

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

CORSO DI DOTTORATO IN EMATOLOGIA SPERIMENTALE - CICLO XXV
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE E DI COMUNITA'

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE
DELLA SINDROME DI SÉZARY
E POSSIBILI RISVOLTI PROGNOSTICO-TERAPEUTICI**

(MED/15)

Dott.ssa GIORGIA SAPORITI
(matr. R08689)

TUTOR:

Chiar.mo Prof. Umberto Gianelli

COORDINATORE DEL DOTTORATO:

Chiar.mo Prof. Paolo Corradini

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

*A Marco e Matteo,
per il loro travolgente e disarmante universo
nel quale diventa possibile
ogni sogno più bello.*

INDICE

RIASSUNTO	4
INTRODUZIONE	7
<i>LE NEOPLASIE LINFOIDI</i>	8
I LINFOMI CUTANEI A CELLULE T.....	14
<i>La micosi fungoide</i>	15
<i>La sindrome di Sézary</i>	18
<i>LA COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION</i>	23
<i>I MICRORNA</i>	26
<i>STUDI MOLECOLARI SULLA SS</i>	28
SCOPO DELLA TESI	32
PAZIENTI E METODI	34
<i>SELEZIONE DEI PAZIENTI</i>	35
<i>METODOLOGIA</i>	36
RISULTATI	41
DISCUSSIONE	56
BIBLIOGRAFIA	71
RINGRAZIAMENTI	85

RIASSUNTO

I linfomi cutanei a cellule T (CTCL) rappresentano un insieme di malattie rare contraddistinto dal primitivo coinvolgimento della cute; essi, nella loro totalità, costituiscono meno del 4% di tutti i linfomi non Hodgkin. Alcuni istotipi sono caratterizzati da un decorso clinico indolente e da una prognosi favorevole, altri possono al contrario progredire rapidamente ed assumere caratteristiche cliniche particolarmente aggressive.

Tra i CTCL, la sindrome di Sézary viene tradizionalmente definita dal punto di vista clinico dalla presenza di eritrodermia, linfadenopatia e cellule T neoplastiche con nucleo cerebriforme nella cute, nel sangue periferico e nei linfonodi; è una patologia caratterizzata da un decorso aggressivo, spesso intrinsecamente resistente alle terapie convenzionali, con una sopravvivenza media a 5 anni pari al 24% dei pazienti.

La sindrome di Sézary è caratterizzata dalla proliferazione clonale di linfociti T helper CD4+ a fenotipo “central memory T-cell”, con possibile espressione alterata di antigeni della linea T quali CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD26 e CD45RO; in particolare nelle cellule neoplastiche la negatività per CD26 e CD7 rappresenta l’aberrazione fenotipica più frequente (rispettivamente nel >99% e nel 78% dei casi).

Questo studio è stato condotto su un gruppo di 40 pazienti affetti da sindrome di Sézary “de novo” o secondaria seguiti presso l’U.O. di Ematologia-Centro Trapianti di Midollo Osseo in collaborazione con la U.O. di Dermatologia della Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico - Università degli Studi di Milano. Al momento dell’inclusione nello studio, in tutti i pazienti è stata verificata la presenza dell’immunofenotipo aberrante CD4+/CD26- e della clonalità del TCR- γ e/o del TCR-B. Nella prima parte dello studio è stata condotta una caratterizzazione dal punto di vista della citogenetica molecolare mediante tecnica di arrayCGH, con l’ausilio della piattaforma Agilent (Human CGH Microarrays). Successivamente, un subset di 14 pazienti è stato ulteriormente indagato mediante l’analisi del profilo d’espressione dei microRNA mediante utilizzo di scanner Agilent e software GeneSpring.

I risultati dell’analisi arrayCGH hanno permesso di identificare la presenza di frequenti aberrazioni cromosomiche a livello dei cromosomi 7, 8, 10, 17 e 19, con amplificazioni e delezioni in regioni che coinvolgono geni particolarmente importanti nel processo patogenetico tumorale quali c-MYC, TP53, PTEN, STAT3/STAT5 e relativi pathways, confermando in parte i dati precedentemente riportati in letteratura. Sono stati inoltre identificate, seppur in una minoranza dei pazienti, delezioni a carico del braccio corto del cromosoma 9 già descritte come associate ad una prognosi sfavorevole in altre forme di CTCL.

Per quanto riguarda il profilo di espressione dei miRNA, sono stati individuati un gruppo di 24 miRNA espressi in modo differenziale nei pazienti affetti da sindrome di Sézary rispetto a dei controlli normali; anche in questo caso è stato possibile da una parte confermare dati già precedentemente riportati (è il caso ad esempio della down-regolazione di miR21, e dell'upregolazione di miR29c e miR214) e dall'altra evidenziare un piccolo gruppo di miRNA prevalentemente upregolati ancora poco descritti in letteratura (miR-801, miR-188-5p, miR-371-5p, miR-518c, miR-630, miR-483-5p, miR-663 e miR-513a-5p) e comunque non associati alla SS.

L'ampliamento della casistica e la validazione dei risultati mediante l'impiego di ulteriori metodiche molecolari potrebbe permettere in futuro l'identificazione di markers molecolari in grado di facilitare una diagnosi precoce, una stadiazione di malattia più accurata, e un approccio terapeutico basato su una migliore stratificazione prognostica. Tali indicatori potrebbero inoltre favorire lo sviluppo di nuovi farmaci molecolari o biologici mirati.

INTRODUZIONE

LE NEOPLASIE LINFOIDI

Le neoplasie linfoidi sono disordini clonali che originano da linfociti B, T o NK in diversi stadi di maturazione e differenziazione. Poiché i linfociti NK condividono con i linfociti T molte caratteristiche immunofenotipiche e funzionali, normalmente le patologie derivanti da queste due sottopopolazioni vengono considerate insieme nel capitolo dei disordini linfoproliferativi a cellule T/NK.

I linfociti B e T patologici corrispondono in alcuni casi a rispettivi stadi di maturazione della controparte normale e possono, per tale motivo, essere classificati secondo i gradi di maturazione di questi ultimi. D'altra parte può capitare che linfociti patologici acquisiscano markers di superficie eterogenei discordanti rispetto alla linea originaria di appartenenza [1]; ciò rende ragione del fatto che la classificazione di tali patologie non può basarsi esclusivamente sullo stadio di maturazione della controparte cellulare normale.

Per poter capire la classificazione e il significato delle diverse patologie linfoidi, è fondamentale conoscere bene le caratteristiche e le specificità delle cellule che compongono il sistema immunitario normale.

Il sistema immunitario si differenzia in due grandi categorie, l'immunità innata e l'immunità adattativa, a seconda del ruolo e del target cellulare delle sottopopolazioni cellulari che le compongono. I linfociti che fanno parte dell'immunità innata rappresentano una sorta di "prima linea di difesa", sono caratteristicamente presenti nelle mucose e nella cute e includono i linfociti NK, i linfociti T CD3⁺ CD56⁺ (NK-like T-cells) e i linfociti T $\gamma\delta$. Essi non necessitano di un'attivazione mediata dall'antigene per poter esercitare le loro funzioni.

