di una sindrome emofagocitica con febbre, epatosplenomegalia e pancitopenia ^{6, 7}.

Laboratoristicamente, si possono riscontrare ipereosinofilia, ipergammaglobulinemia policlonale e test di Coombs positivo; è possibile l'associazione con anemia emolitica autoimmune, malattie autoimmuni tipo Lupus Eritematosus Sistemico (LES), Artrite Reumatoide (AR) e tiroidite di Hashimoto ⁸.

Dal punto di vista morfologico, si osserva un diffuso sovvertimento della struttura linfoghiandolare o tissutale da parte di un infiltrato pleomorfo e polimorfo (figura 1). I nuclei hanno profilo irregolare, inciso, cerebroide, ad embrione od a medusa e possono essere ipercromatici o nucleolati, mentre i citoplasmici sono relativamente ampi e più spesso chiari⁹. Si può inoltre apprezzare la presenza di numerose mitosi, di venule ad endotelio alto e di elementi di grandi dimensioni, polinucleati, simil Reed-Sternberg^{10, 11}.

I PTCL/NOS si caratterizzano inoltre per un back-ground infiammatorio polimorfo costituito da piccoli linfociti, eosinofili, plasmacellule e clusters di istiociti epitelioidi che a volte sono particolarmente abbondanti (linfoma di Lennert)^{8,9}.

Dal punto di vista fenotipico, i markers T-associati sono generalmente positivi: una caratteristica dei PTCL/NOS è, tuttavia, la presenza di un fenotipo aberrante in circa l'80% dei casi, con perdita di uno o più degli antigeni espressi dai linfociti T normali^{2, 4}.

Generalmente tali tumori rivelano riarrangiamento clonale dei geni che codificano per il T-cell receptor (TCR); infatti la probabilità di riscontrare un riarrangiamento clonale del TCR γ è pari al 90% circa¹².

Più dell'80% dei casi è caratterizzato dalla presenza di un cariotipo anormale e/o complesso compatibile con evoluzione clonale. Alcuni studi di CGH (comparative genomic hybridization) hanno rilevato una serie di anomalie ricorrenti: delezioni di 13q, 6q, 9q, 10q, 12q, 5q e amplificazioni di 7q, 17q, 16q, 8q, 9q, 3p, 1q, 11q¹³, ma fino ad oggi non sono state identificate alterazioni geniche specifiche della patogenesi dei PTCL/NOS¹³. Del tutto eccezionali, sono gli studi di gene expression profiling condotti fino ad oggi nell'ambito dei linfomi T: essi infatti, hanno principalmente riguardato le forme linfoblastiche e la micosi fungoide^{14, 15}.

I PTCL/NOS sono i più aggressivi tra i LNH; i pazienti rispondono scarsamente alla terapia, con frequenti recidive, cosicché la relapse free survival e la overall survival dopo 5 anni di follow-up sono, rispettivamente, del 26% e del 20%^{5, 9, 6, 16, 17, 18, 15}. La morfologia, lo stadio e l'IPI (international prognostic index) correlano scarsamente con la prognosi. Solo recentemente, è stato proposto uno score clinico di rischio, che sembra definire diversi sottogruppi di pazienti¹⁵. Esso, tuttavia, non consente

certamente di identificare i meccanismi di farmaco-resistenza, né di disegnare nuove strategie terapeutiche ^{15, 19}.

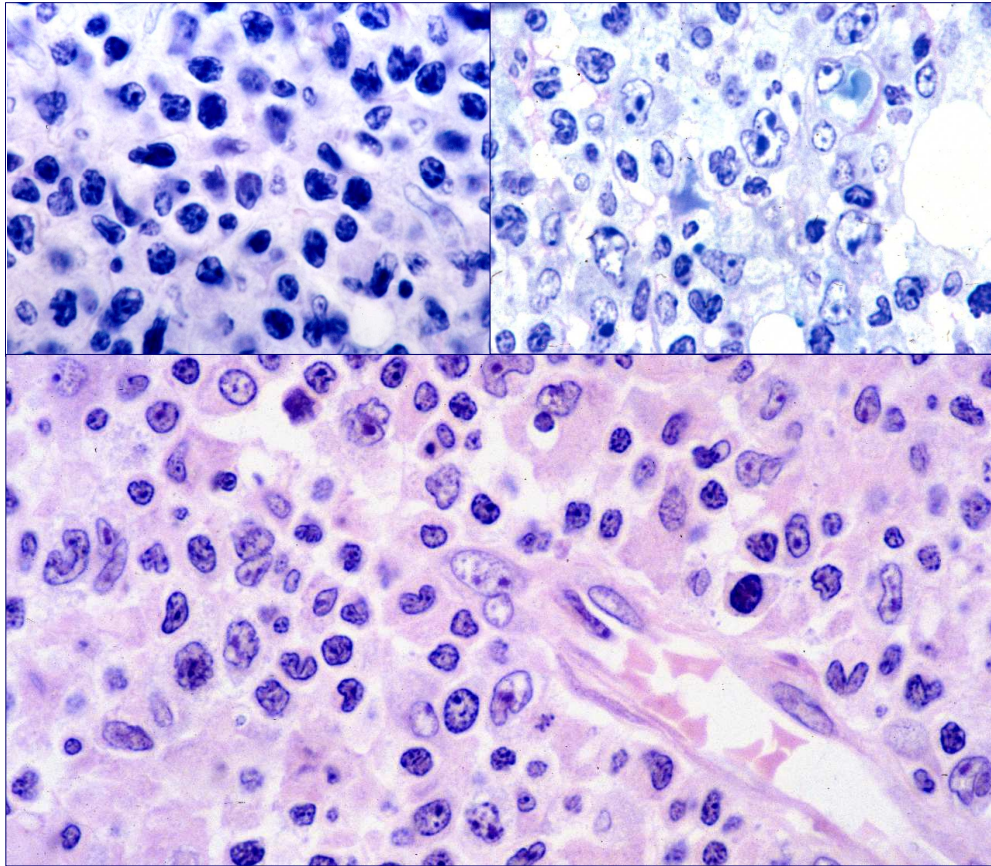


Figura 1

Variabilità di forma e dimensioni (dalla piccola alla media taglia) delle cellule neoplastiche di PTCL/NOS ^{9, 20}.

Profilo fenotipico dei PTCL/NOS

Dal punto di vista fenotipico i PTCL/NOS risultano generalmente positivi per markers T-associati; l'anticorpo β F1, diretto verso il T cell receptor β , infatti, risulta positivo nel 96% dei casi. Tuttavia, l'80% dei casi si presenta con un fenotipo aberrante caratterizzato dalla perdita di uno o più degli antigeni espressi dai linfociti T normali⁴. Gli antigeni più frequentemente mancanti sono il CD5 e il CD7²¹. In sede nodale, il CD4 è ordinariamente più espresso rispetto al CD8 (46% vs 15%)^{18, 22, 23, 24, 7} anche se in un ampio numero di casi (55%) i due marcatori possono essere entrambi presenti od assenti (casi double-positive o double-negative)⁹.

L' anticorpo CD56, la cui presenza suggerisce un fenotipo maligno, è riscontrato in circa il 5% dei casi^{19, 25}, mentre il CD57 nel 10%, anche se quest'ultimo valore sembra aumentare con l'età del paziente^{19, 26}.

Il CD52 è presente, in bassi livelli, nel 60% dei casi; il CD30 può essere espresso dagli elementi neoplastici di grande taglia e se questi ultimi predominano, la diagnosi differenziale con gli ALCL ALK⁻ diviene problematica⁹.

L'espressione di molecole citotossiche, come il TIA-1 e il Granzyme B, è frequente nelle forme extranodali e rara in quelle nodali²⁷. L'EBV è in genere assente, anche se nel 5% dei casi è stata riscontrata l'integrazione del virus a livello delle cellule neoplastiche^{28, 29}. Occasionalmente, si osserva un'espressione aberrante di antigeni B-associati (CD20 e CD79a)³⁰.

Ki-67, marker più utilizzato per lo studio della proliferazione, è positivo nella maggior parte dei PTCLs/NOS e risulta notevolmente elevato (> 80%) nell'11% dei casi. In un importante studio Went et al. mostrano una significativa correlazione tra l'alta espressione di questo marker e una manifestazione tumorale più aggressiva; sottolineando l'importanza prognostica di questa molecola (figura 2)¹⁹.

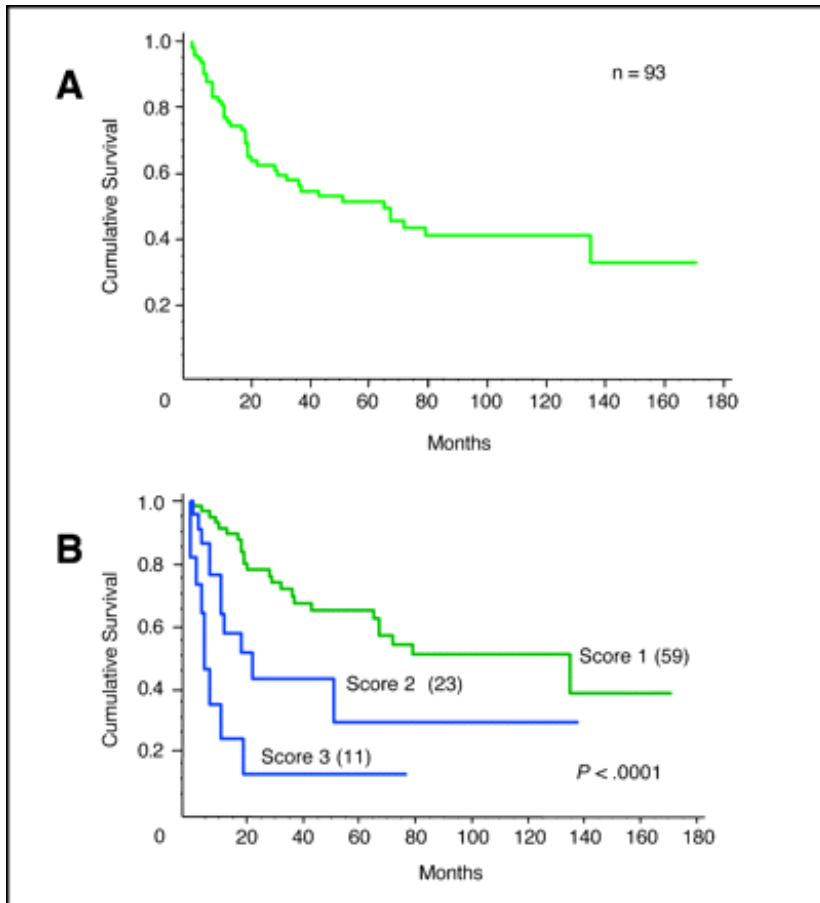


Figura 2

A: curva di sopravvivenza in riferimento al linfoma a cellule T periferiche non altrimenti specificato. **B:** età, PS (performance status), LDH (lactate dehydrogenase), e Ki-67 sono fattori fortemente associati alla sopravvivenza nei PTCL/NOS. Score 1: sopravvivenza in assenza di tali fattori, score 2 sopravvivenza in presenza di 2 fattori, score 3; in presenza di 3 o 4 di suddetti fattori. Questi indici mostrano un alto grado di correlazione con l'outcome del paziente ($P < .0001$)¹⁹.

Profilo genico dei PTCL/NOS

A livello molecolare la patobiologia dei PTCL/NOS rimane fino ad ora poca definita, soprattutto a causa del limitato numero di studi.

Tracy et al. e de Leval et al. hanno focalizzato l'attenzione rispettivamente su: micosi fungoide, ALCL ALK⁺ e ALK⁻, e AILT. Di contro, Mertinez-Delgado et al. e Ballester et al. hanno analizzato ampie casistiche di PTCL, sia NOS che AILT e ALCL. I loro studi trovano un'importante limitazione nell'uso di chip con un ristretto numero di geni e nella mancanza di un match fisiologico di confronto. Martinez-Delgado et al. hanno riportato che i PTCL/NOS corrispondono a un gruppo eterogeneo di tumori, con un GEP di difficile interpretazione a causa della quantità di cellule reattive infiltranti. Secondo questi autori, l'unica informazione rilevante concerne il livello di espressione del gene *NF-kB*. Ballester et al. hanno riportato che il GEP è in grado di discriminare tra i PTCL/NOS e AILT e ALCL, nonostante i primi non abbiano un profilo unico. Usando un multi-class predictor, gli autori hanno separato i loro casi in 3 sottogruppi (U1, U2 e U3), le cui firme geniche potrebbero essere state, tuttavia, influenzate dalle componenti reattive.

Recentemente, il nostro gruppo ha pubblicato uno studio di GEP basato sull'analisi di 28 PTCL/NOS, tutti corrispondenti a biopsie linfonodali contenenti una quantità di cellule neoplastiche superiore al 70% dell'intera popolazione esaminata. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli di 6 AILT, 6 ALCL (2 ALK⁺ e 4 ALK⁻) e 20 campioni di linfociti T normali, corrispondenti ai principali subset di cellule T.

In particolare, il profiling di espressione ottenuto indica che i PTCL/NOS sono distinti dai linfociti T e B normali e sono più strettamente correlati alle cellule T attivate rispetto a quelle resting (Figura 3)³¹.

Oltre all'informazione istogenetica, questa analisi fornisce vari dati sulle alterazioni funzionali dei PTCL/NOS. Un'attenta comparazione tra i PTCL/NOS e la loro più vicina controparte normale ha infatti rivelato la deregolazione sistematica di 155 geni (91 geni ipoespressi e 64 geni iper-espressi) che controllano funzioni tipicamente alterate nelle cellule maligne, come il rimodellamento della matrice, l'adesione cellulare, la trascrizione, la proliferazione, l'apoptosi e la chemioresistenza³².

Tra i geni che partecipano all'**organizzazione della matrice extracellulare**, sono apparsi iperespressi *FNI, COL12A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL4A2, FBNI, LAMBI, SPARC e CDH11*.

Relativamente all'**adesione cellulare**, si è apprezzata “down-regulation” dei geni *GJAI, TNS, VCAMI e LIFR*.

Nell'ambito dei geni coinvolti nell'organizzazione del **citoscheletro**, si sono rilevati fenomeni di ipo-espressione (*TPM1, Dcl2, MGAT4A, MYLIP*) e di iper-espressione (*NFIB, WASPIP*), rispettivamente.

Fra i geni che regolano l'**apoptosi**, sono risultati sistematicamente “down-regolati” *CD69, DUSP2, DUSP8, GADD45A, GADD45B, ING3, JUND, MOAPI e PPP1R15A*.

Per ciò che riguarda la **funzione trascrizionale**, si è riscontrata l'ipo-espressione di numerosi geni: *PER1, CBX4, CHD2, COPEB, CREM, EPC1, JMJDIC, MAF, NR4A2, NR43, SERTAD1, ZBTB10, ZBTB24, ZNF198, ZNF331 e BCL10*.

Relativamente alla **trasduzione del segnale**, alcuni geni sono risultati iper-espressi (*CALD1, STK17B, MKNK2, HIPK1, PTP4A1, PDE4E, MAP3K8, ITKB*), mentre altri sono apparsi regolarmente ipo-espressi (*SEPT10, TJP1, IRS2*).

Per quanto riguarda la **proliferazione cellulare**, si sono rivelati iper-espressi *AXUDI, FOXP1, RHOBTB3* ed ipoespressi *NF-kB, CAV2, PLEKHCl, BTG1, CLK1, HECA, JUN, RGC32, TOB1*.

Infine, sono risultati significativamente over-espressi nei PTCL/NOS il **PDGFR α** (Platelet derived Growth factor receptor alpha), una tirosin-kinasi potenzialmente coinvolta nella trasformazione neoplastica, *CYR61* (cystein rich 61) e *NNMT* (nicotinamide-N-metiltransferasi), entrambi coinvolti nei processi di farmacoresistenza. L'immunoistochica, effettuata 200 casi tra PTCL/NOS e PTCL AILD type, ha fornito la validazione *in situ* dei dati genomici, mostrando la corrispondenza tra livelli di mRNA ed espressione proteica, come, ad esempio, nel caso del **PDGFR α** . Il **PDGFR α** è risultato infatti, overespresso nel 90% circa dei casi con marcatura citoplasmatica, diffusa, in alcuni casi, anche a livello delle membrane (figura 4); PDGFR α fosforilato è risultato positivo nel 54% dei casi valutabili (figura 5) Inoltre, l'indagine fenotipica ha evidenziato la possibilità che alcuni risultati ottenuti dall'analisi del GEP possono

dipendere non dalla componente neoplastica del campione esaminato, ma da quella reattiva, come osservato per il Caldesmone.

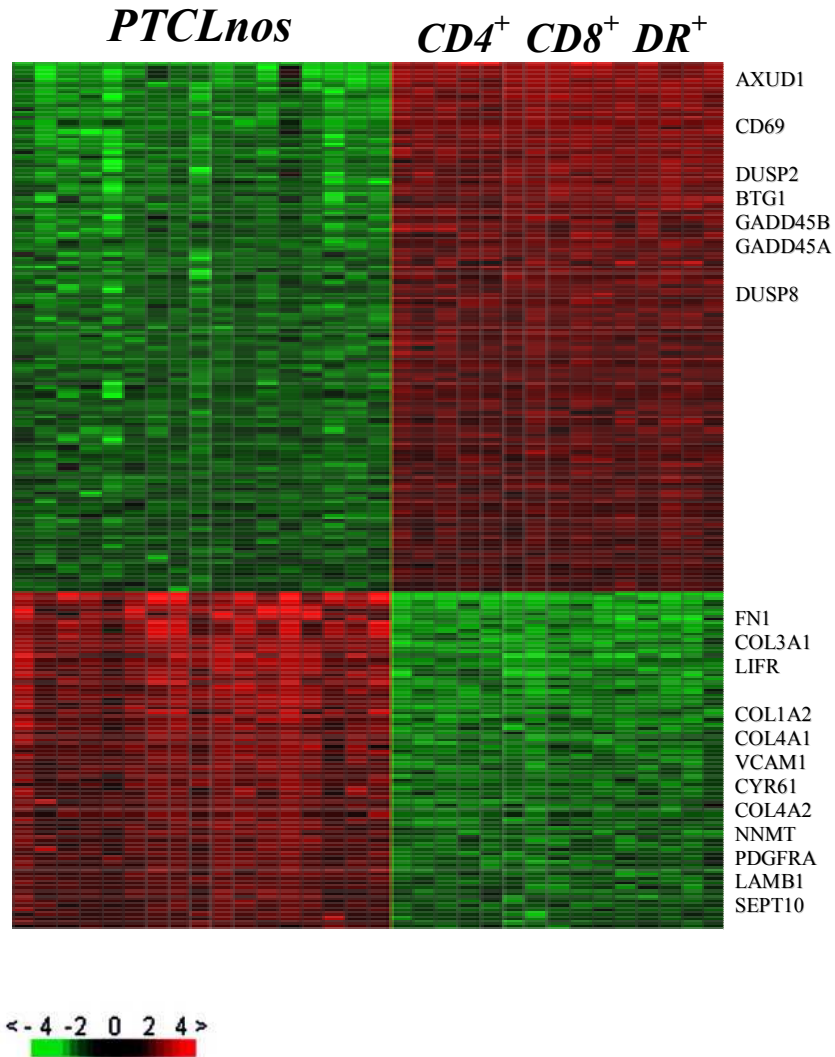


Figura 3

Profiling di espressione genica dei PTCL/NOS.

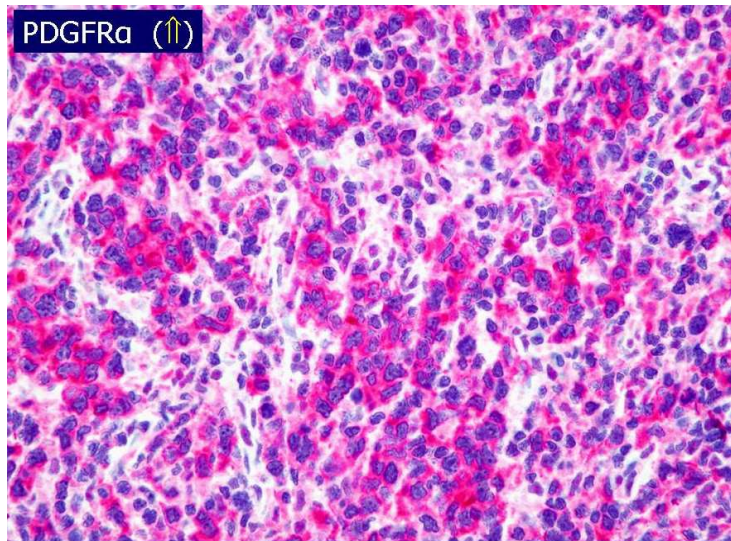


Figura 4

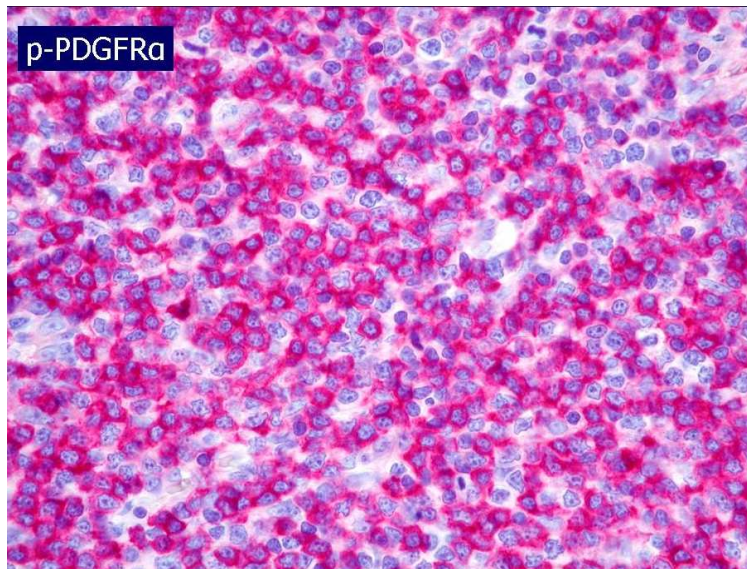


Figura 5

In base ai risultati ottenuti nel nostro istituto e ai dati presenti in letteratura, per migliorare le conoscenze sulla patogenesi dei PTCL/NOS, abbiamo focalizzato l'attenzione su quattro diversi pathway coinvolti nel processo proliferativo, essendo quest'ultimo fortemente associato alla prognosi e risultato alterato all'analisi di GEP. I geni in esame sono: *PDGFRα* e *NF-κB* la cui espressione è stata trovata deregolata

all'interno della nostra casistica dei PTCL/NOS, *PTEN* e *p27* importanti regolatori del signaling in esame.

PDGFR α

Il recettore PDGFR α è un omodimero costituito da due catene α e ha un peso molecolare di 170 kDa in seguito alla maturazione dei gruppi carboidrati. Il PDGFR α appartiene alla famiglia di recettori tirosin-kinasici (RTK) di classe III (come il recettore stem cell factor (SCF/KIT)) ed è localizzato sul cromosoma 4q12 accanto al recettore SCF e al VEGF2. Come tutti i RTK di classe III è caratterizzato dalla presenza di 5 domini Ig-like nella parte extracellulare, da un dominio transmembrana e da due domini con attività tirosin kinasica a livello intracellulare (figura 6)³³.

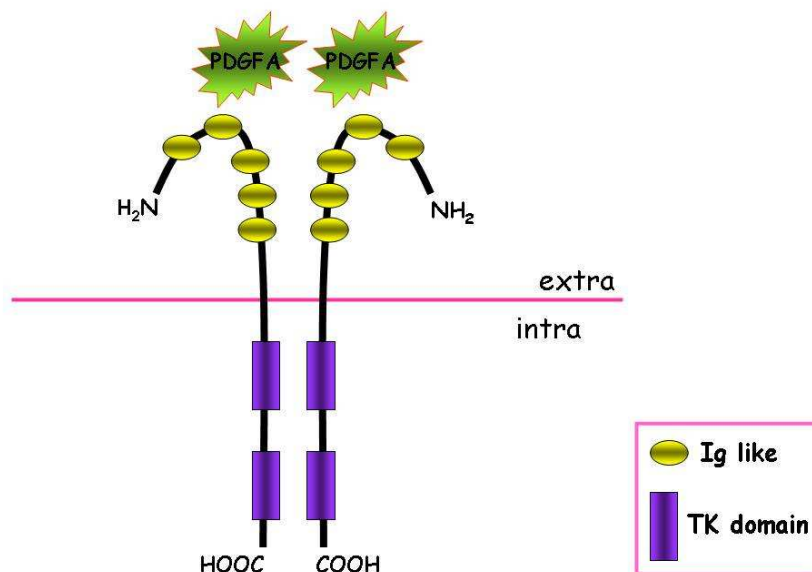


Figura 6

Rappresentazione grafica del recettore PDGFR α

Gli effetti cellulari fisiologici mediati dal recettore sono espliciti principalmente dalla trasduzione di potenti segnali mitogeni, dall'inibizione della chemiotassi di certi tipi cellulari (fibroblasti e cellule del tessuto muscolare liscio), dall'incremento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} e dalla promozione di effetti antiapoptotici³³.

