

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CHIRURGICHE
PROGETTO N°3 SCIENZE DERMATOLOGICHE**

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D4

Settore Scientifico disciplinare: MED/35

**ANALISI MOLECOLARE
DEI LINFOMI CUTANEI AGGRESSIVI**

Presentata da: VALENTINA GIRGENTI

Coordinatore del Dottorato
Chiar.mo Prof. Andrea Stella

Relatore
Chiar.mo Prof. Carlo Gelmetti

Esame finale anno 2012

INDICE

INTRODUZIONE	2
I linfomi primitivi cutanei	3
- Classificazione	4
- Diagnosi	8
- Stadiazione	9
I linfomi cutanei aggressivi	12
- Linfoma extranodale a cellule NK/T, nasal-type	15
- Linfoma primitivo cutaneo a cellule T CD8+ aggressivo epidermotropo	17
- Linfoma primitivo cutaneo pleomorfo a cellule T NOS	19
Analisi genetica e molecolare nei linfomi cutanei	21
- Citogenetica	21
- Espressione genica	23
SCOPO DELLO STUDIO	26
MATERIALI E METODI	28
Casistica	29
Array-CGH	31
Expression gene profiling	37
RISULTATI	41
DISCUSSIONE	49
CONCLUSIONI	59
BIBLIOGRAFIA	62

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 Carabi, 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 convengono su un'eziologia 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 (tabella 1). 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.

Recentemente 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).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 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 “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.

La classificazione della WHO/EORTC e della WHO (4th edition) rappresentano pertanto il parametro utile per il riconoscimento della maggior parte dei linfomi primitivi cutanei. Secondo studi recenti, l’acquisizione di nuovi dati molecolari e citogenetici ha consentito un ulteriore approfondimento sullo studio delle entità più rare, in particolare delle forme NOS, che presentano spesso un decorso particolarmente aggressivo e necessitano di nuove strategie terapeutiche.

Classificazione dei linfomi cutanei WHO/EORTC	Classificazione dei tessuti linfoidei WHO – linfomi cutanei (ICD-O Code)
<p><u>Linfomi cutanei a cellule T e NK</u></p> <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) 	<p><u>Neoplasie a cellule T e NK mature</u></p> <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)
<p><u>Linfomi cutanei a cellule B</u></p> <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 	<p><u>Neoplasie a cellule B mature</u></p> <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
<p><u>Neoplasie dei precursori ematopoietici</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Neoplasia ematodermica CD4+/CD56+ (linfoma blastico a cellule NK) 	<p><u>Neoplasie dei precursori</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Neoplasia a cellule blastiche dendritiche plasmocitoidi

Tabella 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 (radiografia del 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 (tabelle 2-3).^{20,21}

STADIAZIONE TNMB	
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)

Tabella 2. Classificazione TNM dei CTCLs

	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

Tabella 3. EORTC Staging system per i CTCLs

LINFOMI CUTANEI AGGRESSIVI

I linfomi cutanei riconosciuti nella classificazione della WHO/EORTC presentano una variabilità clinica, morfologica, immunofenotipica e genetica che definiscono l'andamento clinico e la prognosi della malattia.

Già in precedenza, nel tentativo di classificare i linfomi cutanei, un parametro era rappresentato dal decorso clinico, individuando forme indolenti e forme aggressive (EORTC, 1997).

La maggior parte dei linfomi cutanei a decorso intermedio-aggressivo appartengono al gruppo dei CTCL che possono presentare un international prognostic index (IPI) > 3 e un performance status (PS) basso.¹⁸

Il fenotipo che contraddistingue i CTCL è rappresentato da linfociti T-helper CD4+, CD3+, CD45RO+, mentre è più raro osservare un fenotipo T citotossico CD8+, che si associa spesso ad una maggiore aggressività.^{22,23}

Alcuni CTCL CD4+ presentano la variante CD8+, come la micosi fungoide, la reticulosi pagetoide, la sindrome di Sezary, i linfomi cutanei CD30+, il linfoma subcutaneo simil-panniculitico a cellule T, il linfoma extranodale a cellule T/NK, nasal type e il linfoma pleomorfo a piccole e medie cellule.^{1,24}

Queste varianti CD8+ possono avere un decorso meno indolente rispetto alle forme di origine CD4+ e sono per lo più rappresentate da un infiltrato di medie e grandi cellule pleomorfe; altri caratteri morfologici riscontrabili sono l'epidermotropismo e la necrosi cheratinocitaria. Ciò che consente di discriminare tra i linfomi cutanei aggressivi e le varianti CD8+ è il quadro clinico che in queste ultime è generalmente caratterizzato da lesioni cutanee meno infiltrate, come chiazze o placche iper o ipo-pigmentate, prive di erosioni, necrosi e ulcerazioni.¹⁷

Inoltre queste varianti hanno una prognosi più favorevole, probabilmente per il fatto che questi linfociti CD8+ presentano un fenotipo di linfociti T citotossici parzialmente attivati (TIA-1+, granzymeB-/+, perforina+) e possono avere un'azione anti-neoplastica.

Molti reports hanno individuato nella micosi fungoide variante CD8+ un comportamento variabile e sovrapponibile all'entità a cellule CD4+, con un quadro cutaneo perlopiù caratterizzato da chiazze ipopigmentate in età giovanile;²² determinante è la presenza del clone neoplastico di linfociti T citotossici che esprimono TIA-1, β -F1, CD45RA, ma non CD7 e CD2.^{22,23,25}

Inoltre nel gruppo della micosi fungoide sono state descritte altre varianti a peggiore prognosi, come la forma follicolare e la forma granulomatosa che hanno una sopravvivenza media a 5 anni del 60-70% dei casi, mentre altre varianti come la reticulosi pagetoide e la granulomatous slack skin hanno un decorso indolente nonostante possano esprimere un fenotipo linfocitario variabile CD4+ o CD8+ o CD30+.^{17,23}

Sono riconosciuti come linfomi a decorso intermedio-aggressivo la sindrome di Sezary, il linfoma cutaneo anaplastico a grandi cellule CD30+, il linfoma subcutaneo simil-panniculitico, il linfoma extranodale NK/T nasal-type ed il gruppo dei PTCL/NOS. Si tratta per la maggior parte di entità rare, caratterizzate da una eterogeneità nella presentazione clinica, distinta prevalentemente nello stadio tumorale da lesioni cutanee nodulari isolate o diffuse, ad evoluzione ulcerativa, e coinvolgimento sistemico. Una eccezione è rappresentata dalla sindrome di Sezary, che è rappresentata da un quadro cutaneo eritrodermico, da linfadenopatie superficiali e dalla presenza nel sangue delle cellule di Sezary >1000/ml.

Una caratteristica morfologica che accomuna queste forme è l'epidermotropismo dei linfociti neoplastici, riscontrabile soprattutto quando l'infiltrato è costituito da linfociti atipici citotossici. Possono essere evidenziabili anche necrosi dei cheratinociti, angiocentrismo e angiodistruzione, fenomeni tipici delle forme aggressive.

Gran parte di queste entità possono esprimere molecole di citotossicità, presenti nei granuli citoplasmatici azzurrofilari dei linfociti T e NK, che incidono sulla morfologia dell'infiltrato e sull'aggressività.²⁶ Altri fattori che possono determinare il decorso sono rappresentati dall'indice di proliferazione, dall'espressione di recettori per le chemochine (CXCR3, CCR4) e dal profilo genetico.

Una diagnosi differenziale fra le varie forme è d'obbligo, poiché molti CTCLs presentano aspetti istologici e immunoistochimici sovrapponibili e distinguibili attraverso una precisa correlazione con il quadro cutaneo e l'andamento clinico.

Le indagini di genetica disponibili finora, come l'array-CGH, la GEP (gene expression profiling) e i miRNA, hanno consentito di discriminare fra i CTCL più noti, i linfomi e leucemie a cellule NK e fra i PTCL/NOS.¹⁸

Le alterazioni genetiche riscontrate sono correlate con funzioni indispensabili nel ciclo cellulare dei linfociti T, come l'adesione cellulare, l'apoptosi, la proliferazione e la trascrizione e i prodotti di questi geni potrebbero avere una rilevanza nell'approccio terapeutico.¹⁸

In particolare, il numero delle aberrazioni cromosomiche sembra aumentare con l'aggressività della patologia, anche se alcune di esse, come le delezioni delle regioni 5q, 10q e 12q sono associate ad una prognosi più favorevole.¹⁸

- LINFOMA EXTRANODALE A CELLULE NK/T, NASAL-TYPE

Il linfoma extranodale NK/T, nasal-type, è una forma rara di linfoma; rappresenta meno del 2% dei linfomi non Hodgkin nella popolazione caucasica, mentre risulta più diffuso in Asia e America latina (5-10%). Colpisce i soggetti di sesso maschile, presentandosi con edema del volto e ostruzione nasale; l'estensione ai distretti contigui è frequente e possono essere coinvolti i linfonodi e sedi extralinfonodali come la cute, i tessuti molli, l'intestino e i testicoli.

Secondo la classificazione della WHO/EORTC, il linfoma NK/T, nasal-type che origina dalla cute (PC-ENK/T-NT) viene riconosciuto come forma indipendente di linfoma T primitivo cutaneo.¹

Finora in letteratura sono stati riportati all'incirca 57 casi di PC-ENK/T-NT in letteratura, dei quali 20 casi sono stati riscontrati nei paesi occidentali.^{27,28}

Il quadro cutaneo è rappresentato da lesioni in placca e nodulari eritemato-violacee, ad evoluzione ulcerativa, che inizialmente sono isolate e coinvolgono più frequentemente gli arti ma possono localizzarsi in qualsiasi distretto corporeo.

I caratteri morfologici che contraddistinguono questa forma sono rappresentati dalla proliferazione di un clone neoplastico di linfociti atipici a fenotipo citotossico, CD2+, CD56+, CD3-, CD3ε citoplasmatico+, TIA-1+, granzyme+, perforina+, con angiocentrismo, angioneurosi e massiva necrosi tissutale.

L'espressione delle molecole di citotossicità, in particolare granzyme-B e perforina, è tipica di questa entità a cellule NK.

La presenza dell'EBV è caratteristica e sembra influenzarne la patogenesi; l'ibridazione in situ evidenzia la presenza dell'RNA dell'EBV a livello delle cellule tumorali (EBER+).²⁹

Le indagini di biologia molecolare evidenziano un riarrangiamento del TCR in fase germinale, mentre solo in parte è stato evidenziato un riarrangiamento clonale, probabilmente associato a casi derivanti da linfociti T citotossici.³⁰

L'aggressività di questa forma è rappresentata da una veloce invasione e distruzione dei tessuti circostanti e la sopravvivenza a 5 anni dall'esordio è stimata intorno al 40% dei casi; l'IPI assume un valore variabile se la malattia è localizzata o disseminata.^{18,31}

Un accurato staging è necessario per determinare lo stadio della patologia e il suo decorso, attraverso TAC e PET. Il trattamento più efficace finora prevede cicli di radioterapia e polichemioterapia a seconda dello stadio di malattia alla prima diagnosi. Inoltre il trapianto autologo di midollo osseo viene considerato precocemente come un'alternativa soprattutto

nelle forme più violente. L'introduzione di nuove terapie associate all'uso di anticorpi monoclonali sembra avere un ruolo favorevole nella prognosi di questa entità.^{5,32,33}

- LINFOMA PRIMITIVO CUTANEO A CELLULE T CD8+ AGGRESSIVO
EPIDERMOTROPO

Il linfoma cutaneo a cellule T CD8+ citotossico epidermotropo aggressivo (AECTCL) è una entità molto rara di CTCL (<1%).¹

La prima descrizione risale al 1980,³⁴ quando Jensen et al. evidenziarono una forma fulminante simile alla micosi fungoide caratterizzata da linfociti T neoplastici CD8+. Altri casi vennero descritti successivamente in letteratura^{35,36} Nel 1999 Berti et al. riconobbero la AECTCL come una nuova entità a prognosi infausta, paragonando 8 casi di linfoma AECTCL con 9 casi di PCL a cellule T CD8+, classificati come linfomi a decorso indolente, quali la micosi fungoide o linfomi simil-CD30+.³⁷

Peculiari sono la presentazione clinica che può coinvolgere la cute e le mucose e il decorso aggressivo. Il AECTCL può manifestarsi con due differenti quadri clinici cutanei caratterizzati rispettivamente dalla comparsa di isolati noduli di grandi dimensioni, eritemato-violacei e placche ad evoluzione necrotico-emorragica oppure da chiazze eritemato-desquamative, placche ipercheratosiche e noduli diffusi su tutto l'ambito cutaneo, paragonabili alle lesioni della Reticulosi pagetoide disseminata (tipo Ketrón-Goodman).

La comparsa di metastasi coinvolge generalmente testicolo, polmone e sistema nervoso centrale, ma non i linfonodi loco-regionali, come accade per la maggior parte dei linfomi.

Caratteristica di questa entità è la presenza di un clone neoplastico di linfociti T CD8+ citotossici, associato a epidermotropismo o angiocentrismo e angionecrosi.

L'infiltrato linfocitario presenta una variabilità morfologica durante le varie fasi della malattia. All'esordio è presente un infiltrato di cellule linfocitarie di piccole e medie dimensioni pleomorfe associate ad una piccola quota di immunoblasti che può localizzarsi in sede intraepiteliale di tipo pagetoide, o più frequentemente può essere diffuso, oppure può assumere una disposizione nodulare o in banda di tipo lichenoide associata a discheratosi con gruppi di cheratinociti necrotici.