Il sistema immunitario adattativo è al contrario caratterizzato da una risposta molto più complessa che si esprime attraverso l'attivazione mediata da uno specifico stimolo antigenico dei linfociti B e T che lo compongono e che, una volta attivati, conservano memoria di tale incontro. Questi due sistemi sono strettamente interconnessi tra loro (figura 1) e le cellule che vi appartengono sono regolate nella loro funzione da feedback positivi e negativi che ne controllano in modo sincrono la funzionalità, così che ogni componente possa esercitare la propria azione in maniera specifica ma in concerto con le altre popolazioni cellulari [2].

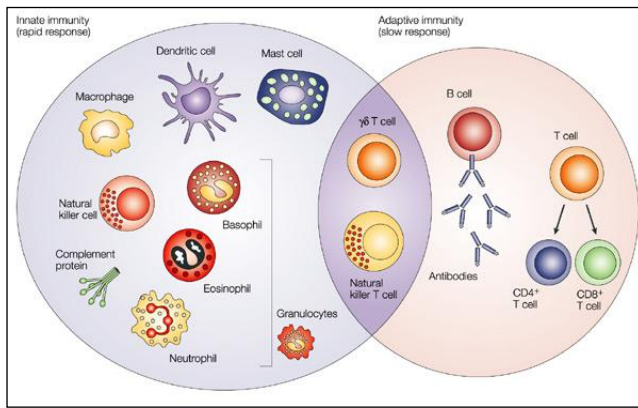


Figura 1. Interazione tra immunità innata e immunità adattativa. La risposta immunitaria innata rappresenta la prima linea di difesa contro le infezioni ed è composta da granulociti, mastociti, macrofagi, cellule dendritiche, linfociti NK e dalle proteine del complemento. La risposta adattativa al contrario necessita di più tempo per manifestarsi, ma è caratterizzata da una maggiore specificità e memoria antigenica. Tale risposta si esplica attraverso l'azione degli anticorpi, dei linfociti B e dei linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$. I linfociti $T\gamma\delta$ e i linfociti NK sono linfociti citotossici che sono in grado di interfacciarsi con entrambi i sistemi [3].

Le neoplasie a cellule B tendono a mimare i normali stadi di differenziazione B cellulare anche se non sempre è possibile identificare in un clone patologico la specifica controparte normale (figura 2). La fisiologica differenziazione dei linfociti B inizia a livello del midollo osseo quando i *progenitori B* vanno incontro a riarrangiamento dei geni VDJ delle Ig e si differenziano in *cellule B immature* che esprimono Ig di membrana [4]. Tali cellule, se non vanno incontro ad apoptosi, diventano *linfociti B maturi "naive"* che, quando stimolati dall'antigene, si differenziano in *plasmacellule "short-lived"* (capaci di produrre anticorpi a bassa affinità per l'antigene) oppure migrano nei linfonodi ed entrano nel centro germinativo dove andranno incontro a ipermutazioni somatiche delle regioni variabili delle catene delle Ig e allo switch isotipico delle catene pesanti. Tali trasformazioni conferiscono alta affinità per l'antigene e producono due diverse popolazioni B linfocitarie circolanti: le *plasmacellule "long-lived"* e le *cellule B memoria* [5].

La maggior parte dei linfomi mantellari originano da un clone cellulare B naive e come tali rappresentano una neoplasia "pre-centro germinativo" [6]. Il linfoma follicolare, il linfoma di Burkitt, una parte dei linfomi a grandi cellule B e il linfoma di Hodgkin fanno parte delle neoplasie B che si sviluppano da cellule del centro germinativo. Essi si differenziano tra loro dal punto di vista immunofenotipico per l'espressione di alcuni markers di superficie la cui perdita o acquisizione riconduce al grado di maturazione/differenziazione cellulare [7]. Il linfoma della zona marginale, il linfoma linfocitico/leucemia linfatica cronica, il linfoma linfoplasmocitico, il plasmocitoma e una parte dei linfomi diffusi a grandi cellule sono invece delle neoplasie a cellule B mature, post-centro germinativo, che hanno la caratteristica di ritornare nel sito in cui le cellule B sono state originariamente stimulate dall'antigene, sia esso il circolo sanguigno periferico o un sito extranodale (MALT) [8].

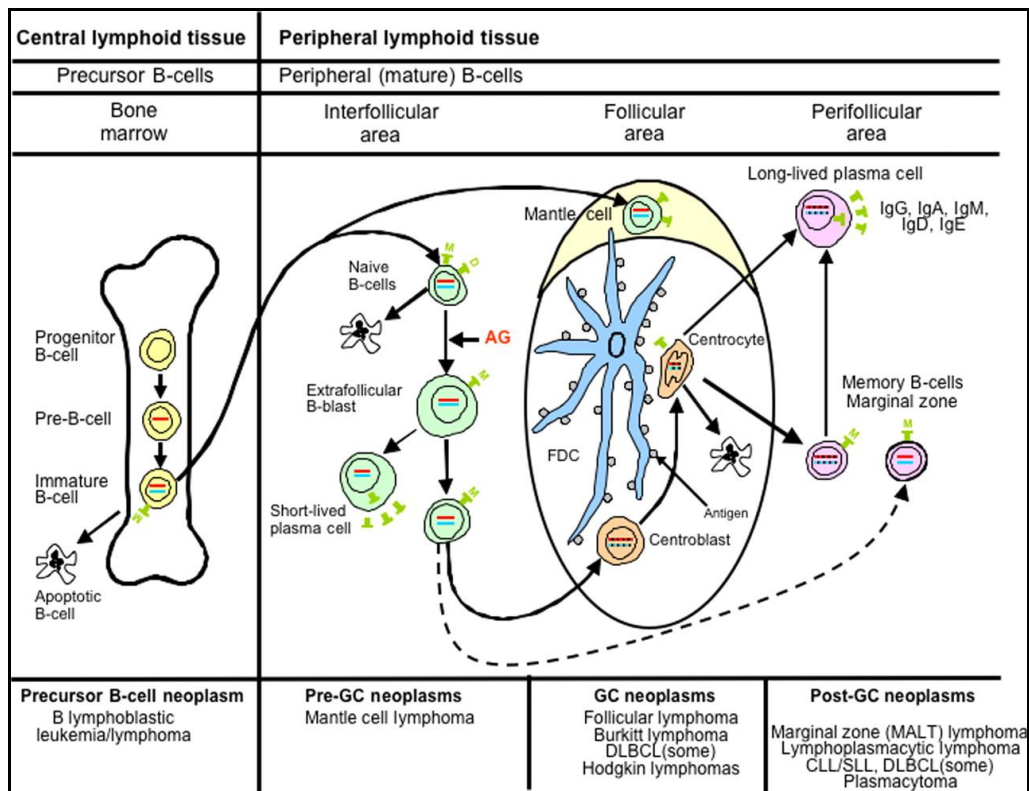


Figura 2. Rappresentazione schematica della relazione tra la differenziazione dei linfociti B normali e le più importanti patologie B. GC, centro germinativo; FDC, cellule follicolari dendritiche, AG, antigene; linee rosse, riarrangiamento delle catene pesanti delle Ig; linee blu, riarrangiamento delle catene leggere delle Ig [7].