L'attivazione del PDGFR α avviene in seguito al legame del ligando dimerico (isoforme $\alpha\alpha/\alpha\beta/\beta\beta/\gamma\gamma$) ai tre domini Ig-like piú esterni (I-II-III): questo provoca la dimerizzazione del recettore e la giustapposizione di alcuni domini intracellulari con la conseguente fosforilazione dei residui tirosinici in trans³³.

L'autofosforilazione indotta dalla dimerizzazione del PDGFR α comporta un incremento dell'efficienza catalitica delle kinasi mediante la fosforilazione di un residuo di tirosina conservato all'interno dei domini kinasici (Tyr-849) e la creazione di siti di legame per molecole di trasduzione del segnale contenenti domini SH2³³. Sono numerose le proteine in grado di legarsi al PDGFR α ; alcune possiedono attività enzimatica come il fosfatidilinositolo 3'kinasi (PI 3-kinase), la fosfolipasi C (PLC)- γ , la famiglia di tirosin kinasi Src, la fosfatasi SHP2, GAP (GTPase activating protein); altre, come Grb2, Grb7, Nck, Shc e Crk, hanno la funzione di "adattatori", fornendo un tramite tra il recettore ed altre molecole con attività catalitica (figura 7)³³.

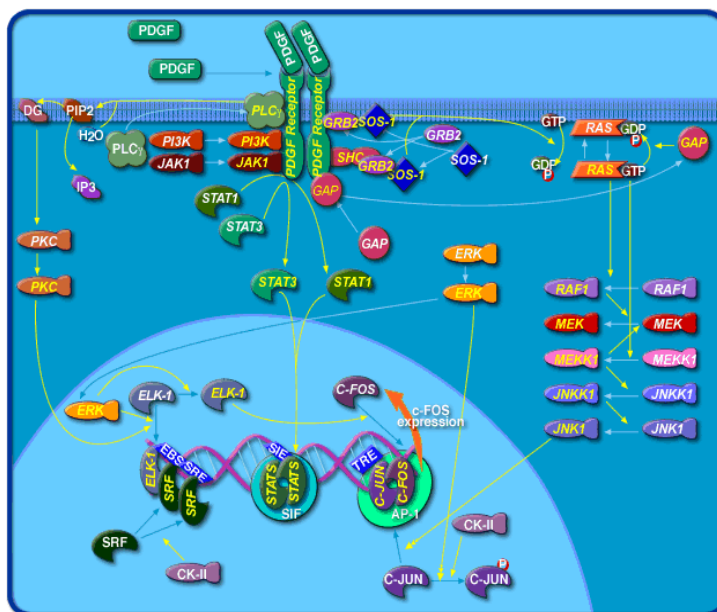


Figura 7
Pathway del PDGFR α

Aberrazioni dell'espressione e dell'attività del PDGFR α sono riscontrate in diversi tipi di tumori: gastrointestinali stromali, ematologici, gliomi, glioblastomi, medulloblastomi, dermatofibrosarcoma, carcinoma mammario, cancro del colon, carcinoma a piccole cellule del polmone sono solo alcuni esempi. Queste alterazioni, che più frequentemente comportano una costitutiva attivazione della tirosina chinasi, possono essere causate: da mutazioni geniche a livello degli esoni codificanti, formazione di un gene di fusione, normalmente non presente a livello fisiologico, amplificazione genica del locus 4q12, stimolazione autocrina o paracrina del recettore da parte del suo ligando, perdita dell'attività fosfataseica, cross-attivazione da parte di altre kinasi, attivazione/inattivazione del promotore attraverso metilazione/demetilazione, deregolazione trascrizionale^{34,35}.

Le patologie più strettamente correlate con lo studio del PDGFR α sono i tumori gastrointestinali stromali (GIST)^{36, 37, 38, 34, 35} nei quali è stata documentata la presenza di mutazioni somatiche nel PDGFR α , e le sindromi ipereosinofile (HES), correlate con il prodotto di fusione FIP1L1/ PDGFR α ^{39,40}.

La sintesi aberrante di PDGF e la conseguente stimolazione autocrina possono essere un importante step nella conversione neoplastica delle cellule positive per PDGFR α . Tuttavia, non è ancora chiaro se questo sia un evento critico o se semplicemente contribuisca allo sviluppo della neoplasia. In letteratura sono stati riportati diversi tipi di tumori che mostrano l'espressione del PDGFR α e del suo ligando e in questi la stimolazione autocrina come causa della proliferazione neoplastica può essere la spiegazione più appropriata. Ciononostante, in molti casi è sconosciuta l'espressione del PDGFR α nei tessuti normali dai quali deriva il tumore; molti studi, infatti, sono stati ristretti all'analisi di espressione del PDGFR α , ignorando l'attivazione del PDGFR α in termini di autofosforilazione costitutiva³³.

Alla luce dei dati ottenuti, all'interno del nostro Istituto, riguardo i PTCL/NOS, il recettore si candida sia come importante gene implicato nella patogenesi di suddette neoplasie che come interessante bersaglio terapeutico in quanto target molecolare di inibitori delle tirosin kinasi.

Nuclear factor-kappa B

NF-kappa B (nuclear factor-kappa B, NF-kB) è una famiglia di fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione della risposta immunitaria alle infiammazioni. Esso agisce, principalmente, modulando i pathways della proliferazione, dell'apoptosi e dell'attivazione, sviluppo e sopravvivenza delle cellule B (figura8) ⁴¹.

La famiglia NF-kB è costituita da cinque membri: RELA, RELB, REL, p50 e p52 i quali dimerizzano in complessi attivi RELA/p50, RELA/RELA, p50/REL, RELA/REL e RELB/p52 o in omodimeri (p50/p50 e p52/p52) inattivi ^{42, 43, 44}.

Nella maggior parte delle cellule, il complesso proteico è presente nel citoplasma in una forma inattiva legata a specifiche proteine inibitrici IκBs ⁴¹. Esistono due vie di attivazione del complesso NF-kB: classica e alternativa. La prima, mediata da stimoli infiammatori, prevede il reclutamento del complesso IκB kinase (IKK) il quale, è in grado di fosforilare IκB promuovendo l'ubiquitinazione e la degradazione mediante proteosoma dell'inibitore. Il complesso NF-kB, così attivo, trasloca nel nucleo dove regola la trascrizione di numerosi geni, mediante il legame con specifiche kB ^{41, 45}. La via alternativa, invece, è mediata da alcuni membri della famiglia del tumour necrosis factor i quali promuovono la degradazione di p100, e la formazione di una nuova proteina (p52), associata a RELB, capace di traslocare nel nucleo dove attiva il processo di trascrizione ^{41, 45}.

Numerosi studi sottolineano un'attività antiapoptotica di NF-kB, associando la sua persistente attivazione a processi di tumorigenesi, progressione neoplastica, metastasi e resistenza ai chemioterapici, in diversi tumori inclusi i linfomi a cellule B ⁴⁶. In contrasto con tale ruolo, è stata evidenziata, in particolari condizioni (induzione attraverso il signaling del TCR e danno al DNA), un'attività proapoptotica di NF-kB indispensabile per il corretto funzionamento del sistema immunitario e dell'ematopoiesi ⁴⁷. Nei linfociti T, nelle cellule B e nei monociti si registra una attività del complesso proteico, principalmente in fase proliferativa. L'attivazione e l'espressione di NF-kB risultano elevate in diversi tipi di cancro, tra i quali ricordiamo la micosi fungoide ^{48, 49}, e il linfoma a grandi cellule anaplastiche (ALCL) ¹⁴. Per quanto riguarda i PTCL/NOS, studi di gene expression profiling, li vedono associati sia ad una up che down

regolazione di *NF-kB*^{50, 51} con possibili implicazioni a livello prognostico⁵⁰. Questi studi presentano delle limitazioni; sono stati infatti, condotti su un campione poco rappresentativo sia dal punto di vista numerico che di composizione a causa della presenza di un'ingente componente non neoplastica.

Il nostro laboratorio ha studiato l'espressione genica e proteica delle molecole coinvolte nel pathway di NF-kB, in un'ampia casistica di PTCL/NOS, al fine di meglio definire il ruolo di questo importante complesso nella patologia in esame.

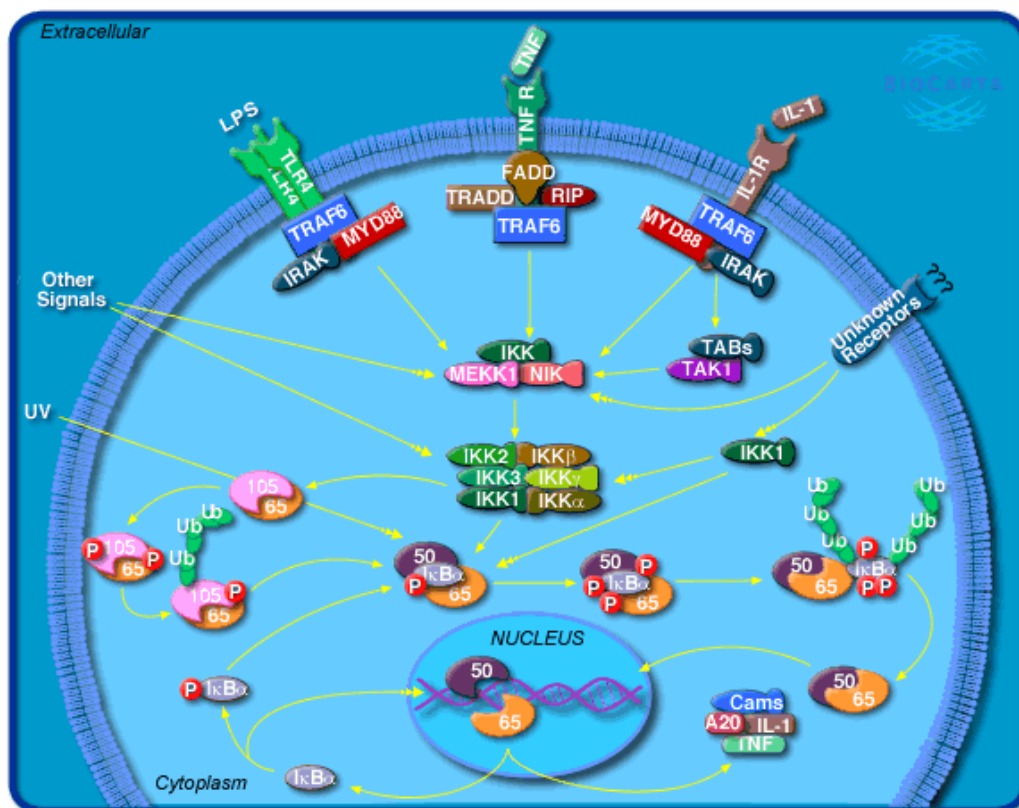


Figura 8

Pathway di NF-kB.

CDKN1B

La proteina p27, codificata dal gene *CDKN1B*, è un membro della famiglia degli inibitori delle chinasi ciclina dipendenti (CDKIs)^{52,53}.

Questa famiglia comprende cinque diverse molecole: p14, p16, p18, p21 e p27. Le prime esplicano la loro azione selettivamente sulle chinasi ciclina dipendenti (CDK) 4 e 6, mentre p21 e p27 lavorano indistintamente su tutte le CDK^{52,53}.

I CDKIs agiscono sequestrando e inattivando specifici CDK-complessi con conseguente arresto del ciclo cellulare, dovuto al blocco del CDK pathway (figura 9).

p27 è coinvolto nella regolazione della progressione del ciclo, inibisce infatti la transizione dalla fase G1 alla fase S, in seguito a stimoli derivati da TGF- β (trasformino growth factor β) o per inibizione da contatto. P27, una volta attivato, è localizzato esclusivamente nel nucleo; sotto stimoli mitogeni trasloca nel citoplasma dove viene ubiquitinato e degradato mediante proteasoma. Cambiamenti nella concentrazione subcellulare di tale proteina ne regolano l'attività^{52,53}.

Alterazioni di p27 compromettono quindi il corretto controllo del ciclo, contribuendo alla trasformazione neoplastica.

In particolare, variazioni nella sua espressione sono associate a diverse neoplasie; una down regolazione è stata infatti associata a uno stato iperproliferativo, mentre una up regolazione a casi di chemioresistenza. In entrambe le situazioni si può apprezzare un'associazione tra i diversi livelli di espressione e una prognosi negativa⁵⁴.

Per quanto riguarda i NHL, i linfomi indolenti sono spesso associati a over espressione di p27, mentre DLBCL e ALCL presentano generalmente bassi livelli di proteina.

Nei linfociti non proliferanti p27 è normalmente elevato, mentre risulta negativo in quelli attivati. Vi è, infatti, una correlazione inversamente proporzionale tra p27 e l'indice proliferativo nel tessuto normale; relazione che può essere persa in presenza di alterazioni patologiche⁵⁴.

Una tra le principali cause di aberrazione di questa proteina è da ricercare nella sua sequenza. Molte mutazioni e SNP sono stati, infatti associati a tumori: come per esempio C(-838)A G(258)C; T(356)C; A(4149)C; (-79C/T). Lo SNP(-79C/T) sembra

eliminare un'isola CpG; recenti studi però affermano che quest'isola non è soggetta a metilazione diminuendo quindi l'importanza di tale alterazione^{55, 56}.

Un cambiamento amminoacidico al codone 109 (V109G) è associato a prognosi negativa nel tumore al seno e nel carcinoma della prostata^{57,58}.

Questo SNP potrebbe alterare il sito di legame di p27 verso p38/COPS5 il suo regolatore negativo. P38 infatti, favorisce la fosforilazione, traslocazione dal nucleo al citoplasma e la sua degradazione⁵⁹. La presenza della variante allelica V aumenta l'affinità di p27 per p38 favorendone la degradazione; ciò diminuisce drasticamente i livelli di proteina portando a una maggiore aggressività tumorale^{57,58}.

Questi dati supportano l'importante ruolo di p27 nello sviluppo tumorale, rendendolo un'interessante molecola anche dal punto di vista prognostico nei PTCL/NOS.

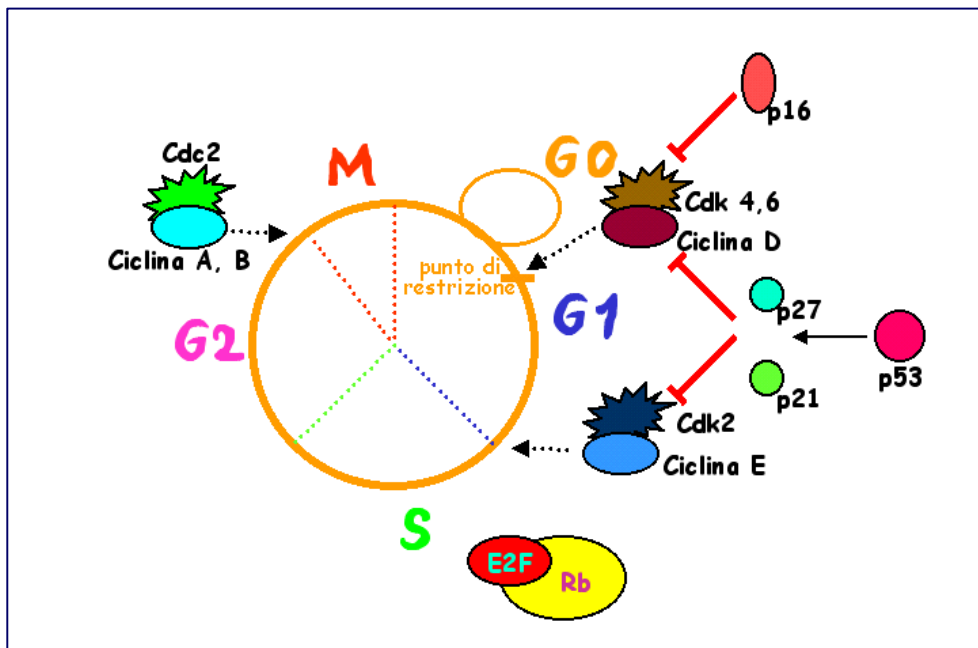


Figura 9

Regolazione del ciclo cellulare mediata da p27

PTEN

L'oncosoppressore PTEN (phosphatase tensin homolog) è un importante regolatore di molti processi cellulari incluso quello della proliferazione⁶⁰.

Il gene *PTEN* codifica per una proteina di 403 residui amminoacidici con un dominio fosfatase in posizione N-terminale, due domini PEST, un dominio di legame a proteine con motivi PDZ e vari siti di fosforilazione in posizione C-terminale⁶¹.

PTEN esplica la sua azione sia a livello citoplasmatico che nucleare agendo su pathways diversi in modo indipendente.

Nel citosol questa molecola è responsabile della regolazione negativa del pathway AKT/PKB. PTEN antagonizza infatti, l'attività di PI3K catalizzando la conversione di PIP3 (fosfatidil inositolo trifosfato) a PIP2 (fosfatidil inositolo bifosfato). PIP2 non è più in grado di attivare AKT con conseguente blocco di processi cellulari quali crescita, adesione, motilità, proliferazione, sopravvivenza cellulare e produzione di citochine (figura 10)⁶⁰.

Nel compartimento nucleare, PTEN gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento della stabilità cromosomica. Esso, infatti, lega una proteina (CEMP C) del cinetocore, stabilizzandola. Alterazioni nel sito di legame portano a perdita della stabilità cromosomica con aumento di frammenti genomici, rottura di cromatidi e traslocazioni bilanciate rispetto al wild-type⁶².

PTEN, a livello nucleare, agisce sul sistema di riparazione del DNA e più specificatamente sembra operare sul promotore di RAD51 regolandone l'espressione. Alterazioni possono portare a una diminuzione di RAD51, con conseguente riduzione della attività del complesso di riparazione del DNA e aumento dei danni a carico dell'acido nucleico⁶².

E' stato, inoltre, evidenziato che aberrazioni dell'attività nucleare di PTEN non sembrano variare la sua funzione nel compartimento citoplasmatico.

Alterazioni di questa molecola sono riscontrate in differenti patologie. Mutazioni germinali, missenso, nulle, sono presenti in molti tumori sporadici e in sindromi quali la Cowden disease e la Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome⁶¹. Delezioni della banda 10q22-25 (locus genico di PTEN) o LHO (perdita di eterozigosità), sono presenti in

circa il 5-10% di B-NHLs ⁶³. Perdita parziale o completa di questa molecola è stata evidenziata nel 66,7% dei linfomi anaplastici e nel 12% dei linfomi a cellule T e NK. Tali aberrazioni aboliscono (81%) o riducono drasticamente (10%) l'attività di PTEN⁶⁴.

Recenti studi hanno dimostrato l'importanza di questa molecola nello sviluppo delle cellule T: topi con LHO per *PTEN* sviluppano, infatti, un linfoma a cellule T ⁶⁵. La sua down regolazione, inoltre, è essenziale per la formazione dei tipici lobuli nucleari nella T cell leukemia-lymphoma e nella progressione della mucosi fungoide ⁶⁶.

Questi dati supportano un probabile coinvolgimento di PTEN nelle patologie che colpiscono le cellule T, candidandolo come molecola di interesse nella patogenesi dei PTCL/NOS.

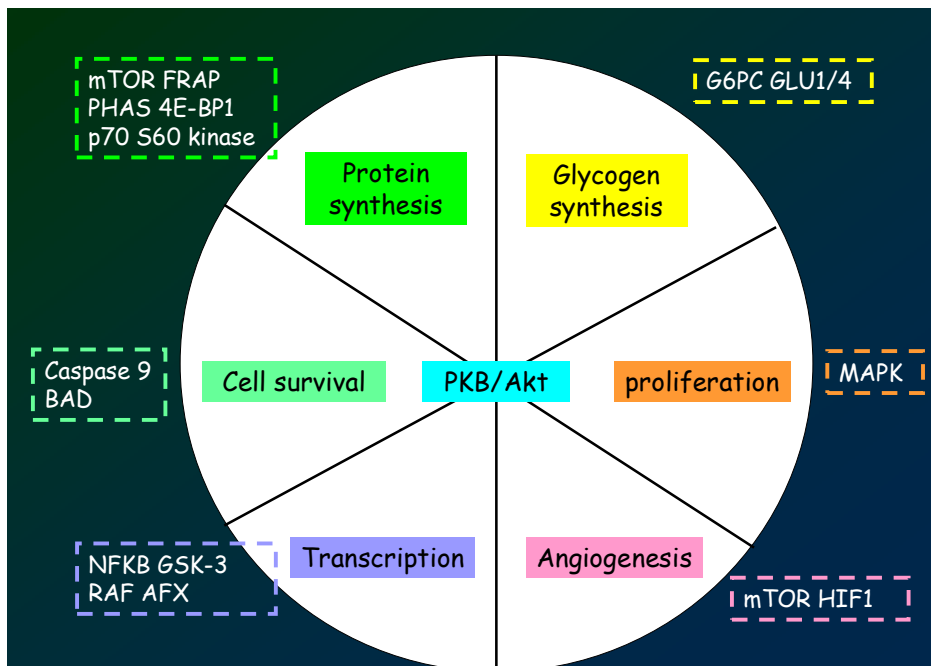


Figura 10

Processi regolati dal pathway di AKT/PKB.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Differenti funzioni cellulari sono risultate compromesse nei PTCL/NOS, tra queste, il processo proliferativo ricopre una particolare importanza, principalmente per la stretta correlazione, nei tumori in esame, tra alto indice di proliferazione e prognosi sfavorevole.

Quattro geni, implicati in tale processo, sono stati selezionati per analisi più dettagliate, al fine di meglio caratterizzare la patogenesi dei PTCL/NOS e identificare nuove terapie più mirate.

Sono stati presi in considerazione geni quali: *PTEN* e *p27*, in quanto regolatori chiave del ciclo cellulare, il signaling di *NF- κ B*, rilevante nella regolazione di processi come apoptosi e proliferazione e *PDGFR α* importante tirosin chinasi.

Un'attenzione particolare è stata riservata a *NF- κ B*, *PDGFR α* e rispettivi pathways, in quanto, sono stati trovati deregolati nella cellula neoplastica rispetto alla controparte sana costituita da linfociti T attivati.

MATERIALI E METODI

Gene expression Profiling

Un'analisi di gene expression profiling è stata, precedentemente, effettuata su 28 casi di PTCLs/NOS e 20 campioni di cellule T normali CD4+, CD8+, HLA-DR+ e HLA-DR-. I dati sono stati generati grazie all'impiego di Affymetrix HG-U133 2.0 *plus* microarray (Affymetrix, Inc. <http://www.affymetrix.com/support/index.affx>), analizzati mediante MAS 5 algorithm in GCOS 1.2 (Affymetrix, Inc.) e resi disponibili sul sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/> (accession number GSE6338).

I campioni patologici provengono da diversi centri (Bologna, Pavia, Brescia, Perugia, Torino). Di ognuno, è disponibile un blocco in paraffina speculare rispetto a quello criopreservato, così da consentire la revisione diagnostica, la stima della percentuale di elementi linfomatosi, la caratterizzazione immunoistochimica della componente neoplastica e di quella reattiva di accompagnamento, oltre alla valutazione del background (% di eosinofili, istiociti e venule ad endotelio alto od altro). Di tutti i casi, sono inoltre disponibili le notizie cliniche.

I venti campioni di linfociti T normali, isolati da tonsille e da sangue periferico presentano un livello di purezza > 92%. Di questi, 5 sono costituiti da elementi CD4+, 5 da elementi CD8+, 5 da linfociti T attivati HLA-DR+ e 5 da linfociti T naïve HLA-DR-. Per dettagli tecnici referenza ³².

