

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIRURGICHE
PROGETTO N.3 "SCIENZE DERMATOLOGICHE"**

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D4

Settore Scientifico disciplinare: MED/35

**Analisi molecolare delle fasi evolutive
della micosi fungoide**

Presentata da: Dott.ssa Roberta Fiorani

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Andrea Stella

Chiar.mo Prof. Stefano Veraldi

Esame finale anno 2013

INDICE

INTRODUZIONE	3
I linfomi primitivi cutanei	3
- Classificazione	4
- Diagnosi	7
- Stadiazione	7
I linfomi cutanei a cellule T	10
- Micosi fungoide	12
- Sindrome di Sezary	15
Analisi genetica e molecolare nei linfomi cutanei	17
- Citogenetica	18
- Microarray	19
SCOPO DELLO STUDIO	20
MATERIALI E METODI	21
Array-CGH	21
Micro-RNA	24
RISULTATI	25
DISCUSSIONE	33
CONCLUSIONI	42
BIBLIOGRAFIA	44

INTRODUZIONE.

I LINFOMI PRIMITIVI CUTANEI

I linfomi primitivi cutanei (PCL) rappresentano un gruppo eterogeneo di malattie linfoproliferative che coinvolgono da principio la cute senza interessamento extracutaneo al momento della diagnosi e fino a 6 mesi dal primo riscontro.^{1,2}

Principalmente si tratta di linfomi non Hodgkin, che si caratterizzano per il frequente coinvolgimento cutaneo, mentre è molto raro osservare linfomi di Hodgkin extralinfonodali a sede primitiva cutanea.

I PCL presentano peculiarità biologiche e clinico-prognostiche distinte dalla corrispettive forme nodali; sono state descritte diverse entità di linfoma cutaneo primitivo che possono manifestarsi con svariati aspetti clinici, morfologici e immunologici e presentano diverso grado di malignità, dalle forme indolenti a quelle aggressive.

Queste forme di linfoma hanno un'incidenza variabile 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, risultano più diffusi alcuni linfomi a cellule T in relazione alla diffusione endemica del virus onco-trasformante HTLV-1.³

I PCL possono originare dai linfociti T, dai linfociti B o dalle cellule NK in vari stadi di maturazione. I linfociti attraversano diverse tappe di maturazione che vengono riconosciute dall'espressione sequenziale di geni diversi e comportano una variazione del fenotipo cellulare, selezionando le sottopopolazioni linfocitarie destinate ai tessuti periferici. Il reclutamento dei linfociti a livello cutaneo è contraddistinto da una serie di eventi che dipendono dall'espressione di citochine, di molecole di adesione e di molecole di superficie specifiche per la cute che ne permettono la circolazione e l'homing.⁴

La proliferazione incontrollata del clone neoplastico linfocitario è un processo che coinvolge svariati fattori, alcuni dei quali sono ormai noti, come agenti virali e batterici, oncogeni e citochine, mentre un ruolo controverso viene attribuito ad alcuni agenti ambientali come gli allergeni da contatto, gli idrocarburi alogenati ed i prodotti plastici.

Numerosi dati convergono su un'etiologia virale dei PCL più frequentemente da HTLV-1 e EBV, mentre rimane dubbio un ruolo patogenetico da parte di altri herpesvirus come HHV-8, HHV-6 e HHV-7. L'HTLV-1 è direttamente implicato nella patogenesi della leucemia a cellule T dell'adulto, nelle cui cellule il virus è sempre integrato,⁵ mentre rimane discusso il ruolo di HTLV-1 nello sviluppo di alcune forme di linfoma cutaneo a cellule T (CTCL).^{6,7} L'azione patogenetica dell'EBV

è ormai ampiamente dimostrata nel linfoma di Burkitt, nel linfoma di Hodgkin, soprattutto la varietà a cellularità mista, e nel linfoma a cellule B in pazienti immunocompromessi.⁸ Inoltre il riscontro del DNA di EBV nelle cellule tumorali linfocitarie suggerisce che una stimolazione antigenica cronica da parte dell'EBV sia implicata nella patogenesi del linfoma NK/T primitivo cutaneo extranodale (nasal type), oltre che nella papulosi linfomatoide e nel linfoma a grandi cellule CD30+ e in alcuni casi di linfoma CD8+ o NK.⁹

Anche alcuni microrganismi batterici possono influenzare la patogenesi dei PCL, come la *Borrelia burgdorferi* che indurrebbe una stimolazione antigenica “cronica” nei linfomi B primitivi cutanei, mentre la produzione di alcune citochine o interleuchine può facilitare lo sviluppo di forme di PCL a cellule T, come l'IL-1 prodotta dai cheratinociti.¹⁰

Numerosi studi hanno rivolto particolare attenzione alla valutazione di un ruolo linfoproliferativo da parte di alcuni oncogeni; in casi di linfoma a decorso particolarmente aggressivo sono state descritte mutazioni a carico di p53, Tal-1, Lym-10 e p16^{11,12} e una ridotta espressione del Fas (CD95) che comporta una riduzione della morte programmata dei linfociti T attivati e quindi può favorire la progressione tumorale.¹³

Altri studi hanno inoltre segnalato la consistente amplificazione e sovraespressione del gene JUN-B (un fattore di trascrizione nucleare), che avrebbe un ruolo nella patogenesi dei CTCL.¹⁴

L'applicazione della metodica di Comparative Genomic Hybridation (CGH) utilizzata in pazienti affetti da micosi fungoide e sindrome di Sezary, ha evidenziato delezioni in 1p, 17p, 10q e 19, e amplificazioni in 4q, 18 e 17q, dove risiederebbero alcuni geni capaci di svolgere un ruolo nella linfomagenesi e nella progressione della malattia.¹⁵

- CLASSIFICAZIONE

I PCL sono singolarmente descritti nella classificazione unificata della WHO/EORTC del 2005 che nasce dalla revisione delle 2 precedenti classificazioni redatte rispettivamente dalla EORTC (Organizzazione Europea per la Ricerca e il Trattamento del Cancro) nel 1997 e poi dalla WHO (World Health Organization) nel 2001, sulla base dell'integrazione di dati clinici, istologici, immunofenotipici e genotipici. Questa classificazione ha una rilevanza clinica e prognostica e delinea in modo netto i PCL dalle corrispettive forme nodali.^{1,16}

Peculiare in questa nuova classificazione è l'intento di descrivere entità di linfoma rare ed eterogenee, che presentano specifici pattern immunoistochimici e molecolari, con conseguenti implicazioni dal punto di vista diagnostico e terapeutico.

Nel 2008 è stata pubblicata una nuova classificazione della WHO (2008, 4th edition) che

rappresenta un aggiornamento delle entità precedentemente descritte; ognuna di esse viene singolarmente riconosciuta ed integrata in una classificazione generale dei linfomi nodali ed extranodali con piccole modifiche nella terminologia (tab 1).¹⁷

I PCL vengono distinti in linfomi cutanei a cellule T (CTCL), linfomi cutanei a cellule B (CBCL) e le cosiddette “neoplasie dei precursori emopoietici”, come la neoplasia ematodermica CD4+/CD56+ (linfoma blastico a cellule NK, ora denominato neoplasia blastica delle cellule dendritiche plasmocitoidi-BPDCN).

I CTCLs rappresentano il 65% dei PCL e sono costituiti per il 90% dalle entità più conosciute, la micosi fungoide, la sindrome di Sezary e le malattie linfoproliferative primitive cutanee CD30+.

Altre entità rare erano state precedentemente definite nella classificazione della WHO, come il linfoma subcutaneo simil-panniculitico a cellule T (SPTL) e il linfoma primitivo cutaneo a cellule T γ/δ . Queste due forme rare di linfoma sono fra loro indipendenti; studi recenti hanno confermato che per linfoma T subcutaneo simil-panniculitico si intende una forma di linfoma cutaneo con fenotipo TCR α/β (β -F1+) a decorso clinico indolente, mentre il fenotipo γ/δ caratterizza il linfoma cutaneo T γ/δ che ha un comportamento molto aggressivo, simile al linfoma NK/T γ/δ .¹⁷

Inoltre nel gruppo dei CTCLs, vengono riconosciute singolarmente entità come il linfoma extranodale NK/T, nasal type, e la neoplasia ematodermica CD4+/CD56+.

I linfomi periferici T “unspecified” (PTCL/NOS, non otherwise specified; NAS, non altrimenti specificabili), già così definiti dalla WHO, rappresentano un gruppo non specifico di linfomi non suddivisibili in ulteriori sottogruppi in base alla morfologia, al fenotipo e alle tradizionali indagini molecolari. Includono il linfoma primitivo cutaneo a cellule T CD8+ citotossico aggressivo epidermotropo, il linfoma primitivo cutaneo a cellule T γ/δ e il linfoma primitivo cutaneo a piccole e medie cellule T CD4+ ma studi contemporanei hanno confermato che tali entità dovrebbero essere considerate delle entità provvisorie e separate dal gruppo dei PTCL/NOS, come viene riconosciuto dall’ultima classificazione della WHO.^{17,18}

Il gruppo dei CBCLs riconosce il linfoma primitivo cutaneo del centro follicolare come entità distinta, costituito da uno spettro di malattia che include casi con pattern di crescita follicolare, follicolare e diffuso e diffuso, e il linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, leg type, che comprende quadri clinici coinvolgenti non solo le gambe ma anche altre sedi corporee. A questo gruppo viene affiancato anche il linfoma primitivo cutaneo a grandi cellule B (PBLBCL) “others”, che include rari casi di linfoma a grandi cellule B che non rientrano nella definizione di linfoma primitivo cutaneo a grandi cellule B, leg type.

Classificazione dei linfomi cutanei WHO/EORTC	Classificazione dei tessuti linfoidei WHO – linfomi cutanei (ICD-O Code)
<u>Linfomi cutanei a cellule T e NK</u> <ul style="list-style-type: none"> - Micosi fungoide (MF) - MF varianti e sottotipi <ul style="list-style-type: none"> MF follicolare Reticulosi pagetoide Granulomatous slack skin - Sindrome di Sezary - Leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto (ATLL) - Disordini linfoproliferativi primitivi cutanei CD30+ <ul style="list-style-type: none"> Linfoma primitivo cutaneo anaplastico a grandi cellule (C-ALCL) Papulosi linfomatoide - Linfoma subcutaneo simil-panniculitico a cellule T (SPTL) - Linfoma extranodale a cellule T/NK, nasal type - Linfoma primitivo cutaneo a cellule T periferiche, “unspecified” <ul style="list-style-type: none"> Linfoma primitivo cutaneo a cellule T CD8+ aggressivo epidermotropo (provvisorio) Linfoma primitivo cutaneo a cellule T γ/δ (provvisorio) Linfoma primitivo cutaneo a piccole e medie cellule T CD4+ pleomorfo (provvisorio) 	<u>Neoplasie a cellule T e NK mature</u> <ul style="list-style-type: none"> - Micosi fungoide (MF) - MF varianti e sottotipi <ul style="list-style-type: none"> MF follicolare Reticulosi pagetoide Granulomatous slack skin - Sindrome di Sezary - Leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto - Disordini linfoproliferativi primitivi cutanei CD30+ <ul style="list-style-type: none"> Linfoma primitivo cutaneo anaplastico a grandi cellule Papulosi linfomatoide - Linfoma subcutaneo simil-panniculitico a cellule T (fenotipo TCR α/β) - Linfoma extranodale a cellule T/NK, nasal type - Linfoma primitivo cutaneo a cellule T periferiche, sottotipi rari <ul style="list-style-type: none"> Linfoma primitivo cutaneo a cellule T CD8+ aggressivo epidermotropo (provvisorio) Linfoma primitivo cutaneo a cellule T γ/δ (provvisorio) Linfoma primitivo cutaneo a piccole e medie cellule T CD4+ pleomorfo (provvisorio)
<u>Linfomi cutanei a cellule B</u> <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma primitivo cutaneo a cellule B della zona marginale - Linfoma primitivo cutaneo del centro follicolare - Linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, leg type - Linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, altri - Linfoma primitivo cutaneo a grandi cellule B intravascolare 	<u>Neoplasie a cellule B mature</u> <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma extranodale della zona marginale dei tessuti linfoidei associati alla mucosa (MALT) - Linfoma primitivo cutaneo del centro follicolare - Linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, leg type - Linfoma diffuso a grandi cellule B, NOS - Linfoma primitivo cutaneo a grandi cellule B intravascolare
<u>Neoplasie dei precursori ematopoietici</u> <ul style="list-style-type: none"> - Neoplasia ematodermica CD4+/CD56+ (linfoma blastico a cellule NK) 	<u>Neoplasie dei precursori</u> <ul style="list-style-type: none"> - Neoplasia a cellule blastiche dendritiche plasmocitoidi

Tab. 1 Classificazione WHO/EORTC dei linfomi primitivi cutanei

- DIAGNOSI

La diagnosi dei PCL è basata su una attenta valutazione clinica e sull'esecuzione di una biopsia cutanea per l'esame istologico, indagini di immunoistochimica e biologia molecolare.

Il quadro cutaneo generalmente si caratterizza per la comparsa di lesioni papulari, in chiazza, in placca e/o nodulari isolate o coinvolgenti diverse sedi anatomiche a seconda del tipo di PCL e della sua aggressività. Per le forme aggressive, è possibile un contemporaneo riscontro di un coinvolgimento extracutaneo, viscerale o linfonodale, associato alla comparsa di iperpiressia, astenia e sudorazioni notturne. In questi casi, sono riscontrabili linfadenopatie diffuse, superficiali e profonde, infiltrazione epatica e/o splenica. Più raramente può comparire una sindrome leucemica o una sindrome emofagocitica con febbre, epatosplenomegalia e pancitopenia.¹⁹

Le indagini su tessuto consentono l'identificazione morfologica dell'infiltrato cutaneo e la valutazione del fenotipo del clone linfocitario neoplastico mediante tecniche di immunoistochimica che prevedono l'uso di determinati anticorpi monoclonali per il riconoscimento degli antigeni di superficie. Il riscontro di determinati antigeni di differenziamento o classi di differenziamento (CD) definisce il fenotipo, il grado di maturazione e la funzione del clone linfocitario neoplastico.

Altre indagini eseguite includono la tipizzazione dell'infiltrato (T o B), la valutazione della monoclonalità delle catene leggere (kappa/lambda) delle immunoglobuline citoplasmatiche e la loro tipizzazione nei CBCL e, nei CTCL, la sottotipizzazione attraverso la valutazione di antigeni di rilevanza prognostica, come CD30, e l'identificazione di un eventuale fenotipo aberrante di entità rare e aggressive.

L'analisi molecolare, mediante PCR o Southern Blot, consente il riconoscimento del riarrangiamento clonale del TCR e delle catene pesanti delle immunoglobuline e la valutazione dell'espressione di oncogeni specifici.