I linfociti T derivano invece da precursori midollari che vanno incontro a maturazione e differenziazione nel timo. Le *cellule T antigene specifiche*, maturano a livello della corticale e presentano un fenotipo T immaturo caratterizzato dall'espressione superficiale di TdT, CD1a, CD3, CD5 e CD7. I *linfociti T corticali* sono negativi sia per CD4 che per CD8, molecole queste ultime che vengono coesprese nel corso della maturazione dei timociti per essere infine espresse in modo mutuamente esclusivo nei *linfociti T maturi* presenti nella midollare timica. I diversi stadi di maturazione timica rappresentano lo specchio dei diversi tipi di leucemie/linfomi linfoblastici [7]. I timociti midollari hanno un fenotipo molto simile ai linfociti T presenti in circolo o nei linfonodi e fanno parte del sistema immunitario adattativo. I linfociti T maturi si distinguono in due classi distinte a seconda del tipo di recettore T cellulare (TCR) [9].

Il TCR riconosce frammenti peptidici degli antigeni proteici legati al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) espresso sulle "cellule che presentano l'antigene" (APC). Il TCR è una proteina glicosilata a struttura quaternaria formato da due catene polipeptidiche $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ legate tra loro da un ponte disolfuro. Entrambe le coppie hanno una regione variabile (V) amino-terminale, una regione costante (C) e una corta regione cerniera che contiene due residui di cisteina che formano il ponte disolfuro tra le due catene (figura 3) [10].

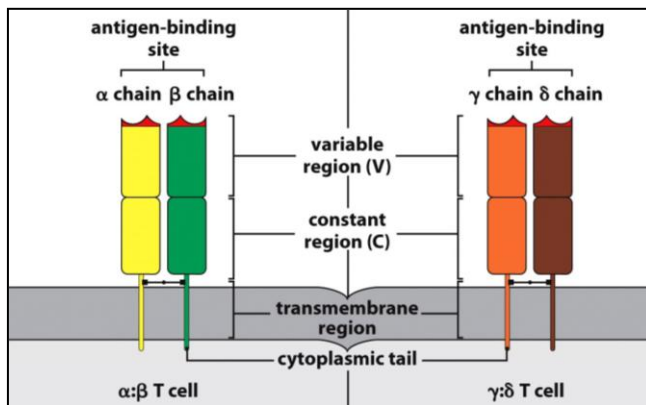


Figura 3. Rappresentazione schematica delle due classi del recettore TCR (vedi testo) [11]

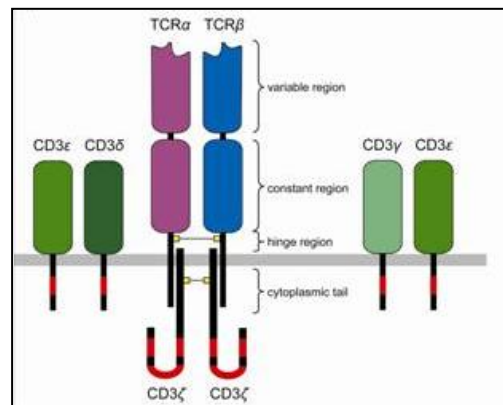


Figura 4. Struttura schematica del complesso TCR/CD3 (vedi testo) [12].

Durante la maturazione intratimica dei linfociti T, i geni codificanti per il TCR vanno incontro ad un riarrangiamento tra le regioni V, J e C, e il recettore che ne deriva viene esposto in membrana. Il TCR non possiede un dominio citoplasmatico in grado di trasdurre il segnale, per tale motivo si associa al CD3 e alle catene ζ intracitoplasmatiche formando il complesso TCR/CD3 (figura 4). Il CD3 è formato da un insieme di proteine (ϵ , γ e δ) che sono in grado di trasdurre il segnale attivando la cellula. Le molecole CD4 e CD8, invece sono dei co-recettori che si associano al TCR per completare il legame tra MHC di classe I o II e i linfociti CD8+ o CD4+ rispettivamente [10].

I linfociti $T\alpha\beta$ lasciano quindi il timo e in seguito alla stimolazione antigenica, si trasformano in cellule CD4+ o CD8+ effettrici o memoria. Tra i linfociti T CD4+, effettori particolarmente importanti per l'immunomodulazione sono le cellule T regolatorie (CD25+, FOXP3+) e le cellule T helper follicolari (CD57+, CXCR5+, PD-1+). I linfomi e le leucemie a cellule T periferiche rispecchiano e si caratterizzano per la funzione delle cellule T da cui originano [2].

I linfociti $T\gamma\delta$ originano dai linfociti corticali, fanno parte (insieme ai linfociti NK) dell'immunità innata, non esprimono né il CD4 né il CD8 e spesso sono negativi anche per il CD5; rappresentano meno del 5% dei linfociti T normali e si distribuiscono generalmente nella milza, nell'epitelio intestinale e in generale in qualsiasi altro tessuto epiteliale. I linfomi che ne derivano sono molto rari e si localizzano abitualmente in tali siti.

I linfociti NK derivano direttamente dai progenitori T presenti nel midollo osseo e per tale motivo non riarrangiano i geni del TCR. Esprimono come markers di superficie il CD2, il CD7, a volte il CD8 ma mai il CD3 (che è presente invece nel citoplasma); caratteristicamente sono positivi per il CD16 e il CD56 e contengono granuli

citoplasmatici citotossici [13]. Essi espletano la loro azione citotossica sia attraverso il legame diretto recettore-antigene sia utilizzando un sistema che coinvolge altri recettori inibitori/attivatori (killer inhibitory receptors - KIRs) che sono in grado di potenziare o inibire la risposta citotossica innescata dal legame recettore-antigene. I linfomi dell'immunità innata (NK e $\gamma\delta$) si manifestano inizialmente come linfomi extranodali e rispecchiano la distribuzione funzionale delle cellule da cui originano [7]. È interessante notare come molti dei linfomi/leucemie che insorgono in età pediatrica o nei giovani adulti, derivino da cellule dell'immunità innata (figura 5).

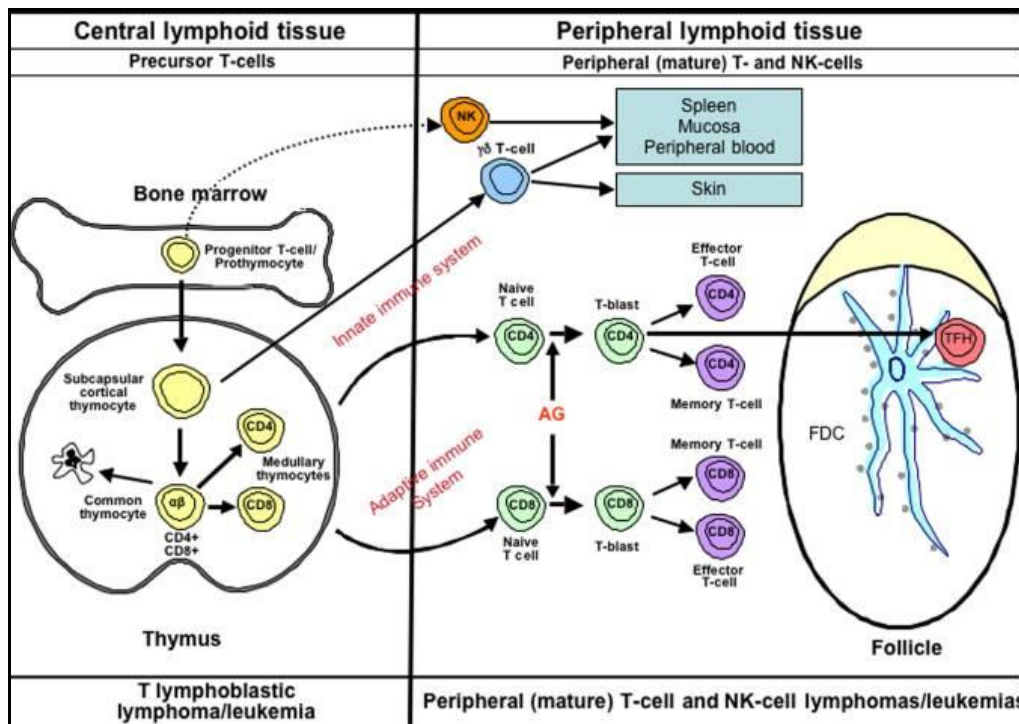


Figura 5. Rappresentazione schematica della normale differenziazione delle cellule T e relazione con i linfomi a cellule T. AG, antigene; FDC, cellule dendritiche follicolari; TFH, cellule T helper follicolari [7].