L'analisi di espressione genica è stata effettuata utilizzando supporti informatici quali Genes@work, Dendrogram e GeneSpring 7.3.1; il dendrogramma è stato generato utilizzando uno "hierarchical clustering algorithm" basato sull' "average-linkage method". Per generare lo "hierarchical clustering", sono stati scelti solo geni che mostravano una variazione del livello di espressione maggiore o pari a 2 volte la media di espressione genica. Il valore di espressione di ciascun gene selezionato è stato normalizzato per avere un valore medio di zero ed un unità di deviazione standard. Per eseguire la "supervised gene expression analysis", in particolare, è stata usata la Gene@Work software platform. Il metodo di classificazione è rappresentato in un sistema di punteggio basato sui valori di un gruppo di geni, che sono risultati differentemente espressi in due subsets cellulari e che, quindi, sono stati usati per determinare l'appartenenza o meno delle cellule studiate a uno dei due gruppi: in linea di principio,

quanto più alto è lo score, tanto più è probabile che il tipo cellulare studiato sia correlato ad un determinato subset cellulare.

Tissue microarrays

Sono stati raccolti i blocchi in paraffina, con i relativi reports diagnostici, di 148 pazienti affetti da PTCL/NOS, provenienti da vari Centri (Bologna, Pavia, Cuneo, Modena, Brescia, Bergamo, Bolzano, Torino, Roma, Forlì, Reggio Emilia). L'immunofenotipo di ciascun caso è stato determinato al momento della diagnosi.

Nei vetrini colorati in ematossilina-eosina allestiti da ciascun blocco, sono state selezionate le aree più rappresentative, sulle quali, successivamente, sono stati effettuati dei carotaggi di tessuto di 1 mm di diametro, utilizzando il Manual Tissue Microarrayer MTA-1 prodotto dalla Beecher Instruments e successivamente inseriti nel corretto punch del blocco ricevente. Sono stati così costruiti, 3 TMAs, comprendenti rispettivamente 60, 51 e 38 casi. Di ogni core, è stata valutata la rappresentatività in base alla morfologia ed alla reazione con anticorpi anti-CD3 e anti-CD20. La lettura è stata effettuata acquisendo immagini digitali dei TMA con il Bacus Labs Incorporated Slide Scanner (BLISS). Come controlli positivi sono stati testati in parallelo linfonodi reattivi, tonsille iperplastiche ed alcuni tipi di neoplasie in base alle specifiche reattività degli anticorpi utilizzati.

Di tutti i 148 pazienti sono state raccolte le notizie cliniche.

Maggiori dettagli sulla costruzione del TMA sono disponibili alla referenza ¹⁹.

Analisi immunoistochimica

Sezioni di 3-5 μ di spessore sono state ricavate da ciascun TMA. In seguito ad appropriato smascheramento antigenico, effettuato in citrate buffer (pH=6.0) alla temperatura di 900W (5' per 3 cicli), sono stati testati specifici anticorpi, selezionati in base ai risultati dell'analisi di gene expression profiling. La reazione antigene anticorpo

è stata visualizzata mediante tecnica dei complessi immuni fosfatasi alcalina anti-fosfatasi alcalina (APAAP) o mediante tecnica EnVision.

In particolare, è stata studiata l'espressione proteica di PTEN sia a livello citoplasmatico che nucleare su sezioni ricavate da un TMA contenente 33 casi di PTCL/NOS. È stato utilizzato l'anticorpo monoclonale di topo PTEN/MMAC1 Ab-4 (clone 17.A, Thermo Scientific) alla diluizione 1:20 per testare il livello di espressione citoplasmatica della proteina; mentre l'espressione nucleare è stata testata mediante l'anticorpo monoclonale di topo PTEN Ab-6 (clone 28H6, Thermo Scientific) alla diluizione 1:10. Le reazioni sono state evidenziate con tecnica EnVision e APAAP rispettivamente.

L'espressione di p27 è stata valutata su 98 casi di PTCL/NOS mediante l'impiego dell'anticorpo monoclonale di topo: clone F-8, (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) alla diluizione 1:10. La colorazione delle cellule tumorali per p27 è considerata positiva se uguale o maggiore al 30%¹⁹.

Sono state, inoltre, effettuate delle doppie colorazioni su 6 casi di PTCL/NOS per valutare l'eventuale co-espressione di p27 e Ki-67 da parte delle stesse cellule neoplastiche. A tale scopo sono state impiegate sezioni di 2 μ di spessore e lo smascheramento antigenico è stato effettuato in citrate buffer 10 mM (pH=6.0) mediante l'impiego di una pentola a pressione. Gli anticorpi primari utilizzati sono rispettivamente clone F-8, (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) alla diluizione 1:10 per lo studio di p27 e l'anticorpo monoclonale rabbit Ki67 clone SP6 (Thermo Scientific) alla diluizione 1:100 per Ki-67. Gli anticorpi secondari utilizzati sono ALEXA FLUOR G488 goat anti mouse IgG1 con emissione nel verde per p27 e ALEXA FLUOR R568 goat anti rabbit IgG con emissione nel rosso per Ki-67. Le sezioni sono state contrastate con un medium contenente DAPI.

La valutazione dell'espressione della ciclina E è stata effettuata mediante l'anticorpo: Cyclina E Ab-5 (clone 13A3) alla diluizione 1:40 (Thermo Scientific).

L'espressione proteica dei membri della famiglia NF-kB è stata saggiata su 47 casi di PTCL/NOS. Le sezioni ottenute da ciascun TMA sono state testate con anticorpi per: c-REL (rabbit polyclonal; Santa Cruz Inc.; dilution 1:60 -APAAP), RELB/p50 (rabbit

polyclonal; Santa Cruz Inc.; dilution 1:120 -APAAP), RELA/p65 (mouse monoclonal; Santa Cruz Inc.; dilution 1:160 -APAAP).

Il PDGFR α è stato valutato sia nella sua forma attiva ossia fosforilata che inattiva su 134 casi di PTCL/NOS mediante tecniche di immunistochemica. È stato usato l'anticorpo p- PDGFR α (Tyr 754): sc-12911 (rabbit polyclonal ; Santa Cruz Inc.; dilution 1:30) per valutare l'espressione del recettore fosforilato, mentre per lo stato defosforilato o inattivo del recettore è stato impiegato l'anticorpo PDGFR α (C-20): sc-338 (rabbit polyclonal ; Santa Cruz Inc.; dilution 1:80).

È stata, inoltre, effettuata una valutazione del ligando A del PDGFR α impiegando l'anticorpo PDGFA (N-30): sc-128 rabbit polyclonal ; Santa Cruz Inc.; dilution 1:100).

Ogni TMA è stato, infine, analizzato con anticorpi anti-CD20 e CD3 al fine di differenziare le cellule B reattive dalla popolazione di cellule T neoplastiche, un anticorpo diretto contro Ki-67 è stato impiegato per la valutazione dell'indice proliferativo.

Nel controllo negativo, l'anticorpo primario è stato omissso. Per l'analisi e l'acquisizione delle immagini sono stati utilizzati; un microscopio Olympus BX41 con obiettivo UPlanFl (20x/0.50 and 40x/0.75), una camera digitale Olympus Camedia C-7070 e il software Olympus Master 1.1. Per le immagini di fluorescenza è stato usato un microscopio a fluorescenza Olympus BX61.

Estrazione del DNA

Su 96 blocchetti di tessuti paraffinati, utilizzati per il precedente studio su TMA, è stata effettuata estrazione del DNA utilizzando un kit commerciale (QIAGEN "QIAamp DNA Mini Kit"). 3 o 4 fettine di tessuto, tagliate al microtomo, sono state "sparaffinate" con hystoclear e reidratate con etanolo assoluto. Il pellet ottenuto è stato addizionato di buffer di lisi tissutale e proteinasi K, e incubato a 56°C "over night". La mattina successiva, al campione è stato aggiunto buffer di lisi cellulare e incubato a 70°C per 10 minuti al fine di inattivare la proteinasi K. Al termine dell'incubazione è stato aggiunto un volume di etanolo assoluto per permettere al DNA di "ancorarsi" alla membrana

della colonnina di eluizione. Le colonnine sono quindi state centrifugate, scartando l'eluato, e sono stati effettuati due lavaggi con buffer di lavaggio. Il DNA è stato infine ottenuto grazie ad uno specifico buffer di eluizione. Al termine dell'estrazione, il DNA è stato dosato allo spettrofotometro e conservato a 4°C fino alle successive analisi molecolari.

PCR del gene di controllo PLZF

Prima di procedere all'esecuzione delle analisi molecolari, è stato necessario verificare lo stato d'integrità e amplificabilità del materiale estratto. A tal fine è stata amplificata una regione del gene *PLZF* (human promyelocytic leukemia zinc-finger gene) di circa 300 bp (protocollo BIOMED2); per ciascun campione sono state testate diverse concentrazioni di DNA (generalmente da 100ng fino a 500ng) per verificare quale fosse la condizione migliore da utilizzare per la successiva PCR. Per ciascun campione è stata preparata una miscela di reazione contenente DNA, buffer 1X (10X), MgCl₂ (1,5mM), primers (25pmoli ciascuno), dNTPs (0,1mM), Taq Polimerasi (1,5U), dH₂O per ottenere un volume finale di 25µl. Le condizioni di amplificazione hanno previsto una preattivazione a 95°C per 10 minuti, 35 cicli di denaturazione a 95°C per 30 secondi, di annealing a 60°C per 30 secondi e di extension a 72°C per 30 secondi, ed una extension finale a 72°C per 10 minuti. Il prodotto è stato visualizzato su un gel di agarosio al 2%.

PCR e sequenziamento

I geni *PDGFRα*, *PTEN* e *CCKNIB* sono stati valutati a livello molecolare sia nella regione codificante che nelle regioni regolatorie 5' e 3' UTR.

Ciascun campione è stato analizzato per tutti i frammenti in reazioni indipendenti. Ciascuna miscela di reazione conteneva DNA (da 100ng a 500ng), buffer 1X (10X), MgCl₂ (1,5mM), primers (20pmoli ciascuno), dNTPs (0,1mM), Taq Polimerasi (1,5U),

H₂O per ottenere un volume finale di 25µl.

Condizioni di PCR: step di denaturazione a 95°C per 1 minuto, 45 cicli di denaturazione a 95°C per 1 minuto, di annealing a temperatura primer specifica (tabella 1) per 1 minuto e di extension a 72°C per 1 minuto, ed una extension finale a 72°C per 7 minuti.

Al termine della reazione di amplificazione, il prodotto è stato visualizzato su un gel di agarosio al 2%.

Per purificare la PCR dei diversi geni analizzati è stato utilizzato il metodo enzimatico EXOSAP. Quest'ultimo è costituito da enzimi idrolitici, Esonucleasi I e fosfatasi alcalina di gambero, e permette la rimozione dei deossi-nucleotidi, non incorporati nella reazione di PCR, e dei dimeri di primers . 1µl della soluzione EXOSAP è stata aggiunta alla PCR e incubata a 37°C per 15 minuti e a 80°C per 15 minuti. Ciascun campione purificato è stato quindi quantificato su gel d'agarosio per confronto con un marker di peso molecolare noto.

Il DNA così purificato è stato utilizzato come template per la reazione di sequenza, per la quale sono stati utilizzati tra i 30 e i 90 ng di DNA, 3,2 pmoli di primer (senso o antisense impiegati nella relativa PCR), 4 µl di cyclomix (contenente enzima e dNTPs fluorescenti-dye-terminator) e 4 µl di buffer. La reazione è costituita da 25 cicli con uno step di denaturazione a 95°C per 10 secondi e uno step di annealing a 60°C per 4 minuti. Al termine dei 25 cicli, la reazione di sequenza è stata purificata per rimuovere i dye-terminator non incorporati e il prodotto è stato caricato sul sequenziatore 3730 (Primm srl, San Raffaele Biomedical Science Park). Gli elettroferogrammi sono stati valutati con il programma FinchTV 1.4 e le sequenze nucleotidiche sono state appaiate a sequenze note presenti nel database NCBI (Blastn) al fine di valutare l'eventuale presenza di mutazioni o polimorfismi.

EXON	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	PCR annealing T (°C)
PTEN 1	CAAGTCCAGAGCCATTTCCAT	AAGAGGAGCAGCCGCAGAAAT	56
PTEN 2	ATTCACATGTAACCTTCTTTTA	CAACATGAATATAAACATCAA	56
PTEN 3	TAATTTCAAATGTTAGCTCAT	AAGATATTTGCAAGCATACAA	56
PTEN 4	GTTTGTTAGTATTAGTACTTT	ACAACATAGTACAGTACATTC	56
PTEN 5	CTAAAGTTACCTACTTGTTAAT	AGGAAAAACATCAAAAAATAAC	54
PTEN 6	ATATGTTCTTAAATGGCTACG	ACATGGAAGGATGAGAATTC	55
PTEN 7	CGTGTATATGCTGATATTAA	CTCCCAATGAAAGTAAAGTACA	55
PTEN 8	ATGTTTAAACATAGGTGACAGA	ACACATCACATACATACAAGT	55
PTEN9	GTTTAAGATGAGTCATATTTG	TGGTGTTTTATCCCTCTTGAT	55

Tabella 1

Primer utilizzati per lo studio molecolare di *PTEN*.

I primer per l'analisi di p27, le condizioni di amplificazione e sequenziamento ci sono stati gentilmente forniti Center for Human Genomics, Wake Forest University School of Medicine, Wiston-Salem, North Carolina. ⁵⁶.

I primer per lo studio della regione codificante di *PDGFR α* sono reperibili alla referenza ⁶⁷, mentre quelli per lo studio del promotore sono disponibili alla referenza ⁶⁸.

Analisi statistiche

Tutti i dati relative lo studio di *NF- κ B* sono stati analizzati con StatView 5.0 software package (SAS Institute Inc, Cary, NC).

L'analisi della curva di sopravvivenza è stata effettuata con l'impiego del metodo Kaplan Meier/log rank. Overall survival (OS) è stato calcolato dalla data della diagnosi fino alla data di morte o dell'ultima visita in caso di paziente in vita.

Lo Student t-test è stato applicato sia per la valutazione di una possibile relazione tra la sub-localizzazione cellulare di *RELA*, *RELB* e *c-REL* (nucleare vs. citoplasmatico) e l'espressione di Ki-67, che per la valutazione dell'eventuale correlazione tra p27 e Ki-67. Il limite di significatività per suddette analisi è stato definito come $P < 0.05$.

Elisa (Enzyme – linked immuno assay)

La ricerca del PDGF-AA a livello extracitoplasmatico, per la valutazione del loop autocrino, è stata condotta su una linea cellulare di linfoma a cellule T periferico: **FE - PD**, derivata da una coltura primaria di PTCL/NOS, gentilmente fornita dalla Prof.ssa Teresa Marafioti dell'Università di Oxford.

Come controlli sono state utilizzate le linee cellulari **JURKAT** (leucemia linfoblastica acuta-ALL, controllo positivo per il PDGF-AA extracellulare), fornita dall'Istituto di Embriologia ed Istologia dell'Università di Bologna, **EOL – 1** (ECACC 94042252: Lymphoblast Human eosinophilic leukaemia, controllo positivo per p-PDGFR α e PDGFR α) e **LYM** (linea linfocitaria reattiva, controllo negativo).

Queste linee sono state mantenute alla temperatura di 37°C con 5% di CO₂, in terreno di coltura RPMI-1640 addizionato con siero fetale bovino (FBS) al 10%, 2mM L-glutamine, 1% penicillina/streptomycina.

Le cellule di entrambe le linee sono state seminate in fiasche (T75) a diverse concentrazioni: 1x10⁶ cells, 2x10⁶ cells, 3x10⁶ cells.

Il surnatante di ogni coltura, ottenuto dopo centrifugazione a 1000 rpm per 5 min, è stato analizzato a diversi time point: 48 h, 72 h e 96 h, mediante ELISA (*R&D Systems Europe, Ltd.*).

Questa tecnica, permette la quantificazione del PDGF-AA mediante l'impiego di un anticorpo monoclonale (Monoclonal antibody against human/mouse PDGF-AA), coattato sul fondo di una piastra da 96 pozzetti.

Diluizioni seriali (1:5, 1:10) del surnatante, ottenuto dalle diverse colture cellulari, sono state aliquotate, in duplicato, nei diversi wells della piastra e lasciate in incubazione a temperatura ambiente per 2 h.

Successivi lavaggi con *Wash Buffer* sono stati effettuati al fine di eliminare i legami aspecifici dell'anticorpo.

Ogni pozzetto è stato trattato con quantità idonee di anticorpo PDGF-AA coniugato a perossidasi e incubato per 2 h a temperatura ambiente.

Infine il substrato dell'enzima, tetrametil benzidina, è stato addizionato ad ogni well e incubato per 30 min a temperatura ambiente al riparo da fonti luminose. Il prodotto di ossidazione, di colore blu intenso, è detectabile e quantificabile allo spettrofotometro.

Una curva di taratura è stata preparata utilizzando concentrazioni scalari: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2 e 15,6 pg/ml, dello *standard*.

Neutralizzazione del PDGF-AA

La linea cellulare FE-PD è stata seminata in fiasche (T75) a diverse concentrazioni (1×10^6 cells, 2×10^6) e trattata con quantità differenti di anticorpo anti-PDGF (Anti-human PDGF Antibody, R&D Systems) (2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10µg/ml 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml) il quale è in grado di mascherare tutte le isoforme del PDGF, impedendone il legame con il recettore.

Le cellule sono state analizzate dopo 48 h di incubazione.

I pellet cellulari sono stati analizzati in citofluorimetria per la determinazione del ligando intracitoplasmatico (PDGF-AA), del recettore (PDGFR α) e del recettore fosforilato (pPDGFR α).

Per ogni esperimento è stato utilizzato un controllo negativo cui non è stato addizionato l'anticorpo.

La sopravvivenza cellulare è stata determinata mediante conta cellulare con Trypan Blue in tutti gli esperimenti.

Valutazione del PDGFR α e del pPDGFR α

Il PDGFR α è stato valutato sia nella sua forma attiva ossia fosforilata che inattiva mediante analisi citofluorimetrica. La linea cellulare FE-PD è stata trattata con l'anticorpo monoclonale p- PDGFR α (Tyr 754): sc-12911 (rabbit polyclonal ; Santa Cruz Inc.; dilution 1:30) per valutare l'espressione del recettore fosforilato, mentre per

lo stato defosforilato o inattivo è stato impiegato l'anticorpo monoclonale PDGFR α (C-20): sc-338 (rabbit polyclonal ; Santa Cruz Inc.; dilution 1:80).

Gli anticorpi secondari utilizzati sono marcati rispettivamente mediante FITC (Goat anti- rabbit, Dako Cytomation) e APC (anti-Rabbit IgG (H+L), Beckman Coulter).

I campioni sono stati acquisiti al citofluorimetro (*FC 500 Double Laser, Beckman Coulter*) previa fissazione cellulare in formaldeide.

È stata inoltre effettuata una doppia marcatura con di Annessina V-FITC e di propidio ioduro (20 μ g/ml) per la valutazione citofluorimetrica della vitalità/morte cellulare nei campioni analizzati.

Identificazione di miRNA,

Grazie all'utilizzo di specifiche web resources (Mirnaviewer, PicTar, Tarbase and miRBase) sono stati individuati diversi miRNAs diretti verso il *PDGFR α* .

In base alle predizioni dei software utilizzati, sono stati selezionati, per indagini più approfondite, 6 miRNAs presenti contemporaneamente nei differenti database. Tali miRNAs comprendono: hsa-mir-130a, hsa-mir-130b, hsa-mir-301, hsa-mir-148a, hsa-mir-148b and hsa-mir-152; le sequenze sono visibili nella tabella 2

miRNA	SEQUENZA
hsa-miR-148a	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
hsa-miR-148b	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU
hsa-miR-152	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG
hsa-miR-130a	CAGUGCAAUGUAAAAGGGCAU
hsa-miR-130b	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU
hsa-miR-301	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAGC

Tabella 2

Sequenze dei miRNAs maturi identificati

Estrazione di RNA e Real-time PCR

L'RNA di 9 casi di PTCL/NOS e di 4 linfonodi reattivi (utilizzati come controllo) è stato estratto da sezioni di paraffina, dello spessore di 3-5 μ in seguito a microdissezione delle cellule neoplastiche. L'estrazione è stata effettuata mediante TRIZOL (Invitrogen, Milan, Italy) dopo pre trattamento con Xylene per la rimozione della paraffina.

In seguito a incubazione con DNasi, al fine di eliminare eventuali contaminazioni da parte dell'acido nucleico, 10 ng dell' RNA estratto sono stati retrotrascritti grazie all'impiego di Taqman MicroRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Italy) e di primers specifici per ciascun miRNA secondo le istruzioni del manuale.

La Real-time PCR è stata preformata usando Taqman probes specifiche per i miRNA in esame (tabella 2) e RNU43 come controllo endogeno (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Italy). Sono stati utilizzati 2 microlitri del retrotrascritto in un volume finale di 20 microlitri. Le condizioni di amplificazione sono così riassunte: 10' a 95 gradi, seguiti da 40 cicli così composti: 15" a 95 gradi, 1' a 60 gradi.

Linea cellulare, nucleoporazione e immunofluorescenza

Gli esperimenti, effettuati al fine di vagliare l'attività dei miRNA, sono stati condotti *in vitro* su una linea cellulare linfoblastoide B umana (LCL), gentilmente fornita dal Dipartimento di Patologia umana e Oncologia dell'università di Siena.

Questa linea cellulare è stata mantenuta alla temperatura di 37°C con 5% di CO₂, in terreno di coltura RPMI addizionato con 10% FBS, 1% L-glutamine, penicillin/streptomycin.

I miRNA di interesse sono stati trasfettati in maniera transiente mediante nucleoporazione grazie all'utilizzo dell'apparecchiatura Amaxa, programma A23 and solution V (Amaxa, Cologne, Germany). L'efficienza della metodica, valutata mediante FACS analysis for a GFP reporter, è del 45%. Le cellule sono state trasfettate con 10nM, 25nM and 50nM of miRNA mimic (Dharmacon, Celbio, Italy), 50nM miRNA

inhibitor (Dharmacon, Celbio, Italy) e con 50nM del controllo negativo (NC I: IN-001000-01, NC: CN-001000-01; Dharmacon, Celbio, Italy). L' RNA è stato estratto dopo 7 ore dalla nucleoporazione e l'efficienza della trasfezione è stata valutata mediante specifica Real-Time RT-PCR per i miRNAs in esame.

Per la valutazione mediante immunofluorescenza: le cellule, 9 ore dopo l'avvenuta trasfezione, sono state poste su vetrini polarizzati positivamente e fissate in 4% paraformaldehide in PBS per 10 minuti a temperatura ambiente.

La permeabilizzazione è stata indotta trattando le cellule con PBS, 0.2% TritonX-100, 1% BSA. Le cellule, previa saturazione sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo primario anti-PDGFR α (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) alla diluizione 1:50. L'anticorpo secondario goat anti-mouse coniugato con Alexafluor568 (Molecular Probes, Invitrogen, Italy) alla diluizione 1:100 è stato incubato a temperatura ambiente per 45 minuti. I risultati sono stati analizzati con Axiovert 200 microscope (Carl Zeiss, Germany) e processati mediante software opportuno. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti in triplicato.

RISULTATI

***PTEN* è fisiologicamente espresso nei PTCL/NOS**

L'analisi di gene expression profiling non ha evidenziato nessuna significativa differenza nell'espressione di *PTEN* tra i casi di PTCL/NOS analizzati e il tessuto normale (figura 11). In particolare, la mediana, calcolata sui valori di espressione della molecola, è risultata simile nei due gruppi, con l'eccezione di due casi di PTCL/NOS i quali mostrano un'espressione di *PTEN* più elevata rispetto ai campioni in esame.

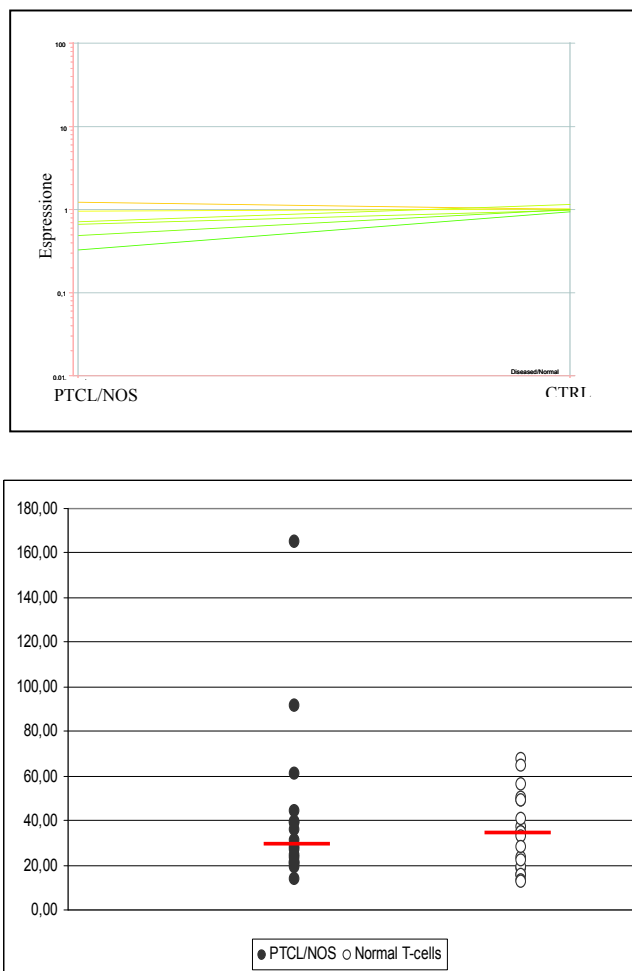


Figura 11

Valori di espressione di *PTEN* nei PTCL/NOS e nei tessuti normali.