In fase avanzata è più evidente un epidermotropismo e/o un follicolotropismo, associato ad un infiltrato linfoide perivascolare nodulare o diffuso nel derma.

Un altro aspetto istologico correlabile con l'avanzamento della malattia è il riscontro di pustole neutrofiliche indotte dalla produzione di chemochine e citochine da parte dei linfociti neoplastici, come IL-8 e IL-17.³⁸

I casi di AECTCL secondari ad un linfoma T a basso grado sono spesso rappresentati da un infiltrato diffuso di linfociti T pleomorfi di piccola o media dimensione o immunoblasti, angiocentrismo e angiodistruzione e necrosi del sottocute.

L'epidermotropismo può essere riscontrato anche nella micosi fungoide o nella reticulosi pagetoide in fase di evolutività, pertanto la diagnosi differenziale istologica deve prendere in considerazione tali entità.³⁹

Per fare diagnosi bisogna quindi considerare anche la peculiarità del quadro clinico, la presenza di Ki76, indice di proliferazione, e il fenotipo del clone neoplastico.

I linfociti T neoplastici sono generalmente CD3+, CD8+, CD7+, CD45RA+, TIA-1/GMP-17+, β F1+, CD20-, CD30-, CD56-, CD45RO-; la presenza di questi antigeni dimostra la derivazione midollare dei linfociti T CD8+ citotossici. Il fenotipo CD2-/CD7+ derivato dalla perdita di CD2 e dall'acquisizione del CD7 sembra essere associato a un decorso maggiormente aggressivo,³⁸ mentre la presenza di CD30 e CD56 è più rara o può essere associata a casi secondari ad altri linfomi a cellule T. E' presente il riarrangiamento monoclonale del TCR alfa/beta o gamma/delta.

I markers citotossici sono espressi in modo variabile, ad eccezione del TIA-1 che è sempre riscontrabile anche nelle cellule non attivate ed è responsabile dell'apoptosi per frammentazione del DNA. I meccanismi patogenetici che caratterizzano questo linfoma sembrano differenti rispetto ad altre entità e questo è testimoniato dall'assenza o minima espressione della molecola CD103/HML-1+ e dell'antigene CLA.

La ricerca dei virus oncogeni EBV, HTLV-1/2, HHV-6/7/8 è negativa.

Il decorso è generalmente aggressivo con una sopravvivenza media di 32 mesi. Tale entità si distingue per il rapido coinvolgimento sistemico in meno di 12 mesi.

E' importante impostare un protocollo terapeutico adeguato in modo da intervenire nelle prime fasi della malattia. La polichemioterapia, come la doxorubicina, la radioterapia e il trapianto autologo di midollo osseo rappresentano le principali terapie da prendere in considerazione.^{1,21,40-43}

Poiché si tratta di una forma CD8+ con un profilo Th-1, l'uso di farmaci come i retinoidi e l'interferone che aumentano la risposta Th-1 è controindicato. Di recente, è stato descritto che l'uso del bexarotene, retinoide sintetico, è efficace in questo tipo di linfoma, poiché induce l'apoptosi nelle cellule dei CTCL attivando la via della caspasi 3.^{44,45}

- LINFOMA PRIMITIVO CUTANEO PLEOMORFO A CELLULE T NOS

Il gruppo dei PTCL/NOS comprende entità provvisorie che presentano caratteristiche clinico-morfologiche distinte rispetto alle forme riconosciute dalla classificazione della WHO/EORTC.

Sono accomunate da un coinvolgimento linfonodale e sistemico precoce, che può interessare il midollo osseo, il fegato, la milza e il sangue periferico.

L'infiltrato neoplastico è diffuso nel derma e nodulare nell'ipoderma con focali aree di ulcerazione ed è costituito da linfociti aberranti di medie e grandi dimensioni, pleomorfi con una variabile espressione di CD4 e CD8, CD56, markers di citotossicità, CD5, CD7, CD30 e a volte CD20 e CD79a e riarrangiamento clonale del TCR alfa/beta o gamma/delta; questo tipo di infiltrato non assume le caratteristiche fenotipiche dei linfociti T helper.

Rappresentativi sono l'epidermotropismo, l'angiocentrismo e il follicolotropismo. Nell'infiltrato possono essere presenti cellule simil-Reed-Sternberg e cellule chiare, piccoli linfociti, eosinofili, istiociti, plasmacellule e grandi cellule B.

L'aggressività dei PTCL/NOS è rappresentata da un alto indice di proliferazione dell'infiltrato, con una sopravvivenza a 5 anni di meno del 30% dei casi. Recenti studi hanno dimostrato anche un decorso più indolente in casi caratterizzati clinicamente da poche lesioni cutanee istologicamente non associate ad epidermotropismo e necrosi cutanea, con EBV- e riarrangiamento policlonale del TCR.²⁶ La prognosi può essere quindi influenzata dalla positività per l'EBV, dall'alto indice di proliferazione e dall'espressione dei granuli citotossici.

Le aberrazioni genetiche presenti in questo gruppo sembrano correlate con i meccanismi di angiogenesi, con recettori di alcuni fattori di crescita e oncosoppressori. Sono state evidenziate amplificazioni del 7q, 8q, 17q e 22q e delezioni di 4q, 5q, 6q, 9p, 10q, 12q e 13q. Il riscontro di una morfologia pleomorfa linfocitaria è possibile e generalmente si tratta di linfoblasti di grandi dimensioni CD8+. Questo aspetto distingue questa forma di PTCL/NOS pleomorfo dal linfoma primitivo cutaneo pleomorfo a piccole e medie cellule T, che è una forma molto rara di linfoma cutaneo (2% dei CTCL), a decorso indolente.⁴⁶

Quest'ultimo si caratterizza per la predominanza di linfociti pleomorfi CD4+, CD8-, CD30- di piccola e media taglia e una piccola quota di cellule pleomorfe di grandi dimensioni (< 30%) nel derma a tutto spessore fino al sottocute con una distribuzione diffusa o nodulare. Non sono espressi i markers di citotossicità e l'EBV, mentre è presente un riarrangiamento monoclonale del TCR. Il riscontro di focali aree di epidermotropismo devono far pensare ad

una diagnosi differenziale con la micosi fungoide, mentre quando sono presenti linfociti reattivi e plasmacellule bisogna tenere conto di una forma di iperplasia linfoide o pseudolinfoma cutaneo.¹⁷

E' descritta anche una variante di linfoma primitivo cutaneo pleomorfo a piccole e medie cellule con fenotipo CD8+, che è inoltre CD3+, CD45RO+, CD4-, CD30-, CD56-, ma non presenta epidermotropismo, nè markers di citotossicità e l'indice di proliferazione Ki-67 è basso. Le indagini di biologia molecolare evidenziano il riarrangiamento clonale per il TCR. La differenza con i PTCL/NOS è legata pertanto all'assenza delle grandi cellule CD8+, che contraddistinguono anche altri linfomi aggressivi come il AECTCL.

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 fitoemagglutina. 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: FISH E CGH

Queste tecniche sono state introdotte successivamente e si distinguono per maggiore rapidità e potere di risoluzione.

La FISH (fluorescence in situ hybridization) è una tecnica molto sensibile e specifica con una risoluzione massima di alcune megabasi. Prevede l'uso di specifiche molecole fluorescenti che si legano e marcano direttamente o indirettamente siti specifici di DNA. Il DNA viene denaturato e ibridizzato con una sonda e, dopo il legame con i fluorocromi, viene osservato al microscopio a fluorescenza. E' possibile applicare anche fluorocromi diversi e pertanto analizzare contemporaneamente diversi cloni di DNA. Inoltre la FISH può essere utilizzata quando i cromosomi sono in prometafase o meglio ancora in nuclei interfasicci e la maggiore estensione dei cromosomi in queste fasi consente un'analisi a più alta risoluzione.

Tale tecnica deve comunque essere preceduta dall'utilizzo del bandeggio, che individua le anomalie cromosomiche da approfondire, poiché la FISH non è in grado di identificare le alterazioni di tutti i cromosomi in una singola analisi.

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.⁴⁷

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 log2. Il log2 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 .⁴⁸

- ESPRESSIONE GENICA

Rappresenta la tappa successiva al sequenziamento del materiale genetico e consente la misurazione dell'attività dei geni, ossia quello che fa la cellula target dello studio. Infatti, in un determinato istante la cellula produce mRNA solo da una piccola quota di geni, che vengono considerati in attivazione e questo può dipendere da svariati fattori, come la fase del ciclo cellulare o la presenza di segnali inviati da altre cellule.

L'espressione di questi geni può essere studiata a livelli differenti e con varie metodiche.

Ogni metodica di espressione presenta distinti parametri di applicazione: il materiale oggetto di studio, la risoluzione e la resa dell'indagine. Il bersaglio dello studio è costituito da trascritti di RNA o proteine. Il materiale può variare da preparati di estratti di RNA o proteine a sezioni di tessuto o colture cellulari in vivo. Da questo dipende la risoluzione, poiché i preparati di estratti di RNA possono evidenziare le tracce di una grossolana espressione di un gene mentre in colture cellulari è possibile valutare la dimensione e le eventuali isoforme di un prodotto genico.

Il risultato di ogni indagine può essere poi rappresentato da pochi geni, come nella RT-PCR, a molti geni contemporaneamente, come nei microarray di DNA.

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.⁴⁹

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.

PCR

Si tratta della reazione a catena della polimerasi e la sua introduzione nell'analisi genetica ha consentito di clonare e analizzare velocemente il DNA. E' molto sensibile poiché basta l'amplificazione di DNA bersaglio in quantità minime, anche quello di un'unica cellula.

Il DNA bersaglio spesso è costituito da una piccola frazione dell'intero DNA di un tessuto o di una cellula in coltura. Il meccanismo consiste nell'amplificazione selettiva attraverso primers specifici che riconoscono le sequenze adiacenti a quelle da esaminare, evitando quei primers che si leghino a sequenze di DNA ripetitivo. Il DNA viene precedentemente denaturato a circa 93-95°C e i primers vengono appaiati ad una temperatura dai 50 ai 70°C per consentire la fusione con il DNA. Successivamente avviene la sintesi del DNA a circa 70-75°C attraverso la DNA polimerasi che è termostabile. Questo processo può essere ripetuto più volte partendo dal DNA appena sintetizzato, in modo da avere una reazione a catena con un aumento esponenziale del prodotto, che si raddoppia ogni volta. Il risultato è dato dalla formula $a=t* 2^n$ dove a è la quantità di amplicone prodotto, t è il numero di molecole target iniziali e n è il numero di cicli eseguiti.

Questo processo è comunque limitato dalla quantità dei primers, dall'attività della polimerasi e dal reannealing dei filamenti, con un effetto plateau.

Per ottenere una buona quantità di prodotto, sono necessari diversi cicli e la reazione di amplificazione assume un andamento sigmoide, con un appiattimento della curva durante i cicli finali di amplificazione poiché i prodotti di PCR non raddoppiano.

I dati più attendibili sono quelli ottenuti durante la fase esponenziale, cioè quando il prodotto della PCR è proporzionale al target iniziale e il rilevamento di una fluorescenza che è proporzionale al prodotto di PCR. La fluorescenza viene accumulata seguendo la stessa cinetica della reazione di PCR e può essere rilevata, ad ogni ciclo di amplificazione, utilizzando uno strumento che ne acquisisca l'intensità.

Per questo motivo è stata introdotta la PCR Real Time, che è una forma di PCR quantitativa in grado di misurare l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, riducendo al minimo eventuali variabili di reazione. I limiti di questa metodica sono rappresentati dalla ristretta gamma di dimensioni delle sequenze di DNA (0-5 kb) che possono essere clonate e, inoltre, dalla possibilità di amplificare solo sequenze note, che bisogna conoscere per poter sintetizzare i primers.⁵⁰

Consiste nella rilevazione della fluorescenza associata all'amplificazione e nell'analisi del prodotto di fluorescenza tramite computer e non analisi del prodotto di PCR su gel di agarosio. Spesso è combinata con la RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) per quantificare i livelli di espressione di specifici RNA.

La fluorescenza, che si genera durante la PCR, avviene per effetto di diverse possibili reazioni chimiche, basate principalmente sull'uso di coloranti o sonde ad ibridazione.

Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione, in cui l'operatore sceglie un valore soglia (Threshold) in maniera da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale. Per ogni curva di amplificazione il C_T (Threshold Cycle), ovvero il ciclo di reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza è maggiore rispetto a quello della Threshold, è inversamente proporzionale alla quantità di target iniziale.

La quantificazione dei campioni di RNA o DNA può essere assoluta, che necessita di campioni standard di cui si conosce la concentrazione assoluta, in modo da utilizzare curve standard di calibrazione; oppure relativa, in cui si rapporta la quantità dei campioni rispetto a quella di un gene di controllo o housekeeping per normalizzare l'espressione del gene studiato. I campioni vengono quindi quantificati paragonando il loro ΔC_T con quello di un insieme di geni housekeeping.

SCOPO DELLO STUDIO

La ricerca del processo patogenetico che contraddistingue i linfomi cutanei ha svolto negli ultimi anni notevoli progressi e numerose sono state le pubblicazioni scientifiche in merito. Alcuni concetti sono ormai acquisiti nella nostra conoscenza riguardo ai fattori ereditari o acquisiti che possono essere coinvolti nell'induzione di tali entità, come agenti chimici, radiazioni e virus, che sono direttamente coinvolti alla base della linfomagenesi, ossia all'insieme dei processi dovuti a danni genetici specifici.