Classificazione

La classificazione delle neoplasie linfoidi è basata sull'utilizzo di quante più informazioni possibili per poter definire con maggior precisione ogni singola entità [14]. La morfologia e l'immunofenotipo sono sufficienti per la diagnosi della maggior parte delle neoplasie linfoidi, ma nessun marker è specifico per un unico tipo di linfoma, per tale motivo è necessario che la diagnosi si basi sull'insieme delle caratteristiche morfologiche e del pannello antigenico delle cellule neoplastiche. Negli ultimi anni inoltre, le caratteristiche genetiche stanno assumendo un ruolo preponderante nella distinzione e stratificazione prognostica di alcuni tipi di neoplasie linfoidi, soprattutto per quel che riguarda i linfomi B.

L'ultima revisione del 2008 della classificazione WHO inoltre [9], tende ad enfatizzare, rispetto alle precedenti classificazioni, l'importanza delle caratteristiche cliniche delle singole patologie, così da rendere più accurata la diagnosi e la definizione di alcuni tipi di linfomi; è il caso per esempio della distinzione, all'interno dei linfomi della zona marginale (MZL), tra MALT, MZL nodali ed MZL extranodali che, oltre ad avere localizzazione e eziopatogenesi diversa, si associano anche a prognosi differenti (tabella 1).

<p>B-cell precursor neoplasms B lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities</p> <p>Mature B-cell neoplasms Chronic lymphocytic leukemia/Small lymphocytic lymphoma B-cell prolymphocytic leukemia Splenic marginal zone lymphoma Hairy cell leukemia Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable <i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma*</i> <i>Hairy cell leukemia variant*</i> Lymphoplasmacytic lymphoma Waldenstrom macroglobulinemia Heavy chain diseases <i>α heavy chain diseases</i> <i>γ heavy chain diseases</i> <i>μ heavy chain diseases</i> Plasma cell myeloma Solitary plasmacytoma of bone Extraneous plasmacytoma Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) Nodal marginal zone lymphoma Pediatric nodal marginal zone lymphoma Follicular lymphoma Pediatric follicular lymphoma Primary cutaneous follicular center lymphoma Mantle cell lymphoma Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS <i>T cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma</i> <i>EBV+ DLBCL of the elderly</i> <i>DLBCL associated with chronic inflammation</i> <i>Lymphomatoid granulomatosis</i> Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma Intravascular large B-cell lymphoma Primary cutaneous DLBCL, leg type ALK+ large B-cell lymphoma Plasmablastic lymphoma (approached as DLBCL) - DLBCL associated with chronic inflammation Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castlemann disease Primary effusion lymphoma Burkitt lymphoma B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Hodgkin lymphoma</p>	<p>T-cell and NK-cell precursor lymphomas T lymphoblastic leukemia/lymphoma</p> <p>Mature T- and NK-cell neoplasms T-cell prolymphocytic leukemia T-cell large granular lymphocytic leukemia Chronic lymphoproliferative disorder of NK cells* Aggressive NK cell leukemia Systemic EBV+ T-cell lymphoproliferative disease of childhood Hydroa vacciniforme-like lymphoma</p> <p>Adult T-cell leukemia/lymphoma Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type Enteropathy-associated T-cell lymphoma Hepatosplenic T-cell lymphoma Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma Mycosis fungoides Sézary syndrome Primary cutaneous CD30+ T-cell lymphoproliferative disorders <i>Lymphomatoid psoriasis</i> <i>Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma</i> Primary cutaneous γδ T-cell lymphoma Primary cutaneous CD8+ aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma* Primary cutaneous CD4+ small/medium T-cell lymphoma* Peripheral T-cell lymphoma, NOS Anaplastic large cell lymphoma, ALK+ Anaplastic large cell lymphoma, ALK-*</p> <p>Hodgkin Lymphoma (HL) Nodular lymphocyte predominant HL Classical HL (CHL) <i>Nodular sclerosis CHL</i> <i>Lymphocyte-rich CHL</i> <i>Mixed cellularity CHL</i> <i>Lymphocyte-depleted CHL</i></p> <p>Post-transplant Lymphoproliferative Disorders (PTLDs) Early lesions Plasmacytic hyperplasia Infectious mononucleosis-like PTLD Polymorphic PTLD Monomorphic PTLD (B- and T/NK-cell types) Classic Hodgkin lymphoma type PTLD</p>
--	--

Tabella 1. *Classificazione WHO delle neoplasie a cellule B, T ed NK (2008). NOS, non altrimenti specificato; * entità provvisoria. Modificato da WHO 2008.*

Epidemiologia

Le neoplasie a precursori linfoidi (leucemia/linfoma linfoblastico a cellule B leucemia/linfoma linfoblastico a cellule T) sono patologie che si sviluppano perlopiù in età pediatrica. Il 75% dei casi insorge prima dei 6 anni di età e l'85% è di pertinenza B, mentre le neoplasie linfoblastiche T si manifestano prevalentemente come linfomi e con masse mediastiniche [15, 16].

Le neoplasie a cellule B mature raggruppano circa il 90% di tutte le neoplasie linfoidi del mondo, sono più frequenti nei paesi industrializzati [15]. L'istotipo più comune è

rappresentato dal LINFOMA FOLLICOLARE E DAL LINFOMA DIFFUSO A LARGHE CELLULE che rappresentano insieme il 60% di tutti i linfomi B (esclusi il LINFOMA DI HODGKIN e il MIELOMA MULTIPOLO). Si manifestano soprattutto tra la sesta e la settima decade di vita (fatta eccezione per il LINFOMA MEDIASTINICO A LARGHE CELLULE B e del LINFOMA DI BURKITT che si presentano prevalentemente intorno ai 20-30 anni).

Le neoplasie a cellule T ed NK mature sono poco frequenti, rappresentando circa il 12% di tutti i linfomi non Hodgkin. I sottotipi più comuni sono il LINFOMA T PERIFERICO NOS (non altrimenti specificato) e il LINFOMA T ANGIOIMMUNOBLASTICO. L'incidenza dei linfomi a cellule T ed NK mature è particolarmente influenzata dalla distribuzione geografica (maggiore in Asia che in tutto il resto del mondo) e dalla predisposizione razziale (maggiore tra gli asiatici e tra i nativi americani del centro e sud America che hanno affinità genetiche con la razza asiatica) [16]

I LINFOMI CUTANEI A CELLULE T

Il termine “linfomi primitivi cutanei” (PCL, primary cutaneous lymphoma) si riferisce ai linfomi cutanei a cellule T (CTCL, cutaneous T-cell lymphomas) e a cellule B (CBCL, cutaneous B-cell lymphomas) che coinvolgono la cute senza interessamento extracutaneo al momento della diagnosi.