Di recente acquisizione è la citogenetica, che evidenzia alterazioni genetiche specifiche importanti per l'approfondimento dello studio delle entità più rare ed aggressive, come quelle riconosciute nella classificazione della WHO/EORTC nel gruppo dei linfomi T "unspecified".

- STADIAZIONE

Lo studio dei PCL viene completato dall'esecuzione di esami ematici specifici (emocromo con formula, LDH, β 2-microglobulina, ferritina, elettroforesi proteica ed immunoglobuline quantitative) e strumentali (rx torace, ecografia dell'addome completo e dei linfonodi superficiali), per valutare il grado di malattia e l'eventuale interessamento di sedi extracutanee, come il midollo osseo, i

linfonodi e la milza.

Queste indagini vengono ripetute periodicamente in modo da stabilire una eventuale progressione della malattia e la prognosi.

Una valutazione ematologica, l'esecuzione della biopsia osteo-midollare e della biopsia linfonodale per esame istologico ed immunoistochimica sono previste nelle forme a prognosi aggressiva, come nei PTCL/NOS, o comunque in caso di progressione della malattia, associate alla tipizzazione linfocitaria e all'analisi molecolare del sangue periferico e dei linfonodi istologicamente sospetti.

La stadiazione dei PCL viene pertanto stabilita da un protocollo specifico basato sul TNM.^{20,21}

T: CUTE	
T1	chiazze, papule e lesioni eczematose limitate a <10% della superficie cutanea
T2	chiazze, papule e macchie eritematose diffuse a >10% della superficie cutanea
T3	noduli tumorali, uno o più (>1 cm di diametro)
T4	eritrodermia
N: LINFONODI	
N0	assenza di interessamento linfonodale clinico e istologico
N1	linfadenopatie periferiche con istologia Dutch grade 1 o NCI LN0-2
N1a	clone negativo
N1b	clone positivo
N2	linfadenopatie periferiche con istologia Dutch grade 2 o NCI LN3
N2a	clone negativo
N2b	clone positivo
N3	linfadenopatie periferiche con istologia Dutch grade 3-4 o NCI LN4
N4	linfadenopatie periferiche senza conferma istologica
M: VISCERALE	
M0	assenza di coinvolgimento viscerale
M1	coinvolgimento viscerale specifico confermato dall'istologia
B: SANGUE PERIFERICO	
B0	<5% di linfociti atipici circolanti
B0a	clone negativo
B0b	clone positivo
B1	>5% di linfociti atipici circolanti
B1a	clone negativo
B2b	clone positivo
B2	linfociti atipici circolanti >1000/mL (clone positivo)

	T	N	M	B
IA	1	0	0	0,1
IB	2	0	0	0,1
II	1,2	1,2	0	0,1
IIB	3	0,2	0	0,1
IIIA	4	0-2	0	0
IIIB	4	0-2	0	1
IVA1	1-4	0-2	0	2
IVA2	1-4	3	0	0-2
IVB	1-4	0-3	1	0-2

Tab 2 EORTC Staging system per CTCLs

LINFOMI CUTANEI A CELLULE T (CTCL).

I CTCL rappresentano circa il 65% dei PCL e sono costituiti per il 90% dalle entità più conosciute: la micosi fungoide, la sindrome di Sézary e malattie linfoproliferative cutanee CD30+.

Classificazione WHO-EORTC	Frequenza, %	Sopravvivenza a 5 anni, %
CTCL		
Micosi fungoide	44	88
MF follicolare	4	80
Reticulosi pagetoide	< 1	100
MF granulomatosa	< 1	100
Linfoma a grandi cellule CD30+	8	95
Papulosi linfomatoide	12	100
Linfoma sottocutaneo simil-panniculitico CD8+ ($\alpha\beta$ +)	1	82
Linfoma T pleomorfo CD4+ a piccole e medie cellule	2	75
Sindrome di Sézary	3	24
Linfoma extranodale a cellule T/NK, nasal type	< 1	NR
Linfoma primitivo cutaneo a cellule T CD8+ aggressivo epidermotropo (provvisorio)	< 1	18
Linfoma primitivo cutaneo a cellule T γ/δ (provvisorio)	< 1	NR
Linfoma T periferico non altrimenti specificabile (PTL-NOS)	2	16
CBCL		
Linfoma primitivo cutaneo a cellule B della zona marginale	7	99
Linfoma primitivo cutaneo del centro follicolare	11	95

Linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, leg type	4	55
Linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, altri	< 1	50
Linfoma primitivo cutaneo a grandi cellule B intravascolare	< 1	65

Tab. 3 Frequenze relative e sopravvivenza a 5 anni dei PCL, classificati secondo la classificazione WHO-EORTC (NR: non raggiunta).

La classificazione del rimanente gruppo di CTCL è risultata negli anni confusa e difficoltosa, cosa che in verità non sorprende, vista l'eterogeneità e la rarità di questi tumori.

Nell'insieme essi rappresentano meno del 10% di tutti i CTCL. Con poche eccezioni queste forme sono clinicamente aggressive e richiedono spesso una chemioterapia sistemica.

Essi sono rappresentati dal linfoma sottocutaneo simil-panniculitico CD8+(α/β +), il linfoma cutaneo NK/T extranodale nasal type e il linfoma T periferico non altrimenti specificato (PTL-NOS). In quest'ultima categoria vengono incluse tre nuove entità cliniche (linfoma T pleomorfo CD4+ a piccole e medie cellule, linfoma T citotossico aggressivo epidermotropo CD8+ e linfoma T cutaneo $\gamma\delta$) e i quadri sporadici, aneddotici o inclassificabili con le attuali metodologie istologiche, immunoistochimiche e molecolari.

La micosi fungoide (MF) e la sindrome di Sézary (SS) insieme rappresentano le forme più comuni di CTCL.

Queste sono patologie croniche, rare e che mostrano una notevole variabilità nella presentazione cutanea, nel quadro istologico, nel coinvolgimento del sangue periferico, nell'immunofenotipo e nella prognosi.

MICOSI FUNGOIDE (MF)

La Micosi Fungoide (MF) è la forma più frequente e meglio definita di linfoma primitivo cutaneo. È caratterizzata dalla proliferazione di linfociti T di piccola o media taglia con nucleo cerebriforme a livello del derma superficiale.

Il termine MF dovrebbe essere usato solamente per la forma classica “Alibert-Bazin” caratterizzata dall’evoluzione in chiazze, placche e noduli tumorali, o per le varianti aventi un comportamento clinico simile.

Caratteristiche Cliniche

La MF colpisce prevalentemente gli adulti con un’età media di comparsa tra i 55-60 anni e un rapporto maschi/femmine di 1,6-2,0:1. Tuttavia, a volte vengono descritti casi anche tra i bambini e gli adolescenti.

La MF ha un comportamento clinico di tipo indolente con una lenta progressione, nell’ordine degli anni o talora dei decenni. Essa mostra un processo linfoproliferativo suddiviso in più tappe. Esordisce con chiazze eritematose, rotondeggianti od ovalari, a bordi netti. Le lesioni iniziali spesso coinvolgono la regione glutea o altre zone non fotoesposte, come il tronco e la radice degli arti. Le chiazze possono presentare aspetto desquamativo, psoriasiforme, ittiosiforme, eczematoide o cheratosico, e sono poco pruriginose. Possono presentare inizialmente tendenza alla regressione spontanea, soprattutto dopo l’esposizione solare o all’utilizzo di farmaci corticosteroidi topici, per poi ripresentarsi nella stessa sede, con tendenza ad aumentare in numero e dimensioni.

Vi è poi evoluzione allo stadio di placca, con infiltrazione delle chiazze, ed eventualmente di nodulo tumorale.

Alcuni pazienti evolvono dalla fase in chiazza alla fase eritrodermica, caratterizzata da eritrodermia esfoliativa e intenso prurito; si osservano aree di risparmio delle pieghe e di ipercheratosi palmoplantare.

Negli stadi avanzati della malattia possono venire coinvolti i linfonodi e gli organi interni.

I pazienti in stadio tumorale presentano caratteristicamente una combinazione di chiazze, placche e noduli tumorali, che possono mostrare ulcerazione.

Se al momento della presentazione clinica sono presenti solo noduli tumorali la diagnosi di MF è improbabile e vanno considerati in diagnosi differenziale altri tipi di CTCL.

Istologia

All’esordio l’infiltrato è di tipo polimorfo, ed è costituito da linfociti, istiociti, cellule dendritiche ed eosinofili. Esso è situato in sede perivascolare nel derma superficiale, con infiltrazione focale degli strati basali dell’epidermide, la quale può mostrarsi acantotica, ipercheratosica, o meno

frequentemente, atrofica.

Successivamente l'infiltrato si dispone in banda e l'epidermotropismo si rende più manifesto. Aumentano i linfociti intraepiteliali, spesso circondati da un alone chiaro, e si formano teche linfocitarie intraepiteliali (microascessi di Pautier).

Gli annessi cutanei possono presentare infiltrazione linfocitaria a livello infundibolare. Si osservano fenomeni di fibroplasia nel derma superficiale.

Nella fase in placca e in quella tumorale aumenta il numero di cellule linfoidi atipiche a citomorfologia pleomorfa, diminuiscono le cellule reattive, aumentano le plasmacellule e viene a mancare progressivamente il tipico epidermotropismo, mentre la patologia arriva a coinvolgere anche l'ipoderma.

Immunofenotipo e analisi molecolare

Le cellule neoplastiche nella MF presentano un fenotipo tipico delle cellule T (α/β) della memoria CD3+, CD4+, CD45RO+, CD7-, CD8-, con scarsa espressione degli antigeni di attivazione CD25-, CD30- e di proliferazione MIB +/- (Ki-67) e un pattern di citochine caratteristico dei linfociti Th2 (IL-2, IL-4, IL-10). Inoltre, le cellule infiltranti esprimono l'antigene linfocitario cutaneo (CLA) riconosciuto dal MoAb-HECA-452.

Va ricordato che può essere riscontrato anche un fenotipo CD4- e CD8+. Questi ultimi casi hanno un identico comportamento clinico e prognosi dei casi CD4+, e non dovrebbero pertanto essere considerati separatamente.

Di ausilio alla diagnosi può anche essere il rilievo di un fenotipo aberrante, come la perdita degli antigeni pan-T: CD2, CD3 e CD5.

L'espressione di proteine di tipo citotossico come TIA-1 e granzime B è presente nel 10% delle MF in stadio di placca, ma queste proteine sono più frequentemente espresse nei tumori presentanti trasformazione blastica.

La dimostrazione della monoclonalità dell'infiltrato, con indagini di biologia molecolare eseguite sul DNA estratto dalla lesione mediante tecniche di polimerase chain reaction (PCR) o Southern Blot e sonde molecolari per TCR- γ o TCR- β , costituisce un parametro diagnostico di estrema importanza nelle fasi iniziali di sviluppo della neoplasia e in seguito consente di valutare il coinvolgimento extracutaneo (sangue periferico, linfonodi etc.) della patologia linfoproliferativa.

Stadiazione

La MF può essere stadiata usando i criteri proposti dalla ISCL/EORTC nel 2007, per la stadiazione e la classificazione della micosi fungoide e la sindrome di Sézary. (Vedi capitolo: La sindrome di Sézary).

Prognosi

La prognosi dei pazienti affetti da MF dipende molto dallo stadio, in particolar modo dal tipo e dall'estensione delle lesioni e dalla presenza di malattia a livello extracutaneo.

I pazienti con MF limitata allo stadio di chiazza/placca (<10% della superficie cutanea) hanno una aspettativa di vita simile a quella della popolazione generale con una sopravvivenza a 10 anni del 97-98%, nei pazienti in stadio di chiazza/placca diffuso (>10% della superficie cutanea) la sopravvivenza invece scende all'83%, con la presenza di noduli tumorali al 42% e circa al 20% se vengono coinvolti i linfonodi. Se vi è coinvolgimento linfonodale, viscerale e la trasformazione in un linfoma T a larghe cellule si ha un comportamento clinico aggressivo.

I pazienti solitamente giungono ad exitus per il coinvolgimento sistemico o le infezioni.²²⁻²⁴

LA SINDROME DI SÉZARY (SS)

La sindrome di Sézary (SS) rientra nel gruppo dei CTCL ed è considerata una forma di linfoma/leucemia con interessamento della cute e del sangue periferico.

Storicamente la SS viene definita come una malattia caratterizzata dalla triade: eritrodermia, linfadenopatia generalizzata e la presenza di un clone neoplastico T-cellulare con nucleo cerebriforme (cellule di Sézary) nella pelle, nei linfonodi e nel sangue periferico.²⁵

Epidemiologia

La SS è una malattia rara che colpisce esclusivamente gli adulti. Essa rappresenta meno del 5% dei CTCL, con un'incidenza annua intorno allo 0,3 casi per milione di abitanti. Nelle ultime decadi si è notato un aumento dell'incidenza dei CTCL, probabilmente per un generale miglioramento delle capacità diagnostiche e dell'accesso alle cure. Sono più colpiti i bianchi, i maschi e l'incidenza aumenta con l'età.²⁶

Presentazione clinica

La SS è caratterizzata dalla comparsa de novo o da precedente MF di un'eritrodermia spesso intensamente pruriginosa, che può essere associata ad intensa esfoliazione, edema e lichenificazione.

Sono altresì comuni: linfadenopatia, alopecia, onicodistrofia e ipercheratosi palmo-plantare.

Negli stadi avanzati vi può essere interessamento oculare, che si manifesta con blefarocongiuntivite ed ectropion.

Per quanto riguarda le eritrodermie la diagnosi differenziale comprende: reazioni cutanee da farmaci, reticulosi attinica, reazioni pseudolinfomatose indotte da farmaci, gravi reazioni di tipo eczematoso, psoriasi, dermatite seborroica, parapsoriasi, pitiriasis rubra pilaris e stati di fotosensibilità (es. lupus e dermatomiosite).

Morfologia

Le cellule di Sézary sono linfociti atipici dotati di nucleo convulso o cerebriforme, presenti sia nella cute che nel sangue.

Diagnosi

La diagnosi della SS si basa su parametri clinici e strumentali (ecografia, TC e PET), sull'esame istologico-immunoistochimico di biopsie cutanee e/o linfonodali e sullo studio immunofenotipico (CD4+/CD26-, CD7±) e molecolare (clonalità e citogenetica) del sangue periferico e dell'aspirato

midollare.

Istologia

L'istologia nella SS può risultare simile a quella della MF, tuttavia l'infiltrato cellulare tende ad essere spesso monotono e l'epidermotropismo può a volte essere assente.

Da sottolineare è il fatto che in più di un terzo delle biopsie di pazienti con la SS il quadro istologico risulta non specifico, potendo riprodurre pattern presenti nelle patologie benigne di tipo infiammatorio (perivascolare superficiale, perivascolare superficiale e profondo, spongiotico, psoriasiforme, con infiltrato lichenoidale etc.).