I principali bersagli di questo danno sono costituiti da tre classi di geni che normalmente regolano importanti funzioni cellulari: i proto-oncogeni, che promuovono la crescita, i geni oncosoppressori che inibiscono la crescita, e i geni che regolano l'apoptosi.

Scopo di questa tesi è l'analisi molecolare di un gruppo di pazienti affetti da linfomi primitivi cutanei particolarmente aggressivi con fenotipo CD8+, il PC-ENK/T-NT e il ENK/T-N, il AECTCL e il PTCL/NOS pleomorfo CD8+.

Si tratta di patologie rare, verso le quali si è sviluppato un notevole interesse nel capire quali siano i meccanismi di induzione, il processo patogenetico che le caratterizza e quali siano i fattori che possano influenzarne una prognosi così grave.

L'intento è pertanto quello di approfondire dal punto di vista molecolare quali meccanismi genetici siano coinvolti e cosa distingua queste entità da altre forme di CTCL CD8+; queste applicazioni sono importanti nella determinazione della prognosi e della terapia più specifica ed efficace.

L'analisi verte sulla valutazione dei dati ottenuti mediante applicazione sul materiale biotico cutaneo di arrayCGH, tecnica innovativa di citogenetica molecolare, ormai ampiamente utilizzata in campo oncologico, che permette di identificare le anomalie numeriche presenti nella struttura genomica dei campioni, e di cDNA microarray, metodica di gene expression che evidenzia il profilo di espressione genica delle cellule neoplastiche.

I risultati, convalidati dalla ricerca della significatività statistica, rappresentano quali possano essere i meccanismi determinanti l'evento patologico di queste forme di linfoma; perciò devono essere valutati in base al ruolo che svolgono all'interno del ciclo cellulare, ma soprattutto, devono essere comparati con i dati di analisi molecolari degli altri CTCL e in particolare con quelli a decorso indolente.

MATERIALI E METODI

CASISTICA

Per questo studio sono stati selezionati 3 gruppi di pazienti seguiti presso il Centro di Immunopatologia Cutanea dell'Istituto di Scienze Dermatologiche della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, affetti dalle seguenti patologie:

- PC-ENK/T-NT e ENK/T-N: 3 pazienti con la forma nasal-type (2 maschi e 1 femmina), 1 paziente con la forma nasale, età media 58 anni;
- AECTCL: 10 pazienti (5 maschi e 5 femmine) ai quali è stato aggiunto nello studio un gruppo di 5 pazienti maschi in cura presso la Leiden University Medical Center (LUMC) di Leiden (NL), età media 59 anni;
- PTCL/NOS pleomorfo CD8+: 4 pazienti (2 maschi e 2 femmine), età media 66 anni;

Inoltre è stato scelto un gruppo di controllo di 7 pazienti (6 maschi e 1 femmina; età media 51 anni) affetti da micosi fungoide variante CD8+.

L'arruolamento dei pazienti è stato preceduto dalla valutazione delle seguenti informazioni cliniche: 1) sesso ed età; 2) aspetto macroscopico (chiazze, placche o noduli, eventuale ulcerazione), sede e numero di lesioni cutanee presenti alla diagnosi; 3) stadiazione clinica completa, comprese TC total body e biopsia osteomidollare per conferma primitività cutanea lesionale; 4) emocromo, formula leucocitaria, valori di LDH e beta2-microglobulina, presenza di componente monoclonale; 5) terapie eseguite (escissione chirurgica e/o radioterapia e/o chemioterapia); 6) recidive cutanee o extracutanee di malattia; 8) "outcome" e stato dei pazienti all'ultimo controllo di "follow-up".

Per ogni singolo paziente si disponeva di un campione di cute crioconservata per procedere alle indagini immunoistochimiche, molecolari e citogenetiche.

La diagnosi è stata eseguita con indagini di istologia su sezioni di tessuto fissate con ematossilina-eosina e Giemsa e con analisi di immunoistochimica attraverso l'uso dei seguenti anticorpi: cytoplasmic CD3 ϵ (polyclonal; Dako), surface CD3 (UCHT1; Dako), CD4 (1F6; Novocastra), CD5 (4C7; Novocastra), CD7 (CBC.37; Dako), CD8 (C8/144B; Dako), CD20 (L26; Dako), CD30 (Ber-H2; Dako), CD45RA (4KB5; Dako), CD45RO (UCHL1; Dako), CD56 (1B6; Novocastra), CD79a (JCB117; Dako), Granzyme B (GrB-7; Monosan), TIA-1 (2G9; Immunotech), TdT (TdT-339; Novocastra), Mum-1 (MUM-1p; Dako), TCR β F1 (8A3; Thermo Scientific), TCR δ 1 (TS8.24; Endogen), ki-67 (MIB-1; Dako). Inoltre è stata eseguita la ricerca dell'EBV attraverso indagini di ibridazione in situ con un probe complementare al sito di legame del virus, EBER-1 e EBER-2 (Dako).

L'inquadramento istologico ed immunofenotipico dei singoli gruppi verte sui criteri forniti dalla classificazione EORTC/WHO dei linfomi cutanei (2005) e dalla classificazione WHO delle malattie linfoproliferative (2008).

Il DNA estratto dai campioni di cute è stato analizzato mediante arrayCGH presso il laboratorio di Biologia Generale e Genetica Medica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, mentre l'RNA estratto è stato utilizzato in seguito per analisi di espressione genica mediante cDNA microarray presso l'Istituto per le Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" di Milano.

Sia per l'analisi di arrayCGH che per quella di espressione genica è stato applicato un protocollo elaborato da Agilent Technologies (Santa Clara, CA), selezionando sonde d'interesse e di controllo in base alla loro localizzazione cromosomica e contenuto genico.

Per il nostro studio sono stati scelti array 4x44K (un vetrino diviso in 4 parti) "Whole genome", che hanno analizzato tutto il genoma dei pazienti.

Le piattaforme utilizzate sono costituite da sonde oligonucleotidiche lunghe 60 bp (piattaforme Agilent 60-mer Whole Human Genome Microarray) e conferiscono una risoluzione di 75K.

ARRAY-CGH

Preparazione del DNA genomico

1. **Estrazione del DNA dal campione** da cute crioconservata in azoto liquido, seguendo tale protocollo:

Digestione

- sminuzzare il campione per omogenarlo su piastra Petri aggiungendo 1 ml di TNE (Tris Cl, NaCl, EDTA) 5X
- trasferire in eppendorf
- aggiungere 1/10 di SDS (Sodio dodecil solfato) 10% (100 µl) e 100 µl di PK (protein K)
- agitare e chiudere con parafilm
- bagnetto termostato (ON-Over night-37°C) (2-3h 56°C)

Estrazione

- travasare la soluzione digerita in eppendorf phase lock gel 15 ml
- aggiungere 2 ml di fenolo:cloroformio:isoamilico
- agitare delicatamente
- centrifugare a 3000 g per 10 minuti
- ripetere le operazioni precedenti una seconda volta
- aggiungere solo cloroformio 1 ml e centrifugare a 4000 giri per 10 minuti
- trasferire il sovrnatante in una Falcon da 15 ml, aggiungere al sovrnatante 3 ml di etanolo freddo e mettere in freezer da 2 ore a ON
- centrifugare a 4000 giri per 5 minuti a 4°C
- gettare il sovrnatante e lasciare asciugare il pellet per 5 minuti
- aggiungere 200 µl di acqua distillata e stoccare in frigo a -20/-40°C

2. Quantificazione del DNA al Nanodrop

Il Nanodrop è uno spettrofotometro che misura la concentrazione del campione di DNA in funzione dell'assorbanza, basandosi sulla legge di Lambert-Beer ($A = \epsilon_{\lambda} \cdot b \cdot c$, dove A è l'assorbanza, ϵ_{λ} è il coefficiente di estinzione ad una determinata lunghezza d'onda, b è il cammino ottico e c è la concentrazione). L'assorbanza è la frazione di luce incidente assorbita dal campione che, nel caso del DNA, ha lunghezza d'onda pari a 260 nm, ed è direttamente proporzionale alla concentrazione del DNA.

3. Concentrazione del DNA estratto

Questa operazione è richiesta quando il DNA estratto (prima eluizione) 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.

La procedura è semplice: si inserisce l'eluato all'interno delle colonnine che a loro volta vengono inserite nelle apposite provette. Si centrifuga a 10000rpm per 2 minuti e successivamente si inserisce la colonnina capovolta in una nuova provetta e si centrifuga nuovamente a 10000 rpm per 10 minuti. Si procede quindi alla quantificazione dei campioni concentrati al Nanocrop.

Applicazione della tecnica di arrayCGH, che consiste nelle seguenti operazioni:

4. 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.

Per ogni DNA campione e per ogni reference, si digeriscono separatamente 0,5 µg di ognuno in un volume totale di 22,2 µl.

La mix di digestione (per 1 campione) è così composta:

0,5 µl di enzima Alu1 (10 U/µl)

0,5 µl di enzima RSA1 (10 U/µl)

0,2 µl di siero bovino acetilato (BSA), per aumentare l'efficienza della digestione

2,6 µl di Buffer C

per volume finale di 3,8 µl.

Questa quantità viene aggiunta a tutti i campioni, per un volume finale di 26 µl per ogni campione (reference e in esame). A questo punto, le provette vengono incubate in un bagnetto a 37°C per 2 ore.

Per inattivare l'azione degli enzimi, le provette vengono poste per 20 minuti a 65°C.

5. Marcatura

A partire da questa fase fino al termine della procedura, occorre lavorare al buio perché i fluorocromi utilizzati sono sensibili alla luce. 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).

La marcatura viene effettuata secondo la tecnica “random priming”, che utilizza una miscela di oligonucleotidi di 6 bp casuali, i quali si appaiano al DNA stampo denaturato e fungono da primers per l'attività polimerasica 5-3 dell'enzima di Klenow della DNA polimerasi I. partendo dall'estremità 3' OH del primer, l'enzima di Klenow, privo dell'attività esonucleasica 3→5, sintetizza nuovo DNA lungo il substrato a singolo filamento.

In questa tecnica si aggiungono tra i substrati quattro desossiribonucleotidi trifosfati (dNTP) di cui uno è sostituito parzialmente da un dNTP omologo coniugato a biotina, digossigenina o a molecole fluorescenti.

Per ogni paziente ed ogni controllo vengono aggiunti al DNA precedentemente digerito 5 µl di Random primer di DNA (la soluzione è fornita con Agilent Genomic DNA Labeling Kit PLUS) e si lascia il tutto immerso per 3 minuti in un bagnetto a 95°C, per ottenere la denaturazione dei primer e del campione di DNA. Le provette vengono quindi trasferite in ghiaccio per 5 minuti per raffreddarle ed evitare quindi la rinaturazione (annealing) e ad ognuna vengono aggiunti 19 µl di mix di marcatura preparata, per ogni campione, con:

10 µl di Buffer 5X

5 µl della mix di dNTPs 10X (contiene dATP, dCTP, dGTP, e, in concentrazione minore, dUTP)

3 µl di Cy3-dUTP (1,0 mM) (dUTP coniugato con Cy3) per i controlli e di Cy5-dUTP (1,0 mM) (dUTP coniugato al fluorocromo Cy5) per i pazienti

1 µl di enzima di Klenow

Le provette vengono lasciate in un bagnetto a 37°C per 2 ore, al termine delle quali le provette vengono poste a 65°C per 10 minuti per bloccare la reazione.

6. Purificazione del DNA marcato

Prima della purificazione del DNA marcato, volta ad eliminare i nucleotidi marcati non incorporati perché in eccesso, il DNA dei pazienti viene unificato con quello dei rispettivi

controlli, dimezzando così il numero delle provette. A ognuna di queste vengono aggiunti 430 µl di TE (Tris-EDTA, pH 8).

Per la purificazione si prevede l'utilizzo dello stesso sistema (Microcon) impiegato per la concentrazione del DNA. Si trasferisce il DNA nelle colonnine e si centrifuga per 10 minuti a 10000 rpm. Al termine, si elimina l'eluato e nella stessa provetta, di cui si è conservato il filtro, si aggiungono altri 480 µl di TE e si centrifuga nuovamente a 10 minuti a 10000 rpm. A questo punto la colonnina viene capovolta in una nuova provetta e viene sottoposta ad una breve centrifugata di 1 minuto a 10000 rpm in modo tale da far eluire il DNA raccolto sul filtro.

Prima di eliminare il filtro, bisogna assicurarsi che il volume ottenuto sia di 41 µl (nel caso degli array 4x44, 158 µl per i 244K). Se il volume è superiore, occorre trasferire nuovamente il campione nel filtro, centrifugare a 10000 rpm per 1 minuto, svuotare e ripetere l'operazione finché il volume non arrivi al valore desiderato.

Se il volume ottenuto è inferiore ai 41 µl, si aggiunge TE q.b.

Dopo aver trasferito l'eluato in una provetta pulita è possibile utilizzare il Nanodrop, non solo per misurare la concentrazione di DNA (ng/µl), ma anche per calcolare l'attività specifica dei due fluorocromi (pmol/µl), che lo strumento riesce a distinguere perché assorbono luce a diverse lunghezze d'onda.