I CTCL fanno parte dei linfomi non Hodgkin extranodali; pur avendo caratteristiche cliniche ed istopatologiche assai eterogenee, hanno in comune la derivazione da linfociti T maturi clonali con caratteristico epidermotropismo [17]. Rappresentano circa il 75% dei PCL e sono costituiti per il 90% dalle entità più conosciute: la MICOSI FUNGOIDE, la SINDROME DI SÉZARY e MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE CUTANEE CD30+. La classificazione del rimanente gruppo di CTCL è risultata negli anni confusa e difficoltosa soprattutto a causa della rarità di queste patologie. I CTCL spesso presentano un comportamento clinico e una prognosi completamente diversi rispetto alle forme sistemiche di linfoma istologicamente simili, le quali richiedono differenti tipi di trattamento, pur coinvolgendo in alcuni casi la cute come sito secondario [18]. Per questo motivo nei più recenti sistemi di classificazione (e per la prima volta nella classificazione WHO del 2005) i CTCL vengono descritti come singole entità [19]. La classificazione WHO del 2005 (che integra quella precedente del 2001 [20] e quella dell'EORTC [21]), ha pertanto assunto rilevanza clinica e prognostica, delineando in modo netto i PCL dalle corrispettive forme nodali. L'ultima classificazione della WHO [13] aggiorna le entità precedentemente descritte, riconoscendole singolarmente ed integrandole in una classificazione generale dei linfomi nodali ed extranodali con piccole modifiche nella terminologia (tabella 1).

Per comprendere l'origine di questa specifica popolazione T neoplastica, che ha appunto la peculiarità di dirigersi e replicarsi a livello cutaneo, è fondamentale ripercorrere il percorso evolutivo dei linfociti T e il ruolo che essi hanno nella sorveglianza immunologica a livello cutaneo. Il processo di maturazione dei linfociti, che comporta una variazione del fenotipo cellulare di questi ultimi, seleziona le sottopopolazioni linfocitarie destinate ai tessuti periferici. Il reclutamento a livello cutaneo è poi contraddistinto da una serie di eventi (infettivi o traumatici) che portano all'espressione di citochine, di molecole di adesione e di molecole di superficie specifiche che permettono l'homing di una certa sottopopolazione di linfociti T a livello della cute [3]. I linfociti T stimolati assumono la funzione di linfociti T effettori/memoria antigene specifici e acquisiscono la capacità di migrare nel sito originario di infezione/trauma (in questo caso la cute appunto). Questi linfociti T esprimono l'antigene cutaneo linfocitario (CLA) e il recettore 4 CC per le chemochine (CCR4) entrambi fondamentali per il "rolling" e l'adesione alle cellule endoteliali, passaggi questi ultimi indispensabili per l'homing cutaneo [22]. L'equilibrio tra una risposta immunitaria appropriata a livello cutaneo e una disregolazione della stessa potrebbe rappresentare la chiave per comprendere la patogenesi di questo tipo di disordini acquisiti ed implementarne il trattamento [23]

La cute è il secondo sito per frequenza dei LNH extranodali dopo il tratto gastrointestinale, con un'incidenza di 1 nuovo caso all'anno ogni 100.000 abitanti [24]. L'eziopatogenesi di questi linfomi non è stata ancora chiarita, anche se diverse ipotesi implicherebbero un ruolo promuovente di agenti virali (EBV, HTLV-1), citochine tissutali (IL-2, IL-7, IL-10, IL-13, IL-15, TGF- β) e oncogeni (P53, Tal-1, Lym-10), questi ultimi dimostrati solo in casi clinicamente molto aggressivi. Altri fattori, quali antigeni ambientali o occupazionali, potrebbero indurre un'attivazione persistente delle cellule di Langherans, che sono i più potenti attivatori-stimolatori dei T-linfociti CLA+ specifici della cute [25].

La micosi fungoide

La Micosi Fungoide (MF) rappresenta circa il 50% di tutti i linfomi primitivi cutanei e ne è la forma meglio definita. È caratterizzata dalla proliferazione di linfociti T di piccola o media taglia con nucleo cerebriforme a livello del derma superficiale.

Il termine MF dovrebbe essere usato solamente per la forma classica "Alibert-Bazin" caratterizzata dall'evoluzione in chiazze, placche e noduli tumorali, o per le varianti aventi un comportamento clinico simile. Colpisce prevalentemente gli adulti tra i 55 e 60 anni con un rapporto maschi/femmine di 1,6-2,0:1 [18]. Ha un comportamento clinico

indolente caratterizzato da una lenta progressione (nell'ordine di anni e talora di decenni) con lesioni inizialmente in stadio di chiazza, di placca e infine di tumore. Nelle fasi avanzate di malattia si può avere una disseminazione extracutanea a livello di linfonodi, milza, fegato, sangue e polmoni. La localizzazione midollare è rara [18]. I pazienti in stadio tumorale presentano caratteristicamente una combinazione di chiazze, placche e noduli tumorali, che possono mostrare aspetti ulcerativi. Se al momento della presentazione clinica sono presenti solo noduli tumorali la diagnosi di MF è improbabile e vanno considerati in diagnosi differenziale altri tipi di CTCL; non è inoltre frequente lo sviluppo di eritrodermia in assenza del caratteristico coinvolgimento ematico tipico della sindrome di Sézary.

Dal punto di vista istologico, all'esordio l'infiltrato è di tipo polimorfo, ed è costituito da linfociti, istiociti, cellule dendritiche ed eosinofili; è situato in sede perivascolare nel derma superficiale, con infiltrazione focale degli strati basali dell'epidermide, che può mostrarsi acantotica, ipercheratosica, o meno frequentemente, atrofica. Successivamente le lesioni sono caratterizzate da un'infiltrato cellulare disposto a banda con manifesto epidermotropismo (aumentano i linfociti intraepiteliali e si formano teche linfocitarie intraepiteliali - microascessi di Pautier) [26]. Gli annessi cutanei possono presentare infiltrazione linfocitaria a livello infundibolare e si osservano fenomeni di fibroplasia nel derma superficiale. Nella fase in placca e in quella tumorale aumenta il numero di cellule linfoidi atipiche a morfologia pleomorfa, diminuiscono le cellule reattive, aumentano le plasmacellule e viene a mancare progressivamente il tipico epidermotropismo, mentre la patologia arriva a coinvolgere anche l'ipoderma [27].

Per quanto riguarda l'espressione immunofenotipica, le cellule neoplastiche presentano il fenotipo tipico dei linfociti T α / β memoria CD3+,CD4+,CD45RO+,CD7-,CD8-, con scarsa espressione degli antigeni di attivazione (CD25-,CD30-) e di proliferazione (MIB1+/-) e un pattern di citochine caratteristico dei linfociti Th2 (IL-2, IL-4, IL-10). Inoltre, le cellule infiltranti esprimono l'antigene linfocitario cutaneo (CLA) riconosciuto dal MoAb-HECA-452 [28]. Da sottolineare che si può riscontrare anche un fenotipo CD8+ e CD4- [29]. Questi ultimi casi hanno un identico comportamento clinico e prognostico rispetto alla MF CD4+, e non dovrebbero pertanto essere considerati separatamente [18].