Il valore della mediana, indicato dalla barra rossa, è rispettivamente di 27,87 e 33,81 nei PTCL/NOS e nei controlli. Nessuna significativa differenza dell'espressione della molecola è evidenziata in questa analisi.

Il sequenziamento diretto, delle regioni codificanti (9 esoni) e regolatrici di *PTEN* (5', 3'UTR e promotore), effettuato su 72 casi di PTCL/NOS, non ha mostrato la presenza di nessuna variazione della sequenza nucleotidica come mutazioni, micro delezioni, micro amplificazioni, micro inserzioni o polimorfismi.

L'analisi ad alta densità del cariotipo, effettuata mediante Affymetrix 250k SNPs array, di 49 casi di PTCL/NOS non ha evidenziato nessuna aberrazione del locus genico di *PTEN* (Hartmann et al. submitted).

Al fine di vagliare l'eventuale presenza di alterazioni post trascrizionali, in grado di compromettere il corretto funzionamento di questa molecola ⁶⁰, sono state allestite indagini immunoistochimiche, con il preciso scopo di studiare l'espressione e la localizzazione sub cellulare della proteina.

33 PTCL/NOS sono stati, perciò, analizzati sia a livello nucleare che citoplasmatico (figura 12). Nel primo compartimento cellulare analizzato, 31 casi sono risultati positivi alla colorazione immunoistochimica, 2 sono risultati non valutabili a causa di problematiche tecniche della metodica. A livello citoplasmatico 27 casi sono risultati positivi, 3 negativi e 3 non valutabili. Considerando contemporaneamente entrambe le colorazioni, la totalità dei casi analizzati è risultata positiva per PTEN in almeno un compartimento (figura 13). Questi dati evidenziano una regolare espressione della proteina in entrambi i distretti analizzati.

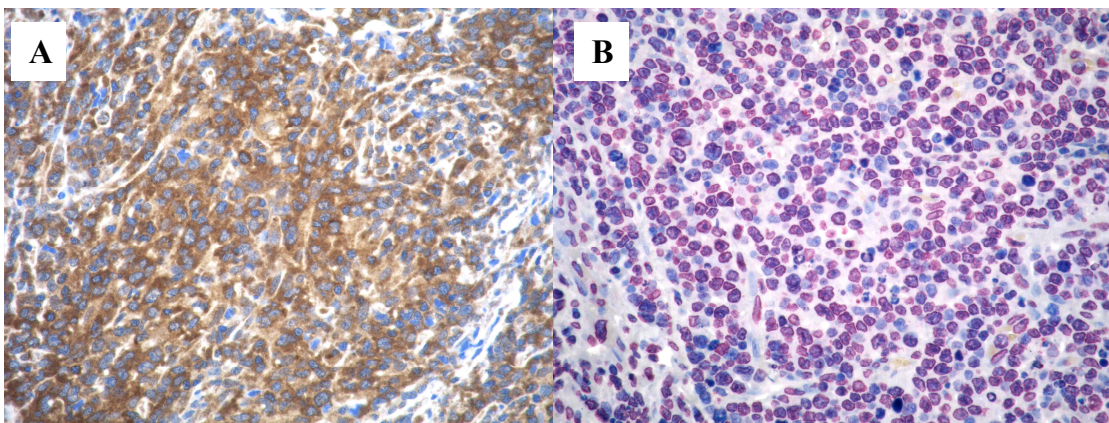


Figura 12

Colorazione immunoistochimica per PTEN citoplasmatico (A) e nucleare (B).

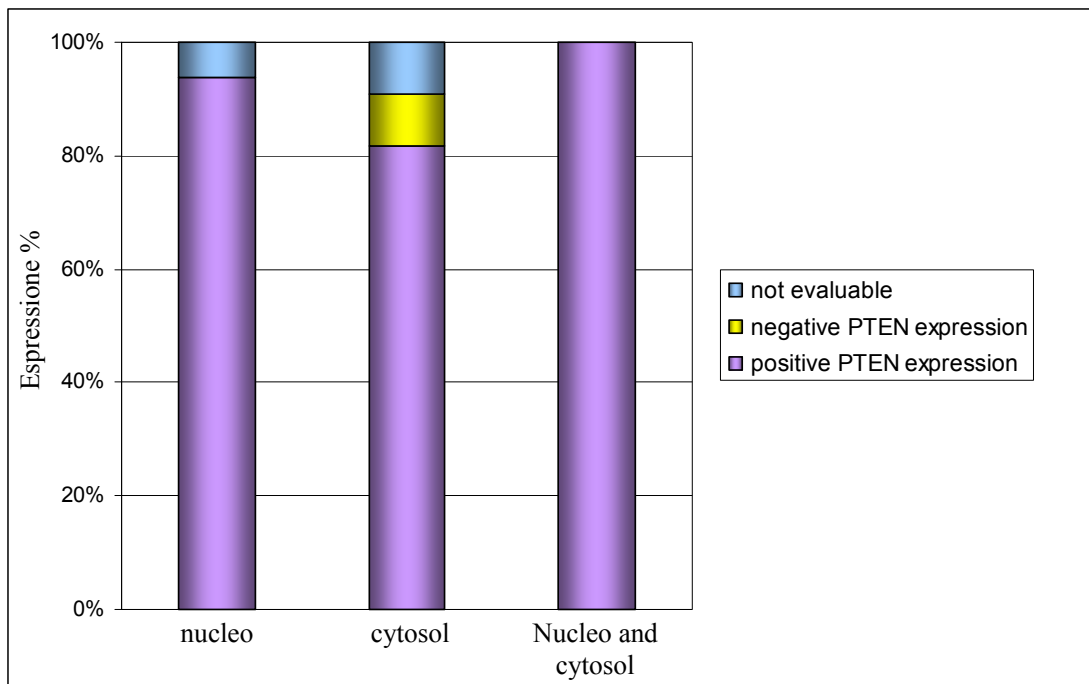


Figura 13

Espressione della proteina PTEN nel nucleo, nel citoplasma e in entrambi i distretti cellulari.

***CDKN1B*/p27 non sembra essere de-regolato nel PTCL/NOS**

L'analisi di gene expression profiling eseguita su *CDKN1B*/p27 e alcune proteine ad esso correlate come CCNE1, CCND, CDK4, CDK6 e CDK2, non ha evidenziato nessuna significativa differenza, nell'espressione di tali molecole, tra i casi di PTCL/NOS e il tessuto normale (figura 14).

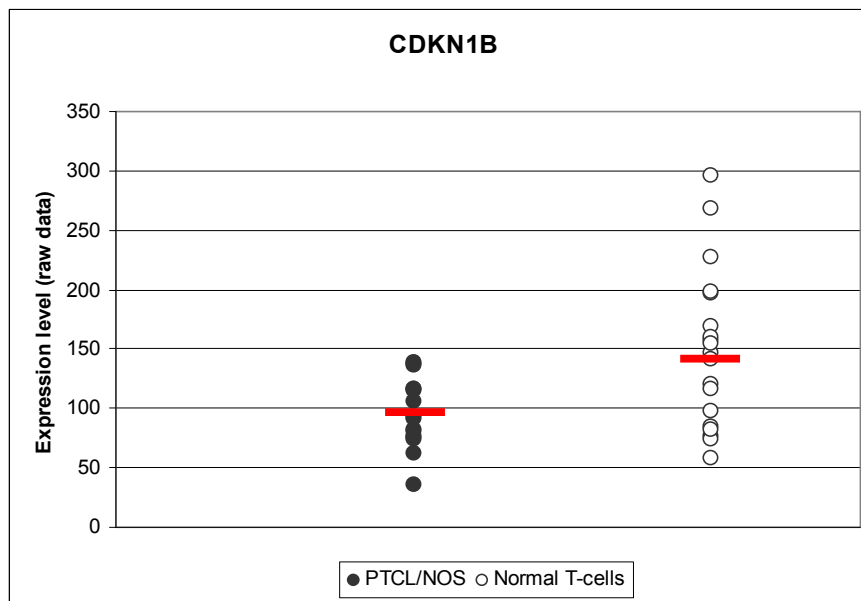


Figura 14

Valori di espressione di *CDKN1B* nei PTCL/NOS e nelle cellule normali.

Il valore della mediana, indicato dalla barra rossa, è rispettivamente di 92.38 e 147.27 nei PTCL/NOS e nei controlli. I tumori mostrano un'espressione lievemente inferiore di p27 rispetto alle cellule normali; la differenza registrata, non risulta, tuttavia, significativa.

A livello proteico l'espressione di p27, valutata in immunistochemica su 98 casi di PTCL/NOS, è riscontrata positiva (Threshold: 30%) in 46/98 casi analizzati (figura 15).

L'espressione di Ki-67 è risultata elevata ($\geq 80\%$) in 6/98 casi, intermedia ($\geq 20\%$; $\leq 80\%$) in 74/98 e bassa ($\leq 20\%$) in 18/98 casi.

Se comparati questi risultati evidenziano una sostanziale concordanza tra l'espressione di p27 e un basso indice proliferativo, in rari casi (6) sembra persa la correlazione inversamente proporzionale esistente tra queste due molecole.

Al fine di valutare l'eventuale aberrante co-espressione di Ki-67 e p27 da parte delle medesime cellule sono state allestite delle doppie colorazioni immunohistochimiche su 6 casi di PTCL/NOS selezionati in base alla presenza di Ki-67 elevato e p27 positivo (figura 16).

I risultati portano all'esclusione della contemporanea co-espressione delle due molecole. È stata effettuata, inoltre, una valutazione dell'espressione a livello proteico della ciclica E, in quanto una sua over espressione può annullare gli effetti inibitori di p27 sul ciclo, favorendo la proliferazione cellulare. All'analisi immunohistochimica l'espressione di CCNE1 appare negativa nei 36 casi analizzati.

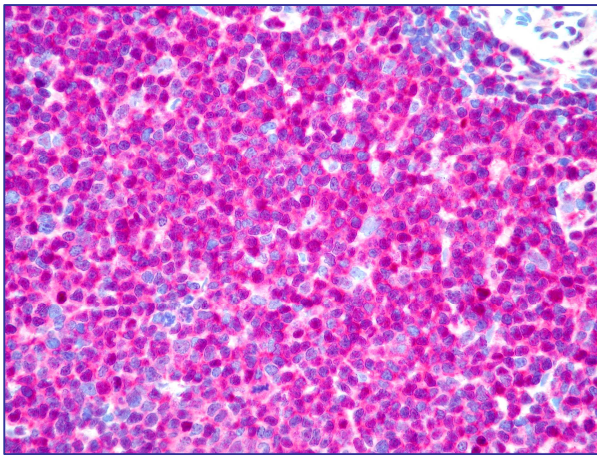


Figura 15

Colorazione immunohistochimica di p27.

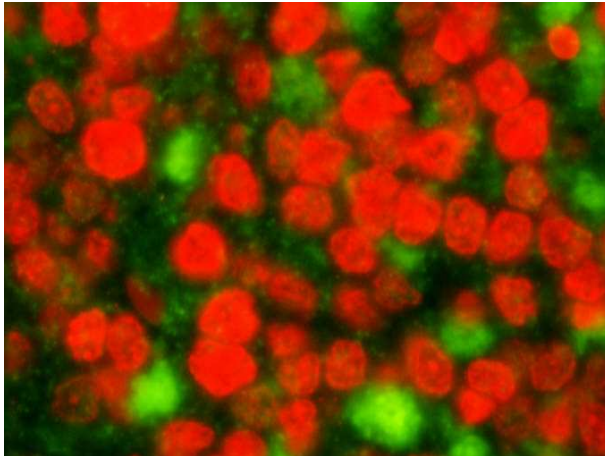


Figura 16

Doppia colorazione di p27 (verde) e Ki-67 (rosso).immagine analizzata mediante microscopia a fluorescenza.

Il gene *CDKN1B* è stato, inoltre, studiato, in 81 casi di PTCL/NOS, mediante sequenziamento diretto dei suoi 3 esoni, delle regioni di giunzione introne-esone e del promotore.

L'analisi molecolare ha evidenziato la presenza di due SNPs (-79 C/T, 326 T/G).

In particolare, la variante T dello SNP -79C/T è presente in 22/81 pazienti, mentre per quanto riguarda lo SNP 326 T/G, 28/81 sono omozigoti TT, 45/81 eterozigoti TG e 8/81 omozigoti GG.

Lo SNP 326 T/G comporta un cambiamento aminoacidico da un valina (V) a una glicina (G) al codone 109; la variante V è stata associata ad una diminuzione dei livelli di p27 causata da un aumento della sua degradazione^{57,58}. Nella nostra casistica, 28 pazienti (28/81 sono omozigoti TT) presentano suddetta variante.

Analisi statistiche (Student T-test, in particolare) sono state effettuate al fine sia di mostrare una correlazione tra lo SNP e i livelli di espressione di p27 sia di identificare un'eventuale associazione tra il polimorfismo e la patologia in esame.

In primis, sono stati analizzati i livelli di espressione della proteina nei 28 campioni SNP 326 T/G positivi; 11/28 mostrano livelli elevati di p27, 17/28 sono associati a livelli bassi o nulli.

Sono stati, successivamente, comparati i valori di espressione di p27 e Ki-67 (marcatore prognostico) in presenza dello SNP; i risultati ottenuti non rilevano nessuna associazione tra il polimorfismo e la sopravvivenza (tabella 3).

p27	Ki-67	Pazienti con SNP T(326)G
Positivo (30-35)	Basso (<10)	2
Positivo (30-35)	Intermedio (20-80)	8
Positivo (30-35)	Alto (>80)	1
Negativo (10-30)	Basso (<10)	2
Negativo (10-30)	Intermedio (20-80)	11
Negativo (10-30)	Alto (>80)	4

Tabella 3

Distribuzione dei pazienti positivi allo SNP T(326)G in base ai valori di espressione di p27 e Ki-67.

Infine, vista la correlazione inversa esistente tra Ki-67 e p27 nei tessuti sani, una curva di sopravvivenza (kaplan-meier) è stata costruita per studiare il possibile ruolo prognostico di p27.

L'espressione di questa proteina è stata studiata in 68 casi di PTCL/NOS forniti di indicazioni cliniche complete. In base ai livelli di espressione, i 68 PTCLs/NOS sono stati suddivisi in 2 gruppi: elevata espressione di p27 ($\geq 30\%$) e bassa espressione ($\leq 30\%$). Tali gruppi sono stati, successivamente, comparati mediante un test statistico (kaplan maier) (figura 17).

I risultati evidenziano una differenza di sopravvivenza tra i 2 gruppi (figura 17): il gruppo associato ad un elevata espressione di p27 mostra un andamento migliore

rispetto al gruppo con bassi livelli di proteina. Tale differenza risulta, tuttavia, non significativa (P value:0.1086).

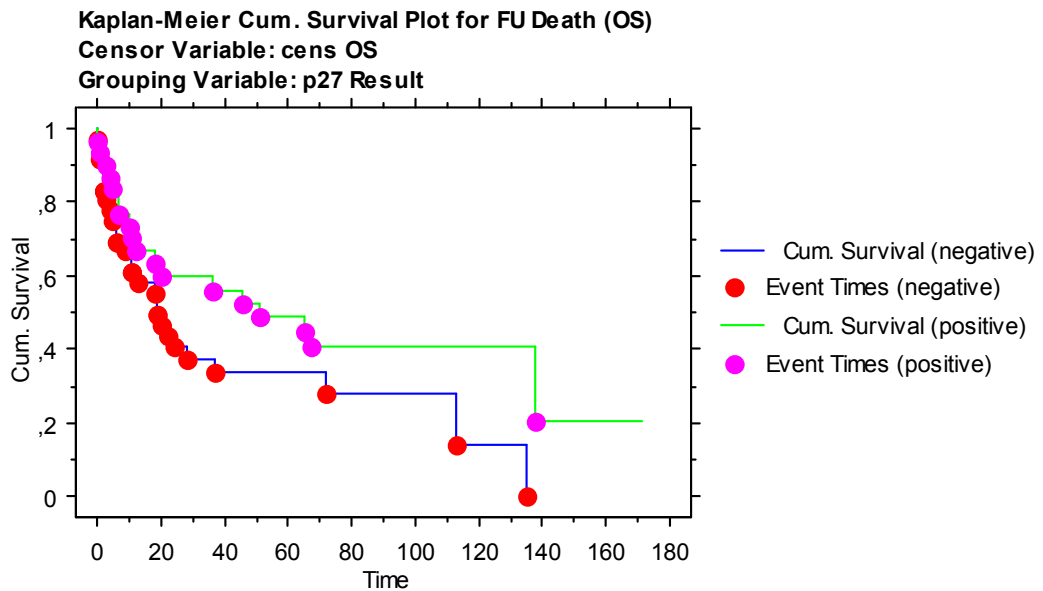


Figura 17

Curva di sopravvivenza kaplan-meier per la valutazione del ruolo prognostico di p27.

In verde è rappresentata la curva di sopravvivenza associata ai casi di PTCL/NOS con p27 elevato; in blu i PTCLs/NOS con p27 basso.

L'espressione di molecole NF-kB correlate differenzia i PTCLs/NOS in due sottogruppi

Una hierarchical clustering analysis è stata effettuata su 28 casi di PTCL/NOS e 20 controlli sani per l'espressione dei membri della famiglia NF-kB e di 109 geni ad essa correlati (appendice 1). È stato trovato che il gruppo delle neoplasie mostra un'espressione eterogenea di queste molecole ed è nettamente distinto dal gruppo dei controlli (figura 18).

In base all'espressione di questi geni, i PTCLs/NOS analizzati, possono essere divisi in due sottogruppi C1 e C2 (figura 18); in particolare C1 rappresenta il gruppo di PTCLs/NOS che mostra una generale down regolazione dell'intero pathway, mentre il gruppo C2 è associato all'espressione di alcuni di questi geni (lista completa dei geni diversamente espressi dai due gruppi in appendice 2).

Analizzati contemporaneamente tutti i PTCL/NOS mostrano una down regolazione di alcuni gruppi di geni come: marker della linea cellulare T (*CD3*, *CD5*, e *CD6*), molecole di adesione (*ICAM3*), molecole implicate nella risposta immunitaria (*IFG*, *IRF1*, *IL10RA*, *IL2RB*, *IL4R*), regolatori della trascrizione (*JUN*, *JUNB*, and *NFATC1*), fattore tumorale di necrosi (TNF) proteine ad esso correlate (*TNF*, *TNFAIP3*, *TNFRSF14*, *TNFRSF1B*, *TNFRSF25*, *TNFRSF4*, *TRAF4* e *TRAF6*), e componenti della famiglia NF-kB (*RELA*, *RELB*, *REL*, *NFKB1*, *NFKB2*, *NFKBIA*, *NFKBIB*, e *NFRKB*).

Il gruppo C2 è invece associato ad una up regolazione di geni coinvolti: nella regolazione trascrizionale (*IRF2* e *NFATC3*), nella regolazione dell'apoptosi (*CFLAR* e *FADD*), nella traduzione del segnale (*CSF1R* e *CSF2RB*), nella risposta immune (*IL10RB*, *IL15*, *IL15RA*, *IL1R1*, e *IL2RG*) e nel signaling del TNF (*TNFAIP1*, *TNFAIP2*, *TNFRSF5*, *TNFRSF7*, *TNFSF10*, *TNFSF13*, *TNFSF13B*, *TRADD* e *TRAF3*). È stata, inoltre, effettuata una unsupervised analysis comprendente solo PTCLs/NOS al fine di confermare la presenza dei 2 sottogruppi C1 e C2. Questo approccio assicura i risultati ottenuti dalla hierarchical clustering analysis.

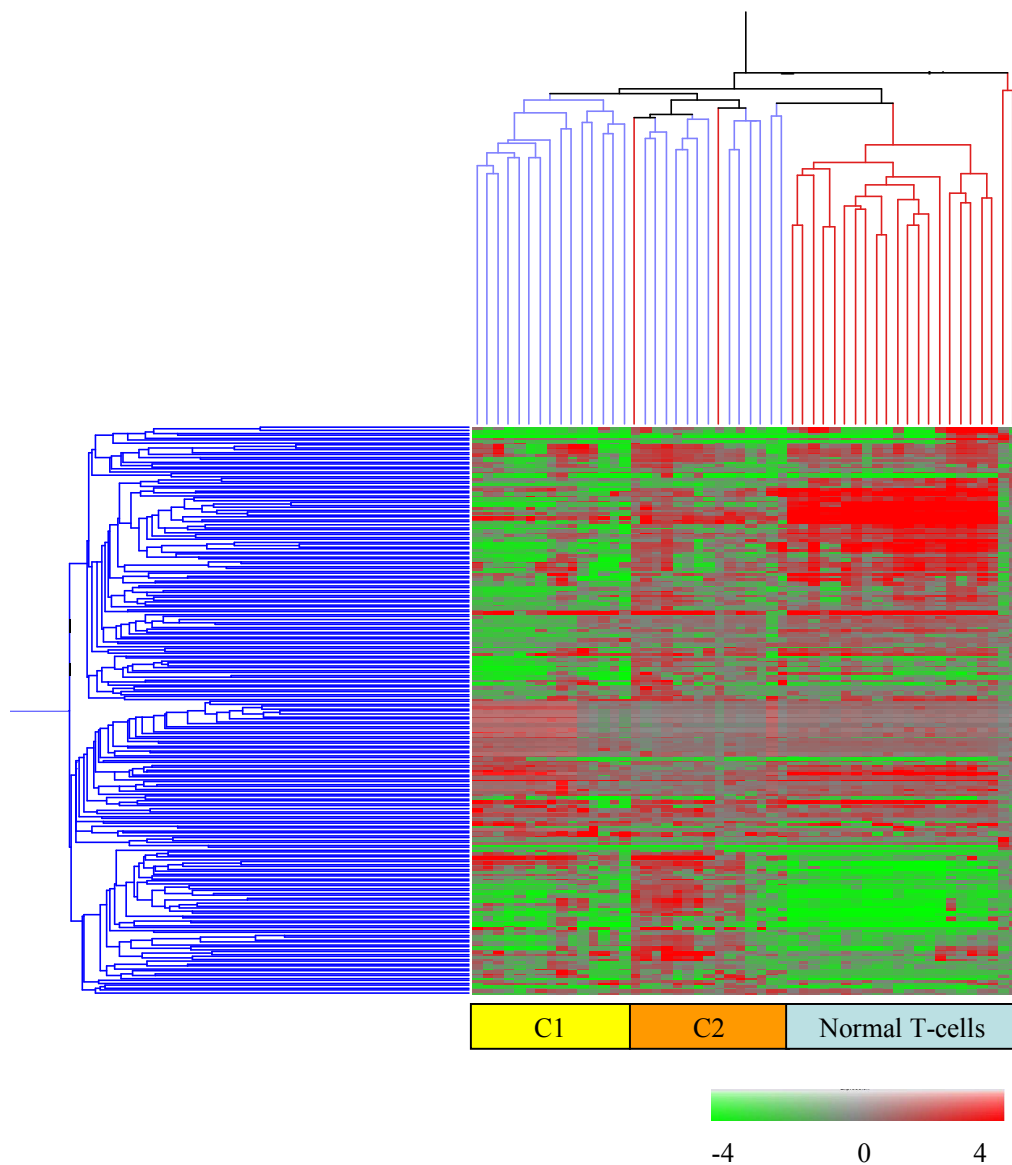


Figura 18

Hierarchical clustering di PTCL/NOS (N=28, blu), cellule T normali (N=20, rosso) e tessuti reattivi (N=4, rossi) in relazione all'espressione di 109 geni correlati con NF-kB. PTCL/NOS sono chiaramente distinti dai controlli, e possono essere divisi in 2 sottogruppi (C1 e C2).