Questa situazione spesso rende difficoltosa una diagnosi e un trattamento precoci.

I linfonodi coinvolti mostrano in modo caratteristico un infiltrato di cellule di Sézary denso e monotono con perdita della normale architettura linfonodale.

Anche il midollo osseo può a volte essere coinvolto, ma l'infiltrato è spesso sparso e maggiormente interstiziale.

Immunofenotipo

Le cellule di Sézary da un punto di vista immunofenotipico rappresentano la proliferazione clonale di linfociti T helper CD4+ ed esprimono pertanto antigeni associati alle cellule T: CD2+, CD3+, CD5+, circa 2/3 sono CD7-, quasi tutte sono CD4+/CD8-, CD45RO+, CD26-, CD60+, CD49d-.

Sono possibili anche casi CD3+, CD4-/CD8+, in questi ultimi deve però essere considerata la diagnosi differenziale con la leucemia mieloide.

Indagini molecolari

I geni del TCR spesso mostrano un riarrangiamento clonale. Non sono state identificate traslocazioni ricorrenti, ma il riscontro di un cariotipo alterato è un reperto comune in questa patologia.

Criteri diagnostici

La SS rientra nel gruppo degli E-CTCL (erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma), linfomi cutanei a cellule T caratterizzati dalla presenza di eritrodermia (eritema diffuso a più dell'80% della superficie cutanea). In questo gruppo rientrano: la sindrome di Sézary (fase leucemica dei E-CTCL), la micosi fungoide eritrodermica (E-MF), e gli E-CTCL NOS (not otherwise specified).

Le caratteristiche cliniche della SS si sviluppano solitamente "de novo" nel giro di un breve intervallo di tempo (SS variante classica), in alcuni casi invece sono preceduti da prodromi quali la presenza di prurito o quadri di dermatite aspecifici, o infine possono insorgere da una tipica MF.

L'International Society for Cutaneous Lymphoma (ISCL) raccomanda che questi ultimi casi siano indicati come "SS preceduta da MF" o "SS secondaria", in ragione delle possibili differenze nel comportamento clinico e nella prognosi.

La percentuale di cellule di Sézary richiesta per la diagnosi di SS rimane una questione controversa. I criteri minimi per fare diagnosi sono rappresentati da eritrodermia, un'istologia cutanea compatibile, >5% di cellule di Sézary circolanti e l'evidenza nel sangue periferico di un clone T cellulare.

L'ISCL ha proposto per la diagnosi di SS la presenza di uno o più dei seguenti criteri ematologici: (1) una conta assoluta di cellule di Sézary di almeno 1000cells/mm³, (2) un rapporto CD4/CD8>10 dovuto ad un incremento delle cellule CD4+ circolanti e/o la presenza su di essi di un immunofenotipo aberrante (per esempio, la perdita degli antigeni pan-T: CD2, CD3, o CD5, e/o CD4 e CD8), (3) un'aumentata conta linfocitaria con l'evidenza di un clone T cellulare nel sangue periferico, evidenziato con la metodica di Southern blot o mediante PCR, (4) presenza di anomalie cromosomiche sul clone T cellulare.²⁷⁻³⁰

Fattori prognostici

Stratificati in base alla conta delle cellule di Sézary (SC), i pazienti affetti da E-CTCL mostrano una mediana di sopravvivenza (MS) di 7,6 anni in caso di numero minore di 1000 SC/μL, di 5,4 se compreso tra 1000 e 10.000 SC/μL, e di 2,4 se maggiore di 10.000 SC/μL.

L'età avanzata, livelli elevati di lattato deidrogenasi (LDH) e una conta dei globuli bianchi (WBC) >20.000/μL alla diagnosi sono stati associati a una cattiva prognosi.

Anche un elevato numero di CD60+ e uno basso di CD49d+ tra i CD4+ alla presentazione della malattia è risultato associato a minori probabilità di sopravvivenza.²⁷⁻³⁰

ANALISI GENETICA E MOLECOLARE NEI LINFOMI CUTANEI

Le indagini descritte di seguito ricercano anomalie genetiche specifiche che possono riguardare alterazioni del numero dei cromosomi (aneuploidie come trisomie, monosomie o nullisomie) o della loro struttura (delezioni, traslocazioni, inversioni); la scoperta del cariotipo standard rappresenta il target di riferimento per identificare le anomalie genetiche osservate con queste metodiche. Si tratta di tecniche ormai collaudate da molti anni che si avvalgono non soltanto dello studio del genoma ma anche dell'analisi del DNA associata a tecniche di biologia molecolare e hanno assunto una importanza nell'approfondimento delle conoscenze patogenetiche relative ai linfomi cutanei.

- CITOGENETICA

CITOGENETICA TRADIZIONALE: IL BANDEGGIO

Rappresenta uno dei test genetici maggiormente utilizzati nello studio delle alterazioni genetiche presenti nei tumori e nelle malattie genetiche e permette di identificare riarrangiamenti cromosomici coinvolgenti non meno di 5 Mb. Il materiale da analizzare viene estratto dalle cellule in fase di mitosi dopo un'adeguata stimolazione in coltura. In particolare, i linfociti vengono trattati con lectine quali la fitoemagglutinina. Il genoma viene quindi denaturato con specifici enzimi e viene colorato in modo da ottenere un'alternanza di bande chiare e scure. Il bandeggio è alla base della citogenetica tradizionale che identifica ogni singolo cromosoma con una serie di bande specifiche; una diversa successione delle bande definisce una specifica alterazione strutturale.

CITOGENETICA MOLECOLARE: CGH

Questa tecnica è stata introdotta successivamente e si distingue per maggiore rapidità e potere di risoluzione.

La CGH (comparative genomic hybridization) è stata introdotta da alcuni anni nell'analisi di alterazioni numeriche di copie di geni e ha contribuito allo studio di numerose patologie oncologiche, identificando amplificazioni e delezioni submicroscopiche prima non note. Consiste nell'analisi del DNA attraverso la comparazione con un DNA di riferimento attraverso due fluorocromi distinti. Questa tecnica consente di evidenziare quanto DNA si lega per ogni locus; questo dato viene espresso dal rapporto tra le due fluorescenze. Rispetto alle precedenti metodiche, non necessita di sottoporre a coltura il materiale cellulare, ma vengono usati campioni fissati in formalina.

E' una tecnica che presenta una risoluzione limitata a 3-7 Mb per le delezioni e 2 Mb per le amplificazioni. Inoltre ha dei limiti relativi al riscontro di mosaicismi e alterazioni cromosomiche strutturali.

L'introduzione della CGH ad alta risoluzione ha sortito un effetto notevole sulla ricerca di ulteriori alterazioni genetiche, come la presenza di sbilanciamenti subcriptici.³¹

L'array-CGH è una metodica innovativa e standardizzata della CGH che possiede una elevata sensibilità e specificità poiché è ripetibile. Ha assunto un ruolo nella diagnosi delle patologie tumorali ed è possibile tracciare con questa metodica il profilo genetico di singole entità patologiche.

Utilizza cloni di materiale genetico specifici come riferimento e consente quindi una immediata correlazione tra una alterazione genetica e la sua posizione nel genoma attraverso un processo di

coibridazione del DNA campione e di quello di controllo che vengono marcati con diversi fluorocromi. I fluorocromi solitamente utilizzati sono Cy3, che emette una lunghezza d'onda nel campo del verde, e Cy5, che invece emette una lunghezza d'onda nel rosso. Il materiale in studio è disposto su microarray di sonde genomiche, ognuna presente in duplice copia per ridurre al minimo eventuali errori, dove si lega il materiale genomico dopo il processo di coibridazione. Il risultato dell'esame è rappresentato dal rapporto di fluorescenza fra i due segnali emessi dai fluorocromi; un software analizza questo rapporto e altri parametri qualitativi, calcolandone il \log_2 . Il \log_2 rappresenta il numero di copie di DNA relativo fra i due campioni ibridati ed il valore medio di riferimento è pari a zero.

Il potere di risoluzione può variare da alcune decine di Kb a Mb, a seconda del numero, della dimensione, della lunghezza e dello spazio fra le sonde presenti sull'array.

Anche questa metodica non è in grado di rilevare aberrazioni bilanciate ed i mosaicismi, che coinvolgono meno del 10-30% del numero totale delle cellule; inoltre non può identificare le poliploidie per il meccanismo di normalizzazione del \log_2 .³²

MICROARRAY

L'introduzione di questa metodica ha permesso di attuare l'analisi del profilo di espressione genica nel campione in esame, sia esso un tessuto o una cellula.

Consiste nell'utilizzo di microarrays, biosensori che rendono evidente in modo veloce e molto preciso ciò che succede nel campione in esame attraverso un computer, differenziando geni espressi in modo differente. Viene estratto innanzitutto l'mRNA che viene convertito in cDNA attraverso la trascrittasi inversa e quindi ibridizzato, marcato con fluorocromi e associato al microarray. I fluorocromi più spesso utilizzati nelle ibridazioni con microarray sono Cy3 (stimolazione del canale del verde) e Cy5 (stimolazione del canale del rosso). I segnali emessi vengono identificati utilizzando un analizzatore laser ad alta risoluzione che acquisisce un'immagine per ciascun fluorocromo e le rapporta fra loro. Un software per immagini digitali analizza quindi il segnale emesso a seconda della sua intensità e converte i dati ottenuti in colori. Il rapporto tra le intensità viene trasformato logaritmicamente (\log ratio) e il valore che corrisponde al rapporto 1 viene assunto come zero, in modo da poter paragonare i valori up- o down-regolati. I valori ottenuti vengono studiati statisticamente confrontandoli con dati ottenuti da precedenti analisi su campioni biologici indipendenti o dalla ripetizione tecnica del processo di microarray sullo stesso campione di estrazione di RNA. Questo meccanismo aiuta a ridurre le possibili variabili che si possono verificare durante il processo.

La qualità dell'immagine dipende da un processo standardizzato nella costruzione dell'array, nell'estrazione dell'RNA e nell'ibridazione e da un'adeguata risoluzione della scansione.³³

I dati estrapolati dall'analisi dell'immagine devono essere però pre-processati per rimuovere gli spot di bassa qualità. Si tratta di un processo di normalizzazione, che elimina alcune variabili sistematiche, mentre è possibile avere variabili biologiche e fisiologiche.

I dati di espressione così ottenuti vengono successivamente confermati mediante RT-PCR ed immunostochimica.

SCOPO DELLO STUDIO.

Lo scopo del progetto triennale di dottorato è lo studio delle alterazioni genetiche in un gruppo di pazienti affetti da micosi fungoide ed un gruppo di pazienti affetti da sindrome di Sezary seguiti c/o il centro di immunopatologia cutanea della Clinica Dermatologica di Milano da alcuni anni.

Dalle biopsie cutanee congelate eseguite su pazienti affetti da micosi fungoide è stato estratto il DNA e analizzato, comparandolo con DNA sano di riferimento, utilizzando la tecnica array-CGH, derivata dalla CGH tradizionale, allo scopo di identificare la presenza di geni potenzialmente implicati nel processo di oncogenesi. Questa analisi è stata eseguita, per ogni paziente, su biopsie effettuate ad una fase iniziale di malattia (stadio in chiazza) e ad una fase di progressione della stessa (fase nodulo-tumorale o progressione in linfoma T pleomorfo).

Sugli stessi pazienti è stata inoltre eseguita un'analisi miRNA (micro-RNA). Si ipotizza che il profilo d'espressione dei miRNA possa infatti dare informazioni utili per predire lo stato di malattia, il decorso clinico, la progressione tumorale e la risposta terapeutica.

Questo lavoro è stato poi eseguito su biopsie effettuate in pazienti affetti da sindrome di Sezary che, quando non insorge primitivamente come tale, si può considerare una fase evolutiva della micosi fungoide.

La valutazione delle alterazioni genetiche, ed in particolare la correlazione esistente tra duplicazione e delezione genetica e sovra/sottoespressione genetica, è stata possibile attraverso l'interpretazione e la comparazione dei dati ottenuti attraverso le tecniche array-CGH (comparative genome hybridization) e miRNA (micro-RNA).

Sono stati comparati quindi i risultati ottenuti per valutare quali fossero le alterazioni cromosomiche riscontrate nei pazienti affetti da micosi fungoide prima e durante la progressione della malattia o la trasformazione della stessa in linfoma più aggressivo.

Nei pazienti affetti da sindrome di Sezary sono state studiate le alterazioni cromosomiche al momento della diagnosi di malattia.

L'applicazione dell'array-CGH e della metodica di analisi mi-RNA si sono rivelate molto utili per l'identificazione delle diverse aberrazioni cromosomiche presenti nel genoma dei pazienti affetti da micosi fungoide e sindrome di Sezary, per valutare la prognosi del paziente e per cercare di migliorare o trovare nuove linee terapeutiche per il trattamento delle due patologie. Lo studio di questi profili può rappresentare quindi uno strumento di grande importanza nella classificazione e nella diagnosi dei tumori.

MATERIALI E METODI.

Per questo studio sono state utilizzate due metodiche di biologia molecolare diverse: l'arrayCGH e MicroRNA microarray.

Per la micosi fungoide sono stati selezionati 13 pazienti affetti da micosi fungoide e seguiti c/o il centro di immunopatologia cutanea della Clinica Dermatologica di Milano da alcuni anni. Ogni paziente è stato sottoposto ad una biopsia cutanea, ripetuta durante la progressione di malattia. La patologia linfoproliferativa ha portato all'exitus, dopo vari tentativi terapeutici intrapresi nel corso degli anni, 11 pazienti, 2 pazienti sono attualmente sottoposti a chemioterapia. Sulle biopsie congelate sono stati eseguite le analisi array-CGH e miRNA

Per la sindrome di Sezary: nello studio CGH sono stati selezionati 25 pazienti seguiti presso le U.O. di Ematologia e di Dermatologia della Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, con diagnosi di sindrome di Sézary (11 maschi e 14 femmine, età mediana 65 anni, con un range di 29-85 anni). Di tutti è stata dimostrata la presenza di una popolazione clonale di linfociti T nel sangue periferico mediante valutazione dei riarrangiamenti del T-cell receptor gamma e beta effettuata con metodica di PCR e analisi degli heteroduplex. Tutti i pazienti presentavano un immunofenotipo CD4+, con un rapporto CD4/CD8 significativamente aumentato e perdita degli antigeni CD26 e/o CD7. Per lo studio riguardante i microRNA è stata utilizzata una casistica minore, usando solo campioni di cellule CD4+/CD14-. È stato tracciato il profilo d'espressione miRNA di 14 pazienti (di cui 1 post-trapianto) e di 6 controlli sani.