I geni del TCR sono clonalmente riarrangiati in una proporzione variabile di casi, che dipende essenzialmente dal numero di linfociti patologici infiltranti la lesione e dal tipo di tecnica utilizzata [30]. La dimostrazione della monoclonalità dell'infiltrato con indagini di biologia molecolare sul DNA estratto dalla lesione mediante tecniche di PCR, Southern Blot e sonde molecolari per TCR- γ o TCR- β , costituisce un parametro

diagnostico di estrema importanza nelle fasi iniziali di sviluppo della neoplasia e in seguito consente di valutare il coinvolgimento extracutaneo (sangue periferico, linfonodi etc.) della patologia linfoproliferativa.

La prima classificazione prognostica dei CTCL è stata pubblicata nel 1979 da Bunn e colleghi [31]; le ulteriori modifiche proposte prima nella classificazione NCI-VA [32] e successivamente con il “Dutch system” [33] (tabella 2) sono state integrate dapprima nella classificazione WHO/EORTC del 2005 [18] e più tardi nella classificazione ISCL/EORTC pubblicata da Olsen e colleghi nel 2007 (tabelle 3a-3b) [34]. In quest’ultima revisione è stata rivista la classificazione clinicopatologica linfonodale, è stato inserito e definito il coinvolgimento del sangue periferico e si è cercato di eliminare variabili cliniche e istologiche per cercare di standardizzare il più possibile il sistema di stadiazione e di classificazione.

Updated ISCL/EORTC classification	Dutch system ⁵⁸	NCI-VA classification ^{13,57,59}
N ₁	Grade 1: dermatopathic lymphadenopathy (DL)	LN ₀ : no atypical lymphocytes LN ₁ : occasional and isolated atypical lymphocytes (not arranged in clusters) LN ₂ : many atypical lymphocytes or in 3-6 cell clusters
N ₂	Grade 2: DL; early involvement by MF (presence of cerebriform nuclei > 7.5 μm)	LN ₃ : aggregates of atypical lymphocytes; nodal architecture preserved
N ₃	Grade 3: partial effacement of LN architecture; many atypical cerebriform mononuclear cells (CMCs) Grade 4: complete effacement	LN ₄ : partial/complete effacement of nodal architecture by atypical lymphocytes or frankly neoplastic cells

Tabella 2. *Staging istopatologico dei linfonodi nella micosi fungoide e nella sindrome di Sézary*

TNMB stages	
Skin	
T ₁	Limited patches,* papules, and/or plaques† covering < 10% of the skin surface. May further stratify into T _{1a} (patch only) vs T _{1b} (plaque ± patch).
T ₂	Patches, papules or plaques covering ≥ 10% of the skin surface. May further stratify into T _{2a} (patch only) vs T _{2b} (plaque ± patch).
T ₃	One or more tumors‡ (≥ 1-cm diameter)
T ₄	Confluence of erythema covering ≥ 80% body surface area
Node	
N ₀	No clinically abnormal peripheral lymph nodes§; biopsy not required
N ₁	Clinically abnormal peripheral lymph nodes; histopathology Dutch grade 1 or NCI LN ₀₋₂
N _{1a}	Clone negative#
N _{1b}	Clone positive#
N ₂	Clinically abnormal peripheral lymph nodes; histopathology Dutch grade 2 or NCI LN ₃
N _{2a}	Clone negative#
N _{2b}	Clone positive#
N ₃	Clinically abnormal peripheral lymph nodes; histopathology Dutch grades 3-4 or NCI LN ₄ ; clone positive or negative
N _x	Clinically abnormal peripheral lymph nodes; no histologic confirmation
Visceral	
M ₀	No visceral organ involvement
M ₁	Visceral involvement (must have pathology confirmation¶) and organ involved should be specified)
Blood	
B ₀	Absence of significant blood involvement: ≤ 5% of peripheral blood lymphocytes are atypical (Sézary) cells
B _{0a}	Clone negative#
B _{0b}	Clone positive#
B ₁	Low blood tumor burden: > 5% of peripheral blood lymphocytes are atypical (Sézary) cells but does not meet the criteria of B ₂
B _{1a}	Clone negative#
B _{1b}	Clone positive#
B ₂	High blood tumor burden: ≥ 1000/μL Sézary cells with positive clone#

Tabella 3a. *Stadiazione istopatologica dei linfonodi nella micosi fungoide e nella sindrome di Sézary*

	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
III	4	0-2	0	0,1
IIIA	4	0-2	0	0
IIIB	4	0-2	0	1
IVA ₁	1-4	0-2	0	2
IVA ₂	1-4	3	0	0-2
IVB	1-4	0-3	1	0-2

Tabella 3b. *Revisione ISCL/EORTC della stadiazione della MF e SS*

Il più importante fattore prognostico nella MF è rappresentato dall'estensione cutanea ed extracutanea delle lesioni. I pazienti affetti da malattia limitata allo stadio di chiazza/placca (<10% della superficie cutanea) hanno una aspettativa di vita simile a quella della popolazione generale con una sopravvivenza a 10 anni del 97-98% [35]. Negli stadi più avanzati la prognosi è povera, in particolare nei pazienti con noduli tumorali e coinvolgimento extracutaneo la sopravvivenza a 10 anni è del 42% e 20% rispettivamente. [18]

La sindrome di Sézary

La sindrome di Sézary (SS) rappresenta circa il 5% di tutti i linfomi T cutanei ed è storicamente caratterizzata dal coinvolgimento cutaneo (eritrodermia) e linfonodale (linfadenomegalie generalizzate) e dalla presenza a livello del sangue periferico, della cute e dei linfonodi di un clone neoplastico T-cellulare con nucleo cerebriforme (cellule di Sézary)[36].

La SS colpisce prevalentemente gli adulti, caratteristicamente sopra i 60 anni, prevalentemente maschi di razza bianca [37], con un'incidenza che aumenta con l'età. Si ipotizza che la stimolazione cronica da parte di agenti infettivi quali l'*Helicobacter Pylori*, lo *Staphilococcus Aureus*, la *Chlamydia spp*, l'HCV, l'EBV o il CMV, piuttosto che una predisposizione genetica legata ad una maggior frequenza di certi alleli HLA di classe II, possa avere un ruolo nell'eziopatogenesi della malattia. Tali ipotesi non sono però state chiaramente dimostrate [38].

La maggioranza dei pazienti affetti da SS presenta, a livello del sangue periferico, una proliferazione di cellule T neoplastiche mature CD4+ con fenotipo effetttore/memoria e con tropismo cutaneo; questi linfociti mostrano un'elevata espressione del CCR4, la frequente coespressione di CLA e l'assenza caratteristica del CD26 e/o del CD7 [39]. Il CD26 è una glicoproteina della superficie cellulare che ha la capacità d'inattivare CXCL12, il ligando di CXCR4, un importante recettore nella regolazione dell'homing cellulare; la negatività di CD26 potrebbe pertanto suggerire un ruolo decisivo di questo

marcatore nell'homing cutaneo delle cellule di Sézary [40]. Tuttavia, una caratteristica peculiare della SS, rispetto alla MF, soprattutto negli stadi più avanzati di malattia, è la perdita dell'epidermotropismo. Sebbene le basi di questo fenomeno non siano ancora del tutto chiarite, si presume che ciò possa essere collegato ad una alterazione dell'espressione del pattern delle chemochine, caratteristica della fase leucemica di gran parte dei CTCL [41]. Alcuni studi hanno infatti dimostrato come nella SS rispetto agli stadi iniziali della MF, si registri una riduzione dei livelli di espressione di CCR4 e CXCR3 e dei loro ligandi CCL17 e CXCL10 rispettivamente; collateralmente si rileva inoltre un aumentato livello di espressione di CCR7, un recettore necessario per l'immissione in circolo dei linfociti T [42].