Per una marcatura efficiente i valori di riferimento devono essere almeno 25 pmol/µg per il DNA marcato con Cy5 e 35 pmol/µg per quello marcato con Cy3. Infine in ogni provetta vengono aggiunti:

5 µl di Human Cot-1 DNA (1,0 mg/ml) (per gli array 244K 50 µl)

11 µl di 10X Blocking Agent (52 µl per i 244K)

55 µl di 2X Hybridization Buffer ad ogni campione (260 µl per i 244K)

Le provette vengono denaturate per 3 minuti a 95°C e si lasciano in incubazione per 30 minuti a 37°C affinché avvenga il pre-annealing, cioè l'ibridazione del DNA Cot-1 alle sequenze ripetute presenti nel genoma dei pazienti e dei controlli.

7. Ibridazione

L'ibridazione viene fatta all'interno di una particolare camera definita camera di ibridazione (Agilent SureHyb chamber). Sulla base di questa camera è posto un particolare vetrino coprioggetto detto "gasket-slide". Esso viene montato all'interno della camera di ibridazione tenendo la parte con il silicone rivolta verso l'alto, in particolare viene appoggiato all'interno di speciali apparecchiature in acciaio chiamate "clamp", fornite dalla ditta, che serviranno ad

accogliere anche l'array e a mantenere stabile l'unione fra di essi, grazie alla loro funzione di “morsa”. Le provette contenenti la miscela marcata di campione e controllo preparata come appena descritto vengono agitate e il loro contenuto (circa 100 µl; nel caso dei 244K 500 µl) viene trasferito sull'apposito spazio del vetrino coprioggetto. Per ibridare i campioni alle sonde disposte sull'array, cioè per far avvenire l'appaiamento fra essi si posiziona l'array al disopra del gasket-slide in modo che il lato attivo dell'array (quello in cui sono depositati gli oligonucleotidi) prenda contatto con la soluzione stessa, formando così un “sandwich”. Si chiudono le clamp, verificando che non ci siano bolle d'aria tra la superficie dell'array e del gasket-slide. Infine l'array viene posizionato all'interno di un forno d'ibridazione con un rotore che gli permette di ruotare ad una velocità massima di 20 rpm e ad una temperatura di 65°C per 24 ore (nel caso dei 244K per 40 ore).

8. Lavaggi

La seguente procedura consente di eliminare il DNA non ibridato e gli altri reagenti presenti nella miscela che è stata dispersa sul vetrino. Le soluzioni di lavaggio sono due, *Oligo aCGH Wash Buffer 1* e *Oligo aCGH Wash Buffer 2*.

Mentre la prima viene usata a temperatura ambiente, la seconda va scaldata fino a raggiungere i 37°C.

I vetrini vengono tolti dalla camera di ibridazione e immersi nella soluzione *Wash 1*, cercando di separare i coprioggetto dall'array. Questi ultimi vengono quindi riposti dentro un'altra vaschetta, contenente la stessa soluzione, in agitazione a temperatura ambiente per 5 minuti, trascorsi i quali, vengono spostati e immersi nella soluzione *Wash 2*, sempre in agitazione, per 1 minuto.

Infine i vetrini vengono estratti e i loro lati vengono tamponati su un foglio di carta; teoricamente, a questo punto dovrebbero essere già asciutti perché la soluzione *Wash Buffer 2* ha la funzione di asciugarli. Comunque se rimanessero delle gocce residue, occorre eliminarle servendosi di una bomboletta di aria compressa.

9. Scansione e visualizzazione dei risultati

Dopo aver effettuato i lavaggi, gli array vengono analizzati attraverso lo Scanner Agilent (ogni vetrino va posizionato in una cameretta specifica a partire dalla posizione 1): l'immagine degli array viene acquisita dallo scanner (risoluzione di 5 µm) e salvata sul computer sottoforma di file TIF. Lo scanner rileva i segnali di fluorescenza emessi da ogni spot.

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 spots 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 CGH-Analytics (vers.3.2) 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 \log_2 del rapporto di fluorescenza sarà pari a zero per tutti i cloni di tutti i cromosomi, mentre i valori del \log_2 che indicano con certezza la delezione o la duplicazione di un oligonucleotide corrispondono a -1 e a +0,5, rispettivamente.

EXPRESSION GENE PROFILING

1. Estrazione dell'RNA dalle cellule

Tutti i passaggi durante i quali si lavora con l'RNA devono essere fatti in contenitori privi di RNasi e si devono sempre utilizzare soluzioni preparate con H₂O-DEPC per evitare la degradazione dell'acido ribonucleico ad opera delle ribonucleasi.

La biopsia deve essere divisa, in modo che una parte venga messa in formalina per l'esame istologico e l'altra parte venga immediatamente congelata.

Il protocollo utilizzato per l'estrazione è basato sul reagente RNA Bee, una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato.

Il tessuto da processare deve essere trattato velocemente per evitare che si scongeli.

Il tessuto viene omogeneizzato mediante l'uso di bisturi e i frammenti vengono trasferiti in una eppendorf o, nel caso la biopsia sia più piccola di 20-30 mg, in un RNase-Free microfuge Tubes da 1.5 ml, nel quale è stato aggiunto RNA Bee.

Si aggiunge quindi il 5% di cloroformio e si mescola vigorosamente per circa 1 minuto e poi si centrifuga a 12000 x g per 15 minuti a 4°C. La centrifugazione separa la fase inferiore fenolo-cloroformica dalla fase superiore acquosa contenente l'RNA che viene recuperata con un pasteur di plastica e posta in un altro RNase-Free Microfuge Tube. L'RNA viene precipitato dalla fase acquosa superiore aggiungendo circa 0,5 ml di isopropanolo per ogni millilitro iniziale di reagente e 5 µg di glicogeno ed incubando a temperatura ambiente per 10 minuti il tutto. Dopo di ciò si centrifuga a 12000 x g per 10 minuti a 4°C, si rimuove il surnatante e si lava una volta il pellet con 500 µl di etanolo diluito al 75% con H₂O-DEPC.

Per quest'ultimo lavaggio, una volta aggiunto l'etanolo, si centrifuga a 12000x g per 5 minuti a 4°C, si elimina l'etanolo e si lascia asciugare il pellet per almeno 10 minuti in cappa sterile a flusso laminare.

Infine l'RNA viene risospeso ad una concentrazione teorica finale di circa 1 µg/µl in H₂O trattata con dietilpirocarbonato (DEPC). Per una migliore risospensione è preferibile utilizzare H₂O riscaldata a circa 50°C e agitare pipettando in modo prolungato.

L'RNA risospeso deve essere conservato a -80°C. Se si pensa di non dovere utilizzare l'RNA preparato per tempi superiori ai 3 mesi è preferibile conservarlo a -80°C aggiungendo alla soluzione acquosa 2.5 volumi di etanolo assoluto filtrato.

2. Analisi dell'RNA estratto

L'RNA estratto viene analizzato allo spettrofotometro per determinarne la concentrazione ed evidenziare eventuali contaminazioni da fenolo o da proteine.

Per il calcolo della quantità di RNA si considera che una soluzione acquosa di RNA a pH 7-7,5 ad una concentrazione di 40 ng/μl ha un'assorbanza pari a circa 1, se si utilizza per la misura una cuvetta con un cammino ottico di 1 cm. Invece, picchi a 270 nm evidenziano contaminazioni da fenolo e un basso rapporto A_{260}/A_{280} indicano la presenza di proteine (il rapporto ideale è 1.8-2.0)

L'integrità dell'RNA viene poi verificata analizzandone circa 50-100 ng con il *chip RNA 6000 nano assay* (Agilent) associato allo strumento Agilent 2100 Bioanalyzer. Il chip utilizzato ha un range di misura quantitativa, per l'RNA totale, compreso tra i 5 ng/μl e i 50 ng/μl, ma sono in commercio anche chip che permettono l'analisi di quantitativi di RNA totale anche di concentrazioni 200 pg/μl. Dato che la quantità di RNA totale estratto dalle biopsie è limitante negli esperimenti di microarray, risulta essere di fondamentale importanza poterne analizzare la qualità a partire da concentrazioni così esigue.

3. Retrotrascrizione e marcatura

Questo metodo si basa su una semplice reazione di retrotrascrizione nella quale una parte del nucleotide dCTP “freddo” viene sostituita con del dCTP marcato con Cy3 o Cy5.

A 1000 ng di RNA totale viene aggiunto, in un microtubo da 0,2 ml, 1 μl di T7 Oligo(dT) primers e portata ad un volume finale di 12 μl utilizzando acqua nuclease-free. La miscela RNA oligo viene mantenuta per 10 minuti a 70°C per denaturare le strutture secondarie dell'RNA, quindi viene posta in ghiaccio per qualche minuto per permettere l'appaiamento dell'oligo con l'RNA. Al campione viene quindi aggiunto 8 μl di Reverse Transcription Master Mix (tabella 4) e incubata a 42°C per 2 ore.

Passate le 2 ore si centrifuga il campione a +4°C a 12000x g per 10 minuti.

Si posiziona quindi i microtubi in ghiaccio e procedere con la sintesi del second strand cDNA (tabella 5).

Al campione vengono aggiunti 80 μl di Second Strand Master Mix e il tutto incubato a 16°C per 2 ore e posto in ghiaccio.

4. Purificazione del cDNA

Per la purificazione del cDNA il campione contenente il Second Strand Master Mix viene miscelato con Binding Buffer e successivamente centrifugato attraverso il cDNA Filter Cartridge e lavato con Wash Buffer, quindi eluito con acqua nuclease-free, precedentemente scaldata a 55°C.

5. In vitro transcription to synthesize Biotin-labeled aRNA

A temperatura ambiente si prepara una IVT Master Mix (tabella 6) e se ne distribuiscono 24 µl in ogni campione.

Il tutto viene incubato a 37°C per 4-14 ore.

La reazione viene quindi stoppata aggiungendo 60 µl di acqua nuclease-free

6. Purificazione dell'aRNA

In ogni campione vengono aggiunti 350 µl di aRNA Binding Buffer e 250 µl di etanolo assoluto e, mediante l'utilizzo di aRNA Filter Certridge, purificati. Quindi lavati con Wash Buffer ed eluiti con acqua nuclease-free.

7. Valutazione della purificazione e quantificazione dell'aRNA con Byoanaliser 2100 Agilent

8. Marcatura

Si procede quindi alla centrifugazione dell'RNA e all'asciugatura del pellet.

I campioni sono ora pronti per essere marcati con Cy3 e Cy5 per 1 ora a temperatura ambiente e al buio.

9. Purificazione dell'aRNA marcato

Come sopra descritto, in ogni campione vengono aggiunti 350 µl di aRNA Binding Buffer e 250 µl di etanolo assoluto e, mediante l'utilizzo di aRNA Filter Certridge, purificati. Quindi lavati con Wash Buffer ed eluiti con acqua nuclease-free.

10. Lettura allo spettrofotometro per valutare l'avvenuta incorporazione del marcatore

11. Frammentazione e ibridazione dell'RNA

I campioni vengono incubati per 30 minuti a 60°C in una soluzione di frammentazione (tabella 7) e vengono direttamente caricati su vetrino e lasciati nel rotator-hybridizer per 17 ore a 65°C

12. Scansione della fluorescenza mediante software Agilent

QUANTITA'	COMPONENTE
2 µl	10X First Strand Buffer
4 µl	dNTP Mix
1 µl	RNase Inhibitor
1 µl	ArrayScript

Tabella 4. Reverse Transcription Master Mix (per una singola reazione di 20 µl)

QUANTITA'	COMPONENTE
63 µl	Nuclease-free Water
10 µl	10X Second Strand Buffer
4 µl	dNTP Mix
2 µl	DNA Polymerase
1 µl	RNase H

Tabella 5. Second Strand Master Mix (per una singola reazione di 100 µl)

QUANTITA'	COMPONENTE
3 µl	aaUTO (50 mM)
12 µl	ATP, CTP, GTP Mix (25 mM)
3 µl	UTP Solution (50 mM)
4 µl	T7 10X Reaction Buffer
4 µl	T7 Enzyme Mix

Tabella 6. IVT Master Mix (per una singola reazione di 40 µl)

COMPONENTI	VOLUMI PER IBRIDIZZAZIONE
cRNA da Fragmentation Mix	55 µl
2x GEx Hybridization Buffer HI-RPM	55 µl
2x Hybridization Buffer	

Tabella 7. Hybridization mix

RISULTATI

L'analisi istologica e immunoistochimica del campione di pazienti in studio ha confermato la diagnosi delle tre entità rare di linfoma primitivo cutaneo prese in considerazione.

Per le entità PC-ENK/T-NT e ENK/T-N tutti i pazienti mostravano un infiltrato di linfociti atipici di medie dimensioni e alcuni linfoblasti, CD2+, CD56+, CD3ε+, CD3-, CD45RO+, granzymeB+, TIA-1+, localizzato nel derma e nell'ipoderma. Si associavano caratteri di angiocentrismo e necrosi coagulativa in 2 casi e la presenza di un infiltrato infiammatorio di istiociti e neutrofili. In tutti i casi studiati la ricerca dell'EBV risultava positiva (EBER+).

I casi selezionati nel gruppo del AECTCL mostravano un infiltrato di linfociti atipici pleomorfi e blasti CD3+, CD8+, CD2-, CD5-, CD7+, CD45RA+, TCR-βF1+, Ki-67+, granzyme-b+, TIA-1+, perforina+, diffuso nel derma a tutto spessore e nell'ipoderma con marcati aspetti di epidermotropismo; si associavano necrosi cheratinocitaria, acantosi e iperplasia dell'epidermide. La ricerca dell'EBV risultava straordinariamente positiva in un caso.