ArrayCGH

Preparazione del DNA genomico

1. **Estrazione del DNA dal campione** costituito, nel nostro caso, da cellule mononucleate del sangue periferico (pbl) o da linfociti CD4+/CD14- separati con metodica immunomagnetica.
2. **Quantificazione del DNA al Nanodrop.** Il Nanodrop è uno spettrofotometro che misura la concentrazione del campione di DNA in funzione dell'assorbanza. L'assorbanza è la frazione

di luce incidente assorbita dal campione ed è direttamente proporzionale alla concentrazione del DNA.

3. **Concentrazione del DNA estratto.** Questa operazione è richiesta quando il DNA estratto non ha una concentrazione sufficiente per garantire una buona qualità dei risultati degli array e viene eseguita con il sistema Microcon (Millipore), il quale prevede l'utilizzo di colonnine contenenti resina, che in un primo momento intrappolano il DNA, consentendo di eliminare l'eccesso di solvente, per poi rilasciarlo una volta invertite, esclusivamente in seguito all'applicazione di una forza centrifuga.

Tecnica di ArrayCGH

Dopo la preparazione dei campioni di DNA si procede con la vera e propria tecnica di arrayCGH, che consiste nelle seguenti operazioni:

1. **Digestione del DNA estratto con enzimi di restrizione.**

I campioni di DNA da analizzare vengono digeriti tramite enzimi di restrizione al fine di permettere l'ibridazione. Poiché la tecnica dell'arrayCGH è una tecnica comparativa, è necessario, per ogni campione in esame, preparare in parallelo DNA cosiddetti "reference" dello stesso sesso, che fungono da riferimento per la realizzazione dell'esperimento. Il mix di digestione è costituito da: enzima RSA1, enzima Alu1, siero bovino acetilato (BSA) e Buffer C.

2. **Marcatura.**

Per la marcatura del DNA genomico (gDNA) viene utilizzato il kit "Agilent Genomic DNA Labeling Kit PLUS" (Agilent p/n 5188-5309) il quale utilizza random primers e una DNA polimerasi (frammenti Klenow) per la marcatura differenziale di gDNA con diversi nucleotidi fluorescenti.

Il campione viene marcato con il fluorocromo Cianina-5 (Cy-5) e il riferimento con il fluorocromo Cianina-3(Cy-3).

3. **Purificazione del DNA marcato.**

La purificazione del DNA marcato, volta ad eliminare i nucleotidi marcati non incorporati perché in eccesso, prevede l'utilizzo di colonnine Amicon con filtri da 30kDa.

Dopo questo procedimento è possibile utilizzare il Nanodrop, non solo per misurare la concentrazione di DNA (ng/μl), ma anche per calcolare i parametri di resa e attività specifica dei campioni.

Il DNA dei pazienti viene unificato con quello dei rispettivi controlli, dimezzando così il numero

delle provette, facendo in modo di abbinare campioni con caratteristiche di resa e attività specifica il più simile possibile.

Alle provette viene quindi aggiunto l'opportuno buffer d'ibridazione e, prima di procedere con la successiva fase, le si lascia 3 minuti a 95°C e 30 minuti a 37°C affinché avvenga l'ibridazione del DNA Cot-1 alle sequenze ripetute presenti nel genoma dei pazienti e dei controlli.

4. Ibridazione.

Ibridare i campioni sui vetrini (array) e posizionare questi ultimi in forno rotante ad una temperatura di 65°C per 24 ore.

5. Lavaggi

Questa procedura consente di eliminare il DNA non ibridato e gli altri reagenti presenti nella miscela che è stata dispersa sul vetrino con appositi wash buffer.

6. Scansione e visualizzazione dei risultati

Dopo aver effettuato i lavaggi, gli array vengono analizzati attraverso lo Scanner Agilent. L'analisi dei risultati viene effettuata utilizzando il software Agilent feature Extraction (vers.8.1) che permette di evidenziare, per ogni singola sonda oligonucleotidica, la variazione del numero di copie dei geni presenti sui cromosomi. Il software calcola il rapporto tra l'intensità di fluorescenza emessa dal DNA campione e quella emessa dal DNA di riferimento, sottratta del background (il background è il segnale di fluorescenza medio dato dai non-target pixels).

In un primo momento tutti i dati di fluorescenza ottenuti vengono normalizzati: il software calcola il logaritmo in base 2 del rapporto di fluorescenza (\log_2 ratio) tra Cy3 e Cy5; successivamente viene calcolata la media per ogni gruppo di spot e viene calcolata la deviazione standard dei valori ottenuti rispetto a quelli di riferimento.

I dati vengono poi visualizzati sotto forma di profili di fluorescenza per ogni cromosoma con il software Agilent Genomic Workbench, il quale pone sull'asse delle ordinate le sonde oligonucleotidiche di ogni cromosoma, in ordine dal telomero p al telomero q, e sull'asse delle ascisse i valori di \log_2 del rapporto delle fluorescenze calcolate per ogni singola sonda.

Per correggere le eventuali differenze date da una diversa efficienza di marcatura dei campioni, la fluorescenza calcolata dagli array viene normalizzata per ottenere un log ratio medio pari a 0 (rapporto medio pari a 1 indica che non ci sono variazioni nel DNA campione rispetto al riferimento) per tutte le sonde dell'array. Vengono esclusi gli spots con segnale di fluorescenza insufficiente dei campioni di DNA (segnale di fluorescenza < 20% rispetto al background, derivanti da marcatura fallita). Viene calcolata la media e la deviazione standard del log ratio della

fluorescenza per determinare la presenza di duplicazioni del DNA (fluorescence ratios >1) e delezioni (fluorescence ratios <1). Quindi se in un campione sono assenti sbilanciamenti, il log₂ del rapporto di fluorescenza sarà pari a zero per tutti i cloni di tutti i cromosomi, mentre i valori del log₂ che indicano con certezza la delezione o la duplicazione di un oligonucleotide corrispondono a -1 e a +0,5, rispettivamente.

Protocollo miRNA (Agilent).

Per l'analisi dei miRNA è stato utilizzato "Human miRNA Microarray Kit (8x15K)" su piattaforma Agilent. Il procedimento consiste nell'ibridazione di RNA estratto dai campioni in studio su array a supporto solido (in vetro), sui quali sono spottate sonde specifiche per il riconoscimento dei microRNA.

Si può riassumere l'intera procedura nel seguente modo:

1. L'RNA totale viene estratto dal campione e ne vengono valutate concentrazione e qualità mediante elettroforesi su gel d'agarosio e l'utilizzo di uno spettrofotometro.
2. Defosforilazione enzimatica dei campioni che sfrutta l'attività dell'enzima CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), per 30 min a 37°C.
3. Denaturazione dei campioni con DMSO (dimetilsolfossido) a 100°C per 7 min.
4. Marcatura dell'RNA con cianina Cy3, grazie all'attività della T4 RNA ligase.
5. Purificazione dei campioni su colonnine Micro Bio-Spin 6 che serve ad eliminare il DMSO e la cianina libera.
6. Concentrare i campioni utilizzando un concentratore centrifugo sottovuoto a 45-55°C.
7. Risospendere i campioni in Hi-RPM Hybridization Buffer e denaturarli a 95°-100°C per 5'.
8. Ibridare i campioni sui vetrini (array) e posizionare questi ultimi in forno rotante a 55°C per 20 ore.
9. I vetrini vengono lavati con appositi wash buffer.
10. Scansione dei vetrini mediante scanner Agilent.
11. Dall'immagine ottenuta durante la scansione vengono estratti i dati numerici relativi all'espressione dei miRNA di ogni campione attraverso l'utilizzo di un software dedicato (Agilent Feature Extraction).

RISULTATI.

MICOSI FUNGOIDE.

I dati ottenuti dallo studio di arrayCGH sui campioni di ogni paziente sono stati analizzati attraverso l'utilizzo del software di analisi Genomic Workbench Lite v 6.5.0.18 fornito da Agilent Technologies.

Questo sistema permette di evidenziare, per ogni singola sonda oligonucleotidica le amplificazioni e le delezioni presenti sui cromosomi.

Stadio iniziale (in chiazza)

Nella micosi fungoide in stadio iniziale sono state individuate poche alterazioni, in particolare si sono rilevate più amplificazioni cromosomiche rispetto alle delezioni,

- **1p:** la regione coinvolta è minima con delezione di 1p31p36 (30% della casistica). Questa alterazione si rileva nei tumori nodali e nelle leucemie e suggerisce che un numero di geni su 1p può essere coinvolto nella patogenesi dei CTCL (BRCD2, MOM1, p18, BCL10)
- **10q:** la regione coinvolta con minima alterazione è 10q26
- **17p:** alterazione di protein-chinasi coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare
- **19:** delezione di 19p e 19q. Queste alterazioni sono state rilevate anche nei carcinomi tiroidei, ovarici e nell'oligodendroglioma.¹⁰⁶ I geni coinvolti sono oncosoppressori (STK1/LKB1), per questo la delezione di questi loci può essere critica per lo sviluppo di CTCL.
- **7:** la duplicazione di 7q, che codifica per FASTK (serine/threonine protein kinase), risulta essere presente nel 59% dei pazienti affetti da MF segnalati in letteratura. Molti lavori suggeriscono che FASTK possa essere coinvolta nell'induzione dell'apoptosi tramite la via di Fas, mentre molte evidenze indicano che questa proteina abbia proprietà anti-apoptotiche, inducendo uno splicing alterato di Fas.
- **8:** amplificazione di 8q24 che coinvolge proteine di trascrizione del segnale con attivazione

cellulare. 8q24.3 contiene 28 geni, tra cui HSF1 (heat shock factor protein1) e altre proteine di trascrizione del segnale, la cui duplicazione porta ad un'attivazione cellulare permanente; i pazienti che posseggono questa duplicazione hanno un'aumentata probabilità di progressione di malattia con riduzione della sopravvivenza, in accordo con i dati riportati in letteratura che hanno rilevato la presenza di questa alterazione nel 45% dei pazienti affetti da micosi fungoide nodulo-tumorale.

- **9p:** 9p21.3 rappresenta un'altra importante alterazione. La regione cromosomica in questo caso è risultata deleta in entrambi i cromosomi 9 nel 25% dei pazienti (doppia delezione). Il gene codifica per CDKN2A/p16 (gene oncosoppressore), anch'esso associato a progressione di malattia.
- **17q:** amplificazione di proteine coinvolte nella regolazione del segnale
- **18:** l'amplificazione del 18q21.3, visibile anche nei linfomi nodali è meno frequente ma pur sempre presente nella MF. Codifica per BCL2.¹⁰⁶

Stadio tumorale (MF-T)

Lo stadio tumorale rappresenta l'evoluzione dello stadio iniziale della malattia e si considera tale quando si rileva la comparsa di lesioni nodulari accompagnate da adenopatia satellite o multifocale. I nostri pazienti hanno avuto evoluzione in stadio tumorale in tempi diversi (media di 4 anni) dall'esordio della malattia. L'esame istologico ha documentato la trasformazione della malattia in linfoma T pleomorfo.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a staging ematologico con esami strumentali e BOM con ago aspirato midollare e striscio su sangue periferico.

Sottoposti a chemioterapia e/o trapianto di midollo allogenico da donatore, la maggior parte dei pazienti è andata incontro a rapido exitus (media di 6 mesi dall'evoluzione).

Le principali alterazioni trovate in questo stadio di malattia ricalcano in parte quelle rilevate nello stadio in chiazza e aggiungono nuove mutazioni cromosomiche, per la maggior parte coincidenti con quelle trovate nella sindrome di Sezary. Per questo motivo possiamo considerare le due patologie come due condizioni dello stesso spettro di malattia.

- **4:** la delezione del 4 è comune nella MF e nella sindrome di Sezary. E' stata trovata inoltre nei carcinomi del polmone e del colon-retto e nel melanoma, mentre risulta essere più rara nelle leucemie e nei linfomi. I geni coinvolti da questa delezione sono hPTTG, TBC1D1, FGFR3, KIT e PDGFRA, rilevanti nel ciclo cellulare.
- **10:** 10 q risulta essere deleto in una minima regione 10q26; tra i geni coinvolti, comuni con la sindrome di Sezary, troviamo PTEN, che agisce come oncosoppressore.
- **13:** un ulteriore regolatore del ciclo è RB1, codificato dalla regione 13q, risultata deleta. La perdita di RB1 comporta una diminuita espressione di questa fondamentale proteina regolatrice inattivante il ciclo cellulare con eccessiva crescita cellulare.
- **17p:** è la mutazione più comune trovata nella MF-T. Questa alterazione è stata trovata, secondo i dati della letteratura, in leucemie e linfomi.¹⁰⁶ 17p è sede del gene p53; la delezione di questa regione provoca un aumento del numero di mutazioni del gene che agisce da oncosoppressore. La stessa alterazione è stata trovata nella sindrome di Sezary, suggerendo così un ruolo attivo di questa delezione nella progressione di malattia.
- **17q:** . amplificazione di questa regione dove il gene più rilevante è STAT che, in risposta alle citochine e a fattori di crescita, va ad agire come fattore di trascrizione. Fa parte della pathway di JAK/STAT e una sua attivazione si traduce in un' aumentata proliferazione e resistenza all'apoptosi. Il suo ruolo è risultato importante nello sviluppo sia di tumori solidi che di neoplasie ematologiche, tra cui la sindrome di Sézary.

Nella sindrome di Sezary, come vedremo in seguito, le delezioni sono più frequenti rispetto alla MF, mentre le amplificazioni sono molto più frequenti nella MF. La SS e la MF-T hanno un pattern molto simile eccetto per l' amplificazione di 17q che si rileva solo nella SS. Come si evince dalla letteratura le delezioni comuni riguardano i loci 6p, 13q, 16p e 20, mentre l' amplificazione del cromosoma 8 si nota in SS e in MF-T.¹⁰⁶ Le delezioni di 1p e 17p sono le più frequenti, seguite dall' amplificazione del cromosoma 4, dalla delezione dei cromosomi 10 e 19 e dall' amplificazione di 18 e 17q.¹⁰⁶

I dati riportati e le nostre evidenze suggeriscono che la MF e la SS facciano parte dello stesso spettro di malattia e che le regioni cromosomiche comuni coinvolte possano essere rilevanti nella

progressione della malattia e nella patogenesi dei CTCL.