RELA, RELB e REL sono frequentemente down-regolati nel PTCL/NOS

L'espressione dei geni *RELA*, *RELB* e *REL* è stata studiata, mediante GEP, in 28 casi di PTCL/NOS, 20 campioni di cellule T normali e 4 tessuti linfoidi. *RELA* e *REL* sono correlati al pathway di attivazione canonico di NF- κ B, *RELB* a quello alternativo.

I risultati hanno evidenziato livelli maggiori di questi geni nei campioni di tessuto normale (figura 19) rispetto a quelli patologici. Tali dati non sono dovuti alla presenza di componenti reattive nei tessuti tumorali, infatti, risultati analoghi, sono stati ottenuti dopo normalizzazione, effettuata in base alla media dell'espressione di queste molecole nei tessuti reattivi (figura 19).

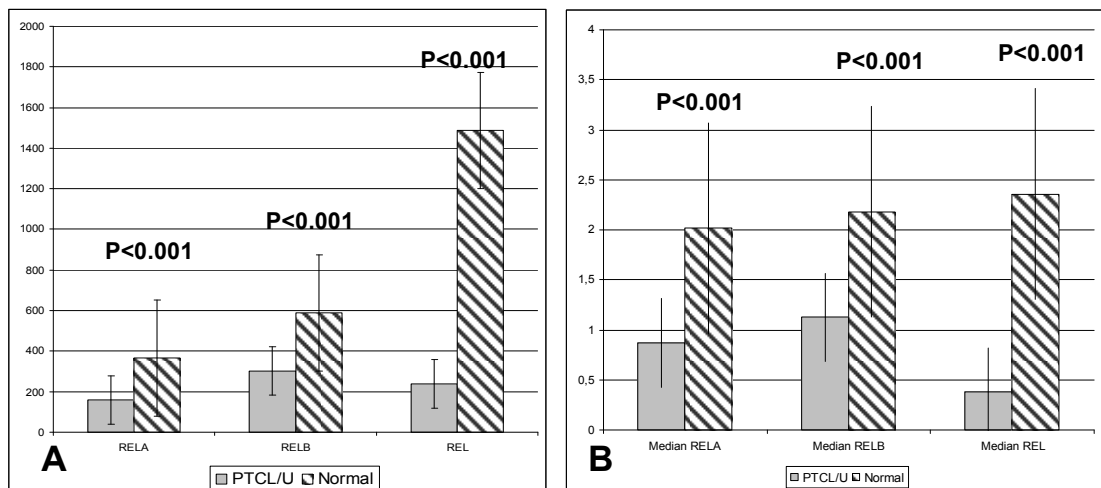


Figura 19

Espressione di *RELA*, *RELB*, e *REL* nei tessuti normali e nei PTCL/NOS (A).

Stessa analisi effettuata in seguito a normalizzazione dei dati (B).

Analizzando singolarmente ogni gene, è risultato che tutti i PTCLs/NOS presentano livelli di *RELA* inferiori alla media osservata nei campioni normali (figura 20); analoghi risultati sono stati ottenuti dall'analisi di *RELB* (media PTCL/NOS 303.1; media controlli 587.4) e di *REL*; in quest'ultimo caso i livelli di espressione sono

notevolmente inferiori rispetto ai controlli; infatti la media di espressione di REL nei PTCL/NOS è 239.9 contro 1487.025 nei campioni sani.

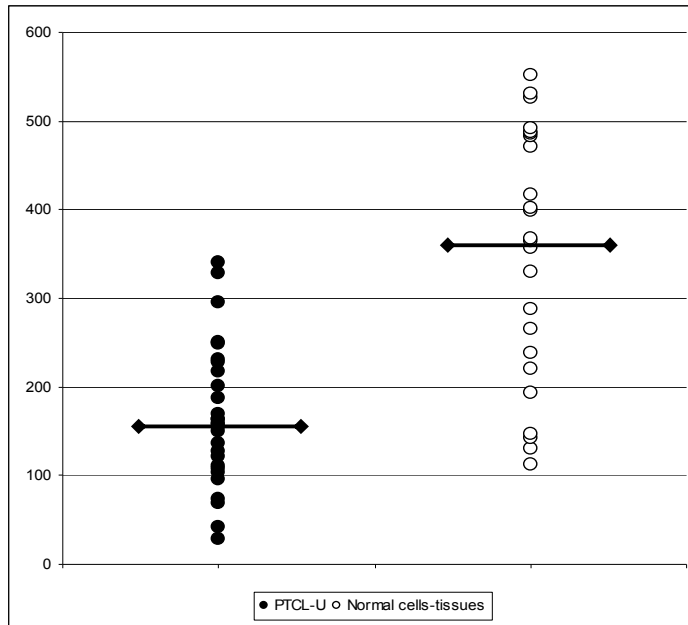


Figura 20

Valori di espressione di RELA nei PTCL/NOS e nei controlli.

Il valore della media, indicato dalla barra nera, è rispettivamente di 157.98 e 365.65 nei PTCL/NOS e nei controlli. I tumori mostrano un'espressione inferiore di RELA rispetto alla media di espressione delle cellule normali.

Al fine di studiare l'espressione proteica e lo stato di attivazione del pathway di NF-kB, è stata allestita un'analisi immunostochimica per la valutazione dell'espressione e della localizzazione cellulare della famiglia di proteine in esame. Questa indagine è stata effettuata su casi di PTCL/NOS completi di notizie cliniche.

Le proteine RELA, RELB e REL mostrano una predominante espressione citoplasmatica; la colorazione nucleare, adottata come marker di attivazione di NF-kB^{69, 70}, è positiva solo in una minoranza dei casi e nelle cellule reattive (tabella 4).

Viceversa P100/P52 e P105/P50 presentano nella maggioranza dei casi una positività nucleare (tabella 4)

Antigene	Casi valutati	Positività citoplasmatica	Positività nucleare e citoplasmatica.	non valutabili
RELA	47	35	8	4
c-REL	47	31	13	3
P105/P50	47	7	19	21
RELB	47	39	2	6
P100/P52	47	8	21	18

Tabella 4

Risultati dell' analisi immunistochimica per RELA, RELB, REL P105/P50 e P100/P52

I vari membri della famiglia NF-kB, possono associarsi formando complessi eterodimerici od omodimerici, capaci di attivare la via canonica (RELA/p50, RELA/RELA, p50/REL e RELA/REL) o alternativa (RELB/p52); omodimeri di p50 o di p52, sono, invece, inattivi o agiscono come repressori.

Analizzando, quindi, i membri della famiglia di NF-kB, in base alla loro appartenenza alle diverse vie di attivazione, è risultato che 14/47 casi (35%) mostrano un'attivazione del pathway canonico; 1/47 (5%) l'alternativo, 23 PTCLs/NOS mostrano una disattivazione di entrambe le vie e 9 per problemi inirenti alla metodica non solo valutabili per almeno uno dei due pathways.

Correlazione tra l'espressione di NF-kB e l' overall survival

È stata, inoltre, effettuata una correlazione tra il grado di proliferazione (valori di Ki-67) e l'attivazione dei componenti di NF-kB. Nessuna associazione è stata identificata. Infine, è stata costruita una curva di sopravvivenza per valutare la correlazione esistente tra i diversi pattern di espressione di NF-kB (C1 e C2) e l' overall survival (OS) (figura 21). Nessun legame è stato individuato.

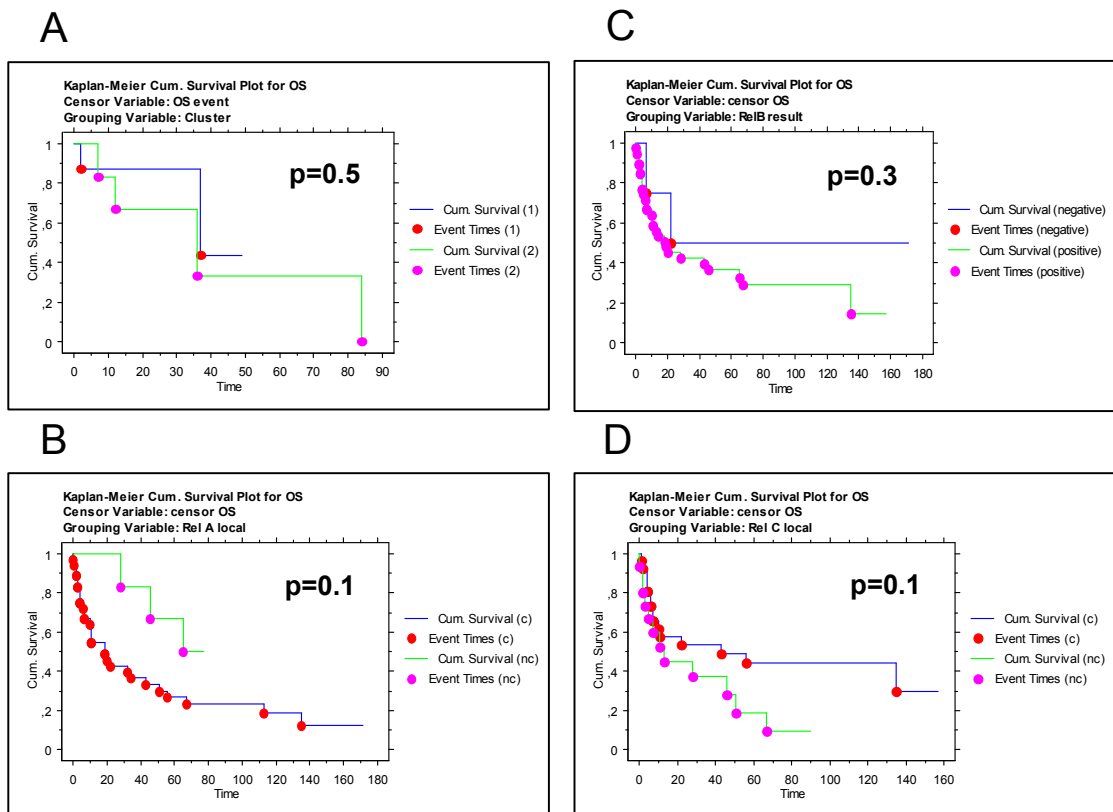


Figura 21

Curve di sopravvivenza basate sull'espressione del pathway di NF-kB.

Nessuna differenza nell' OS dei casi di PTCL/NOS è stata identificata sia in base all'espressione genica di NF-kB(A), che alla localizzazione proteica di RELA, RELB e REL (panelli B, C e D rispettivamente.). I p value ottenuti, per ogni singola curva, sono infatti, maggiori del limite di significatività definito come $P < 0.05$.

Risultati analoghi sono stati ottenuti studiando l'OS in base all'attivazione (o meno) del pathway canonico o alternativo (dati non mostrati)

***PDGFR α* è over-espresso e costantemente attivato nel PTCL/NOS**

L'analisi di gene expression ha evidenziato un'aberrante espressione del *PDGFR α* nei 28 casi di PTCL/NOS analizzati.

La media di espressione di questa proteina è, infatti, significativamente più elevata nei tumori rispetto ai controlli sani (figura 22).

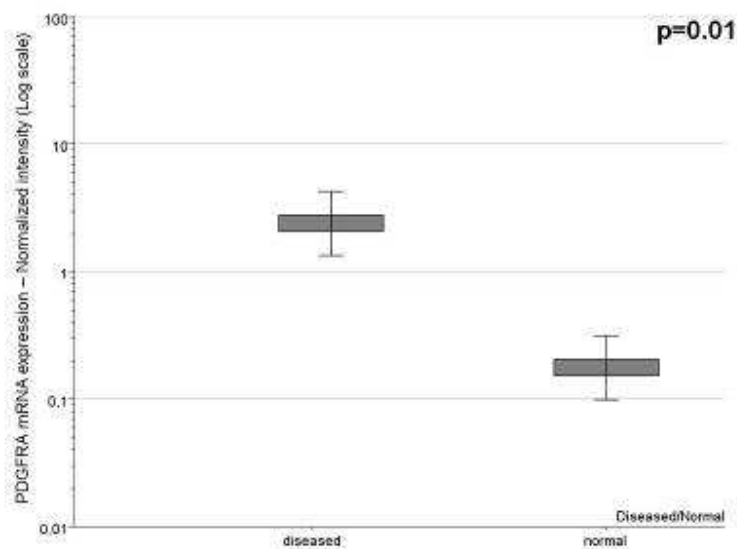


Figura 22

Espressione del *PDGFR α* analizzata mediante gene expression profiling nei PTCL/NOS e nei tessuti normali.

Questi dati, sono supportati anche a livello proteico da indagini immunostochimiche.

134 casi di PTCL/NOS sono stati analizzati mediante un anticorpo diretto contro il recettore, 121 campioni sono risultati positivi per la colorazione (91%), 12 negativi e 12 non valutabili a causa di problematiche tecniche della metodica.

I risultati di tale indagine, confermano l'overespressione del PDGFR α , osservata precedentemente in GEP.

E' stata, inoltre, effettuata, un'analisi immunofenotipica al fine di studiare lo stato di attivazione del recettore.

Il 95% dei casi positivi per il PDGFR α , mostra la presenza del recettore nella sua forma fosforilata (figura 23), ossia attiva, in contrasto con i controlli sani dove il recettore è presente in forma defosforilata.

Questi risultati indicano che il recettore, oltre ad essere overespresso, è presente in uno stato di costante attivazione.

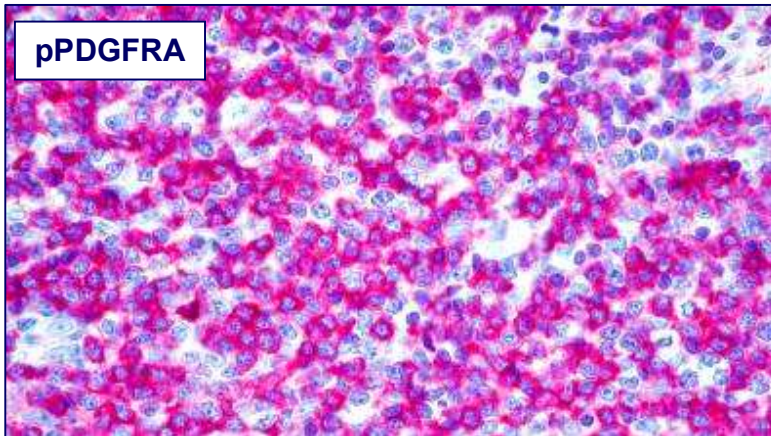


Figura 23

Colorazione immunoistochimica della forma fosforilata del PDGFR α nel PTCL/NOS

Il locus genico del PDGFR α non è alterato

L'overespressione e l'alterata attivazione del PDGFR α possono dipendere da cause eterogenee, diversi esperimenti sono stati allestiti al fine di indagare le diverse possibilità di deregolazione.

90 campioni sono stati analizzati mediante sequenziamento diretto di tutti 23 esoni codificanti, delle regioni regolatorie 5' e 3' UTR e del promotore del *PDGFR α* .

Nessuna variazione nucleotidica è stata identificata nella sequenza del recettore (regione codificante e regolatrice) ad eccezione dell'esone 10 che mostra in 12 casi una mutazione puntiforme (da T a C) all'interno della sequenza esonica. La mutazione non è stata riconosciuta né da Blast, né da Ensembl come polimorfismo o come mutazione nota.

Tale mutazione provoca una modificazione a livello della sequenza aminoacidica. La serina, aminoacido neutro e polare, presente nel wild type viene sostituita con una prolina, aminoacido neutro ed idrofobico.

La predizione proteica effettuata con il programma bioinformatico polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) non mostra alcun cambiamento conformazionale a livello della proteina (figura 24).

<u>Acc number</u>	<u>Position</u>	<u>A</u> 1	<u>A</u> 2	<u>Description</u>
P16234	478	S	P	Alpha platelet-derived growth factor receptor precursor (EC 2.7.1.112) LENGTH: 1089 AA

Prediction This variant is predicted to be benign				
<u>Prediction</u>	<u>Available data</u>	<u>Prediction basis</u>	<u>Substitution effect</u>	<u>Prediction data</u>
benign	FT alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 0.571

Details PSIC profile scores for two amino acid variants					
<u>Score 1</u>	<u>Score 2</u>	<u> Score1-Score2 </u>	<u>Observations</u>	<u>Diagnosics</u>	<u>Multiple alignment around substitution position</u>
+0.471	+1.042	0.571	65	cached	Sequences: Flanks:

Mapping of the substitution site to known protein 3D		
<u>Database</u>	<u>Initial number of structures</u>	<u>Number of structures</u>
PQS	610	0

Figura 24

Risultati della predizione proteica effettuati con il programma polyphen.

Una FISH (Fluorescent in situ hybridization) specifica per il locus genico del *PDGFR α* è stata allestita presso l'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università di Basilea con lo scopo di indagare aberrazioni cromosomiche (riarrangiamenti, geni di fusione, amplificazioni) coinvolgenti il recettore in esame. 2 sonde sono state impiegate a tale fine: una sonda Break-apart per lo studio di riarrangiamenti e una sonda CEP (Chromosome enumeration probes) per lo studio delle amplificazioni.

I risultati, schematizzati nella tabella 4, non evidenziano la presenza di nessuna alterazione cromosomica che interessa il recettore.

Per ulteriore conferma il locus genico del *PDGFR α* è stato studiato mediante un'analisi ad alta densità del cariotipo, (Affymetrix 250k SNPs array), su 49 casi di PTCL/NOS. Non è stata evidenziata nessuna aberrazione del locus genico del recettore. (Hartmann et al. submitted).

Gene	PTCL/
PDGFRA	
<i>no amplification</i>	26
no amplification	22
no amplification/ borderline	0
no amplification/ Deletion?	4

Tabella 4

Risultati della FISH per lo studio del *PDGFR α* su 26 casi di PTCL/NOS.

Il miRNA 152 è implicabile nell'overespressione del *PDGFR α*

Avendo escluso anomalie strutturali, come cause della iper-espressione del *PDGFR α* , abbiamo ipotizzato una possibile de-regolazione a livello trascrizionale. Sono stati quindi ricercati, mediante strumenti informatici, miRNA la cui struttura potesse candidarli quali potenziali regolatori del *PDGFR α* .

In base alle predizioni di software di specifiche banche dati (Mirnaviewer, PicTar, Tarbase and miRBase), sono stati individuati 6 differenti miRNAs (hsa-mir-130a, hsa-mir-130b, hsa-mir-301, hsa-mir-148a, hsa-mir-148b and hsa-mir-152). I livelli di espressioni di tali molecole sono stati analizzati sul RNA, estratto da cellule microdisseccate, di 9 casi di PTCL/NOS e 4 linfonodi reattivi mediante specifica real time PCR. I risultati hanno evidenziato un pattern di espressione aberrante per 3 dei 6 miRNAs analizzati (hsa-mir-130a, hsa-mir-301 and hsa-mir-152). In particolare queste 3 molecole risultano down espresse nei tumori primari rispetto ai controlli normali (figura 25).

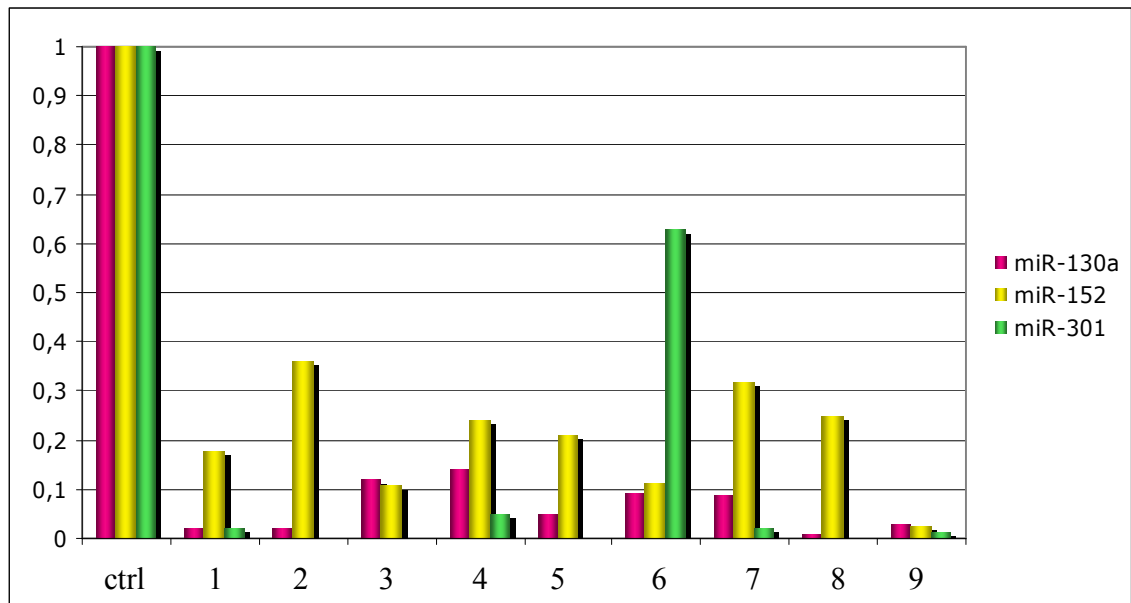


Figura 25

Grafico dell'espressione dei miRNAs 152, 130a e 301 nei controlli e in 9 casi di PTCL/NOS. I dati sono ottenuti in seguito a specifica Real-Time PCR relativa. I valori riportati sono normalizzati sulla media di espressione dei 4 controlli

Al fine di confermare quale tra questi miRNAs fosse strettamente correlato con il *PDGFR α* , in collaborazione con il Dipartimento di Patologia umana e Oncologia dell'università di Siena del Prof. Leoncini sono stati testati, mediante trasfezione in una linea cellulare linfoblastoide, specifici miRNAs sintetici. In seguito a trasfezione, con diverse concentrazioni di mimic (10nM, 25nM and 50nM), è stata effettuata una qRT-PCR per valutare le eventuali variazioni di espressione del *PDGFR α* . Una riduzione dei livelli del recettore è stata osservata in risposta all'azione del hsa-mir-152 (figura 26). Per ulteriore conferma del coinvolgimento del hsa-mir-152 nella regolazione del *PDGFR α* , è stata effettuata una trasfezione, con 50nM di un inibitore miRNA specifico. Cio' ha ripristinato i livelli di espressione dell'mRNA del *PDGFR α* (figura 27) confermando il coinvolgimento di questo miRNA nella regolazione del *PDGFR α* .

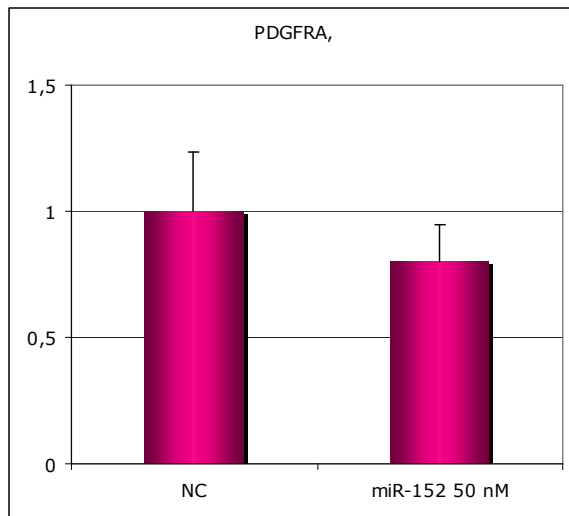


Figura 26

Espressione del PDGFR α valutata mediante qRT-PCR relativa nei controlli negativi (NC) e in cellule trasfettate con 50 nM di miR-152. I valori riportati sono normalizzati in base all'espressione del controllo (1). La riduzione dell'espressione del PDGFR α corrisponde circa ad $\frac{1}{4}$ (0.801).

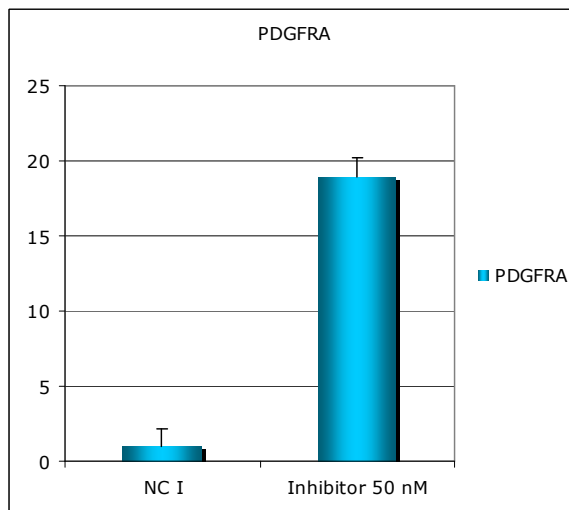


Figura 27

Espressione del PDGFR α valutata mediante qRT-PCR nei controlli negativi (NC) e in cellule trasfettate con 50 nM di inhibitor miR-152. I valori riportati sono normalizzati in base all'espressione del controllo. L'aumento dell'espressione del PDGFR α in seguito a trasfezione del inhibitor è di circa 20 volte (18,961) rispetto al controllo (1).