Nei pazienti affetti dal PTCL/NOS pleomorfo CD8+ l'infiltrato si caratterizzava di linfoblasti pleomorfi localizzati nel derma a tutto spessore e nell'ipoderma con focali aree di epidermotropismo; il fenotipo linfocitario era rappresentato da CD4-, CD8+, CD3+, CD45RO+, CD45RA-, CD20-, CD30-, CD56-, TIA-1+, granzymeB +/-, MIB-1+, TCR-1alfa/beta+, EBER-. In base alla morfologia dell'infiltrato si trattava di casi di linfoma primitivo cutaneo pleomorfo a cellule T CD8+ NAS.

E' stato inoltre inserito nello studio un campione controllo di pazienti affetti dalla variante CD8+ della micosi fungoide, caratterizzata istologicamente da un infiltrato di linfociti CD8+, CD4-/+, CD3+, CD45RO+, CD45RA+, CD20-, CD30-, CD5-, CD7-, CD56-, CD68+, CD1a+/-, TIA-1+, MIB-1-/+, nel derma superficiale con marcato epidermotropismo e spongiosi e riarrangiamento monoclonale del TCR.

Il follow-up clinico-strumentale periodico ha evidenziato nei tre gruppi di pazienti una progressione della malattia con coinvolgimento sistemico.

Il primo gruppo si caratterizzava per l'interessamento in pochi mesi di faringe, pancreas e linfadenopatie superficiali in 2 casi con un $PS \geq 2$; tutti i casi sono stati trattati con la chemioterapia e la radioterapia e un caso con terapia antivirale. Nel 40% di questi pazienti si associavano nello stadio avanzato della malattia i sintomi della sindrome leucemica con febbre, astenia, sudorazioni notturne e calo ponderale. La progressione della malattia portava ad exitus con una sopravvivenza media di 12 mesi.

Nel secondo gruppo il 67% dei pazienti presentava un andamento tipicamente aggressivo della malattia con coinvolgimento sistemico generale ed interessamento di testicolo e SNC rispettivamente in 2 casi. I casi affetti da questa patologia sono stati sottoposti a diversi trattamenti immunomodulanti, PUVA, interferone, chemioterapia secondo lo schema CHOP e radioterapia senza particolari risultati ed exitus, con una sopravvivenza media di 27 mesi.

L'andamento clinico dei pazienti affetti dal linfoma primitivo cutaneo pleomorfo NAS era contraddistinto da una prognosi grave, soprattutto in 2 casi che mostravano un coinvolgimento sistemico precoce ed exitus.

I dati ottenuti dallo studio di arrayCGH sui campioni di ogni paziente sono stati analizzati e confrontati tra loro attraverso VAMP (Visualization and Analysis of CGH arrays, transcriptome and other Molecular Profiles), un'interfaccia grafica per la visualizzazione e analisi dei profili di arrayCGH tumorali.

Il metodo da noi utilizzato è FrAGL (Frequency of Amplicon, Gain and Loss), che ottiene le informazioni riguardo alle alterazioni delle regioni cromosomiche lavorando a livello delle sonde; ovvero per ogni sonda, viene calcolata e mostrata l'amplificazione e la delezione in base al dataset.

Le informazioni riguardo le aberrazioni cromosomiche sono state ottenute anche attraverso l'utilizzo del software di analisi DNA Analytics v 4.0 fornito da Agilent Technologies.

Questo sistema permette di evidenziare, per ogni singola sonda oligonucleotidica, la variazione del numero di copie dei geni presenti sui cromosomi. I dati ottenuti da ogni gruppo di pazienti vengono valutati in modo statistico, analizzando ogni alterazioni genetica riscontrata (Tabella 10). L'intento è quello di evidenziare le alterazioni comuni significative, evidenziando le più piccole regioni cromosomiche ricorrenti che contengono alterazioni comuni nell'analisi di ogni gruppo di pazienti, definite come minimal common regions (MCRs).

Fra di esse sono state evidenziate alcune delezioni e amplificazioni, esplicitate dalle seguenti tabelle.

Cromosomi	MCRs PC-ENK/T-NT	MCRs ENK/T-N
1	Amp1q21.2-q23.3 nel 66% Amp1q31.3-q32.1 nel 66% Amp1q32.1-q44 nel 66% Amp1q32.1 nel 100%	
6	Del6q16-qter nel 33%	
7	Amp7q11.22-qter nel 66%	Amp7q11.22-qter
9		Del9p21.3
12		Del12pter-12p11.1 Del12q13.12
17	Del17p13.2-p13.1 nel 66%	

Tabella 8. Alterazioni genetiche MCRs riscontrate nei casi di PC-ENK/T-NT e ENK/T-N

Cromosomi	MCRs AECTCL
1	Del1p36.32-p36.31 nel 33%
7	Amp7p13 nel 33% Amp7p13-p11.2 nel 33% Amp7q11.21-q34 nel 53-73% Amp7q34-q36.3 nel 53-67% Del7q34 nel 40%
8	Del8p in almeno 33% con regioni a 40% e47% Amp8q24 nel 67%
9	Del9p21.3 nel 67%
11	Amp11p15 nel 33% Amp11q13 nel 33%;
16	Amp16p13.3 nel 47%
17	Amp17q in almeno 47% con punte del 67%
19	Amp19p13 nel 33% con p13.3 nel 47% Amp19q13.11-q13.32 nel 33%
20	Amp20q13.33 nel 33%
22	Amp22q11.22 nel 40%
X	AmpXp11.23 nel 27% con una regione nel 33% AmpXq28 nel 40%
Y	DelYp11.2 nel 33%

Tabella 9. Alterazioni genetiche riscontrate nei casi di AECTCL

Cromosomi	MCRs PTCL/NOS pleomorfo CD8+
7	Del7q34 nel 75%
9	Del9p21.3 nel 75%
17	Del17p nel 50% Amp17q11.1-q12 nel 50%
19	Amp19q13 nel 50%
X	AmpXp11.23 nel 50%

Tabella 10. Alterazioni genetiche riscontrate in casi di PTCL/NOS pleomorfo CD8+

Nel gruppo di controllo di pazienti affetti da micosi fungoide sono state evidenziate solo alcune alterazioni, presenti in 2 casi: la delezione di 6q11.1-q16.3 e di 6p12.3-q25.2 e l'amplificazione di 1p13.1.

L'analisi con la GEP è stata applicata solo su 5 pazienti affetti dal AECTCL. L'esiguità del campione studiato è dovuta alla difficoltà di ottenere l'RNA per i microarray dalle cellule tumorali, in pazienti che sono andati precocemente incontro ad exitus. Per poter eseguire questa applicazione è necessario estrarre l'RNA dalle cellule tumorali, che è estremamente degradabile.

Sono state impiegate sezioni di tessuto per estrarre m-RNA che viene convertito in cDNA; il materiale in studio viene ibridizzato su microarray di DNA ed analizzato con l'impiego di fluorocromi. I segnali fluorescenti vengono trasformati logaritmicamente e studiati statisticamente; il valore che corrisponde al rapporto 1 viene assunto come zero, in modo da poter paragonare i valori up- e down-regolati.

I pazienti che sono stati sottoposti a questa analisi presentavano un cluster ben distinto. Sono stati quindi valutati i singoli profili di espressione confrontandoli con l'RNA estratto da un pool di cellule commerciali (reference), comprendente diverse linee cellulari.

I risultati ottenuti sono riportati nella seguente tabella, evidenziando in rosso le delezioni ed in verde le amplificazioni cromosomiche.

Gene Name	Chromosome	CD8 Agg	CD8 Agg	CD8 Agg	CD8 Agg	CD8 Agg	Mean CD8
BIRC5	Chr17	1,409524	1,7978	1,635141	2,200254	0,095088	1,427562
CD8A	Chr2	2,29072	0,364375	4,146317	-0,02436	0,388162	1,433043
CDKN2A	Chr9	-1,32863	-0,4371	-1,65313	-0,10377	-2,18634	-1,14179
GZMA	Chr5	1,712966	0,379424	6,156562	0,071926	1,639794	1,992134
GZMB	Chr14	2,38911	0,450032	6,555781	2,075481	0,779978	2,450077
GZMH	Chr14	2,231467	0,602933	3,900225	0,32646	0,300712	1,472359
ICAM2	Chr17	1,281552	-0,0903	2,139057	0,188567	1,461148	0,996006
JAK3	Chr19	2,49049	0,003754	3,435882	3,682361	3,342975	2,591092
JUND	Chr19	1,65725	0,611304	2,033023	1,17579	2,487676	1,593009
RELB	Chr19	1,699466	0,618606	2,550107	1,157744	1,947153	1,594615
STAT6	Chr12	1,653224	-0,62782	1,360766	-0,20457	1,683235	0,772966

Tabella 11. Espressione genica in AECTCL

DISCUSSIONE

I CTCL che abbiamo incluso nel nostro studio presentano caratteristiche clinico-prognostiche corrispondenti con quanto conosciamo dalla letteratura, confermando la loro particolare aggressività. Il riscontro dell'EBV è caratteristico della patogenesi del ENK/T-NT e di altri linfomi, come l'hydroa vacciniforme ma non dei CTCL che abbiamo esaminato. Appare pertanto eccezionale la presenza dell'EBV in un caso di AECTCL. Alcuni reports hanno identificato che l'EBV possa essere espresso inusualmente anche in altri linfomi, dove avrebbe un impatto notevolmente negativo sulla prognosi.⁵¹⁻⁵³

L'EBV potrebbe quindi influenzare l'andamento clinico di queste entità, determinandone in parte l'aggressività.

L'obiettivo della nostra analisi verte sulla valutazione delle aree delete o amplificate presenti su ogni cromosoma in tutti i gruppi di linfoma studiati.

Il nostro intento è quello di identificare e selezionare dei geni potenzialmente importanti nella linfomagenesi, partendo dal presupposto che in letteratura sono state evidenziate alterazioni genetiche correlate alla patogenesi tumorale e riguardanti l'apoptosi, il ciclo cellulare, i fattori di trascrizione, il DNA repair, i fattori di crescita e differenziazione, gli oncogeni e oncosoppressori, i fattori dell'infiammazione e le citochine, la linea linfoide, i microRNA, le metalloproteasi, l'angiogenesi e le heat shock proteins.

Gli studi finora pubblicati si riferiscono principalmente ai linfomi cutanei più frequenti, come la micosi fungoide e la sindrome di Sezary. Inoltre, recenti reports hanno visto l'applicazione di metodiche di analisi molecolare per la valutazione di possibili alterazioni genetiche presenti nei CTCLs più rari e meno noti.

L'analisi molecolare ha evidenziato aberrazioni che interessano un gran numero di cromosomi e che possono essere determinanti non solo nell'induzione e nella patogenesi tumorale ma anche nella prognosi.^{11,15,54-58}

La nostra analisi mette in evidenza un'alterazione comune fra le entità studiate, la delezione di 9p21.3. In questa regione sono contenuti alcuni geni oncosoppressori, p16 (INK4a-CDKN2A), p15 (INK4b-CDKN2B) e p14 (ARF), che vengono inattivati.⁵⁹⁻⁶⁰ I prodotti di questi geni sono proteine kinasi-dipendenti che inibiscono la loro attività e la fosforilazione di pRb. Questo meccanismo ha una funzione importante nella progressione del ciclo cellulare, permettendo alla cellula di superare il ciclo cellulare in fase S e alla fine della fase G1. Molti tumori, leucemie e linfomi presentano tale delezione e nella micosi fungoide è stata riscontrata già in fase iniziale.^{58,61} Pertanto potrebbe essere rappresentativa della patogenesi iniziale dei linfomi inclusi nel nostro studio.

Altre aberrazioni cromosomiche appaiono significative nel nostro studio, essendo presenti in almeno due gruppi di linfoma, quali l'amplificazione di 7q, la delezione di 7q34, la delezione di 17p, l'amplificazione di 17q e l'amplificazione di 19q13.11-q13.32.

Le anomalie che coinvolgono il braccio lungo del cromosoma 7 sono raramente descritte in casi di CTCLs. In questa regione sono contenuti alcuni geni che codificano per i recettori dei linfociti T (OTSCR, locus del TCR beta) e l'ipoespressione di queste proteine è stata evidenziata in altri linfomi a cellule T che non coinvolgono la cute.⁶² Alcuni reports hanno evidenziato alterazioni poco note che interessano questo cromosoma e nella micosi fungoide sembrano influire su un peggioramento della prognosi.⁵⁸

La delezione del 17p ed in particolare della regione 17p13.3-p13.1 è legata alla perdita di espressione dei geni TP53, RPA1, HIC1. Normalmente TP53 inibisce l'espletamento dell'azione oncogena del c-MYC, HIC1 interviene nel bloccare l'evento tumorale, reprimendo SIRT1 e inibendo la deacetilazione di TP53, mentre RPA1 controlla la stabilità cromosomiale. Questi geni lavorano in sinergia nel reprimere l'induzione tumorale ma, quando sono alterati, viene indotta una instabilità cromosomica e genomica.^{55,57}

Questa alterazione è stata segnalata in alcuni carcinomi, leucemie e linfomi ed è stata già ampiamente descritta in casi di micosi fungoide e sindrome di Sezary in stadio iniziale.^{58,62}

L'amplificazione del braccio lungo del cromosoma 17 (**17q**) contiene alcuni geni molto noti per il loro ruolo nel processo tumorale. Si tratta di STAT3, ERBB2, NIK (MAP3K14), RPS6KB1, PRKCA, CCR10, BIRC5, MIRN21, LIMD2, CDK3 e SEPT9, che spesso influenzano l'attività dei linfociti neoplastici.⁵⁷

La presenza di questa alterazione in più del 50% dei pazienti affetti da AECTCL e da PTCL/NOS pleomorfo CD8+ potrebbe far ipotizzare che questi geni abbiano un ruolo patogenetico in queste entità.