Dal punto di vista immunologico inoltre, l'espansione di un clone neoplastico costitutivamente attivato, si associa ad una disregolazione del sistema immunitario normale [43] che si traduce nella soppressione della popolazione T linfocitaria normale, in particolare dei linfociti T CD8+ e NK, così come delle altre linee effettrici dell'immunità adattativa, le cellule dendritiche (DC) e i monociti (figura 6) [40, 44].

I linfociti T patologici esprimono generalmente un fenotipo T-helper 2 (Th2); tale caratteristica tende a sbilanciare la risposta immunitaria inibendo la risposta T-helper 1 (Th1) attraverso la produzione cronica elevata di citochine Th2 quali IL-4, IL-5 e IL-10 e la riduzione di citochine Th1 come IL-12 e IFN- α [45]. Tra le anomalie nell'assetto delle citochine, sono stati riportati anche livelli incrementati di IL-7 e IL-15, che potrebbero contribuire alla proliferazione incontrollata delle cellule neoplastiche [46]. Nello specifico, IL-4 e IL-10 inibiscono la funzionalità delle cellule NK e dei linfociti T CD8+, contribuendo a sopprimere la risposta cellulare di tipo Th1. IL-10 tende inoltre ad inibire la produzione di IL-12 da parte delle DC e di IFN- γ da parte delle cellule NK, ostacolando così la normale maturazione e differenziazione delle DC [47]. Infine, la ridotta espressione del ligando di CD40 (CD40L) sul clone neoplastico T inibisce la normale differenziazione delle DC. L'overespressione del CD40L durante l'attivazione delle cellule T e la sua interazione con CD40, espresso in modo costitutivo dalle DC, è un passaggio cruciale per l'attivazione di queste ultime; senza questa interazione vi è una marcata riduzione nell'attivazione delle DC con conseguente riduzione della secrezione di IL-12 [48].

In questo panorama di disregolazione del sistema immunitario, recenti studi hanno inoltre messo in evidenza come i linfociti T patologici CD4+ possano esprimere, in seguito ad opportuni stimoli un fenotipo T regolatorio CD25+ [49]. Tali cellule, se messe in coltura con DC precedentemente stimulate da linfociti T e pertanto già attivate, aumentano l'espressione di Foxp3 producendo elevati livelli di IL-10 e TGF- β [50].

Entrambe queste citochine hanno un importante effetto inibitorio sulle DC, sulle cellule NK e T CD8+, contribuendo pertanto all'immunodepressione che tipicamente accompagna la SS.

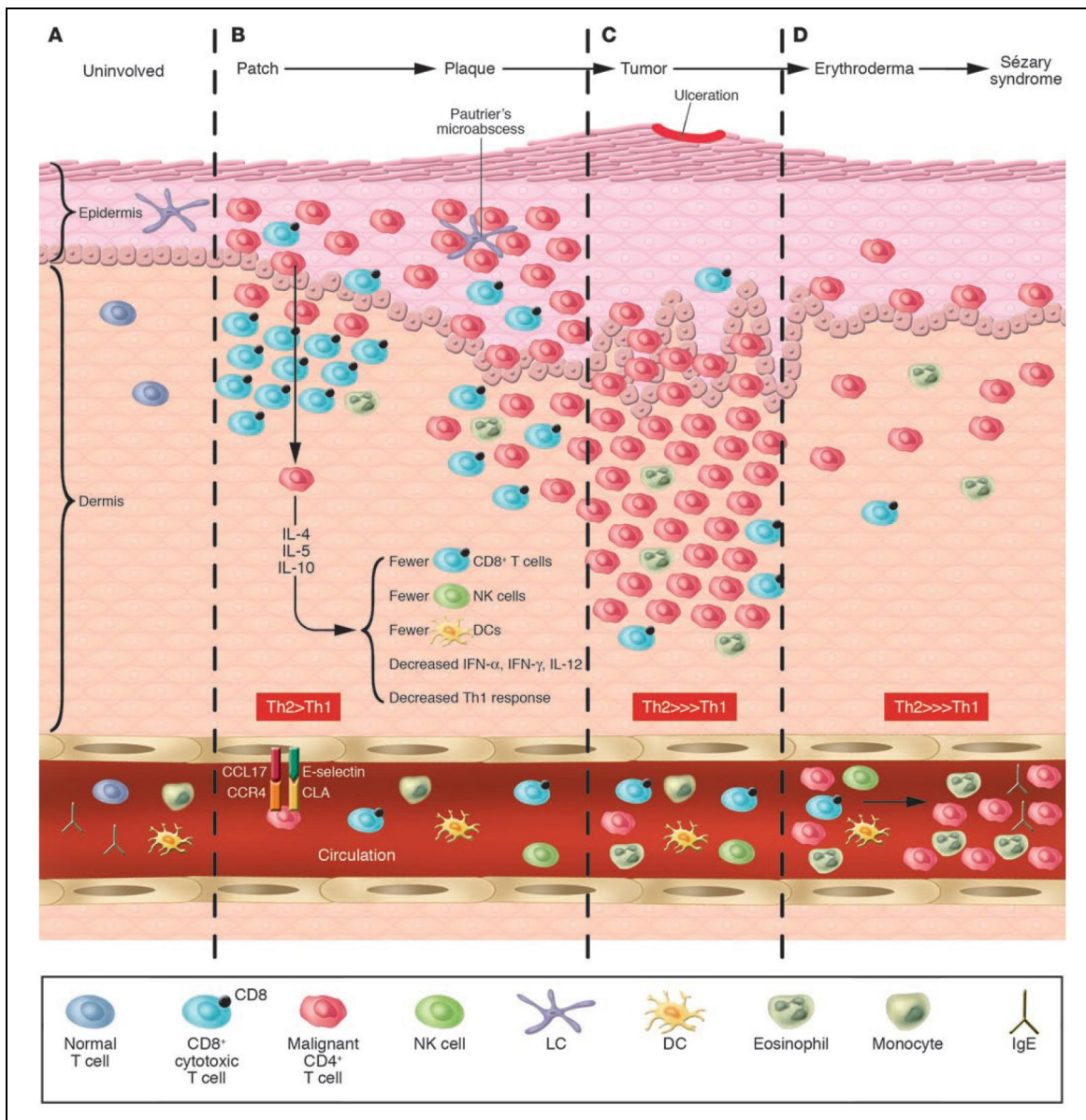


Figura 6. Coinvolgimento del microambiente nella progressione di malattia della MF/SS [23].

La riduzione nel numero e nella funzionalità dei linfociti T CD8+ e dei linfociti NK è associata, dal punto di vista clinico, ad un deterioramento della sorveglianza immunitaria sia antitumorale che nei confronti di microrganismi patogeni. Esempi di questo fenomeno sono le ripetute e disseminate infezioni da HSV/VZV anche in pazienti non precedentemente immunosoppressi da chemioterapie [51, 52] e la maggior frequenza di melanomi e carcinomi cutanei secondari pur in assenza di precedenti stimoli radio/chemioterapici [53].