Genomic aberrations in MF-T

Cytoband	G/L	Candidate genes	%	Ref.
1p36.2	Gain	MFN2	45%	Van Doorn 2008
1q21-q22	Gain	MCL1, CLK2, PRCC, ARHGEF11	40-45%	Van Doorn 2008; Barba 2008
1q25-q31	Gain	RGS1, RGS2	35%	Laharanne 2010; Van Doorn 2008; Barba 2008
7p22-p11.2	Gain	RAC1, OCM, CAMK2B; MCL1, CLK2, PRCC, ARHGEF11	45-50%	Laharanne 2010; Van Doorn 2008
7q11.2	Gain	GTF2IRD1	50%	Van Doorn 2008
7q21	Gain	HGF, AP1S1, SMURF1	55-60%	Laharanne 2010; Van Doorn 2008
7q31	Gain	DOCK4, MET, ING3	50%	Laharanne 2010
7q33.5-q35	Gain	PTN, HIPK2, BRAF, PIP, EPHA1, EZH2	55%	Salgado 2010; Van Doorn 2008
7q36	Gain	FASTK	59%	Van Doorn 2008
8q24	Gain	MYC, HSF1	32-36%	Salgado 2010; Van Doorn 2008
17q12	Gain	PIIP4K2B, MMP28, GRB7, ERBB2	30%	Laharanne 2010
17q21	Gain	STAT3, STAT5A-5B, ERBB2, FMNL1	32-41%	Salgado 2010; Van Doorn 2008; Barba 2008
5q13	Loss	TAF9	45%	Van Doorn 2008
9p21	Loss	CDKN2A-2B, MTAP, DMRTA1	30-40%	Salgado 2010; Laharanne 2010; Van Doorn 2008
9q21	Loss	UBQLN1	32%	Van Doorn 2008
9q31	Loss	CDC14B, XPA, NR4A3	30%	Salgado 2010; Van Doorn 2008
10p11.2	Loss	MAP3K8, ZEB1, ITGB1	17-30%	Salgado 2010; Laharanne 2010
10q26	Loss	MGMT, FGFR2	40%	Laharanne 2010
13q14	Loss	RB, DLEU1, KLF12	20-36%	Salgado 2010; Van Doorn 2008
13q24	Loss	TFDP1	35-40%	Laharanne 2010; Van Doorn 2008
16q21-q22	Loss	CMTM1, CKLF, E2F4, CFBF	30%	Laharanne 2010
16q23-q24	Loss	BCAR1, WWOX, CDH13	35%	Laharanne 2010
17p13	Loss	TP53, TNK1	28%	Salgado 2010

Principali alterazioni cromosomiche in MF-T

Attraverso lo studio miRNA sono stati selezionati miRNA di interesse nei casi di micosi fungoide studiati, con particolare riferimento alla MF in stadio di progressione, dove sono stati trovati dati numericamente e statisticamente più significativi rispetto alla MF in stadio iniziale.

Nella sezione dedicata alla discussione parleremo più approfonditamente di questi risultati.

I miRNA risultati maggiormente deregolati nei pazienti affetti da MF, con indicato il cromosoma su cui sono codificati sono inseriti nella tabella sottostante. I nostri risultati coincidono con i dati riportati in letteratura per quanto riguarda le alterazioni più rilevanti:

- **miR-93 (up)**

- **miR-155 (up)**

- miR17-92 (up)

- miR15-16 (down)

- let-7 (down)

Table 2 – Differentially expressed miRNAs with chromosomal location.

miRNA	Fold change	Adj. P-value	Chromosomal location
hsa-miR-620	-3.07	0.0481	12: 116586365-116586459 [-]
hsa-miR-302d	-2.23	0.0422	4: 113569160-113569227 [-]
hsa-miR-463	-2.19	0.0030	11: 21553364-2155439 [-]
hsa-miR-204	-2.08	0.0010	9: 73424891-73425000 [-]
hsa-miR-323b-5p	-2.07	0.0407	14: 101522556-101522637 [+]
hsa-miR-380-5p	-2.06	0.0303	14: 101491354-101491414 [+]
hsa-miR-383	-2.02	0.0459	8: 14710917-14711019 [-]
hsa-miR-211	-1.96	0.0459	15: 31357235-31357344 [-]
hsa-miR-363*	-1.94	0.0015	X: 133303408-133303482 [-]
hsa-miR-133b	-1.92	0.0033	6: 52013721-52013839 [+]
hsa-miR-485-3p	-1.80	0.0075	14: 101521756-101521828 [+]
hsa-miR-517c	-1.70	0.0377	19: 54244567-54244661 [+]
hsa-miR-159b	-1.64	0.0165	9: 131007000-131007109 [-]
hsa-miR-199a	-1.63	0.0304	19: 10928102-10928172 [-]
hsa-miR-133a	-1.53	0.0475	1: 172113675-172113784 [-]
hsa-miR-99a	-1.48	0.0407	18: 19405659-19405746 [-]
hsa-miR-197	-1.44	0.0155	20: 61162219-61162220 [+]
hsa-miR-218	-1.41	0.0481	21: 17911409-17911489 [+]
hsa-miR-100	-1.40	0.0248	1: 110141515-110141589 [+]
hsa-miR-25	1.28	0.0483	4: 20529898-20530007 [+]
hsa-miR-15b	1.34	0.0407	5: 168195151-168195260 [-]
hsa-miR-195	1.34	0.0325	11: 122022937-122023016 [-]
hsa-miR-221	1.40	0.0066	7: 99691183-99691266 [-]
hsa-miR-103	1.46	0.0389	3: 160122376-160122473 [+]
hsa-miR-107	1.48	0.0176	17: 6920994-6921020 [-]
hsa-miR-181a	1.49	0.0407	X: 45605585-45605694 [-]
hsa-miR-342	1.67	0.0025	20: 3898141-3898218 [+]
hsa-miR-20a	1.69	0.0165	5: 167987901-167987978 [-]
hsa-miR-222	1.70	0.0025	10: 91352504-91352584 [-]
hsa-let-7i	1.78	0.0022	9: 127454721-127454830 [+]
hsa-miR-30c	1.91	0.0075	1: 198828173-198828282 [-]
hsa-miR-191	1.92	0.0040	14: 100575992-100576090 [+]
hsa-miR-24	1.99	0.0038	13: 92003319-92003389 [+]
hsa-miR-17-5p	2.06	0.0021	X: 45606421-45606530 [-]
hsa-miR-342-3p	2.08	0.0004	12: 62997466-62997549 [+]
hsa-miR-146b	2.13	0.0007	6: 72086663-72086734 [-]
hsa-miR-29a	2.26	0.0407	1: 41222956-41223044 [+]
hsa-miR-92b	2.26	0.0007	3: 49058051-49058142 [-]
hsa-miR-320a	2.41	0.0295	9: 97848303-97848370 [+]
hsa-miR-16	2.46	0.0021	19: 13947101-13947173 [-]
hsa-miR-30b	2.51	0.0155	13: 92002859-92002942 [+]
hsa-miR-146a	2.70	0.0005	14: 100575992-100576090 [+]
hsa-miR-92	2.80	<0.0001	10: 104196269-104196341 [+]
hsa-miR-142-3p	3.05	0.0077	7: 130561506-130561569 [-]
hsa-miR-92a	3.20	<0.0001	1: 155164968-155165063 [+]
hsa-miR-21	3.86	0.0123	8: 22102475-22102556 [-]
hsa-miR-155	4.41	<0.0001	13: 50623109-50623197 [-]
hsa-miR-425-5p	5.54	0.0165	3: 160122533-160122613 [+]
hsa-miR-93	5.83	0.0093	8: 135812763-135812850 [-]

miRNA più significativi:
miR-155
miR-92a
miR-93

Ref: van Kester *et al.* – Molecular Oncology 5 (2011) 273-280

SINDROME DI SEZARY.

Attraverso lo studio CGH sono state messe in evidenza le seguenti anomalie:

- **7q22.1:** per quanto riguarda questa alterazione si può notare come questa amplificazione sia rilevabile praticamente solo nei campioni CD4.
Inoltre si può notare come vi sia una tendenza, pur senza raggiungere una significatività statistica, ad essere presente maggiormente nei pazienti che presentano valori di WBC e di linfociti normali alla diagnosi. Inoltre la sua frequenza sembra aumentare con l'aumento del tempo del prelievo rispetto alla diagnosi (esordio 23%, 6mesi-3anni 40%, oltre 3 anni 57%).
- **8q24 (MYC):** l'amplificazione di questa regione è risultata più presente nei pazienti in follow-up in cui sono stati utilizzati prelievi a oltre 3 anni dalla diagnosi (esordio 23%, 6mesi-3anni 20%, oltre 3 anni 85%). Inoltre, sembra esserci una tendenza ad essere più frequente nei pazienti con valori di LDH e di linfociti normali e in quelli che avevano effettuato la fotoferesi prima del prelievo.
- **10p e 10q:** queste delezioni sembrano essere più presenti nei pazienti che presentano leucocitosi e linfocitosi alla diagnosi.
- **17p:** la Del17p (sede di TP53) si è visto essere associata a livelli di leucocitosi alla diagnosi e all'essere stati sottoposti a fotoferesi. Si osserva inoltre una tendenza ad essere più frequente nei pazienti con linfocitosi.
- **17q (STAT3 e STAT5):** a carico di questa regione amplificata non sono osservate differenze interessanti tra i raggruppamenti dei vari parametri, a parte la tendenza ad essere rilevata con maggiore frequenza nei campioni CD4.
- **19p13.3:** la delezione di questa regione è associata alla presenza di linfocitosi alla diagnosi. Si nota inoltre una tendenza ad essere più frequente nei pazienti che presentano leucocitosi, in quelli che hanno eseguito fotoferesi prima del prelievo e in quelli in follow-up in cui sono stati utilizzati prelievi a oltre 3 anni dalla diagnosi.

Per quanto riguarda lo studio miRNA, sono stati selezionati 24 miRNA espressi in modo differenziale all'interno del nostro gruppo composto da 14 pazienti (di cui 1 post-trapianto) e da 6

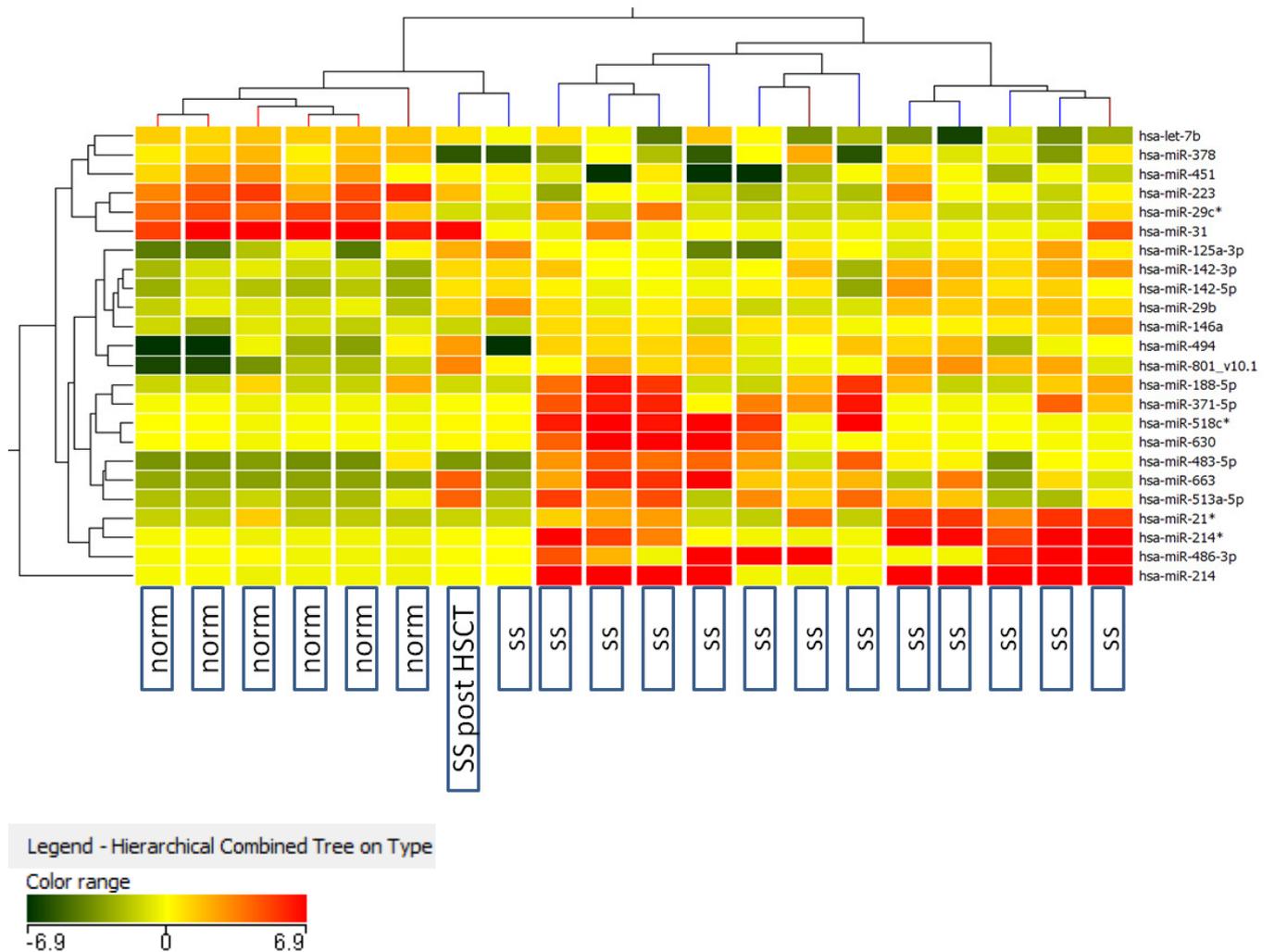
controlli sani.

Questi microRNA sono riportati nella tabella sottostante:

systematic_name	regulation	chr
hsa-let-7b	down	chr22
hsa-miR-125a-3p	up	chr19
hsa-miR-142-3p	up	chr17
hsa-miR-142-5p	up	chr17
hsa-miR-146a	up	chr5
hsa-miR-188-5p	up	chrX
hsa-miR-21*	up	chr17
hsa-miR-214	up	chr1
hsa-miR-214*	up	chr1
hsa-miR-223	down	chrX
hsa-miR-29b	up	chr1
hsa-miR-29c*	down	chr1
hsa-miR-31	down	chr9
hsa-miR-371-5p	up	chr19
hsa-miR-378	down	chr5
hsa-miR-451	down	chr17
hsa-miR-483-5p	up	chr11
hsa-miR-486-3p	up	chr8
hsa-miR-494	up	chr14
hsa-miR-513a-5p	up	chrX
hsa-miR-518c*	up	chr19
hsa-miR-630	up	chr15
hsa-miR-663	up	chr20
hsa-miR-801_v10.1	up	chr1

miRNA risultati deregolati nei pazienti affetti da SS,
con indicati la loro up o down-regolazione, e il
cromosoma su cui sono codificati.

Dai i dati ricavati dallo studio del profilo d'espressione dei microRNA, è stato eseguito un clustering gerarchico ottenuto mediante un'analisi non supervisionata. Come riportato nella figura sotto:



Clustering gerarchico ottenuto mediante un'analisi non supervisionata. In rosso sono indicati i miRNA overespressi, in verde quelli downregolati. I controlli sani sono indicati come "norm", i pazienti come "SS" e il caso post-trapianto come "SS, post HSCT".

DISCUSSIONE.