La maggior parte di essi codifica alcune chinasi che fosforilano una grande quantità di proteine coinvolte in diversi signaling pathways. Partecipano a numerosi processi cellulari, come l'adesione cellulare e l'avanzamento del ciclo cellulare, hanno funzioni anti-apoptotiche e sono pertanto in grado di influenzare la progressione nel ciclo cellulare e la trascrizione genica.⁶³

In particolare, NIK ha una azione mirata nell'induzione di un processo alternativo di attivazione di NF-kB, un fattore di trascrizione, e sembra essere influenzato dalla stimolazione di alcuni membri della famiglia del TNF, come CD40, lymphotoxin-β, B-cell-

activating factor e LIGHT, che avrebbero un ruolo nell'iperplasia linfocitica, nella trasformazione cellulare e nell'apoptosi.⁶⁴⁻⁶⁶

Invece, PCKA sembra essere implicato nel meccanismo di amplificazione del TCR, poiché agisce nel signaling pathway di CD3/CD28 durante la tarda fase di attivazione del TCR nei linfociti T, che porta all'attivazione del complesso IKK e di NF- κ B.⁶⁷

STAT3 è un fattore di trascrizione che coopera con JAK ed è in grado di indurre la progressione del ciclo cellulare, prevenire l'apoptosi e promuovere alcuni oncogeni, come c-myc e bcl-X, intervenendo direttamente nel processo di oncogenesi.⁶⁸

CCR10 codifica per un recettore delle chemochine, che insieme alle citochine sembra avere un ruolo cruciale nell'homing delle cellule T memory effettrici verso la cute. Alcuni autori hanno evidenziato la sua espressione sui linfociti T neoplastici nella micosi fungoide e nella sindrome di Sezary, influenzando il processo di epidermotropismo e la progressione già nella fase precoce.⁶⁹⁻⁷¹ Numerosi studi hanno dimostrato che queste molecole sono coinvolte nei processi di metastasi tumorale, invasione dei vasi linfatici e probabilmente nello spostamento delle cellule linfomatoidi.⁷²

BIRC5 codifica per una proteina anti-apototica espressa in numerosi tumori. Alcuni studi sono stati eseguiti con l'intento di bloccare questa proteina attraverso l'utilizzo di Vitamina D e di Avicina D e la considerano un valido target molecolare di terapia.⁷³

La **regione 19q**, insieme al **19p**, presenta numerosi geni molto importanti nell'induzione tumorale, rappresentati da BCL3, ICAMs, JAK3, JUNB, JUND, KIR3DL2, LYL1, AKT2, MUM1, RELB. Molti di essi sono proto-oncogeni e determinano con diverse modalità la regolazione, la differenziazione e la proliferazione cellulare.

Sembrano direttamente correlati alla patogenesi della micosi fungoide, della sindrome di Sezary e di altri CTCLs e CBCLs. Queste evidenze giustificherebbero un possibile ruolo patogenetico nel AECTCL e nel PTCL/NOS pleomorfo CD8+.

BCL3 ha funzioni anti-apoptotiche nei linfociti T e B ed è stato descritto anche in forme aggressive di linfomi cutanei, come i linfomi a grandi cellule anaplastici. La derivazione delle cellule tumorali dei linfomi anaplastici da cellule citotossiche, come nel caso del AECTCL, potrebbe farci pensare che ci possa essere un meccanismo comune ai due processi linfoproliferativi.⁷⁴

ICAMs codifica per molecole di adesione presenti sugli endotelioцитi che si legano alle integrine alfa L ed M (ITGAL o CD11a e ITGAM o CD11b rispettivamente) e possono interagire con l'antigene linfocitario LFA-1 favorendo l'homing dei linfociti verso la cute.

Alcuni studi hanno dimostrato un aumento di espressione di questa molecola negli endotelioцитi dei vasi dermici in pazienti affetti da linfomi cutanei suggerendo un ruolo importante di ICAM3.⁷⁵

JAK3, citato prima insieme a STAT, è rappresentativo dello JAK/STAT signaling pathway. Alterazioni che attivano costituzionalmente questa via sono state descritte in varie forme di tumori, soprattutto nelle malattie mieloproliferative, verso le quali viene considerato come un possibile target terapeutico. JAK, legato ai domini intracitoplasmatici dei recettori delle citochine, va incontro a fosforilazione e attivazione con induzione della cascata JAK/STAT; questo meccanismo viene mantenuto nelle cellule neoplastiche, inducendo così uno stimolo proliferativo non controllato. In particolare, JAK3 si lega in modo specifico al recettore della IL2, inducendo la trascrizione di geni che codificano per cicline coinvolte nella transizione G1-S.⁷⁶

JUNB e JUND, due fattori di trascrizione AP-1, modulano l'espressione di molti geni e sono coinvolti nel processo di linfomagenesi; l'overespressione nei linfomi cutanei è legata all'attivazione costitutiva del pathway di ERK1/2 MAPK.⁷⁷

KIR3DL2 codifica per un recettore espresso dalle cellule NK e da un subset citotossico di cellule T. Questa molecola è universalmente riconosciuta come marker delle cellule T maligne ed è utilizzato per l'identificazione delle cellule di Sézary nella sindrome di Sézary.⁷⁸

LYL1 e AKT2 sono meno noti e sembrano influenzare la formazione di linfomi T e B, promuovendo la sopravvivenza cellulare e probabilmente provocando instabilità genomica e causando alterazioni cromosomiche.

MUM1/IRF4 (interferon regulatory factor 4) è un fattore di trascrizione che regola l'espressione genica in risposta agli stimoli degli interferons e di altre citochine. Questa proteina è espressa da linfociti B, plasmacellule e da un subset di linfociti T attivati e sembra essere coinvolto nella differenziazione delle cellule linfoidi, in particolare nella produzione delle plasmacellule. E' stata riconosciuta la presenza di MUM1 in molti CBCLs, come il linfoma linfoplasmocitoide, i linfomi B a grandi cellule diffusi e quelli della zona marginale, ed in alcuni CTCLs, in particolare nella fase tumorale di micosi fungoide, sindrome di Sézary e papulosi linfomatoide nelle sue varianti A e C.⁷⁹

RELB, un fattore di trascrizione, è legato all'attivazione del NF-kB signaling pathway ed è in grado di attivare geni coinvolti nella sopravvivenza cellulare, nella proliferazione, nell'angiogenesi e nell'invasione. Questo meccanismo è descritto in molte leucemie e

linfomi, tra i quali il linfoma di Hodgkin's, la leucemia linfoblastica acuta, T-ALL e alcuni linfomi cutanei.⁸⁰

I risultati del nostro studio mettono in evidenza inoltre altre aberrazioni cromosomiche specifiche per ogni linfoma analizzato.

Nel gruppo di PC-ENK/T-NT e ENK/T-N abbiamo riscontrato le stesse alterazioni cromosomiche descritte in letteratura in pazienti affetti da leucemia a cellule NK; molti autori sostengono che vi siano delle analogie dal punto di vista molecolare fra la leucemia a cellule NK e ENK/T-NT senza fare una netta distinzione fra di esse. In particolare, le delezioni di **7p** e di **17p13.1** sono state definite come possibili responsabili della tumorigenesi della leucemia a cellule NK, mentre la delezione di **6q** sembra correlata a ENK/T-NT.⁸¹

Gli oncosoppressori codificati nella regione **6q** sono stati già evidenziati in alcuni linfomi,⁸¹ ma il frequente riscontro di questa delezione nel PC-ENK/T-NT farebbe pensare che siano coinvolti oncosoppressori differenti.⁸²

Le aberrazioni riscontrate sul braccio lungo del cromosoma 1 corrispondono a quanto riportato per altri CTCLs e la leucemia a cellule NK, anche se si tratta principalmente di delezioni.⁵⁷ L'amplificazione di **1q21-q22** sembra assumere un significato particolare nella patogenesi e nella progressione della micosi fungoide e di altri CTCLs più aggressivi e potrebbe assumerlo in questa entità, considerata la prognosi particolarmente grave. Questa regione presenta alcuni geni, fra cui MCL1 che ha una funzione antiapoptotica e regolerebbe la resistenza alla terapia steroidea.⁸³

Per quanto concerne il cromosoma **12**, aree di delezione sono state dimostrate nei CTCLs.⁵⁸ Nel braccio lungo sono contenuti alcuni geni oncosoppressori, NAV3, BCL7a, SMAC/DIABLO, RHOF, che sono stati correlati alla fase iniziale della micosi fungoide e ad alcuni linfomi T e B.⁵⁶

Nei casi affetti da AECTCL abbiamo riscontrato altre regioni cromosomiche alterate, anch'esse in parte già descritte in letteratura.

La delezione della regione **1p36** è stata precedentemente riscontrata nella micosi fungoide e nella sindrome di Sezary,⁸³ oltre che in numerosi tumori e potrebbe partecipare all'induzione di questa entità.^{81,84} I geni coinvolti sono principalmente oncosoppressori, quali BRCD2, MOM1/PLSG2, CDC2L1, DAN, TNFR2, ID2, P73, P18, TAL-1, BCL10 e

MTS1/SA1/TFS1. Fra di essi il gene TNFRSF8 rappresenta il recettore del TNF che è espresso dai linfociti T e B attivati.⁵⁸

In letteratura è riconosciuta l'amplificazione del braccio lungo del cromosoma 8, mentre è meno nota la delezione di **8p**. L'amplificazione di 8q determina l'iperespressione di numerosi oncogeni che sembrano coinvolti nella patogenesi dei CTCLs, ma il ruolo che hanno in queste malattie rimane da chiarire.⁵⁸

La regione **8q24** contiene il noto gene c-MYC, che ha un notevole potenziale tumorigenico. Codifica per una proteina che interviene sulla regolazione dell'apoptosi indotta dal legame di BIM con il citocromo c; per espletare questo meccanismo interagisce con MAX, che viene a sua volta controllato da due molecole, MNT e MXI1. L'iperespressione di c-MYC pertanto promuove la proliferazione cellulare, inibisce la differenziazione ed induce una maggiore instabilità genomica. Collabora inoltre con altri geni, tra i quali i sopracitati TP53 e p14ARF, nell'induzione dei linfomi.^{55,83}

Nel braccio lungo del cromosoma **11** sono presenti i seguenti geni: CCND1, MAPK311, RELA.

Codificano per proteine appartenenti alle famiglie delle kinasi e delle cicline che sono coinvolti nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare. L'iperespressione del locus CCND1/BCL1 è stata riportata in alcuni CTCLs e nella sindrome di Sezary. CCND1 forma il complesso CCND1/CDK4-6 che è largamente coinvolto nella proliferazione dei linfociti normali e neoplastici, poiché influisce sulla regolazione del ciclo cellulare per la fosforilazione della proteina Rb, che rilascia il fattore di trascrizione E2F e permette l'espressione dei geni target.⁸⁵ La regolazione di CCND1 dipende dal NFκ pathway e da JUNB.⁸⁴

MAPK311 e RELA (p65) rappresentano in letteratura importanti target terapeutici tumorali. Il primo è coinvolto nell'attivazione del JAK/STAT, mentre il secondo forma il NFκB attivo. L'overespressione di RELA è stata descritta in alcune neoplasie linfomatose e recentemente nel linfoma cutaneo a cellule NK-T.⁸⁶

L'amplificazione della regione **16p13.3** comprende i geni IL21R, CCNF, MAPK3, PDPK1, che assumerebbero un ruolo rilevante quando sono iperespressi, anche nel gruppo di AECL.

Le funzioni principali sono legate alla regolazione, alla proliferazione, alla differenziazione e alla progressione del ciclo cellulare.

IL21R, recettore dell'interleuchina 21, induce la trasduzione del segnale dell'IL21 e incide sul differenziamento dei linfociti T e B e delle cellule NK. Questo meccanismo avviene perché questo complesso induce l'attivazione del pathway JAK/STAT, in particolare JAK3 e STAT3/STAT5. L'overespressione di IL12 e del suo recettore è stata segnalata in diversi tipi di linfoma come, ad esempio, nel linfoma di Hodgkin, nei linfomi B follicolari, nell'anaplastico a grandi cellule ALK+.⁸⁷

CCNF appartiene alla famiglia delle cicline che legano le chinasi ciclina-dipendenti; non è molto descritta e non sembra essere di fondamentale importanza nella regolazione della proliferazione cellulare.