Un'analisi, mediante immunofluorescenza, ha confermato gli effetti della azione del miRNA sul PDGFR α anche a livello proteico (figura 28).

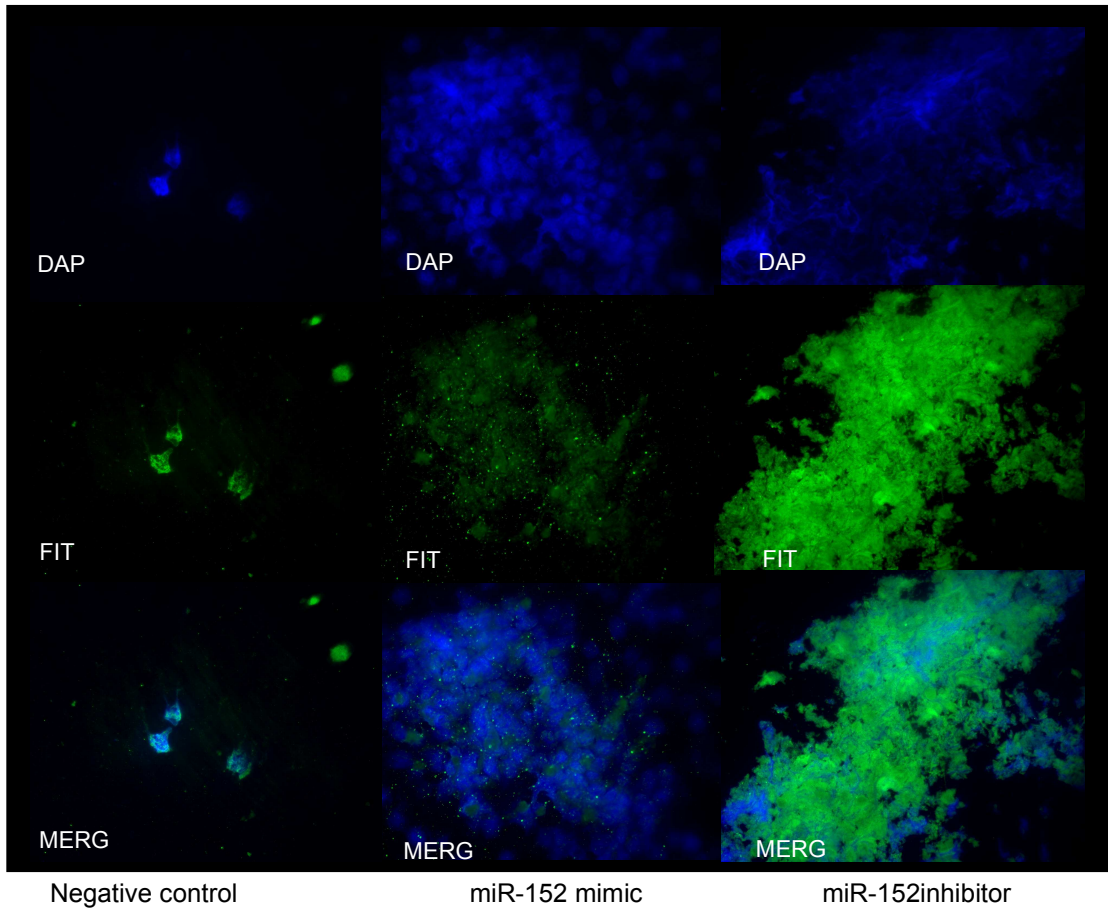


Figura 28

Valutazione, mediante immunofluorescenza, dell'espressione del PDGFR α in controlli negativi e in cellule trasfettate rispettivamente con miR152 mimic e miR152 inhibitor. Il PDGFR α è marcato mediante FITC (FIT); i nuclei contrastati con DAPI (DAP). La sovrapposizione delle due colorazione (MERG) dimostra l'effettiva azione del miRNA 152 a livello proteico.

Loop autocrino: probabile causa dell'alterato stato di attivazione del PDGFR α

Sono stati, infine, effettuati, degli esperimenti al fine di studiare le cause dell'aberrante stato di attivazione del PDGFR α .

L'analisi mutazionale non rileva la presenza di nessuna alterazione a carico della regione codificante del recettore.

Lo studio del locus genico non ha evidenziato alterazioni a carico dello stesso.

Una possibile spiegazione dello stato di attivazione aberrante del PDGFR α nei PTCLs/NOS è da ricercarsi nell'esistenza di un loop autocrino recettore-ligando; diversi esperimenti sono stati quindi allestiti per confermare questa ipotesi.

L'analisi di GEP, ha evidenziato la presenza del ligando del PDGFR α sia nei PTCLs/NOS che nei controlli. (figura 29)

L'indagine immunofenotipica, allestita per valutare la presenza del PDGF-AA nei casi PDGFR α positivi, ha mostrato presenza del ligando nel 93% dei campioni analizzati (figura 30).

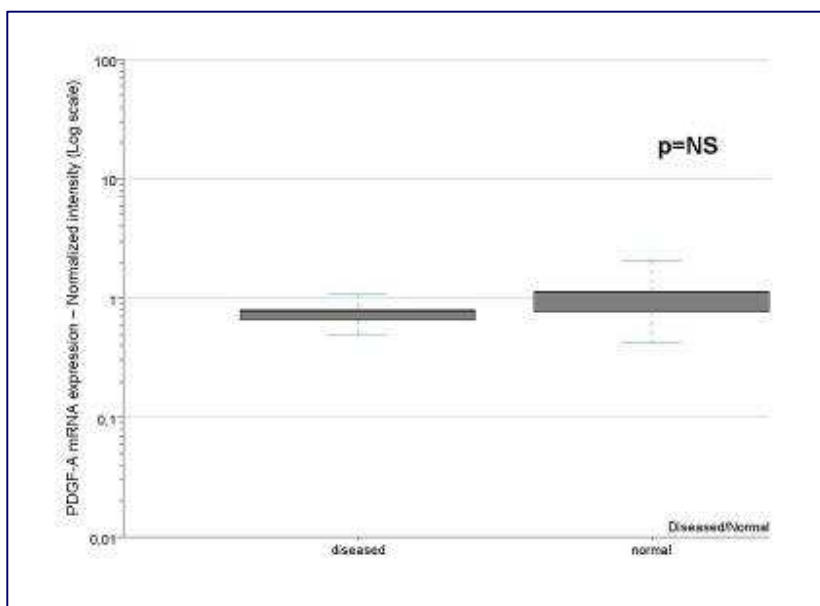


Figura 29

Espressione del PDGFA, analizzata mediante gene expression profilino, nei PTCL/NOS e nei tessuti normali

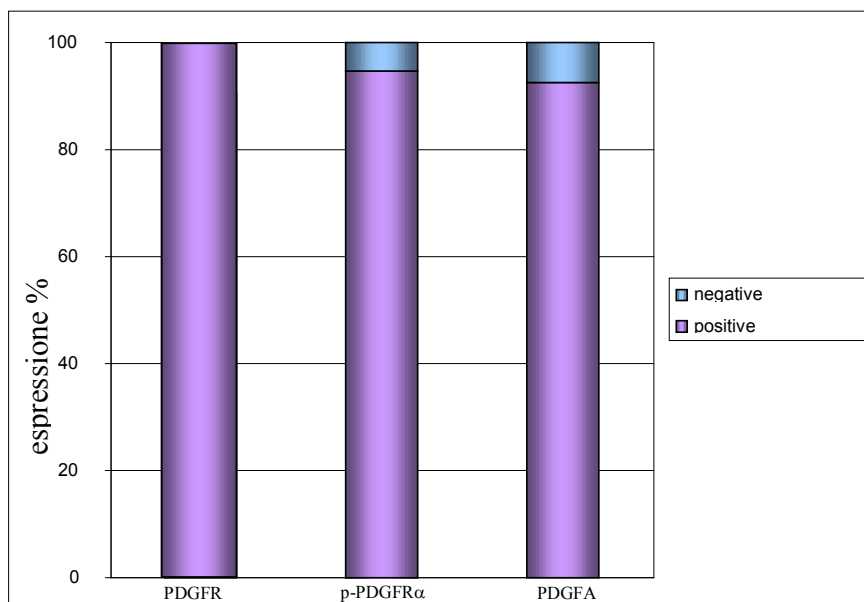


Figura 30

Valori di espressione proteica della forma fosforilata del PDGFR α e del ligando PDGFA analizzati su 121 casi PDGFR α positivi.

I dati ottenuti supportano la nostra ipotesi. Al fine, quindi, di dimostrare l'esistenza di una stimolazione autocrina del PDGFR α , sono stati condotti degli esperimenti *in vitro* avvalendoci dell'utilizzo di una linea cellulare di linfoma a cellule T periferico non altrimenti specificato (PTCL/NOS): **FE – PD**.

Questa linea mima l'alterazione del PDGFR α identificata nei PTCL/NOS, infatti all'analisi citofluorimetrica il recettore è risultato presente e fosforilato (figura 31).

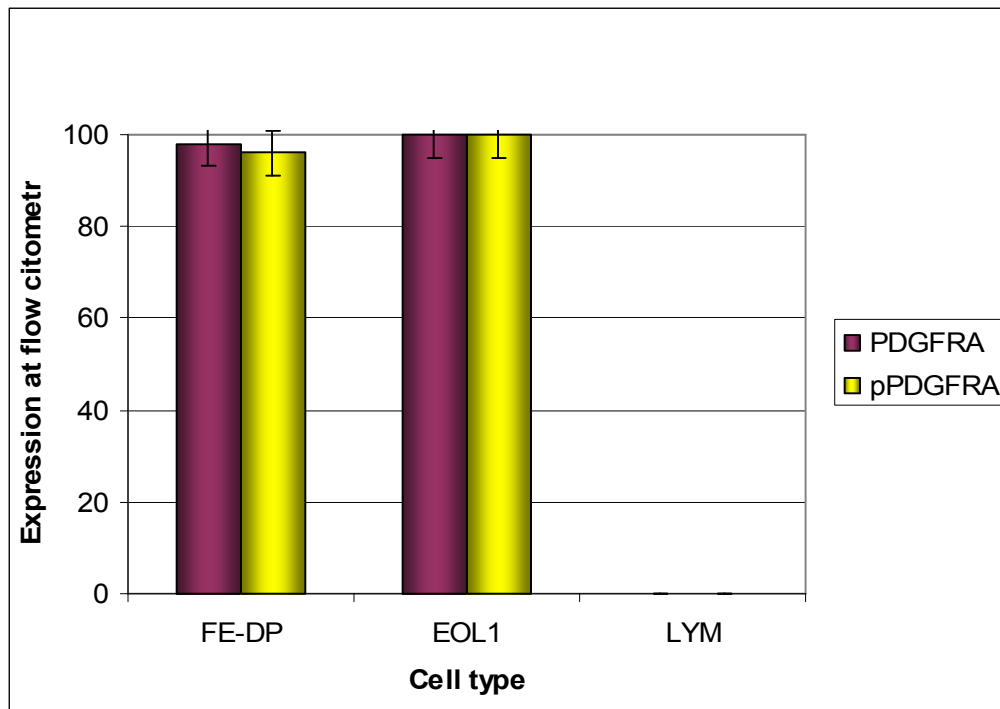


Figura 31

Analisi citofluorimetrica dell'espressione del PDGFR α e del p-PDGFR α nelle cellule FE-PD nelle EOL1 (controllo positivo) e nella linea cellulare LYM (controllo negativo).

Il saggio ELISA, effettuato al fine di ricercare il PDGF-AA a livello extracitoplasmatico, è stata condotto sul surnatante delle cellule FE – PD e JURKAT (controllo) seminate in coltura a diverse concentrazioni, e successivamente analizzate a differenti time point.

La totalità degli espreimenti allestiti, ha evidenziato una concentrazione elevata del ligando nel surnatante delle cellule FE-PD (5ng/ml) rispetto alle Jurkat (8 pg/ml) (figura 32) sottolineando l'effettiva secrezione del PDGF-AA da parte delle cellule FE-PD.

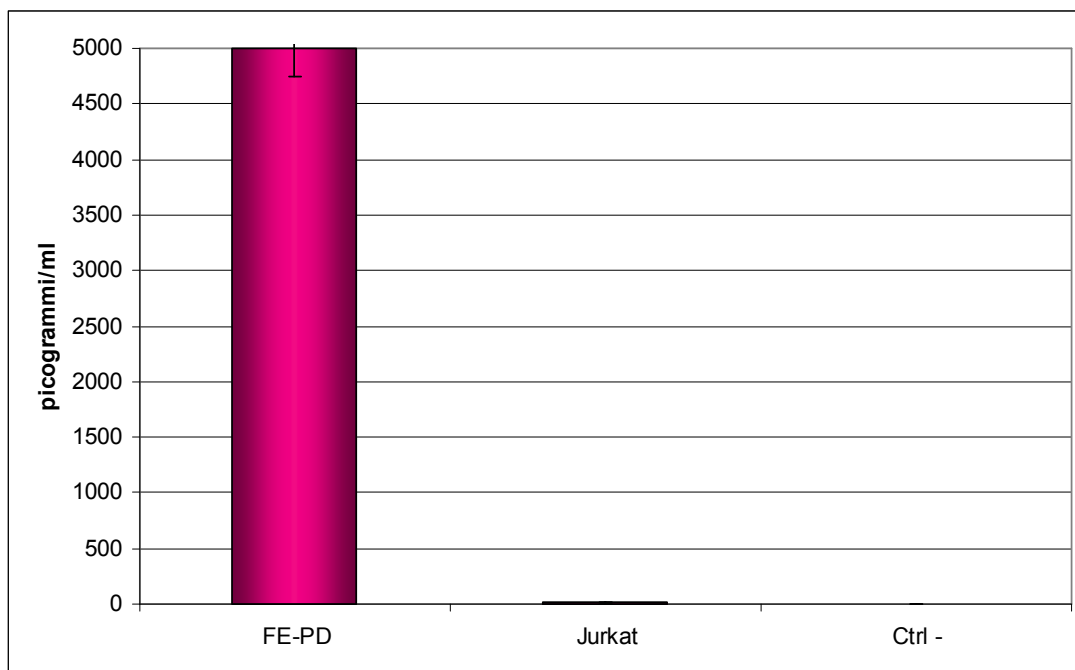


Figura 32

Espressione del PDGF-AA extracellulare nel surnatante delle cellule FE-PD (PTCL/NOS), JURKAT e nel controllo negativo. Analisi effettuata a 48 h.

Successivamente è stato condotto un saggio di neutralizzazione del PDGF-AA al fine di valutare gli effetti che questa rimozione comporta sull'attivazione del recettore e dimostrare, quindi, il coinvolgimento del ligando extracitoplasmatico nell'attivazione autocrina del PDGFR α .

Le linee cellulari FE-PD e EOL-1 sono state trattate con diverse concentrazioni di un anticorpo in grado di sequestrare il PDGF-AA e renderlo incapace di agire sul PDGFR α .

Le cellule sono state analizzate mediante citofluorimetria per la valutazione dello stato di fosforilazione del recettore.

I risultati, semplificati in figura 33, mostrano una significativa riduzione dei livelli di fosforilazione del PDGFR α nelle cellule FE-PD. Nella linea cellulare di controllo EOL1, caratterizzata da una attivazione costitutiva del PDGFR α dovuta alla presenza del prodotto di fusione FIP1L1/PDGFR α , lo stato di fosforilazione del recettore rimane

invariato sottolineando la diretta implicazione del ligando nell'attivazione del PDGFR α presente nelle cellule FE-PD.

Le cellule trattate con 20 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$ e 60 $\mu\text{g/ml}$ hanno mostrato un'elevata percentuale di defosforilazione rispetto al controllo non trattato. La concentrazione di 20 $\mu\text{g/ml}$ mostra la significativa riduzione di circa 80% di recettore fosforilato. Con l'utilizzo di 30 $\mu\text{g/ml}$ si ha un'ulteriore riduzione della percentuale di fosforilazione, fino al 90%. La medesima riduzione si ottiene incrementando le concentrazioni di neutralizzante, a 40 $\mu\text{g/ml}$ e a 60 $\mu\text{g/ml}$ (figura 34).

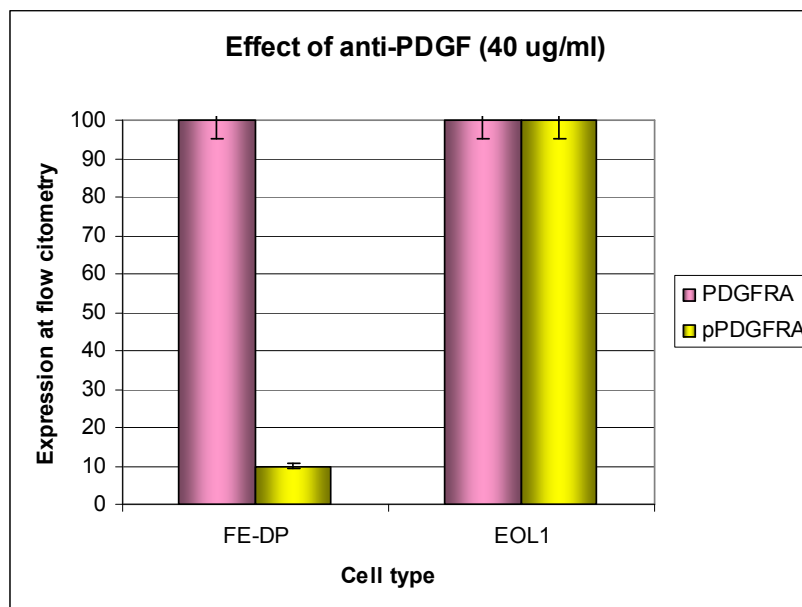


Figura 33

Effetto dell'anti PDGF sulla fosforilazione del PDGFR α , analizzato mediante citofluorimetria.

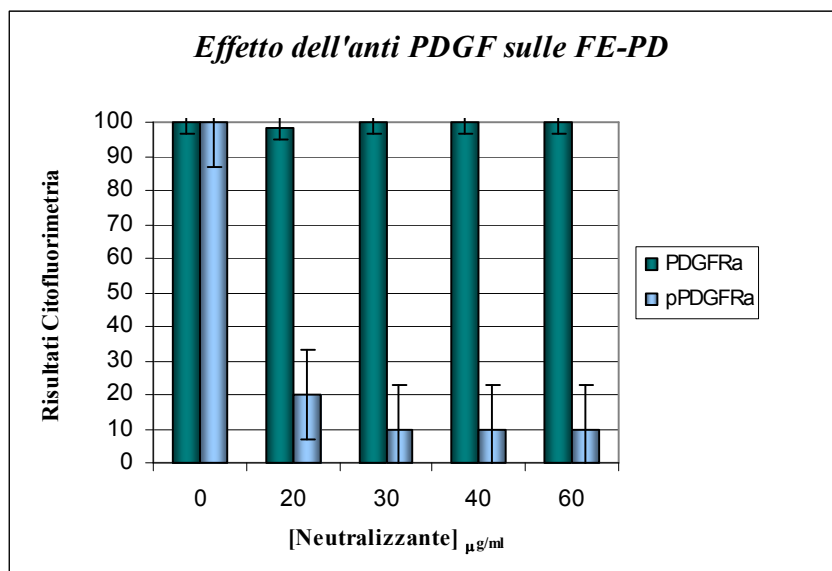


Figura 34

Effetto dell'*anticorpo anti-PDGF* sulla fosforilazione del PDGFR α , analizzato mediante citofluorimetria. **FE-PD** trattate con 20 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$ e 60 $\mu\text{g/ml}$ di *anticorpo anti-PDGF*.

DISCUSSIONE

I PTCL/NOS sono, dal punto di vista morfologico ed immunofenotipico, un gruppo eterogeneo di neoplasie, con prognosi estremamente negativa e per le quali, ad oggi, non esiste una terapia efficace ^{3, 10}. La pato-biologia di questi tumori è ancora poco conosciuta. Negli ultimi anni, alcuni studi di GEP hanno contribuito in maniera significativa alla conoscenza dei linfomi T per quanto riguarda soprattutto istogenesi, profilo molecolare, stratificazione prognostica e identificazione di nuovi possibili bersagli terapeutici ^{51, 71, 72, 73, 74, 32, 75, 76}.

In particolare, risultati, ottenuti presso il nostro Istituto, indicano che i PTCL/NOS sono un gruppo di neoplasie relativamente omogeneo con una firma genica ben distinta dai linfociti T normali ³². Come in questi ultimi, si possono distinguere due sottogruppi con genotipo correlato agli elementi CD4+/helper o CD8+/citotossici. E' importante, tuttavia, rilevare come tale distinzione non riflette l'espressione immunofenotipica delle molecole CD4 e CD8: nella nostra casistica, infatti, i PTCL/NOS si sono distribuiti nei due sottogruppi indipendentemente dal fenotipo CD4, CD8, double-positive o double-negative rilevato con l'immunoistochimica. Questo dato ben si correla con l'espressione variabile degli antigeni T associati nei PTCL/NOS, la quale è osservata non solo in pazienti diversi, ma anche in biopsie successive relative allo stesso paziente, ed evidenzia come la caratterizzazione fenotipica non rappresenti un surrogato affidabile del gene expression profiling ai fini della sottoclassificazione istogenetica dei PTCL/NOS. Ciò costituisce una notevole differenza, rispetto a quanto osservato, per esempio nei linfomi a grandi cellule B di tipo diffuso, per i quali sono stati proposti marcatori immunoistochimici, la cui espressione e combinazione sono in grado di riprodurre – pure se con una certa approssimazione – le categorie ottenute mediante gli studi di espressione genica ^{77, 78, 79}.

La comparazione del profilo di espressione genica dei PTCL/NOS rispetto alla controparte cellulare normale, oltre a fornire importanti dettagli per una corretta classificazione di tale neoplasia evidenzia una rilevante de-regolazione di geni che contollano funzioni tipicamente alterate nelle cellule neoplastiche quali rimodellamento della matrice extracellulare, adesione, regolazione della trascrizione, proliferazione e apoptosi ³². Tali alterazioni spiegano, almeno in parte, alcuni aspetti clinici e patobiologici tipici dei PTCL/NOS.

Recentemente, è stata rivolta un'attenzione significativa all'analisi dei geni coinvolti nel processo di proliferazione. La crescita cellulare, infatti, riveste una notevole importanza, alla luce della diretta proporzionalità, nei tumori in esame, tra alto indice mitotico e prognosi sfavorevole^{19, 75}. Lo studio dell'indice proliferativi, mediante GEP, o più semplicemente attraverso la valutazione del Ki-67, comune marker di proliferazione, può permettere, infatti, una più dettagliata stratificazione dei pazienti affetti da PTCL/NOS^{19, 75}.

Tra i diversi geni, noti per rivestire un ruolo determinante nella regolazione della replicazione cellulare, quattro, sono stati selezionati per analisi più dettagliate, al fine di meglio caratterizzare la patogenesi della neoplasia in esame. In particolare, *PDGFRα* e i membri della famiglia di proteine *NF-κB* sono stati esaminati in quanto, risultati all'analisi di GEP, deregolati nella cellula neoplastica rispetto alla controparte sana costituita da linfociti T attivati.

PTEN e *p27*, invece, sono stati esaminati in quanto regolatori chiave del ciclo cellulare,^{52,53, 60} e frequentemente coinvolti nella tumorigenesi a causa di alterazioni strutturali genomiche o post trascrizionali che spesso non determinano alterazioni nei livelli di RNA.

PTEN e p27

PTEN è un oncosoppressore frequentemente mutato o deletato in vari tumori umani. Questa molecola agisce sia come inibitore del pathway Akt/PKB⁶⁰ che come stabilizzatore del sistema di riparazione del DNA (DSB-repair system), contribuendo al mantenimento dell'integrità cromosomica⁶⁰.