Uno degli obiettivi dello studio è quello di valutare la presenza di geni implicati nella genesi tumorale nelle regioni cromosomiche interessate da amplificazione e delezione, rilevate all'arrayCGH nei nostri casi di MF e SS.

Di seguito verrà riportato un elenco di geni, presenti in queste regioni, che potrebbero svolgere un ruolo importante nel processo di tumorigenesi andando ad agire su svariate funzioni cellulari, come la proliferazione, la riparazione del DNA, l'apoptosi e la differenziazione.

Studio array-CGH in MF e SS.

Amplificazione della regione 7q22.1

Tra i geni che potrebbero risultare interessanti in questa regione sono da citare: TRRAP, SMURF1 e COPS6.

TRRAP è una proteina adattatrice coinvolta nella regolazione della trascrizione e gioca un ruolo centrale nell'attivazione trascrizionale di MYC. È stato descritto un suo ruolo come possibile oncogene in diversi tipi di tumore come l'epatocarcinoma, il melanoma e il glioblastoma multiforme³¹

SMURF1 questa proteina è coinvolta nel processo di ubiquitinazione, ed è stato descritto un suo ruolo nella degradazione degli oncosoppressori P53 e ING2. È stata associata a una maggiore invasività per quanto riguarda il cancro del pancreas.^{32,33}

COPS6 questa proteina sembra prevenire l'ubiquitinazione di Mdm2, un importante regolatore negativo di P53. Il gene e la proteina sono risultati aumentati nei carcinomi mammari e della tiroide rispettivamente.³⁴

Questa amplificazione tende ad essere presente maggiormente nei pazienti affetti da SS che presentano valori di WBC e di linfociti bassi alla diagnosi e non compare in nessuno dei pazienti in stadio avanzato, inoltre la sua frequenza sembra aumentare con l'aumento del tempo di follow-up rispetto alla diagnosi. Si potrebbe ipotizzare, con le dovute cautele, che questa alterazione possa essere associata ad una malattia con presentazione meno aggressiva. A tal proposito si deve ricordare che questa alterazione sia stata descritta come più comune nella MF in stadio tumorale rispetto alla SS.

Amplificazione della regione 8q

In questa regione sono codificati i geni cMYC e IL7.

cMYC questo gene codifica per un fattore di trascrizione, il quale può svolgere un ruolo importante nella tumorigenesi promuovendo la progressione del ciclo cellulare, inibendo la differenziazione e aumentando l'instabilità genomica. Una sua amplificazione è stata descritta in diversi tipi di tumore tra cui il cancro al seno, della cervice uterina, del colon, dell'ovaio, i carcinomi a cellule squamose della testa e del collo, il mieloma multiplo, i linfomi non-Hodgkin's e l'adenocarcinoma gastrico.^{35,36}

IL7 la proteina codificata per questo gene è una citochina che svolge un ruolo importante nello sviluppo delle cellule B e T. Studi eseguiti sui topi suggeriscono che questa citochina giochi un ruolo essenziale nella sopravvivenza delle cellule linfatiche. Essa è stata descritta promuovere malignità ematologiche (leucemia linfoblastica acuta e linfomi a cellule T).^{37,38}

Per quanto riguarda nello specifico l'amp8q24(sede di MYC), tale alterazione è risultata più presente nei pazienti in follow-up in cui sono stati utilizzati prelievi a oltre 3 anni dalla diagnosi nella SS ed in stadio avanzato nella MF. Questo potrebbe stare ad indicare il fatto che si tratti di una mutazione che insorge tardivamente durante il decorso della malattia.

Delezioni delle regioni 10p e10q

Tra i geni che potrebbero risultare interessanti in questa regione per il loro ruolo di oncosoppressori sono da ricordare: ZEB1, PTEN, FAS, MXI1, DUSP5, CASP7 e BUB3.

ZEB1 la proteina codificata da questo gene agisce come inibitore trascrizionale di IL-2, quest'ultima una citochina favorente il differenziamento e l'espansione dei linfociti T.³⁹

PTEN questo gene è stato descritto funzionare come oncosoppressore mediante l'inibizione del pathway di AKT. L'inattivazione o una ridotta espressione di PTEN è stata descritta in svariati tipi di cancro come il glioblastoma, il cancro dell'endometrio, quello prostatico, del seno e del polmone.⁴⁰⁻⁴²

FAS La proteina codificata da questo gene è un membro della superfamiglia dei recettori del TNF. Questo recettore contiene un death domain, ed è stato visto giocare un ruolo favorente l'apoptosi, una sua ridotta espressione è implicata nella patogenesi di diverse patologie maligne e malattie del sistema immunitario, tra cui i CTCL.⁴³

MXI1 l'espressione del gene cMYC è frequentemente soggetta a disregolazione nei tumori umani. Questa proteina agisce come repressore trascrizionale di MYC ed è quindi un potenziale oncosoppressore. Essa va a competere con MYC per MAX, una proteina necessaria per la funzione di quest'ultimo.⁴⁴

DUSP5 questa proteina agisce come inibitore delle MAPK, che sono associate alla proliferazione

cellulare, e della produzione di IL-2.⁴⁵⁻⁴⁷

CASP7 questa proteina fa parte della famiglia delle caspasi, le quali giocano un ruolo centrale nell'apoptosi.⁴⁸

BUB3 proteina coinvolta nel checkpoint del fuso mitotico, che contribuisce al “segnale di attesa” e blocca il complesso che promuove l'anafase.

Delezione della regione 17p

I geni presenti su questa regione, la cui ridotta espressione potrebbe contribuire al processo di tumorigenesi, sono: TP53, MNT, RPA1 e HIC1.

TP53 è un gene oncosoppressore. Esso è stato chiamato “il guardiano del genoma”, in presenza di danni al DNA vi è un accumulo di P53 la qual cosa attiva due tipi di eventi: l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi. Il primo effetto lo ottiene mediante l'attivazione di p21, inibitore l'attività dei complessi cdk-ciclina, e di 14-3-3. Il secondo mediante BAX, PUMA e NOXA. Protegge le cellule dagli effetti dei danni al DNA, induce l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi. Alterazioni di questo gene sono state descritte in svariati tumori solidi ed ematologici.⁴⁸

MNT come MXI1, questa proteina agisce come repressore trascrizionale di MYC e può quindi essere considerato un oncosoppressore.^{49,50}

RPA1 è implicata nei processi di riparazione del DNA e una sua perdita può comportare un aumento dell'instabilità cromosomica.⁵¹

HIC1 questo gene agisce come regolatore della crescita cellulare e come oncosoppressore. L'ipermetilazione o la delezione di questo gene sono state associate con i tumori. La perdita di HIC1 si traduce in una iperespressione di SIRT1 che va ad inattivare P53 tramite deacetilazione.⁵²⁻⁵⁵

Per quanto riguarda la Del17p13.1 (sede di TP53) si è visto essere associata a livelli di leucociti alti alla diagnosi e all'essere stati sottoposti a fotoforesi prima del prelievo.

Il dato dei leucociti potrebbe suggerire che tale mutazione compaia prevalentemente nei pazienti che si presentano con una malattia più aggressiva alla diagnosi.

La maggior frequenza nei pazienti in cui è stata eseguita la fotoforesi potrebbe essere spiegata dal fatto che i pazienti sottoposti ad essa molte volte non facciano ricorso ad altri trattamenti più invasivi, potenzialmente in grado di alterare il quadro delle anomalie cromosomiche, rendendo quindi la loro situazione più simile a quella che si osserverebbe nel caso si seguisse la storia naturale della malattia. Una tendenza in questo senso la si è osservata anche per la maggior parte delle altre alterazioni cromosomiche ricorrenti prese in esame.

Amplificazione della regione 17q

In questa regione sono codificati i geni: STAT3, STAT5A, STAT5B, ERBB2, GRB2, CCR10, BIRC5 e CDK3.

STAT3, STAT5A e STAT5B queste proteine appartengono alla famiglia delle STAT. Esse in risposta alle citochine e a fattori di crescita vanno ad agire come fattori di trascrizione. Fanno parte della pathway di JAK/STAT e una loro attivazione si traduce in un'augmentata proliferazione e resistenza all'apoptosi. Il loro ruolo è risultato importante nello sviluppo sia di tumori solidi che di neoplasie ematologiche, tra cui la sindrome di Sézary.⁵⁵⁻⁵⁸

ERBB2 detto anche Her-2/neu, è un oncogene che codifica per un recettore dell'EGF con attività tirosin chinasi localizzato sulla membrana cellulare. È coinvolto nei pathway delle MAPK, del PI3K/AKT e delle STAT, e comporta un aumento della proliferazione cellulare e una ridotta apoptosi. L'amplificazione o l'overespressione di questo gene sono coinvolte in svariati tipi di cancro tra cui quello del seno e quello ovarico.⁵⁹

GRB2 il reclutamento di questa proteina è coinvolto nella cascata del segnale coinvolgente RAS, Raf-1, MEK1/MEK2, ERK1/ERK2, che porta all'attivazione di fattori di trascrizione quali Elk-1, STAT1, STAT3 e MYC. In più gioca un ruolo nell'attivazione del pathway di PI3K/AKT. Questi pathway promuovono la proliferazione, la crescita, la differenziazione e la sopravvivenza cellulare. In qualità di attivatore del ciclo cellulare GRB2 è coinvolto nell'oncogenesi di svariati tipi di tumori solidi e delle cellule emopoietiche.⁶⁰⁻⁶²

CCR10 è un recettore delle chemochine e lega CCL27. Come già accennato, queste molecole svolgono un ruolo importante nell'homing cutaneo delle cellule T.⁶³

BIRC5 questo gene appartiene alla famiglia degli inhibitor of apoptosis (IAP), che codificano per proteine aventi ruolo di prevenire la morte cellulare programmata. La loro overespressione è stata riscontrata in molti tumori ed è stata considerata come possibile target terapeutico nelle patologie neoplastiche.⁶⁴⁻⁶⁶

CDK3 questo gene codifica per una protein-chinasi ciclina dipendente che svolge un ruolo importante nella regolazione del ciclo cellulare. Essa promuove la transizione dalla fase G₀ alla fase G₁, interagendo con RB1, e dalla fase G₁ alla fase S andando ad attivare la famiglia delle E2F.

Delezione della regione 19p13.3

Tra i geni che potrebbero risultare interessanti in questa regione sono da citare GADD45B e PIAS4.

GADD45B i danni al DNA inducono la trascrizione di questo gene tramite meccanismo p53 dipendente ed indipendente. Favorisce la riparazione del DNA e impedisce l'entrata in fase S.

PIAS4 proteina facente parte della famiglia delle PIAS (protein inhibitor of activated STAT)

inibitori del pathway di JAK/STAT.⁶⁷

La delezione di questa regione è risultata associata alla presenza di linfocitosi alla diagnosi, ciò potrebbe forse indicare che questa mutazione sia più presente nei pazienti con malattia più aggressiva all'esordio.

Da questi dati di arrayCGH si può notare come vi siano diversi geni che possono essere candidati a svolgere un possibile ruolo nell'oncogenesi (P53, PTEN, MYC etc.) e che potenzialmente diversi pathway patogenetici possono andare ad agire in modo sinergico per favorire tale processo.

Di particolare interesse sembra essere il possibile coinvolgimento del pathway di JAK/STAT. Questo pathway determina la trascrizione di geni che regolano la proliferazione, la sopravvivenza e la differenziazione di diversi tipi di cellule. Alterazioni che attivano costituzionalmente questa via sono state descritte in varie forme di tumori solidi, linfomi e leucemie, tanto da essere considerato un possibile target di terapia.

Studio sui microRNA nella MF.

I dati ottenuti dallo studio dei microRNA nella micosi fungoide confermano i dati evinti dalla letteratura. Sono circa 50 i miRNA di interesse in questo linfoma, per la maggior parte up-regolati e rilevati quasi esclusivamente nella forma nodulo-tumorale della patologia. Per questo motivo i dati ottenuti sono provvisori, in quanto risentono dell'esiguità del campione, rispetto a quelli ottenuti nella SS.

Come già accennato, la maggior parte dei miRNA presi in esame sono up-regolati, a differenza di quanto succede in molti tumori solidi, in cui si rileva una down-regolazione rispetto alla controparte benigna¹⁰⁴.

miR-93 (Up): descritto come un promotore di crescita tumorale, fa parte di un cluster più esteso (miR-106b-25) e codifica per l'ntegrina-beta8, FUS1 e E2F1. La sua over-espressione è descritta nei linfomi nodali, gastrici e nell'epatocarcinoma. Inoltre la sua espressione è legata all'aumento della proteina MCM7, rilevata over-espressa nella micosi fungoide.¹⁰⁴

miR-155 (Up): codifica per proteine che agiscono nella risposta immune, in particolare nella risposta T. La sua up-regolazione è descritta in alcuni tipi di leucemie e linfomi.