MAPK3/ERK1 è una MAP chinasi che regola diversi processi cellulari come la proliferazione, la differenziazione, la progressione del ciclo cellulare. L'amplificazione di MAPK3/ERK1 sembra essere coinvolto nella patogenesi tumorale, poiché induce l'attivazione di alcuni geni, come MYC o JUNB.⁷⁷

PDPK1 (PDK1) media l'attivazione di NF- κ B,⁸⁸ meccanismo già citato come possibile responsabile nei nostri pazienti, e regola una serie di famiglie di protein chinasi, come le AKT, le PKC e le SGK, implicate nei processi proliferativi, differenziativi e anti-apoptotici di molti tumori. In particolare, AKT2 viene codificato nel cromosoma 19 che risulta amplificato nei nostri pazienti. Le alterazioni che interessano le regioni 20q13.33, 22q11.22, Xp11.23, Xq28 e Yp11.2 sono state segnalate sporadicamente nei tumori solidi e nelle neoplasie ematologiche ma finora non vi è alcuna correlazione con i PCL.⁸⁹⁻⁹²

Nella regione **Xp11.23** viene codificato il gene RBM10, che sembra correlato alla regolazione del fenomeno apoptotico e della proliferazione delle cellule tumorali.⁹³⁻⁹⁵

Le regioni **Xq28** e **Yp11.2** codificano rispettivamente i geni MTCP1 e TSPY, dei quali non si conosce bene la funzione. Il gene MTCP1, overespresso in alcune leucemie a cellule T, codifica per la proteina p13, mentre per quanto riguarda il gene TSPY non è chiaro come intervenga nella tumorigenesi e nella progressione tumorale.⁹⁶

Il gruppo dei PTCL/NOS pleomorfi CD8+ presenta una serie di aberrazioni che coincidono per la maggior parte con AECTCL.

Questo comporterebbe che i possibili meccanismi alla base di questa entità siano legati principalmente al JAK/STAT signaling pathway e alla perdita di espressione degli oncosoppressori p14, p15, p16 e del TCR beta.

Abbiamo riscontrato delle analogie fra le due entità già nella valutazione dell'andamento clinico, poiché due pazienti affetti da PTCL/NOS pleomorfo hanno presentato un comportamento della malattia molto aggressivo ed exitus precoce. Inoltre, in questi due casi sono state riscontrate tutte le aberrazioni descritte per i PTCL/NOS pleomorfi.

In letteratura, il riscontro di numerose alterazioni genetiche nei PTCL/NOS (amplificazione delle regioni 7q, 8q, 17q e 22q e delezione delle regioni 4q, 5q, 6q, 9p, 10q, 12q e 13) giustificerebbe l'andamento prevalentemente aggressivo di queste entità.

Rispetto alle entità appena discusse, l'analisi dei dati ottenuti dai casi di micosi fungoide si distingue per l'esiguità delle aberrazioni, che peraltro interessano meno del 30% del campione in esame. Le delezioni delle regioni 6q11.1-q16.3 e 6p12.3-q25.2 e l'amplificazione della regione 1p13.1 non risultano significative nella patogenesi dei PCL e si conosce molto poco riguardo al loro ruolo genetico. Le aberrazioni del cromosoma 6 sono state segnalate sporadicamente nei linfomi e sembrano codificare per alcuni oncosoppressori non meglio precisati.⁹⁷

Si può quindi sostenere che nella micosi fungoide in fase iniziale siano poche le alterazioni cromosomiche presenti e solo quando si parla di fase tumorale o nel caso di CTCL maggiormente aggressivi il numero di aberrazioni riscontrabili è più elevato, facendo presupporre che il numero degli sbilanciamenti cromosomici possa essere legato all'aggressività dei CTCLs.

Nel nostro studio, abbiamo inoltre osservato la presenza di alcuni geni nuovi per i CTCLs, che potrebbero assumere pertanto un ruolo significativo nella valutazione della linfomagenesi oltre che nella prognosi.

I risultati ottenuti dalla GEP sono preliminari ma possono darci una stima relativa al gruppo del AECTCL.

Dall'analisi statistica differenziale tra i livelli di espressione nei pazienti affetti da AECTCL e quelli nei pazienti affetti da altri linfomi primitivi cutanei, utilizzati come controlli, abbiamo individuato 11 geni espressi in modo diverso tra i due gruppi fissato un intervallo di confidenza pari all'1% ($p < 0.001$). L'analisi dei singoli profili di espressione di ogni paziente ha permesso di selezionare geni considerati up/down-regolati in almeno il 60% del gruppo di AECTCL, evidenziando alcuni geni, di seguito riportati, che potrebbero essere imputabili nel processo di linfomagenesi.

CDKN2A (9p21) codifica per una proteina che inibisce la formazione del complesso Ciclina D/Cdk4, impedendo l'avanzamento del ciclo cellulare oltre la fase G1/S (vedi sopra e Tavola 2). La ridotta espressione di questo gene è stata descritta in numerosi tumori, sostenendo che CDKN2A giochi un ruolo fondamentale nel processo di oncogenesi.⁵⁹⁻⁶⁰

JAK3 (19p13.1) e **STAT6** (12q13) determinano il JAK/STAT signaling pathway, importante per la trascrizione di geni che regolano la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione di diversi tipi di cellule. Alterazioni che attivano costituzionalmente questa via sono state descritte in varie forme di tumori, soprattutto nelle malattie mieloproliferative, tanto da essere considerato come possibile target per la terapia anti-tumorale. Come già descritto in precedenza, questo complesso dipende dal legame di JAK ai domini intracitoplasmatici dei recettori delle citochine. Pertanto JAK si attiva per fosforilazione dei residui tirosinici e questo segnale attivatore viene tradotto alle proteine della famiglia STAT, che dimerizzano, si spostano nel nucleo e regolano l'espressione dei geni target. Nelle cellule neoplastiche la cascata JAK/STAT viene attivata in modo permanente, inducendo così uno stimolo proliferativo non controllato. In particolare, JAK3 si lega in modo specifico al recettore della IL-2, invece la cascata di segnale che coinvolge STAT6 è promossa da IL-4 e sembra che l'attivazione di questa particolare via rende le cellule resistenti all'apoptosi ed è maggiormente correlata alla formazione di metastasi aggressive.⁷⁶

GZMA (5q11-q12), **GZMB** (14q11.2), **GZMH** (14q11.2), codificano per diverse isoforme di Granzyme, granuli citoplasmatici proapoptotici presenti nei linfociti T CD8+, che vengono espressi solo dopo attivazione linfocitaria. Dai risultati di GEP questi geni appaiono overespressi e ciò conferma la teoria che i linfociti CD8+ neoplastici che determinano la patologia presa in esame siano attivati.

CONCLUSIONE

Lo studio molecolare di forme aggressive di CTCL fornisce risultati utili nella valutazione dei meccanismi genetici alla base della linfomagenesi.

Numerosi studi si sono susseguiti sull'applicazione delle tecniche di array-CGH e GEP nella micosi fungoide e nella sindrome di Sezary, determinando una serie di alterazioni genetiche strutturali e numeriche relative al processo di linfomagenesi o alla progressione tumorale. Le informazioni riguardanti gli sbilanciamenti cromosomici sui CTCL sono comunque esigue rispetto a quanto si conosce di altri tumori.

Tra di esse, hanno assunto un ruolo significativo l'attivazione del JAK/STAT signaling pathway e della via antiapoptotica del TNF e l'inattivazione di CDKN2A e di PTEN. Inoltre, alterazioni genetiche non specifiche sono rappresentate dal riarrangiamento di MYC, CCND1 o BCL2 o dalla mutazione del JAK2, mentre altre alterazioni rappresentano fattori prognostici specifici, come la mutazione di TP53 o FLT3-ITD.

Gli studi più recenti si sono rivolti ad approfondire le entità meno note dei CTCLs e dei PTCL/NOS, accomunati da un decorso particolarmente aggressivo.

L'applicazione della CGH è in grado di riscontrare un numero di aberrazioni maggiori rispetto alla citogenetica tradizionale ma ha un limite relativo alla impossibilità di riscontrare le traslocazioni, molto comuni nei linfomi.

Nel nostro studio abbiamo evidenziato numerose alterazioni genetiche note nei CTCLs ed altre aberrazioni che sembrano essere coinvolte in modo distinto fra le entità studiate e sono correlate all'inibizione di specifici oncosoppressori.

Le aberrazioni riconosciute finora possono rappresentare un valido aiuto nel capire la patogenesi di questi linfomi e nell'identificazione di nuovi target terapeutici.

I dati ottenuti sono comunque preliminari ed è necessario proseguire con l'applicazione della GEP e di ulteriori indagini genetiche come l'analisi dei miRNA e il sequenziamento genomico (whole-genome sequencing). L'analisi dei miRNA consente di evidenziare minime alterazioni geniche utilizzando l'RNA estratto dal tessuto, mentre il sequenziamento genomico è una tecnica di recente acquisizione che sequenzia l'intero genoma ed evidenzia qualsiasi anomalia genetica presente (incluse le traslocazioni). Un'ulteriore tecnica prevede il sequenziamento di una piccola parte del genoma (exome sequencing) selezionata per la valutazione di specifiche regioni contenenti geni e miRNA di interesse. Attualmente queste tecniche hanno il limite di essere piuttosto costose e devono essere applicate in modo selettivo per approfondire entità sconosciute.

L'obiettivo di questi studi verte sull'acquisizione di nuovi dati che consentano una maggiore correlazione fra caratteristiche cliniche, molecolari e citogenetiche delle varie entità clinico-patologiche, sia per quanto riguarda i linfomi cutanei sia nel caso dei tumori cutanei in toto. Tale approccio è significativo in particolare per individuare precocemente le patologie cutanee a prognosi sfavorevole, per definire "pathways" patogenetici specifici per le varie entità cliniche riconosciute e identificare eventuali fattori prognostico-terapeutici.

L'applicazione routinaria delle metodiche di analisi molecolare per la valutazione del profilo genico, come i microarrays, rappresenterebbe nel futuro parte del percorso diagnostico dei PCL.

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. Hafeez D, Doina I. CD8-positive mycosis fungoides and primary cutaneous aggressive epidermotropic CD8-positive cytotoxic T-cell lymphoma. *J Cutan Pathol* 2009;36:390-392.

23. Nikolau VA, Papadavid E, Katsambas A, Stratigos AJ, Marinos L, Anagnostou D, Antoniou C. Clinical characteristics and course of CD8+ cytotoxic variant of mycosis fungoides: a case series of seven patients. *Br J Dermatol* 2009;161:826-830.
24. Geraud C, Goerdts S, Klemke CD. Primary cutaneous CD8+ small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma, ear-type: a unique cutaneous T-cell lymphoma with a favourable prognosis. *BJD* 2011;164:452-461.
25. Robson A. Immunocytochemistry and the diagnosis of cutaneous lymphoma. *Histopathol* 2010;56:71-90.
26. Hagiwara M, Takata K, Shimoyama Y, Yamamoto K, Takahashi E, Asano N, Iwase Y, Okazaki Y, Tamada Y, Yoshino T, Tomita Y, Nakamura S. Primary cutaneous T-cell lymphoma of unspecified type with cytotoxic phenotype: clinicopathological analysis of 27 patients. *Cancer Sci* 2009;100(1):33-41.
27. Choi YL, Park JH, Namkung JH, Lee JH, Yang JM, Lee ES, Lee DY, Jang KT, Ko YH. Extranodal NK/T-cell lymphoma with cutaneous involvement: 'nasal' vs. 'nasal-type' subgroups-a retrospective study of 18 patients. *Br J Dermatol* 2009;160(2):333-337.
28. Ng SB, Lai KW, Murugaya S, Lee KM, Loong SL, Fook-Chong S, Tao M, Sng I. Nasal-type extranodal natural-killer/T-cell lymphomas: a clinicopathologic and genotypic study of 42 cases in Singapore. *Mod Pathol* 2004;17(9):1097-1107.
29. Schwartz EJ, Molina-Kirsch H, Zhao S, Marinelli RJ, Warnke RA, Natkunam Y. Immunohistochemical characterization of nasal-type extranodal NK/T-cell lymphoma using a tissue microarray: an analysis of 84 cases. *Am J Clin Pathol* 2008;130(3):343-351.
30. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL. World Health Organization classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008:285-288.
31. Berti E, Recalcati S, Girgenti V, Fanoni D, Venegoni L, Vezzoli P. Cutaneous extranodal NK/T-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 5 patients with array-based comparative genomic hybridization. *Blood* 2010;116:165-170.
32. Kim K, Chie EK, Kim CW, Kim IH, Park CI. Treatment outcome of angiocentric T-cell and NK/T-cell lymphoma, nasal type: radiotherapy versus chemoradiotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35(1):1-5.