Alterazioni a carico di questo gene ne aboliscono (81%) o diminuiscono (10%) l'attività, promuovendo la tumorigenesi⁶⁴. In particolare, la distruzione di PTEN comporta un notevole aumento di traslocazioni cromosomiche, che favoriscono l'insorgenza di eventi maligni⁶². Negli ultimi anni, numerosi studi hanno messo in risalto l'importanza di questa molecola, nel corretto sviluppo delle cellule T. Aberrazioni di PTEN sono state associate a alcune patologie ematologiche come: leucemia/linfoma a cellule T e mucosi fungoide^{80, 81}. Uner et al.⁶⁶, inoltre, hanno

descritto delezioni complete o parziali di PTEN nel 66.7% dei linfomi a grandi cellule anaplastiche e nel 12% dei linfomi a cellule T/NK. La casistica analizzata è tuttavia limitata impedendo, quindi, una conclusione risolutiva sul possibile coinvolgimento della molecola nella patogenesi di questi tumori.

Sulla base di tali evidenze, *PTEN* si candida come possibile gene implicato nella tumorigenesi dei PTCLs/NOS. Il nostro studio si è, quindi, focalizzato sulla ricerca di eventuali aberrazioni del target in esame, all'interno della nostra casistica.

Lo studio di GEP non ha evidenziato nessuna significativa alterazione dell'espressione di tale gene nei tumori rispetto ai controlli sani.

Le indagini effettuate, al fine di verificare l'integrità del locus genico di PTEN, non hanno mostrato aberrazioni a suo carico e il sequenziamento conferma l'assenza di mutazioni e/o polimorfismi sia nella regione codificante che regolatoria.

L'analisi immunoistochimica, condotta al fine di rivelare eventuali alterazioni post trascrizionali o un'aberrante localizzazione cellulare della proteina, ha mostrato una regolare espressione di PTEN sottolineando una sua fisiologica distribuzione nei PTCLs/NOS.

I dati ottenuti ci portano, quindi, a sostenere l'esclusione di questa molecola nella patogenesi dei linfomi in esame, considerando alterazioni a suo carico unicamente come possibili eventi sporadici.

p27 è un membro della famiglia degli inibitori delle chinasi ciclina dipendenti (CDKIs)^{52,53} e esplica la sua azione inattivando specifici CDK-complessi con conseguente arresto del ciclo cellulare^{52,53}. Alterazioni di questo gene portano alla perdita del controllo della proliferazione, favorendo eventi di trasformazione neoplastica⁵⁴.

Variazioni dell'espressione di p27 sono associate a diverse neoplasie (DLBCL, ALCL carcinoma della mammella e cancro al colon)⁵⁴. In particolare, una diminuzione dei livelli della proteina può essere correlata a progressione tumorale, un aumento invece può essere riferito a fenomeni di chemioresistenza⁵⁴.

Nel tessuto normale, i linfociti non proliferanti presentano elevati livelli di p27, mentre in quelli attivati la molecola non è espressa. Vi è infatti, in situazioni fisiologiche, una correlazione inversamente proporzionale tra p27 e l'indice proliferativo; relazione che può essere persa in condizioni patologiche⁵⁴.

L'espressione e la struttura molecolare di p27 sono state, quindi, analizzate all'interno della nostra casistica di PTCLs/NOS, al fine di valutare un suo possibile coinvolgimento.

L'analisi di GEP non ha evidenziato nessuna alterazione nell'espressione né di p27 né di alcune molecole ad esso correlate come CCNE1, CCND, CDK4, CDK6 e CDK2.

L'indagine immunohistochimica ha dimostrato una sostanziale concordanza tra l'espressione di p27 e un basso indice proliferativo, in rari casi (6/98), peraltro, a fronte di una elevata positività per Ki-67, p27 è risultato espresso. Ulteriori indagini, condotte su tali casi, ed in particolare doppie colorazioni per p27 e Ki-67 in immunofluorescenza, hanno però dimostrato, come i due marcatori non siano mai coespressi dalle medesime cellule.

È stata effettuata, inoltre, una valutazione dell'espressione a livello proteico della ciclica E, in quanto una sua over espressione può annullare gli effetti inibitori di p27 sul ciclo, favorendo la proliferazione cellulare ⁵². All'analisi immunohistochimica l'espressione di CCNE1 è apparsa negativa, escludendo quindi la possibilità di una interferenza "esterna" con l'attività di p27.

L'analisi molecolare ha evidenziato la presenza di due polimorfismi (-79C/T e V109G). Diversi studi associano il cambiamento amminoacidico al codone 109 a prognosi negativa e aggressività tumorale nel carcinoma alla mammella e alla prostata ^{57,58}. Analisi statistiche non hanno evidenziato, all'interno della nostra casistica di PTCLs/NOS, nessuna significativa associazione con il fenotipo patologico.

Infine, vista la correlazione inversa esistente tra Ki-67 e p27 ⁵⁴, è stata costruita una curva di sopravvivenza per valutare il possibile ruolo prognostico di p27, probabilmente, anche, a causa del numero limitato di casi non è emersa alcuna significativa differenza.

Il nostro studio dimostra quindi una normale regolazione di p27 nei tumori analizzati escludendo, verosimilmente, il suo coinvolgimento nella patogenesi dei PTCLs/NOS.

Pathway di NF-kB

La famiglia proteica NF-kB è costituita da fattori di trascrizione sequenza-specifici, coinvolti nella proliferazione e sopravvivenza delle cellule T⁸² ed è ben conosciuta per il suo importante ruolo nell'infiammazione, nella risposta immunitaria e nello sviluppo tumorale⁴¹.

È formata da cinque membri, i quali dimerizzano in complessi capaci di attivare la via canonica (RELA/p50, RELA/RELA, p50/REL e RELA/REL) o quella cosiddetta alternativa (RELB/p52). Gli omodimeri p50/p50 e p52/p52 sono, invece, inattivi o agiscono come repressori trascrizionali^{42, 43, 44}.

Nella maggior parte delle cellule, il complesso proteico, è presente nel citoplasma in una forma inattiva legata a specifiche proteine inibitrici IκBs⁴¹. Una volta attivato, trasloca nel nucleo dove favorisce la trascrizione genica. Conseguentemente la localizzazione nucleare è stata adottata, con successo, come marcatore surrogato dell'attivazione di NF-kB^{70, 46}.

Nei linfociti T e nelle cellule B si registra una sua rilevante attività, principalmente durante la fase replicativa, essendo il pathway necessario per l'attivazione cellulare indotta dal TCR signaling.

L'attivazione e l'espressione di NF-kB risultano elevate in diversi tipi di tumore, tra i quali la micosi fungoide^{48, 49} e il linfoma a grandi cellule anaplastiche (ALCL)¹⁴.

Per quanto riguarda i PTCL/NOS, diversi studi di espressione genica, riportano sia una up sia una down regolazione di *NF-kB*^{73, 71, 51} con possibili implicazioni a livello prognostico^{73, 71, 51}. Questi studi presentano delle limitazioni; sono stati, infatti, condotti su un campione poco rappresentativo sia dal punto di vista numerico che di composizione (presenza di un'ingente frazione non neoplastica), prendendo in considerazione solo la via canonica di attivazione del pathway, tralasciando completamente la via alternativa.

Abbiamo quindi, deciso di analizzare il comportamento di tutti i membri famiglia proteica NF-kB, in una ampia casistica di PTCLs/NOS, al fine di meglio descrivere il loro coinvolgimento nella patogenesi dei linfomi analizzati.

In primis, l'analisi di GEP ha evidenziato, come il gruppo delle neoplasie si differenzi nettamente dal gruppo dei controlli in base all'espressione dei membri della famiglia NF-kB e di geni ad essa correlati (figura70).

In particolare, i PTCLs/NOS possono essere divisi in due distinti sottogruppi (C1 e C2), a seconda dell'espressione di tali geni.

Il gruppo C1 rappresenta i PTCLs/NOS che mostrano una generale down regolazione dell'intero pathway, mentre il gruppo C2 è associato a un'espressione eterogenea di alcuni di questi geni.

Analizzati singolarmente, *RELA*, *RELB* e *REL* (componenti principali del pathway di NF-kB) presentano, nella maggiorparte dei campioni, un'espressione genica notevolmente più bassa rispetto ai controlli sani.

L'analisi immunohistochimica ha poi evidenziato l'attivazione del pathway canonico in circa il 35% dei casi (espressione nucleare di *RELA* e *REL*). A differenza di quanto riportato in letteratura che mostra come più comune il complesso p65/p50^{42, 43, 44}, il dimero più frequentemente presente nella nostra casistica è cREL/p50. Zheng et al, mostrano come questo dimero possa avere un ruolo cruciale nella regolazione dell'espressione della interleukina 2, nella sopravvivenza e nella proliferazione della cellula T. Topi deficitari per c-rel e p50, mostrano, infatti, una riduzione delle cellule della memoria e delle cellule t regolatorie CD4+, inficiando sulla corretto sviluppo della linea T linfocitaria.⁸²

Il nostro studio evidenzia, inoltre, un dato inedito di considerevole importanza, attinente il pathway alternativo; quest'ultimo infatti, studiato per la prima volta nel PTCL/NOS, è risultato attivato nel 5% dei casi. Nel complesso, quindi, circa il 40% ha mostrato un'attivazione del pathway e per la prima volta è stato possibile discriminare i casi in cui fossero interessati *RELA* (4/47), *REL* (10/47) e *REL B* (1/47).

La down regolazione di NF-kB è stata associata, in passato, ad una prognosi relativamente più sfavorevole⁷¹. Nella nostra casistica, seppur costituita da un numero decisamente più elevato di PTCLs/NOS rispetto a quello spagnolo⁷¹, non è stato possibile confermare questo risultato. Infatti, anche i pazienti con NF-kB apparentemente attivato hanno presentato un decorso clinico molto aggressivo. Questo

sottolinea come NF-kB potrebbe rappresentare un interessante bersaglio terapeutico in una frazione rilevante di PTCLs/NOS.

Come detto, il pathway di NFkB gioca un ruolo importante nella proliferazione e nell'attivazione fisiologica delle cellule T. Infatti, è stato dimostrato che, in vivo, l'attivazione di NFkB da parte del TCR è necessaria e sufficiente per la sopravvivenza della cellula T ⁸². Recentemente il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato come il profilo molecolare dei PTCLs/NOS sia strettamente correlato con quello dei linfociti T attivati ³², quindi, come i normali linfociti T presentano l'attivazione del pathway di NFkB, è possibile che l'espressione di geni correlati ad NFkB in alcuni PTCL/NOS rifletta un aspetto fisiologico delle cellule T.

Per contro, la down regolazione del pathway di NF-kB in una quota rilevante dei nostri casi, con profilo molecolare corrispondente a quello di cellula T attivata, potrebbe ascrivere a un fenomeno patologico. Infatti, tale aspetto è in linea con i risultati precedentemente riportati sulla perdita di marker T-associati nei PTCL/NOS ⁷⁶, sottolineando come questi linfomi tendano a perdere alcune caratteristiche tipiche della controparte normale durante l'oncogenesi ³².

PDGFR α

Infine, gli studi di GEP hanno messo in evidenza, per la prima volta, una over-espressione del PDGFR α .

L'analisi immunohistochimica su TMA, ha confermato questo risultato, evidenziando, inoltre, la fosforilazione del recettore nel 95% dei casi PDGFR α positivi. Questo sottolinea come il recettore, oltre ad essere over-espresso, sia presente in uno stato di costante attivazione.

Il PDGFR α è stato ampiamente studiato nei tumori gastrointestinali stromali (GIST) ^{83, 37, 38, 34, 35}, nei quali è stata documentata la presenza di mutazioni somatiche e nelle sindromi ipereosinofile (HES), nelle quali è stato identificato il prodotto di fusione FIP1L1/ PDGFR α ^{39, 40}.

In base a queste evidenze, al fine di identificare la causa di deregolazione del *PDGFR α* nei PTCLs/NOS, sono stati, per prima cosa, allestiti degli esperimenti inerenti lo studio del locus genico.

Il sequenziamento diretto della regione codificante e delle regioni regolatorie (5' UTR, 3' UTR e promoter) e l'analisi di riarrangiamenti cromosomici, mediante FISH non hanno evidenziato la presenza di alcuna alterazione significativa a carico del *PDGFR α* . Incidentalmente, nel corso dell'analisi di caratterizzazione citogenetica ad alta risoluzione SNPs array (250 k Affymetrix), il locus del *PDGFR α* è risultato altresì intatto.

Poiché, gli esperimenti eseguiti, hanno escluso la presenza di mutazioni e aberrazioni cromosomiche, che rendono conto della stragrande maggioranza dei casi di deregolazione del *PDGFR α* in oncematologia, è stato necessario formulare delle nuove ipotesi che potessero spiegare l'over-espressione e l'attivazione aberrante del recettore.

Come possibile causa dell'iperpressione del recettore, avendo escluso la presenza di anomalie strutturali, abbiamo, quindi, ipotizzato una possibile de-regolazione a livello trascrizionale.

Una particolare attenzione è stata rivolta all'analisi dei miRNA. I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA non codificante, che modulano l'espressione di specifici geni bersaglio. Studi recenti, hanno suggerito che incrementi o decrementi nell'espressione delle miRNA possano essere correlati alla regolazione di diverse molecole e perciò esplicitare una funzione importante nell'insorgenza di numerose forme tumorali⁸⁴ ed in particolare nei tumori ematopoietici.

Abbiamo, quindi, focalizzato il nostro studio sulla ricerca di miRNA la cui struttura potesse candidarli quali potenziali regolatori del *PDGFR α* .

Un'analisi informatica ha evidenziato l'esistenza di sei miRNA potenzialmente riferibili alla regolazione del recettore. Il loro studio, mediante qPCR, ha mostrato come 3 dei 6 miRNA siano down regolati nei PTCLs/NOS. Successivi analisi funzionali hanno evidenziato come, effettivamente, *PDGFR α* sia un target di miR152 e come la down regolazione di quest'ultimo, nei tumori in esame, sia responsabile dell' overespressione del recettore.

Il risultato di questa ricerca non fornisce, tuttavia, una spiegazione della costante attivazione del recettore.

Fisiologicamente, la fosforilazione del residuo di tirosina in posizione 849 provoca un aumento dell'efficienza catalitica della kinasi, mentre la fosforilazione di residui di tirosina al di fuori del dominio con attività kinasica crea il sito di legame per molecole di trasduzione del segnale che contengono specifici domini SH2. La fosforilazione del recettore è quindi generalmente associata alla sua funzionalità ed attivazione. Non risulta ancora chiaro, se l'attivazione del PDGFR α , riscontrata in alcune patologie, sia un evento critico nella tumorigenesi o se contribuisca soltanto al mantenimento e alla progressione della neoplasia. Altrettanto ignote, rimangono le cause dell'eventuale fosforilazione del recettore.

La costante attivazione può essere causata da diversi stimoli, quali: mutazioni geniche a livello degli esoni codificanti, gene di fusione, stimolazione autocrina o paracrina del recettore da parte del suo ligando, perdita dell'attività fosfataseica, cross-attivazione da parte di altre kinasi, attivazione/inattivazione del promotore attraverso metilazione/demetilazione, deregolazione trascrizionale

Le indagini molecolari (sequenziamento diretto e FISH), effettuate al fine di vagliare i principali meccanismi di attivazione del PDGFR α noti in oncematologia non hanno evidenziato nessuna alterazione a carico del recettore.

E' stata quindi ipotizzata la presenza di un loop autocrino.

In primis, è stata condotta un'analisi immunofenotipica su TMA (Tissue MicroArray) al fine di valutare la presenza del PDGF-A nei casi PDGFR α positivi; questo studio ha mostrato una positività per ligando nel 93% dei campioni analizzati.

Verificata la coespressione degli elementi che costituirebbero il loop autocrino nelle cellule neoplastiche, per dimostrare la loro reale esistenza, è stato condotto un test funzionale. Abbiamo quindi studiato la linea cellulare FE-PD (l'unica linea di PTCL/NOS attualmente disponibile) al fine di comprendere se le cellule tumorali siano in grado di secernere il PDGFA.

Per dimostrare che la fosforilazione del PDGFR α è indotta dal ligando, le cellule sono state esposte all'azione di un anticorpo specifico, capace di neutralizzare il ligando extracitoplasmatico.

Il saggio ELISA condotto sul surnatante delle cellule ha rivelato non solo la presenza del PDGF-AA ma anche la sua relativa abbondanza: 5ng/ml nelle cellule FE-PD rispetto agli 8 pg/ml delle Jurkat, utilizzate come controllo.

Le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni di anticorpo anti-PDGF e analizzate dopo 48 h di incubazione.

Lo stato di fosforilazione è stato valutato mediante l'analisi citofluorimetrica, che ha evidenziato una riduzione dello stato di fosforilazione del PDGFR α . In particolare la figura 34 illustra come il neutralizzante determini già una significativa riduzione della percentuale di defosforilazione (80%) alla concentrazione di 20 μ g/ml.

Le cellule EOL-1 sono state utilizzate come controllo, per verificare la specificità d'azione del neutralizzante. Nelle EOL-1, l'over-espressione e l'attivazione costitutiva del PDGFR α è dovuta al prodotto di fusione FIP1L1/PDGFR α ; in seguito al trattamento con anticorpo neutralizzante, lo stato di fosforilazione del recettore rimane invariato. Questo sottolinea la diretta implicazione del ligando nell'attivazione del PDGFR α presente nelle cellule FE-PD.

Dai dati ottenuti, si può concludere che l'inibizione della fosforilazione è il risultato del sequestro del ligando extracitoplasmatico ad opera dell'anticorpo anti-PDGF, questo determina una riduzione dello stato di fosforilazione del PDGFR α , sottolineando lo stretto legame esistente tra il ligando e la costante attivazione del recettore.

I nostri risultati dimostrano che l'overespressione del PDGFR α è causata dall'assenza del miR-152 e che la sua aberrante attivazione, nel PTCL/NOS, è sostenuta dall'esistenza di una stimolazione autocrina. Questo rappresenta il primo caso di un tumore ematologico in cui la deregolazione di un miRNA e la presenza un loop autocrino sono associati ad alterazioni a carico di una tirosin chinasi: nei linfomi a cellule T periferiche ciò potrebbe aprire la via a nuovi scenari terapeutici.

Infine è interessante notare come recentemente sia stato osservato che le cellule neoplastiche di *Linfoma Angioimmunoblastico (AILT)* coesprimono sia il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) sia uno dei suoi recettori, il VEGFR2/KDR, contrariamente a quanto avviene nella controparte normale, le cellule T follicolari helper. Intrigantemente, ciò potrebbe indurre a pensare che l'attivazione di loop

autocrini aberranti possa essere un'aspetto comune della patogenesi di diversi tipi di linfoma a cellule t periferiche.

BIBLIOGRAFIA

References

1. Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press. 2008
2. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84:1361-1392
3. Savage KJ. Aggressive peripheral T-cell lymphomas (specified and unspecified types). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005: 267-277
4. Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman J eds. WHO Classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues (ed IV). Lyon: IARC; 2008
5. Evens AM, Gartenhaus RB. Treatment of T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2004;5:289-303
6. Gisselbrecht C, Gaulard P, Lepage E, Coiffier B, Briere J, Haioun C, Cazals-Hatem D, Bosly A, Xerri L, Tilly H, Berger F, Bouhabdallah R, Diebold J. Prognostic significance of T-cell phenotype in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte (GELA)*. *Blood*. 1998;92:76-82
7. Ascani S, Zinzani PL, Gherlinzoni F, Sabbatini E, Briskomatis A, de Vivo A, Piccioli M, Fraternali Orcioni G, Pieri F, Goldoni A, Piccaluga PP, Zallocco D, Burnelli R, Leoncini L, Falini B, Tura S, Pileri SA. Peripheral T-cell lymphomas. Clinicopathologic study of 168 cases diagnosed according to the R.E.A.L. Classification. *Ann Oncol*. 1997;8:583-592.
8. Suchi T, Lennert K, Tu LY, Kikuchi M, Sato E, Stansfeld AG, Feller AC. Histopathology and immunohistochemistry of peripheral T cell lymphomas: a proposal for their classification. *J Clin Pathol*. 1987;40:995-1015
9. Lopez-Guillermo A, Cid J, Salar A, Lopez A, Montalban C, Castrillo JM, Gonzalez M, Ribera JM, Brunet S, Garcia-Conde J, Fernandez de Sevilla A, Bosch F, Montserrat E. Peripheral T-cell lymphomas: initial features, natural history, and prognostic factors in a series of 174 patients diagnosed according to the R.E.A.L. Classification. *Ann Oncol*. 1998;9:849-855
10. Jaffe ES, Ralfkiaer E. Tumours of haematopoietic and lymphoid tissue. In: Jaffe ES, Harris, N.L., Stein, H., Vardiman, J.W. ed. *Pathology & Genetics*. Lyon: IRACPress; 2001
11. Patsouris E, Engelhard M, Zwingers T, Lennert K. Lymphoepithelioid cell lymphoma (Lennert's lymphoma): clinical features derived from analysis of 108 cases. *Br J Haematol*. 1993;84:346-348.
12. Lepretre S, Buchonnet G, Stamatoullas A, Lenain P, Duval C, d'Anjou J, Callat MP, Tilly H, Bastard C. Chromosome abnormalities in peripheral T-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;117:71-79.
13. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, Behm FG, Pui CH, Downing JR, Gilliland DG, Lander ES, Golub TR, Look AT. Gene

expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2002;1:75-87

14. Tracey L, Villuendas R, Dotor AM, Spiteri I, Ortiz P, Garcia JF, Peralto JL, Lawler M, Piris MA. Mycosis fungoides shows concurrent deregulation of multiple genes involved in the TNF signaling pathway: an expression profile study. *Blood*. 2003;102:1042-1050

15. Gallamini A, Stelitano C, Calvi R, Bellei M, Mattei D, Vitolo U, Morabito F, Martelli M, Brusamolino E, Iannitto E, Zaja F, Cortelazzo S, Rigacci L, Devizzi L, Todeschini G, Santini G, Brugiattelli M, Federico M. Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood*. 2004;103:2474-2479

16. Jantunen E, Wiklund T, Juvonen E, Putkonen M, Lehtinen T, Kuittinen O, Franssila K, Soderstrom KO, Leppa S, Elonen E, Remes K, Nousiainen T. Autologous stem cell transplantation in adult patients with peripheral T-cell lymphoma: a nationwide survey. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33:405-410

17. Kahl C, Leithauser M, Wolff D, Steiner B, Hartung G, Casper J, Freund M. Treatment of peripheral T-cell lymphomas (PTCL) with high-dose chemotherapy and autologous or allogeneic hematopoietic transplantation. *Ann Hematol*. 2002;81:646-650

18. Kojima H, Hasegawa Y, Suzukawa K, Mukai HY, Kaneko S, Kobayashi T, Kamoshita M, Shinagawa A, Komeno T, Komatsu T, Mitsuhashi S, Kawachi Y, Yamashita Y, Mori N, Nagasawa T. Clinicopathological features and prognostic factors of Japanese patients with "peripheral T-cell lymphoma, unspecified" diagnosed according to the WHO classification. *Leuk Res*. 2004;28:1287-1292

19. Went P, Agostinelli C, Gallamini A, Piccaluga PP, Ascani S, Sabbatini E, Bacci F, Falini B, Motta T, Paulli M, Artusi T, Piccioli M, Zinzani PL, Pileri SA. Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score. *J Clin Oncol*. 2006;24:2472-2479

20. Quintanilla-Martinez L, Fend F, Moguel LR, Spilove L, Beaty MW, Kingma DW, Raffeld M, Jaffe ES. Peripheral T-cell lymphoma with Reed-Sternberg-like cells of B-cell phenotype and genotype associated with Epstein-Barr virus infection. *Am J Surg Pathol*. 1999;23:1233-1240

21. Hastrup N, Ralfkiaer E, Pallesen G. Aberrant phenotypes in peripheral T cell lymphomas. *J Clin Pathol*. 1989;42:398-402

22. Geissinger E, Odenwald T, Seung-Souk L, Bonzheim I, Roth S, Reimer P, Wilhelm M, Müller-Hermelink HK, Rüdiger T. Nodal peripheral T-cell lymphomas and, in particular, their lymphoepithelioid (Lennert's) variant are often derived from CD8+ cytotoxic cells. *Virchows Arch*. 2004;445:334-343

23. Rudiger T, Weisenburger DD, Anderson JR, Armitage JO, Diebold J, MacLennan KA, Nathwani BN, Ullrich F, Muller-Hermelink HK. Peripheral T-cell lymphoma (excluding anaplastic large-cell lymphoma): results from the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol*. 2002;13:140-149.

24. Au WY, Ma SY, Chim CS, Choy C, Loong F, Lie AK, Lam CC, Leung AY, Tse E, Yau CC, Liang R, Kwong YL. Clinicopathologic features and treatment outcome of mature T-cell and natural killer-cell lymphomas diagnosed according to the World Health Organization classification scheme: a single center experience of 10 years. *Ann Oncol*. 2005;16:206-214.

25. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1986;136:4480-4486
26. Knowles DM. Immunohistochemical markers useful in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasms. In: Knowles DM, ed. *Neoplastic Hematopathology* (ed 2nd). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:93-226
27. Jaffe ES. Hematopathology: integration of morphologic features and biologic markers for diagnosis. *Mod Pathol.* 1999;12:109-115.
28. Jaffe ES, Krenacs L, Kumar S, Kingma DW, Raffeld M. Extranodal peripheral T-cell and NK-cell neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 1999;111:S46-55
29. Blakolmer K, Vesely M, Kummer JA, Jurecka W, Mannhalter C, Chott A. Immunoreactivity of B-cell markers (CD79a, L26) in rare cases of extranodal cytotoxic peripheral T- (NK/T-) cell lymphomas. *Mod Pathol.* 2000;13:766-772
30. Greiner TC, Raffeld M, Lutz C, Dick F, Jaffe ES. Analysis of T cell receptor-gamma gene rearrangements by denaturing gradient gel electrophoresis of GC-clamped polymerase chain reaction products. Correlation with tumor-specific sequences. *Am J Pathol.* 1995;146:46-55
31. Agostinelli C, Piccaluga PP, Went P, Rossi M, Gazzola A, Righi S, Sista T, Campidelli C, Zinzani PL, Falini B, Pileri SA. Peripheral T cell lymphoma, not otherwise specified: the stuff of genes, dreams and therapies. *J Clin Pathol.* 2008;61:1160-1167
32. Piccaluga PP AC, Califano A, Rossi M, Zupo S, Went P, Zinzani PL, Baccarani M, Dalla Favera R, and Pileri SA. Gene expression analysis of peripheral T-cell Lymphoma/undefined reveals distinct and new potential therapeutic targets. *Journal of Clinical Investigation.* 2007:In press
33. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999;79:1283-1316
34. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 2003;299:708-710
35. Sihto H, Sarlomo-Rikala M, Tynninen O, Tanner M, Andersson LC, Franssila K, Nupponen NN, Joensuu H. KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha tyrosine kinase gene mutations and KIT amplifications in human solid tumors. *J Clin Oncol.* 2005;23:49-57
36. van den Boom J, Wolter M, Kuick R, Misek DE, Youkilis AS, Wechsler DS, Sommer C, Reifemberger G, Hanash SM. Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 2003;163:1033-1043
37. Penzel R, Aulmann S, Moock M, Schwarzbach M, Rieker RJ, Mechttersheimer G. The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. *J Clin Pathol.* 2005;58:634-639
38. Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A, McGreevey L, Harrell P, Shiraga S, Bainbridge T, Morich J, Heinrich MC. PDGFRA mutations in

gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol.* 2005;23:5357-5364

39. Cools J, Stover EH, Gilliland DG. Detection of the FIP1L1-PDGFR α fusion in idiopathic hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia. *Methods Mol Med.* 2006;125:177-187

40. Stone RM, Gilliland DG, Klion AD. Platelet-derived growth factor receptor inhibition to treat idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Semin Oncol.* 2004;31:12-17

41. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-260

42. Hansen SK, Baeuerle PA, Blasi F. Purification, reconstitution, and I κ B association of the c-Rel-p65 (RelA) complex, a strong activator of transcription. *Mol Cell Biol.* 1994;14:2593-2603

43. Brown AM, Linhoff MW, Stein B, Wright KL, Baldwin AS, Jr., Basta PV, Ting JP. Function of NF- κ B/Rel binding sites in the major histocompatibility complex class II invariant chain promoter is dependent on cell-specific binding of different NF- κ B/Rel subunits. *Mol Cell Biol.* 1994;14:2926-2935

44. Kang SM, Tran AC, Grilli M, Lenardo MJ. NF- κ B subunit regulation in nontransformed CD4 $^{+}$ T lymphocytes. *Science.* 1992;256:1452-1456

45. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:621-663

46. Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. *Oncogene.* 2006;25:6706-6716

47. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *J Clin Invest.* 2001;107:241-246

48. Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor- κ B: a friend or a foe in cancer? *Biochem Pharmacol.* 2004;68:1071-1080

49. Izbán KF, Ergin M, Qin JZ, Martinez RL, Pooley RJ, Saeed S, Alkan S. Constitutive expression of NF- κ B is a characteristic feature of mycosis fungoides: implications for apoptosis resistance and pathogenesis. *Hum Pathol.* 2000;31:1482-1490

50. Horie R, Watanabe M, Ishida T, Koiwa T, Aizawa S, Itoh K, Higashihara M, Kadin ME, Watanabe T. The NPM-ALK oncoprotein abrogates CD30 signaling and constitutive NF- κ B activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2004;5:353-364

51. Martinez-Delgado B, Melendez B, Cuadros M, Alvarez J, Castrillo JM, Ruiz De La Parte A, Mollejo M, Bellas C, Diaz R, Lombardia L, Al-Shahrour F, Dominguez O, Cascon A, Robledo M, Rivas C, Benitez J. Expression profiling of T-cell lymphomas differentiates peripheral and lymphoblastic lymphomas and defines survival related genes. *Clin Cancer Res.* 2004;10:4971-4982

52. Bales ES, Dietrich C, Bandyopadhyay D, Schwahn DJ, Xu W, Didenko V, Leiss P, Conrad N, Pereira-Smith O, Orengo I, Medrano EE. High levels of expression of p27KIP1 and cyclin E in invasive primary malignant melanomas. *J Invest Dermatol.* 1999;113:1039-1046

53. Xing H, Wang S, Hu K, Tao W, Li J, Gao Q, Yang X, Weng D, Lu Y, Ma D. Effect of the cyclin-dependent kinases inhibitor p27 on resistance of ovarian cancer

multicellular spheroids to anticancer chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131:511-519

54. St Croix B, Florenes VA, Rak JW, Flanagan M, Bhattacharya N, Slingerland JM, Kerbel RS. Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med.* 1996;2:1204-1210

55. Nakatsuka S, Liu A, Yao M, Takakuwa T, Tomita Y, Hoshida Y, Nishiu M, Aozasa K. Methylation of promoter region in p27 gene plays a role in the development of lymphoid malignancies. *Int J Oncol.* 2003;22:561-568

56. Lin MT, Chang CC, Chen ST, Chang HL, Su JL, Chau YP, Kuo ML. Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF-kappaB-dependent XIAP up-regulation. *J Biol Chem.* 2004;279:24015-24023

57. Schondorf T, Eisele L, Gohring UJ, Valter MM, Warm M, Mallmann P, Becker M, Fechteler R, Weisshaar MP, Hoopmann M. The V109G polymorphism of the p27 gene CDKN1B indicates a worse outcome in node-negative breast cancer patients. *Tumour Biol.* 2004;25:306-312

58. Kibel AS, Suarez BK, Belani J, Oh J, Webster R, Brophy-Ebbers M, Guo C, Catalona WJ, Picus J, Goodfellow PJ. CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63:2033-2036

59. Tomoda K, Kubota Y, Kato J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature.* 1999;398:160-165

60. Lian Z, Di Cristofano A. Class reunion: PTEN joins the nuclear crew. *Oncogene.* 2005;24:7394-7400

61. Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, Dixon JE, Pandolfi P, Pavletich NP. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell.* 1999;99:323-334

62. Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, Yin Y. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell.* 2007;128:157-170

63. Butler MP, Wang SI, Chaganti RS, Parsons R, Dalla-Favera R. Analysis of PTEN mutations and deletions in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999;24:322-327

64. Leslie NR, Downes CP. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem J.* 2004;382:1-11

65. Suzuki A, de la Pompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, Ho A, Wakeham A, Itie A, Khoo W, Fukumoto M, Mak TW. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol.* 1998;8:1169-1178

66. Uner AH, Saglam A, Han U, Hayran M, Sungur A, Ruacan S. PTEN and p27 expression in mature T-cell and NK-cell neoplasms. *Leuk Lymphoma.* 2005;46:1463-1470

67. Holtkamp N, Okuducu AF, Mucha J, Afanasieva A, Hartmann C, Atallah I, Estevez-Schwarz L, Mawrin C, Friedrich RE, Mautner VF, von Deimling A. Mutation and expression of PDGFRA and KIT in malignant peripheral nerve sheath tumors, and its implications for imatinib sensitivity. *Carcinogenesis.* 2006;27:664-671

68. Au KS, Northrup H, Kirkpatrick TJ, Volcik KA, Fletcher JM, Townsend IT, Blanton SH, Tyerman GH, Villarreal G, King TM. Promotor genotype of the platelet-derived growth factor receptor-alpha gene shows population stratification but not association with spina bifida meningocele. *Am J Med Genet A*. 2005;139:194-198
69. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:725-734
70. Houldsworth J, Olshen AB, Cattoretti G, Donnelly GB, Teruya-Feldstein J, Qin J, Palanisamy N, Shen Y, Dyomina K, Petlakh M, Pan Q, Zelenetz AD, Dalla-Favera R, Chaganti RS. Relationship between REL amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2004;103:1862-1868
71. Martinez-Delgado B, Cuadros M, Honrado E, Ruiz de la Parte A, Roncador G, Alves J, Castrillo JM, Rivas C, Benitez J. Differential expression of NF-kappaB pathway genes among peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia*. 2005;19:2254-2263
72. Mahadevan D, Spier C, Della Croce K, Miller S, George B, Riley C, Warner S, Grogan TM, Miller TP. Transcript profiling in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, and diffuse large B-cell lymphoma identifies distinct tumor profile signatures. *Mol Cancer Ther*. 2005;4:1867-1879
73. Ballester B, Ramuz O, Gisselbrecht C, Doucet G, Loi L, Loriod B, Bertucci F, Bouabdallah R, Devilard E, Carbuccioni N, Mozziconacci MJ, Birnbaum D, Brousset P, Berger F, Salles G, Briere J, Houlgatte R, Gaulard P, Xerri L. Gene expression profiling identifies molecular subgroups among nodal peripheral T-cell lymphomas. *Oncogene*. 2006;25:1560-1570
74. Piccaluga PP, Agostinelli C, Zinzani PL, Baccarani M, Dalla Favera R, Pileri SA. Expression of platelet-derived growth factor receptor alpha in peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified. *Lancet Oncol*. 2005;6:440
75. Cuadros M, Dave SS, Jaffe ES, Honrado E, Milne R, Alves J, Rodriguez J, Zajac M, Benitez J, Staudt LM, Martinez-Delgado B. Identification of a proliferation signature related to survival in nodal peripheral T-cell lymphomas. *J Clin Oncol*. 2007;25:3321-3329
76. Piccaluga PP, Agostinelli C, Righi S, Zinzani PL, Pileri SA. Expression of CD52 in peripheral T-cell lymphoma. *Haematologica*. 2007;92:566-567
77. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194:1625-1638
78. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:9991-9996
79. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Muller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103:275-282

80. Fukuda R, Hayashi A, Utsunomiya A, Nukada Y, Fukui R, Itoh K, Tezuka K, Ohashi K, Mizuno K, Sakamoto M, Hamanoue M, Tsuji T. Alteration of phosphatidylinositol 3-kinase cascade in the multilobulated nuclear formation of adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:15213-15218
81. Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Russell-Jones R, Whittaker SJ. Loss of heterozygosity on 10q and microsatellite instability in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma and possible association with homozygous deletion of PTEN. *Blood*. 2000;95:2937-2942
82. Zheng Y, Vig M, Lyons J, Van Parijs L, Beg AA. Combined deficiency of p50 and cRel in CD4+ T cells reveals an essential requirement for nuclear factor kappaB in regulating mature T cell survival and in vivo function. *J Exp Med*. 2003;197:861-874
83. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, Kiese B, Eisenberg B, Roberts PJ, Singer S, Fletcher CD, Silberman S, Dimitrijevic S, Fletcher JA. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol*. 2003;21:4342-4349
84. Bueno MJ, de Castro IP, Malumbres M. Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle*. 2008;7:3143-3148

APPENDICE

Appendice 1. lista completa delle probes usate nella gene expression analysis

<i>Probe set</i>	<i>Common name</i>	<i>GeneBank</i>
211434_s_at	CCRL2	AF015524
205831_at	CD2	NM_001767
206804_at	CD3G	NM_000073
216424_at	CD4	S79267
206485_at	CD5	NM_014207
230489_at	CD5	AI797836
1566447_at	CD6	AL832261
1566448_at	CD6	AL832261
208602_x_at	CD6	NM_006725
211893_x_at	CD6	U66145
211900_x_at	CD6	U66146
213958_at	CD6	AW134823
208485_x_at	CFLAR	NM_003879
209508_x_at	CFLAR	AF005774
209939_x_at	CFLAR	AF005775
210563_x_at	CFLAR	U97075
210564_x_at	CFLAR	AF009619
211316_x_at	CFLAR	AF009616
211317_s_at	CFLAR	AF041461
211862_x_at	CFLAR	AF015451
214486_x_at	CFLAR	AF041459
214618_at	CFLAR	AF015452
237367_x_at	CFLAR	AA971429
239629_at	CFLAR	AI634046
207082_at	CSF1	NM_000757
209716_at	CSF1	M37435
210557_x_at	CSF1	M76453
211839_s_at	CSF1	U22386
203104_at	CSF1R	NM_005211
210228_at	CSF2	M11734
210229_s_at	CSF2	M11734
205159_at	CSF2RB	AV756141
207442_at	CSF3	NM_000759
1553297_a_at	CSF3R	NM_172313
203591_s_at	CSF3R	NM_000760
202535_at	FADD	NM_003824

202637_s_at	ICAM1	AI608725
202638_s_at	ICAM1	NM_000201
215485_s_at	ICAM1	AA284705
204683_at	ICAM2	NM_000873
213620_s_at	ICAM2	AA126728
204949_at	ICAM3	NM_002162
207194_s_at	ICAM4	NM_001544
206906_at	ICAM5	NM_003259
210354_at	IFNG	M29383
202490_at	IKBKAP	AF153419
202491_s_at	IKBKAP	NM_003640
209341_s_at	IKBKB	AU153366
209342_s_at	IKBKB	AF080158
211027_s_at	IKBKB	BC006231
204549_at	IKBKE	NM_014002
214398_s_at	IKBKE	AW340333
204912_at	IL10RA	NM_001558
209575_at	IL10RB	BC001903
205992_s_at	IL15	NM_000585
217371_s_at	IL15	Y09908
217372_at	IL15	Y09908
207375_s_at	IL15RA	NM_002189
208200_at	IL1A	NM_000575
210118_s_at	IL1A	M15329
205067_at	IL1B	NM_000576
39402_at	IL1B	M15330
222223_s_at	IL1F5	AF216693
220322_at	IL1F9	NM_019618
202948_at	IL1R1	NM_000877
215561_s_at	IL1R1	AK026803
205403_at	IL1R2	NM_004633
211372_s_at	IL1R2	U64094
207526_s_at	IL1RL1	NM_003856
210442_at	IL1RL1	AB012701
234066_at	IL1RL1	AL117622
242809_at	IL1RL1	AI188516
203679_at	IL1RL1LG	NM_006858
212657_s_at	IL1RN	U65590
212659_s_at	IL1RN	AW083357
216243_s_at	IL1RN	BE563442
216244_at	IL1RN	BE563442

216245_at	IL1RN	BE563442
205291_at	IL2RB	NM_000878
204116_at	IL2RG	NM_000206
203233_at	IL4R	NM_000418
1555784_s_at	IRAK1	AF346607
201587_s_at	IRAK1	NM_001569
1568830_at	IRAK3	BC029493
220034_at	IRAK3	NM_007199
202531_at	IRF1	NM_002198
203275_at	IRF2	NM_002199
202621_at	IRF3	NM_001571
204562_at	IRF4	NM_002460
216986_s_at	IRF4	D78261
216987_at	IRF4	D78261
205468_s_at	IRF5	AI028035
205469_s_at	IRF5	NM_002200
239412_at	IRF5	BF223643
1552477_a_at	IRF6	BC014852
1552478_a_at	IRF6	NM_006147
202597_at	IRF6	AU144284
208436_s_at	IRF7	NM_004030
201464_x_at	JUN	BG491844
201465_s_at	JUN	BC002646
201466_s_at	JUN	NM_002228
213281_at	JUN	BE327172
201473_at	JUNB	NM_002229
203751_x_at	JUND	AI762296
203752_s_at	JUND	NM_005354
214326_x_at	JUND	AI339541
229117_s_at	JUND	AI337326
1559754_at	LTB	BC018898
207339_s_at	LTB	NM_002341
205192_at	MAP3K14	NM_003954
203936_s_at	MMP9	NM_004994
206538_at	MRAS	NM_012219
225185_at	MRAS	BF343625
202431_s_at	MYC	NM_002467
239931_at	MYC	BF512882
244089_at	MYC	BF514781
209756_s_at	MYCN	AI871354
209757_s_at	MYCN	BC002712

211377_x_at	MYCN	AF320053
234376_at	MYCN	M55330
242026_at	MYCN	BF513457
208196_x_at	NFATC1	NM_006162
209664_x_at	NFATC1	AW027545
210161_at	NFATC1	U08015
210162_s_at	NFATC1	U08015
211105_s_at	NFATC1	U80918
207416_s_at	NFATC3	NM_004555
210555_s_at	NFATC3	U85430
210556_at	NFATC3	U85430
209239_at	NFKB1	M55643
207535_s_at	NFKB2	NM_002502
209636_at	NFKB2	BC002844
211524_at	NFKB2	U09609
201502_s_at	NFKBIA	AI078167
231699_at	NFKBIA	AV649293
214062_x_at	NFKBIB	AI684894
214448_x_at	NFKBIB	NM_002503
228388_at	NFKBIB	AA044140
203927_at	NFKBIE	NM_004556
209973_at	NFKBIL1	AF097419
206968_s_at	NFRKB	NM_006165
213028_at	NFRKB	AI887378
237209_s_at	NFRKB	AI304853
237210_at	NFRKB	AI304853
206035_at	REL	NM_002908
206036_s_at	REL	NM_002908
201783_s_at	RELA	NM_021975
209878_s_at	RELA	M62399
230202_at	RELA	AI703057
205205_at	RELB	NM_006509
209941_at	RIPK1	U50062
226551_at	RIPK1	AI743085
209544_at	RIPK2	AF027706
209545_s_at	RIPK2	AF064824
228139_at	RIPK3	NM_006871
206211_at	SELE	NM_000450
204563_at	SELL	NM_000655
209879_at	SELPLG	AI741056
209880_s_at	SELPLG	U02297

202400_s_at	SRF	AI188786
202401_s_at	SRF	NM_003131
1554391_at	TBK1	BC009864
218520_at	TBK1	NM_013254
207113_s_at	TNF	NM_000594
201207_at	TNFAIP1	NM_021137
201208_s_at	TNFAIP1	BC001643
202509_s_at	TNFAIP2	AI862445
202510_s_at	TNFAIP2	NM_006291
202643_s_at	TNFAIP3	AI738896
202644_s_at	TNFAIP3	NM_006290
1562690_at	TNFAIP6	BC039384
206025_s_at	TNFAIP6	AW188198
206026_s_at	TNFAIP6	NM_007115
209294_x_at	TNFRSF10B	BC001281
209295_at	TNFRSF10B	AF016266
210405_x_at	TNFRSF10B	AF153687
207037_at	TNFRSF11A	NM_003839
238846_at	TNFRSF11A	AW026379
204932_at	TNFRSF11B	BF433902
204933_s_at	TNFRSF11B	NM_002546
209354_at	TNFRSF14	BC002794
206641_at	TNFRSF17	NM_001192
203508_at	TNFRSF1B	NM_001066
214581_x_at	TNFRSF21	BE568134
218856_at	TNFRSF21	NM_016629
210847_x_at	TNFRSF25	AF026071
211282_x_at	TNFRSF25	U94506
211841_s_at	TNFRSF25	U94510
216042_at	TNFRSF25	AI275938
219422_at	TNFRSF25	U72763
219423_x_at	TNFRSF25	NM_003790
208023_at	TNFRSF4	NM_003327
214228_x_at	TNFRSF4	AJ277151
205153_s_at	TNFRSF5	NM_001250
215346_at	TNFRSF5	BF664114
222292_at	TNFRSF5	AW298127
35150_at	TNFRSF5	X60592
204780_s_at	TNFRSF6	AA164751
204781_s_at	TNFRSF6	NM_000043
215719_x_at	TNFRSF6	X83493

216252_x_at	TNFRSF6	Z70519
206150_at	TNFRSF7	NM_001242
206729_at	TNFRSF8	NM_001243
202687_s_at	TNFSF10	U57059
202688_at	TNFSF10	NM_003810
214329_x_at	TNFSF10	AW474434
210643_at	TNFSF11	AF053712
211153_s_at	TNFSF11	AB037599
209499_x_at	TNFSF13	BF448647
209500_x_at	TNFSF13	AF114012
210314_x_at	TNFSF13	AF114013
211495_x_at	TNFSF13	AF114011
229326_at	TNFSF13	BE675173
223501_at	TNFSF13B	AW151360
223502_s_at	TNFSF13B	AF134715
207426_s_at	TNFSF4	NM_003326
206508_at	TNFSF7	NM_001252
1729_at	TRADD	L41690
205641_s_at	TRADD	NM_003789
213443_at	TRADD	N36774
205599_at	TRAF1	NM_005658
235116_at	TRAF1	AA922208
204413_at	TRAF2	NM_021138
208315_x_at	TRAF3	NM_003300
221571_at	TRAF3	AI721219
202871_at	TRAF4	NM_004295
211899_s_at	TRAF4	AF082185
235688_s_at	TRAF4	AI992283
242473_at	TRAF4	BF000155
1569861_at	TRAF5	BC032830
204352_at	TRAF5	NM_004619
205558_at	TRAF6	NM_004620
227264_at	TRAF6	AA702531
203868_s_at	VCAM1	NM_001078

Appendice 2 geni deregolati in PTCL/NOS C1 vs. PTCL/NOS C2 e cellule T normali.

<i>Probe set</i>	<i>P value</i>	<i>Gene</i>	<i>GeneBank</i>
239629_at	0,0349	CFLAR	AI634046
214486_x_at	0,000138	CFLAR	AF041459
211317_s_at	0,0007	CFLAR	AF041461
208485_x_at	0,000634	CFLAR	NM_003879
211862_x_at	0,000516	CFLAR	AF015451
209508_x_at	0,000661	CFLAR	AF005774
211316_x_at	0,000263	CFLAR	AF009616
203104_at	1,07E-07	CSF1R	NM_005211
205159_at	1,10E-05	CSF2RB	AV756141
202535_at	1,61E-10	FADD	NM_003824
202638_s_at	0,005	ICAM1	NM_000201
213620_s_at	0,0021	ICAM2	AA126728
204683_at	0,000803	ICAM2	NM_000873
209341_s_at	0,0224	IKBKB	AU153366
209575_at	0,0139	IL10RB	BC001903
217371_s_at	0,00354	IL15	Y09908
205992_s_at	5,25E-06	IL15	NM_000585
207375_s_at	1,24E-06	IL15RA	NM_002189
202948_at	1,94E-05	IL1R1	NM_000877
204116_at	0,019	IL2RG	NM_000206
203275_at	8,79E-11	IRF2	NM_002199
202621_at	0,00098	IRF3	NM_001571
203936_s_at	1,01E-06	MMP9	NM_004994
225185_at	0,00176	MRAS	BF343625
210555_s_at	0,0011	NFATC3	U85430
218520_at	0,000192	TBK1	NM_013254
201207_at	0,000567	TNFAIP1	NM_021137
202510_s_at	5,48E-09	TNFAIP2	NM_006291
215346_at	2,04E-06	TNFRSF5	BF664114
205153_s_at	1,18E-06	TNFRSF5	NM_001250
35150_at	4,54E-07	TNFRSF5	X60592
206150_at	8,94E-05	TNFRSF7	NM_001242
202687_s_at	3,78E-07	TNFSF10	U57059
202688_at	2,31E-08	TNFSF10	NM_003810
214329_x_at	2,53E-11	TNFSF10	AW474434

209499_x_at	0,0153	TNFSF13	BF448647
211495_x_at	0,0149	TNFSF13	AF114011
210314_x_at	4,97E-06	TNFSF13	AF114013
209500_x_at	2,32E-06	TNFSF13	AF114012
223501_at	1,22E-08	TNFSF13B	AW151360
223502_s_at	1,44E-10	TNFSF13B	AF134715
1729_at	0,00978	TRADD	L41690
221571_at	8,33E-06	TRAF3	AI721219
203868_s_at	2,53E-16	VCAM1	NM_001078