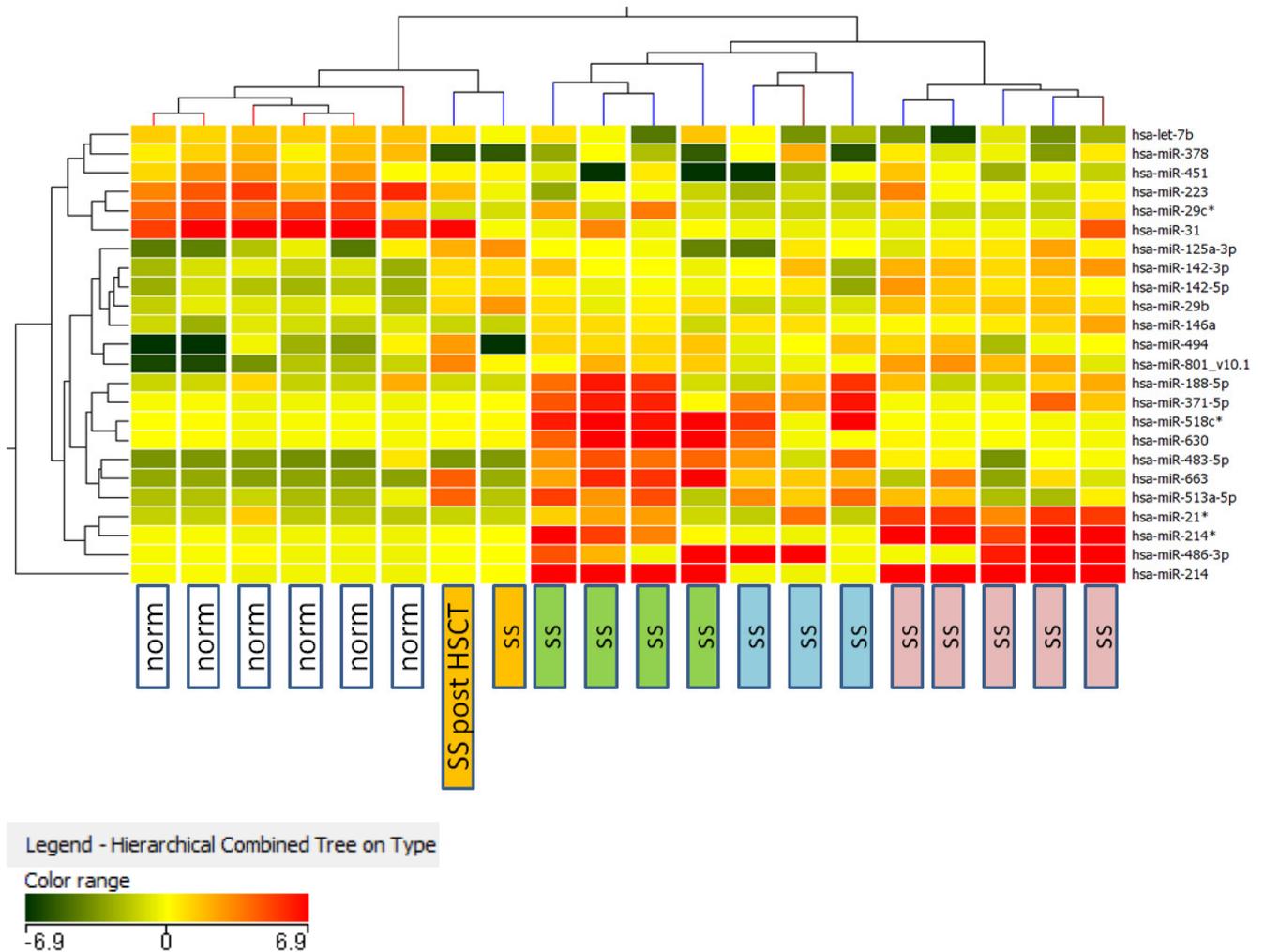
miR17-92 cluster (Up): comprende una serie di regioni tutte up-regolate nella MF-T. La loro funzione, codificando tra gli altri per PTEN, regola la selezione e la sopravvivenza cellulare T; sono coinvolte nel processo di cancerogenesi di molti tumori.¹⁰⁴

miR15-16 cluster (Down): gioca un ruolo nella regolazione del metabolismo cellulare e nel ciclo cellulare. La sua down-regolazione è descritta anche in numerosi tumori. Questa alterazione è comune alla SS e sembra essere un fattore prognostico negativo.¹⁰⁵

Let-7 (Down): let-7 è stato trovato down-regolato non solo nei casi di MF, ma anche nei casi di SS. Presente in altri tumori solidi, la sua diminuita espressione sembra giocare un ruolo importante nella progressione del tumore e nella scarsa differenziazione cellulare. I pazienti affetti a MF con questa importante alterazione hanno una prognosi infausta.¹⁰⁵

Studio sui MicroRNA nella SS.

Dal clustering gerarchico ottenuto mediante analisi non supervisionata, eseguito nel contesto dello studio del profilo d'espressione dei microRNA, sono stati individuati 4 gruppi di pazienti caratterizzati da un diverso profilo d'espressione, come riportato nella figura sottostante:



Clustering gerarchico ottenuto mediante un'analisi non supervisionata. In rosso sono indicati i miRNA overespressi, in verde quelli downregolati. I controlli sani sono indicati come "norm", i pazienti come "SS" e il caso post-trapianto come "SS, post HSCT". I 4 gruppi di pazienti individuati sono stati evidenziati con diversi colori (gruppo 1: arancio, gruppo 2: verde, gruppo 3: azzurro, gruppo 4: rosa).

Il gruppo 1, che mostra un profilo di espressione simile ai sani, è rappresentato da un paziente in cui è stato eseguito trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche dopo condizionamento ad intensità ridotta (RIC allo-HSCT), attualmente in remissione clinica e molecolare completa, in cui

quindi predominano le cellule del donatore e da un paziente che prima del prelievo aveva eseguito 3 cicli di CHOP. Per quanto riguarda gli altri gruppi non sembrano al momento esserci correlazioni cliniche interessanti, tuttavia per i dati definitivi si attende un ampliamento della casistica eventualmente associato a uno studio sui singoli miRNA.

La maggior parte dei miRNA individuati sono già stati descritti in letteratura come espressi in modo aberrante nella sindrome di Sézary.

Di seguito verranno elencati tali miRNA, con di fianco scritto se sono risultati up o downregolati nei casi di SS da noi studiati:

MiR-let-7b (Down): questo miRNA ha dimostrato di essere downregolato in altre neoplasie come nel cancro del seno. Tra i target identificati della famiglia let-7 vi sono gli oncogeni RAS e HMGA2.⁶⁸⁻⁷¹

MiR-21 (Up): questo microRNA è descritto in letteratura come oncogene. Una sua overespressione è stata riportata in svariati tipi di cancro (es. nel glioblastoma, nel cancro del seno, della tiroide etc). Pare agisca andando ad inibire l'espressione di geni favorenti l'apoptosi. Uno dei target indicati di questo gene è l'oncosoppressore PTEN.⁷²⁻⁷⁴

MiR29B (Up): nonostante nei nostri casi sia risultato upregolato, in letteratura è descritto come oncosoppressore.

MiR29C (Down): Nei nostri pazienti è risultato downregolato. È stato descritto un suo ruolo come inibitore del ciclo cellulare mediante azione modulante l'espressione della ciclina E, e favorente l'apoptosi. Una sua downregolazione è stata osservata nella CLL, nel melanoma, nel cancro dell'esofago e nell'epatocarcinoma.⁷⁵⁻⁷⁹

MiR31 (Down): la sua downregolazione è stata descritta anche per altri tipi di cancro come quelli uroteliali, gastrico, ovarico, nel mesotelioma e nella ATL.⁸⁰⁻⁸⁵

MiR125A (Up): nonostante nei nostri casi si presenti upregolato, in letteratura è descritto come probabile oncosoppressore nel cancro del seno, della prostata e nel neuroblastoma.^{86,87}

Mir142 (Up): un articolo lo descrive come overespresso nella T-ALL, mentre un altro come downregolato nella LMA.^{88,89}

MiR146 (Up): è stata descritta la sua funzione come antiapoptotico mediante la sua azione sul Fas-associated death domain (FADD). In un altro è stato presentato invece come possibile oncosoppressore.⁹⁰⁻⁹²

MiR214 (Up): è presentato in letteratura come un oncogene promuovente la sopravvivenza cellulare nel melanoma e nella sindrome di Sézary.⁹³

MiR223 (Down): nell'ambito dei tumori è descritto sia come overespresso (T-LLA), sia come

downregolato (epatocarcinoma).^{94,95}

MiR378A (Down): nonostante nella nostra casistica si presenti come downregolato, due articoli riportano il suo possibile ruolo di oncogene.^{96,97}

MiR451 (Down): è stato descritto un suo ruolo come oncosoppressore nei gliomi, negli adenocarcinomi gastrici e del colon, nel cancro del polmone e nella T-ALL.⁹⁸⁻¹⁰¹

MiR486 (Up): è stato riportato indicato un suo possibile ruolo nella resistenza all'apoptosi.

Mir494 (Up): in letteratura viene descritto come possibile oncosoppressore.^{102,103}

Oltre ai miRNA appena citati, nei gruppi 2 e 3 evidenziati dal dendrogramma è stato identificato un gruppo di miRNA che non sono ancora stati descritti in letteratura come associati alla SS. Essi sono rappresentati da: miR-801, miR-188-5p, miR-371-5p, miR-518c, miR-630, miR-483-5p, miR-663 e miR-513a-5p.

Per questi nuovi miRNA pochi studi sono stati eseguiti fino ad ora.

Per quanto riguarda miR-483-5p, nei nostri casi upregolato, è stato visto avere come target il trascritto di SOCS3 (suppressor of cytokine signalling 3) proteina coinvolta nell'inibizione della via di JAK/STAT.

Invece, per miR-663, risultato overespresso nelle SS, è stato descritto un probabile ruolo nel favorire la proliferazione cellulare nel cancro del polmone tramite la regolazione diretta e indiretta di TGFB1, P53, Bax e Fas.

Riguardo a questi nuovi miRNA si può dire che essi rappresentino un interessante campo di studio per eventuali future ricerche. Si potrebbe indagare il loro possibile ruolo nella tumorigenesi, il significato diagnostico e prognostico. Allo stato attuale, tuttavia, visti la scarsità di dati presenti in letteratura, mancano gli elementi per poter giungere a conclusioni definitive.

Per i pazienti sottoposti sia allo studio con arrayCGH che a quello dei miRNA sono stati messi in correlazione i risultati ottenuti con queste due metodiche, per vedere se vi fosse corrispondenza nel tipo di alterazione rilevata (es. vedere se su una regione soggetta ad amplificazione vi fosse un'augmentata espressione del microRNA di interesse e viceversa per le delezioni).

Si è visto che tale correlazione esisteva per miR142 (17q22) e per miR21 (17q23.1), upregolati e codificati in una regione soggetta ad amplificazione. Un discorso simile invece non si è dimostrato valido per miR451 (17q11.2), il quale nonostante risieda in una regione di amplificazione si presenta nei nostri casi downregolato.

CONCLUSIONI.

Dal nostro studio di arrayCGH è emerso come i dati della letteratura che vedono coinvolti in maggior misura nella micosi fungoide e nella sindrome di Sézary i cromosomi 8, 10 e 17, risultino confermati. Nella nostra casistica vengono infatti rilevate amplificazioni delle regioni 8q/q24 e 17q, e delezioni delle regioni 10p11.22-11.21, 10q e 17p.

Inoltre è stata riscontrata la presenza di un'amplificazione a carico della regione 7q22.1 e una delezione della regione cromosomica 19p13.3. La prima di queste due ultime alterazioni è stata descritta come frequente nei casi di micosi fungoide in stadio tumorale.

Nelle regioni soggette ad amplificazione e delezione da noi rilevate sono codificati diversi geni che potenzialmente possono svolgere un ruolo attivo nella tumorigenesi. A tal proposito si ricordano quelli coinvolti nella via di JAK/STAT, di MYC, la delezione di P53 e di PTEN.

Lo studio miRNA nella MF ci ha permesso di confermare i dati della letteratura, cioè che nella MF in stadio tumorale sono presenti prevalentemente up-regolazioni di regioni cromosomiche che possono essere rilevanti nella progressione di malattia e nell'evoluzione verso un linfoma T pleomorfo o verso una SS (miR93, 155, 15-16, 17-92, let-7).

A conferma di ciò abbiamo rilevato pochissime alterazioni, non significative, nella MF in stadio iniziale.

Per quanto riguarda lo studio del profilo di espressione dei microRNA nella SS possiamo dire che dai nostri dati è stato individuato un gruppo di 24 miRNA espressi in modo differenziale nei pazienti affetti da sindrome di Sézary. Alcuni di essi sono già stati descritti in passato come espressi in modo aberrante nella sindrome di Sézary e diversi studi sono già stati eseguiti che provano il loro ruolo attivo nell'oncogenesi di vari tipi di tumore (ad esempio miR21, mir29c e miR214), e che quindi potrebbero essere implicati nella patogenesi della malattia da noi presa in esame.

Inoltre, è stato messo in evidenza un gruppo di 8 microRNA (miR-801, miR-188-5p, miR-371-5p, miR-518c, miR-630, miR-483-5p, miR-663 e miR-513a-5p) precedentemente non descritti come associati alla SS, sul cui conto sono stati pubblicati pochi lavori.

Da questo studio possiamo avere la conferma, infine, che la MF e la SS possono essere considerate due forme dello stesso spettro di malattia.

Sia per quanto riguarda i risultati ottenuti con l'arrayCGH che quelli dello studio del profilo di espressione dei microRNA, si può dire che essi possano rappresentare un punto di partenza per individuare eventuali geni coinvolti nel processo di oncogenesi della MF e della SS.

Il completamento di questo percorso potrebbe portare in futuro all'individuazione di nuovi target biologici per lo sviluppo di agenti terapeutici "mirati".

Per quanto riguarda la correlazione tra i dati clinici e quelli di arrayCGH, a parte qualche tendenza e pochi dati statisticamente significativi, non si può giungere al momento a conclusioni definitive. Questo può essere imputato in parte alla rarità della malattia e la conseguente scarsità della casistica.

Sarebbe interessante in studi futuri eseguire sistematicamente più prelievi nello stesso paziente durante il decorso clinico delle malattie, da esaminare sia con l'arrayCGH e con l'indagine del profilo d'espressione miRNA. Questo potrebbe consentire di distinguere sempre meglio le alterazioni precoci, che compaiono nelle prime fasi della malattia, da quelle tardive, rilevabili solo in stadi successivi e con la progressione neoplastica. Inoltre, questo procedimento potrebbe favorire lo sviluppo di nuovi ausili diagnostici in grado di rendere più facile la diagnosi precoce.