33. Okamura T, Kishimoto T, Inoue M, Honda M, Yamashita N, Wakiguchi H, Yagita M, Hosoi G, Sako M, Yasui M, Yagi K, Kawa K. Unrelated bone marrow transplantation for Epstein-Barr virus-associated T/NK-cell lymphoproliferative disease. *Bone Marrow Transplant* 2003;31(2):105-111.
34. Jensen JR, Thestrup-Pedersen K. Subpopulations of T lymphocytes in a patient with fulminant mycosis fungoides. *Acta Derm Venereol.* 1980, 60: 159-161.
35. Bennett SR, Greer JP, Stein RS, Glick AD, Cousar JB, Collins RD. Death due to splenic rupture in suppressor cell mycosis fungoides: a case report. *Am J Clin Pathol.* 1984, 82: 104-109.
36. Quarterman MJ, Leshner JL, Davis LS, Pantazis CG, Mullins S. Rapidly progressive CD8-positive cutaneous T-cell lymphoma with tongue involvement. *Am J Dermatopathol.* 1995, 17:287-291.
37. Berti E, Tomasini D, Vermeer MH, Meijer CJ, Alessi E, Willemze R. Primary cutaneous CD8-positive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma: a distinct clinicopathologic entity with an aggressive clinical behavior. *Am J Pathol.* 1999, 155:483-492.
38. Ito Y, Goto M, Hatano Y, Kawamoto M, Ohishi M, Takayasu S, Katagiri K, Fujiwara S. Epidermotropic CD8+ cytotoxic T-cell lymphoma exhibiting a transition from the indolent to the aggressive phase, accompanied by emergence of CD7+ cells and formation of neutrophilic pustules. *Clin Exp Dermatol* 2011 Aug 25;doi:10.1111/j.1365-2230.2011.04160.x. [Epub ahead of print]
39. Webber NK, Goldsmith P, Cerio R, Wells P, Kazmi M, Russell-Jones MR, Morris S, Robson A. Aggressive epidermotropic cutaneous CD8+ (Berti's) lymphoma. *Clin Exp Dermatol* 2010;35:210-212.
40. Lu D, Patel KA, Duvic M et al. Clinical and pathological spectrum of CD8-positive cutaneous T-cell lymphomas. *J. Cutan Pathol* 2002;29:465-472.
41. Burg G, Kempf W, Cozzio A et al. WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas 2005: histological and molecular aspects. *J Cutan Pathol* 2005;32:647-674.
42. Marzano A.V, Ghislanzoni M, Gianelli U, Alessi e, Berti E. Fatal CD8+ epidermotropic cytotoxic primary cutaneous T-cell lymphoma with multiorgan involvement. *Dermatology* 2005;211:281-285.

43. Yoshizawa N, Yagi H, Horibe T et al. Primary cutaneous aggressive epidermotropic CD8+ T-cell lymphoma with a CD15+CD30- phenotype. *Eur J Dermatol* 2007;17:441-442.
44. Gopaluni S, Perzova R, Abbott L. CD8+ cutaneous T-cell lymphoma successfully treated with bexarotene: a case report and review of the literature. *Am J Hematol* 2008;83(9):744-6.
45. Kamstrup M, Gniadecki R. Bexarotene monotherapy for epidermotropic CD8+ CTCL. *Dermatol Clin* 2008;26(1):45-7.
46. Williams VL, Torres-Cabala CA, Duvic M. Primary cutaneous small- to medium-sized CD4+ pleomorphic T-cell lymphoma: a retrospective case series and review of the provisional cutaneous lymphoma category. *Am J Clin Dermatol* 2011;12(6):389-401.
47. Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J. et al. Deletions below 10 megabase pairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Gene Chromosomes Cancer* 1999;25:410-3.
48. Oostlander A.E, Meijer G.A, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its application in human genetics. *Clin Genet* 2004;66:488-65.
49. Freeman W.M, Robertson D.J et al. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques* 2000;29:1042.
50. Wong M.L, Medrano J.F. Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* 2005;39:75-85.
51. Novelli M, Merlino C, Ponti R, Bergallo M, Quaglino P, Cambieri I, Comessatti A, Sidoti F, Costa C, Corino D, Cavallo R, Ponzi AN, Fierro MT, Bernengo MG. Epstein-Barr virus in cutaneous T-cell lymphomas: evaluation of the viral presence and significance in skin and peripheral blood. *J Invest Dermatol* 2009;129(6):1556-61.
52. Caudron A, Bouaziz JD, Battistella M, Sibon D, Lok C, Leclech C, Ortonne N, Molinier-Frenkel V, Bagot M. Two atypical cases of cutaneous gamma/delta T-cell lymphomas. *Dermatology* 2011;222(4):297-303.
53. Pan ST, Chang WS, Murphy M, Martinez A, Chuang SS. Cutaneous peripheral T-cell lymphoma of cytotoxic phenotype mimicking extranodal NK/T-cell lymphoma. *Am J Dermatopathol* 2011;33(2):e17-20.

54. Hwang S.T, Janik J.E, Jaffe E.S, Wilson W.H. Mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Lancet* 2008;371:945-957.
55. Vermeer M.H, van Doorn R, Dijkman R. Novel and highly recurrent chromosomal alterations in Sezary Syndrome. *Cancer Res* 2008;68:2689-2698.
56. Carbone A, Bernardini L, Valenzano F, Bottillo I, De Simone C, Capizzi R, Capalbo A, Romano F, Novelli A, Dallapiccola B, Amerio P. Array-based comparative genomic hybridization in early-stage mycosis fungoides: recurrent deletion of tumor suppressor genes BCL7A, SMAC/DIABLO, and RHOF. *Genes, chromosomes & cancer* 2008;47:1067-1075.
57. Mao X, Lillington D, Scarisbrick J.J. et al. Molecular cytogenetic analysis of cutaneous T-cell lymphoma: identification of common genetic alteration in Sezary syndrome and mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 2002;147(3):464-75.
58. Prochazkova M, Chevret E, Mainhaguet G, et al. Common chromosomal abnormalities in mycosis fungoides transformation. *Genes, chromosomes & cancer* 2007;46:828-838.
59. Scarisbrick J.J, Woolford A.J, Calonje E. Frequent abnormalities of the p15 e p16 genes in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *J Invest Dermatol* 2002;118:493-499.
60. Laharanne E, Chevret E, Idrissi Y, Gentil C, Longy M, Ferrer J, Dubus P, Jouary T, Vergier B, Beylot-Barry M, Merlio JP. CDKN2A-CDKN2B deletion defines an aggressive subset of cutaneous T-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2010;23:547-558.
61. Sharpless N.E, DePinho R.A. The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:22-30.
62. Fischer TC, Gellrich S, Muche JM, Sherev T, Audring H, Meitzel H, Walden P, Sterry W, Tonnies H. Genomic aberrations and survival in cutaneous T-cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 2004;122:579-586.
63. Fleckenstein D.S, Dirks W.G, Drexler H.g, Quentmeier H. TRAF4 is a new binding partner for the p70S6 serine/threonine kinase. *Leuk Res* 2003;27(8):687-94.
64. Sun S.C, Xiao G. Dereglulation of NF-kB and its upstream kinases in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22:405-22.
65. Ciana P, Neri A, Cappellini C. Constitutive expression of lymphoma-associated NFkB2/Lyt-10 protein is tumorigenic in murine fibroblast. *Oncogene* 1997;14:1805-10.

66. Nadiminty N, Lou W, Lee S.O. STAT3 activation of NFkB p100 processing involves CBP/p300-mediated acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7264-9.
67. Trushin S.A, Pennington K.N, Carmora E.M. PKC α acts upstream of PKC θ to activate I κ B kinase and NFkB in T lymphocytes. *Molecular and Cellular Biology* 2003;23(9):7068-7081.
68. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000;19:2474-2488.
69. Notohamiprodjo M, Segerer S, Huss R. et al. CCR10 is expressed in cutaneous T cell lymphoma. *Int J Cancer* 2005;115:641-647.
70. Fujita Y, Abe R, Sasaki M. Presence of circulating CCR10+ T cells and elevated serum CTACK/CCL27 in the early stage of mycosis fungoides. *Clin Cancer Res* 2006;12:2670-75.
71. Sokolowska-Wojdylo M, Wenzel J, Gaffal E. Circulating clonal CLA+ and CD4+ T cells in sezary syndrome express the skin-homing chemokine receptors CCR4 and CCR10 as well as the lymph node-homing chemokine receptor receptor CCR7. *Br J Dermatol* 2005;152:258-64.
72. Jones D, O'Hara C, Kraus M.D. Expression pattern of T-cell-associated chemokine receptors and their chemokines correlates with specific subtypes of T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2000;2:685-90.
73. Zhang C, Li B, Gaikwad AS, Haridas V, Xu Z, Gutterman JU, Duvic M. Avicin D Selectively Induces Apoptosis and Downregulates p-STAT-3, bcl-2, and Survivin in Cutaneous T-Cell Lymphoma Cells. *J Invest Dermatol* 2008;128:2728–2735.
74. Martin-Subero JJ, Wlodarska I, Bastard C, Picquenot JM, Höppner J, Giefing M, Klapper W, Siebert R. Chromosomal rearrangements involving the BCL3 locus are recurrent in classical Hodgkin and peripheral T-cell lymphoma. *Blood* 2006;108(1):401-2.
75. Reiss Y, Engelhardt B. T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: transendothelial migration of different T cell populations is mediated by endothelial ICAM-1 and ICAM-2. *Int Immunol* 1999;11(9):1527-39.
76. Cornejo MG, Kharas MG, Werneck MB, Le Bras S, et al. Constitutive JAK3 activation induces lymphoproliferative syndromes in murine bone marrow transplantation models. *Blood* 2009;113(12):2746-54.

77. Mao X, Orchard G, Mitchell TJ, Oyama N, Russell-Jones R, Vermeer MH, Willemze R, van Doorn R, Tensen CP, Young BD, Whittaker SJ. A genomic and expression study of AP-1 in primary cutaneous T-cell lymphoma: evidence for dysregulated expression of JUNB and JUND in MF and SS. *J Cutan Pathol* 2008;35(10):899-910.
78. Sivori S, Falco M, Carlomagno S, Romeo E, Soldani C, Bensussan A, Viola A, Moretta L, Moretta A. A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2. *Blood* 2010.
79. Wasco MJ, Fullen D, Su L, Ma L. The expression of MUM1 in cutaneous T-cell lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol* 2008;39(4):557-63.
80. Dos Santos NR, Williams M, Gachet S, et al. RelB-dependent stromal cells promote T-cell leukemogenesis. *PLoS One* 2008;3(7):e2555.
81. Nakashima Y, Tagawa H, Suzuki R, Karnan S, Karube K, Ohshima K, Muta K, Nawata H, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of natural killer cell lymphoma/leukemia: different genomic alteration patterns of aggressive NK-cell leukemia and extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal-type. *Genes, chromosomes & cancer* 2005;44:247-255.
82. Yoon J, Ko YH. Deletion mapping of the long arm of chromosome 6 in peripheral T and NK cell lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2003;44(12):2077-2082.
83. van Doorn R, van Kester MS, Dijkman R, Vermeer MH, Mulder AA, Szuhai K, Knijnenburg J, Boer JM, Willemze R, Tensen CP. Oncogenomic analysis of mycosis fungoides reveals major differences with Sezary syndrome. *Blood* 2009;113(1):127-36.
84. Mao X, Orchard G, Vonderheid EC, Nowell PC, Bagot M, Bensussan A, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker SJ. Heterogeneous abnormalities of CCND1 and RB1 in primary cutaneous T-cell lymphomas suggesting impaired cell cycle control in disease pathogenesis. *J Invest Dermatol* 2006;126:1388-1395.
85. Cordon-cardo C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995;147(3):545-560.
86. Huang Y, de Reyniès A, de Leval L, et al. Gene expression profiling identifies emerging oncogenic pathways operating in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Blood* 2010;115 (6):1226-37.

87. Dien Bard J, Gelebart P, Anand M, Zak Z, Hegazy SA, Amin HM, Lai R. IL-21 contributes to JAK3/STAT3 activation and promotes cell growth in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Am J Pathol* 2009;175(2):825-34.
88. Lee KY, D'Acquisto F, Hayden MS, Shim JH, Ghosh S. PDK1 nucleates T cell receptor-induced signaling complex for NF-kappaB activation. *Science* 2005;308(5718):114-8.
89. Robledo C, Garcia JL, Benito R, Flores T, Mollejo M, Martinez-Climent JA, Garcia E, Gutierrez NC, Piris MA, Hernandez JM. Molecular characterization of the region 7q22.1 in splenic marginal zone lymphomas. *PLoS One* 2011;6(9):e24939.
90. Han S, Park K, Shin E, Kim HJ, Kim JY, Kim JY, Gwak G. Genomic change of chromosome 8 predicts the response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. *Oncol Rep* 2010;24(1):121-8.
91. Schwindt H, Akasata T, Zuhlke-Jenish R, Hans V, Schaller C, Klapper W, Dter MJ, Siebert R, Deckert M. Chromosomal traslocation fusing the BCL6 gene to different pattern loci are recurrent in primary central nervous system lymphoma and may be associated with aberrant somatic hypermutation or defective class switch recombination. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65(8):776-82.
92. Tyybakinoja A, Vilpo J, Knuutila S. High-resolution oligonucleotide array-CGH pinpoints genes involved in cryptic losses in chronic lymphocytic leukemia. *Cytogenet Genome Res* 2007;118(1):8-12.
93. Sutherland LC, Wang K, Robinson AG. RBM5 as a putative tumor suppressor gene for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010;5(3):294-298.
94. Martinez-Aribas F, Agudo D, Pollan M, Gomez-Esquer F, Diaz-Gil G, Lucas R, Schneider J. Positive correlation between the expression of X-chromosome RBM genes (RBMX, RBM3, RBM10) and the proapoptotic Bax gene in human breast cancer. *J Cell Biochem* 2006;97(6):1275-82.
95. Martin-Garabato E, Martinez-Aribas F, Pollan M, Lucas AR, Sanchez J, Schneider J. The small variant of the apoptotis-associated X-chromosome RBM10 gene is co-expressed with caspase-3 in breast cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 2008;5(3-4):169-173.
96. Berlin AL, Paller AS, Chan LS. Incontinentia pigmenti: a review and update on the molecular basis of pathophysiology. *J Am Acad Dermatol* 2002;47(2):169-187.

97. Guan XY, Horsman D, Zhang HE, Parsa NZ, Meltzer PS, Trent JM. Localization by chromosome microdissection of a recurrent breakpoint region on chromosome 6 in human B-cell lymphoma. *Blood* 1996;88(4):1418-22.