BIBLIOGRAFIA

1. Willemze R, Jaffe ES, Burg G et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas, *Blood* 2005;105:3768-3785.
2. Willemze R, Kerl H, Sterry W et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood* 1997;90:354-371.
3. 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.
4. Aster J, Kumar V. Malattie dei globuli bianchi, linfonodi, milza e timo, in *Le basi patologiche delle malattie di Robbins*, 6° ed., Cotran SR, Kumar V, Collins T (eds), Piccin, 2000.
5. Yoshida M, Seiki M, Yamaguchi K, Takatsuki K. Monoclonal integration of HTLV in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggest causative role of HTLV in the disease. *Proc Natl Sci USA* 1984;81:2354-2357.
6. Pancake BA, Zucker-Franklin D. HTLV Tax and mycosis fungoides. *N Engl J Med* 1993;329:2035.
7. Hall WW, Liu CR, Schneewind Q, et al. Detected HTLV-1 provirus in blood and cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Science* 1991;253:317-321.
8. Au WY, Pang A. Qualification of circulating Epstein-Barr virus DNA in diagnosis and monitoring of natural killer cell and EBC-positive lymphomas in immunocompetent patients. *Blood* 2004;104(1).
9. Su IJ, Lin KH, Chen CJ. Epstein-Barr virus associated peripheral T-cell lymphomas of activated CD8 phenotype. *Cancer* 1990;66:2557-2561.
10. Sarris A.H, Esclayes-Ribot T, Crow M. Cytokine loops involving interferon and IP-10, a cytokine chemotactic for CD4+ lymphocytes: an explanation for the epidermotropism of cutaneous T cell Lymphoma? *Blood* 1995;86:651-658.
11. Whittaker S. Molecular genetics of cutaneous lymphomas. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 941:39-45.
12. McGregor JM, Crook T, Fraser-Andrews EA, et al. Spectrum of p53 gene mutations suggest a possible role for ultraviolet radiation in the pathogenesis of advanced cutaneous

- lymphomas. *J Invest Dermatol* 1999;112: 317-321.
13. Zoi-Toli O, et al. Expression of Fas and Fas-ligand in primary cutaneous T-cell lymphoma: association between lack of Fas expression and aggressive types of CTCL. *Br J Dermatol* 2000;143:313-319.
 14. Mao X, et al. Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2003;101:1513-1519.
 15. Prochazkova M, Chevret E, Mainhaguet G. Common chromosomal abnormalities in mycosis fungoides transformation. *Genes, chromosomes & cancer* 2007;46:828-838.
 16. Fink-Puches R, Zenahlik P, Bäck B. Primary cutaneous lymphomas: applicability of current classification schemes (European Organization for Research and Treatment of Cancer, World Health Organization) based on clinicopathologic features observed in a large group of patients. *Blood* 2002;99:800-805.
 17. Kempf W, Sander CA. Classification of cutaneous lymphomas – an update. *Histopathology* 2010;56:57-70.
 18. Dearden CE, Johnson R, Pettengell R, Devereux S, Cwynarski K, Whittaker S, McMillan A. Guidelines for the management of mature T-cell and Nk-cell neoplasms (excluding cutaneous T-cell lymphoma). *Br J Hematol* 2011;153:451-485.
 19. 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.
 20. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood* 2007;110:1713-1722.
 21. Kim Y.H, Willemze R, Pimpinelli N. TNM classification system for primary cutaneous lymphomas other than mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organization of research and Treatment of Cancer (EORTC) *Blood* 2007;110:479-484.
 22. Berti E.F., Tomasini D. Linfomi primitivi cutanei, in *Manuale di dermatologia medica e chirurgica*, 4° edizione, Cainelli T., Riannetti A., Rebora A. (eds), McGraw-Hill, 2008
 23. Castoldi G.L., Cavazzini L. Disordini linfoproliferativi, in *Malattie del sangue e degli organi*

- ematopoietici, 5^oedizione, Castoldi G., Liso V. (eds), McGraw.Hill, 2007
24. Willemze, R., et al., WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*, 2005. 105(10): p. 3768-85.
 25. Wieselthier, J.S. and H.K. Koh, Sezary syndrome: diagnosis, prognosis, and critical review of treatment options. *J Am Acad Dermatol*, 1990. 22(3): p. 381-401.
 26. Criscione, V.D. and M.A. Weinstock, Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002. *Arch Dermatol*, 2007. 143(7): p. 854-9.
 27. Hwang, S.T., et al., Mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Lancet*, 2008. 371(9616): p. 945-57.
 28. Shapiro, P.E. and F.J. Pinto, The histologic spectrum of mycosis fungoides/Sezary syndrome (cutaneous T-cell lymphoma). A review of 222 biopsies, including newly described patterns and the earliest pathologic changes. *Am J Surg Pathol*, 1994. 18(7): p. 645-67.
 29. Vonderheid, E.C., On the diagnosis of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma. *J Cutan Pathol*, 2006. 33 Suppl 1: p. 27-42.
 30. Vidulich, K.A., et al., Overall survival in erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: an analysis of prognostic factors in a cohort of patients with erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma. *Int J Dermatol*, 2009. 48(3): p. 243-52.
 31. Wurdak, H., et al., An RNAi screen identifies TRRAP as a regulator of brain tumor-initiating cell differentiation. *Cell Stem Cell*, 2010. 6(1): p. 37-47.
 32. Kwei, K.A., et al., SMURF1 amplification promotes invasiveness in pancreatic cancer. *PLoS One*, 2011. 6(8): p. e23924.
 33. Nie, J., et al., Smad ubiquitylation regulatory factor 1/2 (Smurf1/2) promotes p53 degradation by stabilizing the E3 ligase MDM2. *J Biol Chem*, 2010. 285(30): p. 22818-30.
 34. Zhao, R., et al., Subunit 6 of the COP9 signalosome promotes tumorigenesis in mice through stabilization of MDM2 and is upregulated in human cancers. *J Clin Invest*, 2011. 121(3): p. 851-65.
 35. Henriksson, M. and B. Luscher, Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*, 1996. 68: p. 109-82.
 36. Soucek, L. and G. Evan, Myc-Is this the oncogene from Hell? *Cancer Cell*, 2002. 1(5): p. 406-8.
 37. Appasamy, P.M., Biological and clinical implications of interleukin-7 and lymphopoiesis. *Cytokines Cell Mol Ther*, 1999. 5(1): p. 25-39.
 38. Or, R., A. Abdul-Hai, and A. Ben-Yehuda, Reviewing the potential utility of interleukin-7

- as a promoter of thymopoiesis and immune recovery. *Cytokines Cell Mol Ther*, 1998. 4(4): p. 287-94.
39. Williams, T.M., et al., Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression. *Science*, 1991. 254(5039): p. 1791-4.
40. Li, J., et al., PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 1997. 275(5308): p. 1943-7.
41. Steck, P.A., et al., Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*, 1997. 15(4): p. 356-62.
42. Maehama, T. and J.E. Dixon, The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*, 1998. 273(22): p. 13375-8.
43. Dereure, O., et al., Decreased expression of Fas (APO-1/CD95) on peripheral blood CD4+ T lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol*, 2000. 143(6): p. 1205-10.
44. Kawamata, N., et al., Mxi1 isoforms are expressed in hematological cell lines and normal bone marrow. *Int J Oncol*, 2005. 26(5): p. 1369-75.
45. Kovanen, P.E., et al., Analysis of gamma c-family cytokine target genes. Identification of dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a regulator of mitogen-activated protein kinase activity in interleukin-2 signaling. *J Biol Chem*, 2003. 278(7): p. 5205-13.
46. Kovanen, P.E., et al., T-cell development and function are modulated by dual specificity phosphatase DUSP5. *J Biol Chem*, 2008. 283(25): p. 17362-9.
47. Jang, M., et al., Caspase-7 mediated cleavage of proteasome subunits during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 363(2): p. 388-94.
48. Petitjean, A., et al., TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*, 2007. 26(15): p. 2157-65. Wahlstrom, T. and M. Henriksson, Mnt takes control as key regulator of the myc/max/mxd network. *Adv Cancer Res*, 2007. 97: p. 61-80.
49. Popov, N., et al., Mnt transcriptional repressor is functionally regulated during cell cycle progression. *Oncogene*, 2005. 24(56): p. 8326-37.
50. Haring, S.J., et al., Cellular functions of human RPA1. Multiple roles of domains in replication, repair, and checkpoints. *J Biol Chem*, 2008. 283(27): p. 19095-111.
51. Chen, W.Y., et al., Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell*, 2005. 123(3): p. 437-48.

52. Wales, M.M., et al., p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med*, 1995. 1(6): p. 570-7.
53. Issa, J.P., et al., HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms. *Cancer Res*, 1997. 57(9): p. 1678-81.
54. Chen, W., et al., Epigenetic and genetic loss of Hic1 function accentuates the role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell*, 2004. 6(4): p. 387-98.
55. Zhang, Q., et al., Activation of Jak/STAT proteins involved in signal transduction pathway mediated by receptor for interleukin 2 in malignant T lymphocytes derived from cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma and Sezary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(17): p. 9148-53.
56. Mitchell, T.J., S.J. Whittaker, and S. John, Dysregulated expression of COOH-terminally truncated Stat5 and loss of IL2-inducible Stat5-dependent gene expression in Sezary Syndrome. *Cancer Res*, 2003. 63(24): p. 9048-54.
57. Eriksen, K.W., et al., Constitutive STAT3-activation in Sezary syndrome: tyrphostin AG490 inhibits STAT3-activation, interleukin-2 receptor expression and growth of leukemic Sezary cells. *Leukemia*, 2001. 15(5): p. 787-93.
58. Qin, J.Z., et al., Constitutive and interleukin-7- and interleukin-15-stimulated DNA binding of STAT and novel factors in cutaneous T cell lymphoma cells. *J Invest Dermatol*, 2001. 117(3): p. 583-9.
59. Roy, V. and E.A. Perez, Beyond trastuzumab: small molecule tyrosine kinase inhibitors in HER-2-positive breast cancer. *Oncologist*, 2009. 14(11): p. 1061-9.
60. Gishizky, M.L., D. Cortez, and A.M. Pendergast, Mutant forms of growth factor-binding protein-2 reverse BCR-ABL-induced transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(24): p. 10889-93.
61. Dharmawardana, P.G., et al., Molecular targeting of growth factor receptor-bound 2 (Grb2) as an anti-cancer strategy. *Anticancer Drugs*, 2006. 17(1): p. 13-20.
62. Watanabe, T., et al., Significance of the Grb2 and son of sevenless (Sos) proteins in human bladder cancer cell lines. *IUBMB Life*, 2000. 49(4): p. 317-20.
63. Notohamiprodjo, M., et al., CCR10 is expressed in cutaneous T-cell lymphoma. *Int J Cancer*, 2005. 115(4): p. 641-7.
64. Obexer, P., et al., Repression of BIRC5/survivin by FOXO3/FKHRL1 sensitizes human neuroblastoma cells to DNA damage-induced apoptosis. *Mol Biol Cell*, 2009. 20(7): p. 2041-8.

65. Tracey, L., et al., Expression of the NF-kappaB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively. *J Pathol*, 2005. 206(2): p. 123-34.
66. Kucukzeybek, Y., et al., Enhancement of docetaxel-induced cytotoxicity and apoptosis by all-trans retinoic acid (ATRA) through downregulation of survivin (BIRC5), MCL-1 and LTbeta-R in hormone- and drug resistant prostate cancer cell line, DU-145. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008. 27: p. 37.
67. Shuai, K., Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene*, 2000. 19(21): p. 2638-44.
68. Quesne, J.L., et al., Biological and prognostic associations of miR-205 and let-7b in breast cancer revealed by in situ hybridization analysis of micro-RNA expression in arrays of archival tumour tissue. *J Pathol*, 2012. 227(3): p. 306-14.
69. Johnson, S.M., et al., RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 2005. 120(5): p. 635-47.
70. Lee, Y.S. and A. Dutta, The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*, 2007. 21(9): p. 1025-30.
71. Roush, S. and F.J. Slack, The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol*, 2008. 18(10): p. 505-16.
72. Chan, J.A., A.M. Krichevsky, and K.S. Kosik, MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 2005. 65(14): p. 6029-33.
73. He, H., et al., The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(52): p. 19075-80.
74. Iorio, M.V., et al., MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005. 65(16): p. 7065-70.
75. Stamatopoulos, B., et al., microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood*, 2009. 113(21): p. 5237-45.
76. Mraz, M., et al., miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia*, 2009. 23(6): p. 1159-63.
77. Ding, D.P., et al., miR-29c induces cell cycle arrest in esophageal squamous cell carcinoma by modulating cyclin E expression. *Carcinogenesis*, 2011. 32(7): p. 1025-32.
78. Wang, C.M., et al., miR-29c targets TNFAIP3, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res*

- Commun, 2011. 411(3): p. 586-92.
79. Nguyen, T., et al., Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma. *Epigenetics*, 2011. 6(3): p. 388-94.
 80. Veerla, S., et al., MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31. *Int J Cancer*, 2009. 124(9): p. 2236-42.
 81. Valastyan, S., et al., A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell*, 2009. 137(6): p. 1032-46.
 82. Zhang, Y., et al., Down-regulation of miR-31 expression in gastric cancer tissues and its clinical significance. *Med Oncol*, 2010. 27(3): p. 685-9.
 83. Creighton, C.J., et al., Molecular profiling uncovers a p53-associated role for microRNA-31 in inhibiting the proliferation of serous ovarian carcinomas and other cancers. *Cancer Res*, 2010. 70(5): p. 1906-15.
 84. Ivanov, S.V., et al., Pro-tumorigenic effects of miR-31 loss in mesothelioma. *J Biol Chem*, 2010. 285(30): p. 22809-17.
 85. Yamagishi, M., et al., Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF-kappaB pathway in adult T cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell*, 2012. 21(1): p. 121-35.
 86. Laneve, P., et al., The interplay between microRNAs and the neurotrophin receptor tropomyosin-related kinase C controls proliferation of human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(19): p. 7957-62.
 87. Ozen, M., et al., Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene*, 2008. 27(12): p. 1788-93.
 88. Lv, M., et al., An oncogenic role of miR-142-3p in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by targeting glucocorticoid receptor-alpha and cAMP/PKA pathways. *Leukemia*, 2012. 26(4): p. 769-77.
 89. Wang, X.S., et al., MicroRNA-29a and microRNA-142-3p are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia. *Blood*, 2012. 119(21): p. 4992-5004.
 90. Curtale, G., et al., An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood*, 2010. 115(2): p. 265-73.
 91. Tomita, M., Y. Tanaka, and N. Mori, MicroRNA miR-146a is induced by HTLV-1 tax and

- increases the growth of HTLV-1-infected T-cells. *Int J Cancer*, 2012. 130(10): p. 2300-9.
92. Paik, J.H., et al., MicroRNA-146a downregulates NFkappaB activity via targeting TRAF6 and functions as a tumor suppressor having strong prognostic implications in NK/T cell lymphoma. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(14): p. 4761-71.
 93. Penna, E., et al., microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C. *EMBO J*, 2011. 30(10): p. 1990-2007.
 94. Wong, Q.W., et al., MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology*, 2008. 135(1): p. 257-69.
 95. Chiaretti, S., et al., Gene expression profiling identifies a subset of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia with myeloid-like gene features and over-expression of miR-223. *Haematologica*, 2010. 95(7): p. 1114-21.
 96. Lee, D.Y., et al., MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(51): p. 20350-5.
 97. Feng, M., et al., Myc/miR-378/TOB2/cyclin D1 functional module regulates oncogenic transformation. *Oncogene*, 2011. 30(19): p. 2242-51.
 98. Bandres, E., et al., microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(7): p. 2281-90.
 99. Nan, Y., et al., MiRNA-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cells. *Brain Res*, 2010. 1359: p. 14-21.
 100. Wang, R., et al., MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14). *Oncogene*, 2011. 30(23): p.2644-58.
 101. Li, X., et al., Repression of tumor suppressor miR-451 is essential for NOTCH1-induced oncogenesis in T-ALL. *J Exp Med*, 2011. 208(4): p. 663-75.
 102. Kim, W.K., et al., MicroRNA-494 downregulates KIT and inhibits gastrointestinal stromal tumor cell proliferation. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(24): p. 7584-94.
 103. Ohdaira, H., et al., MicroRNA-494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells. *Cell Prolif*, 2012. 45(1): p. 32-8.
 104. Van Kester M, Ballabio E, et al. miRNA expression profiling of mycosis fungoides. *Molecular Oncology*, 2011. 5: p. 273-280.
 105. Maj J, et al., Altered microrNA expression in mycosis fungoides. *BrJ Dermatol*, 2012. 166: p. 331-336

106. Mao X, et al., Molecular cytogenetic analysis of cutaneous T-cell lymphomas: identification of common genetic alteration in Sezary syndrome and mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 2002. 147: p. 464-475.