Un'altra caratteristica immunologica associata alla progressione di malattia, è l'aumento dell'eosinofilia periferica e dei livelli di IgE totali [43, 54]; l'eosinofilia periferica è stato dimostrato essere un marker prognosticamente sfavorevole in quanto indice di progressione di malattia [55]. È particolarmente importante sottolineare come la scomparsa dell'eritrodermia, delle linfoadenomegalie e dei sintomi B in seguito ad efficace trattamento, si accompagni ad una completa risoluzione anche della concomitante disregolazione immunitaria [56]; questo a controprova del fatto che probabilmente il clone patologico è anche responsabile delle alterazioni immunitarie tipiche della SS.

Dal punto di vista clinico la SS è caratterizzata dalla comparsa (de novo o da precedente MF) di un'eritrodermia spesso fortemente pruriginosa, che può essere associata ad intensa esfoliazione, edema e lichenificazione. Sono comunemente associati linfoadenomegalie superficiali e profonde, alopecia, onicodistrofia e ipercheratosi palmo-plantare. Negli stadi avanzati vi può essere inoltre interessamento oculare, che si manifesta con blefarocongiuntivite ed ectropion [13].

Molto frequentemente la diagnosi è tardiva in quanto sintomi aspecifici quali prurito e xerosi cutanea vengono attribuiti all'età avanzata e possono essere necessari anni perché si sviluppi un quadro di eritrodermia esfoliativa. L'eritrodermia inoltre entra in diagnosi differenziale con quadri cutanei assolutamente aspecifici come reazioni cutanee da farmaci, reticulosi attinica, reazioni pseudolinfomatose indotte da farmaci, gravi reazioni di tipo eczematoso, psoriasi, dermatite seborroica, parapsoriasi, pitiriasi rubra pilaris e stati di fotosensibilità (es. lupus e dermatomiosite).

Morfologicamente le cellule di Sézary sono linfociti atipici dotati di nucleo convulso o cerebriforme, presenti sia nella cute che nel sangue periferico. Il quadro istologico cutaneo può risultare simile a quella della MF con un infiltrato cellulare che tende ad essere per lo più monomorfo e con un epidermotropismo a volte assente [57]. Particolarmente rilevante ai fini diagnostici è il fatto che in più di un terzo delle biopsie cutanee di pazienti affetti da SS il quadro istologico risulta non specifico, non distinguibile da quadri istologici tipici di alcune patologie benigne di tipo infiammatorio (infiltrato perivascolare superficiale, perivascolare superficiale e profondo, spongiotico, psoriasiforme, con infiltrato lichenoide etc.) [57]. Il quadro istologico linfonodale è caratterizzato da un infiltrato di cellule di Sézary denso e monotono con perdita della normale architettura linfonodale [58]. Il midollo osseo può essere coinvolto, ma spesso gli infiltrati sono sparsi e prevalentemente interstiziali [59].

Le cellule di Sézary presentano un fenotipo linfocitario T helper CD4+ ed esprimono pertanto antigeni associati alle cellule T: CD2+, CD3+, CD5+; circa i 2/3 sono CD7- e

quasi tutte sono CD4+/CD8-, CD45RO+, CD26-, CD60+, CD49d- [60, 61]. I geni del TCR mostrano un riarrangiamento clonale [30, 62]. Non sono state identificate traslocazioni ricorrenti, ma il riscontro di un cariotipo alterato è un reperto comune [63].

Dal punto di vista diagnostico la SS rientra nel gruppo degli E-CTCL (erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma), linfomi cutanei a cellule T caratterizzati dalla presenza di eritrodermia (eritema diffuso a più dell'80% della superficie cutanea). In questo gruppo rientrano: la sindrome di Sézary (fase leucemica dei E-CTCL), la micosi fungoide eritrodermica (E-MF), e gli E-CTCL NOS (not otherwise specified) [64, 65]. Le caratteristiche cliniche della SS si sviluppano solitamente "de novo" nel giro di un breve intervallo di tempo (SS variante classica), in alcuni casi invece sono preceduti da prodromi quali la presenza di prurito o quadri di dermatite aspecifici, o infine possono insorgere da una tipica MF. L'International Society for Cutaneous Lymphoma (ISCL) raccomanda che questi ultimi casi siano indicati come "SS preceduta da MF" o "SS secondaria", in ragione delle possibili differenze nel comportamento clinico e nella prognosi [66]. La percentuale di cellule di Sézary circolanti richiesta per la diagnosi di SS rimane una questione controversa. Russell-Jones et al. hanno proposto come criteri minimi per fare diagnosi di SS la presenza di eritrodermia, un'istologia cutanea compatibile, >5% di cellule di Sézary circolanti e l'evidenza nel sangue periferico di un clone T cellulare [67]. L'ultima revisione ISCL/EORTC concorda sul fatto che la diagnosi di SS non possa prescindere da uno o più dei seguenti criteri ematologici: (1) una conta assoluta di cellule di Sezary $\geq 1000/\text{mm}^3$, (2) un rapporto CD4/CD8 > 10 per l'incremento delle cellule CD4+ circolanti +/- un immunofenotipo aberrante (per esempio, la perdita degli antigeni pan-T: CD2, CD3, o CD5, e/o CD4 e CD8), (3) un'aumentata conta linfocitaria con l'evidenza di un clone T cellulare nel sangue periferico, evidenziato con la metodica di Southern blot o mediante PCR [68-72].

LA COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION

La “Comparative Genomic Hybridization” (CGH) è una tecnica introdotta nel 1992 da Kallioniemi *et al.* [73], per rilevare anomalie numeriche di copie di geni allo scopo di individuare gli hot spot specifici per una determinata patologia. La tecnica tradizionale per la rilevazione di tali anomalie è l’indagine citogenetica che, tramite i bandeggi dei singoli cromosomi, consente la ricostruzione del cariotipo (morfologia) e la messa in evidenza di eventuali aberrazioni (trisomie, traslocazioni, ecc). La limitazione principale della citogenetica convenzionale, che rappresenta lo standard di valutazione del cariotipo in molteplici patologie, risiede nella sua bassa sensibilità.

La CGH è stata sviluppata per identificare variazioni del numero di geni soprattutto in campioni oncologici per i quali è difficile ottenere metafasi con risoluzione di bandeggio accettabile. Si tratta di una tecnica citogenetica utilizzata per individuare aberrazioni cromosomiche sbilanciate; essa permette di analizzare, per mezzo di una singola ibridazione l’intero genoma evidenziando amplificazioni o delezioni di regioni cromosomiche in cui potrebbero essere localizzati geni aventi un ruolo nello sviluppo e nella progressione dei tumori.

La CGH consiste dunque nell’ibridazione competitiva di metafasi di cromosomi umani normali con due differenti DNA genomici (DNA tumorale e DNA normale), marcati con due diversi fluorocromi per esempio verde (fluorescina) e (rosso rodamina). Per mezzo di tale ibridazione la differenza delle quantità dei DNA legati ai cromosomi, viene evidenziata dal rapporto dell’intensità della fluorescenza lungo ogni cromosoma metafasico, mostrando quali regioni del genoma tumorale sono guadagnate o perse. La CGH ha permesso di compiere enormi passi avanti nell’analisi delle anomalie cromosomiche in campo oncologico offrendo la possibilità di identificare aberrazioni, tra cui le amplificazioni e la presenza di delezioni criptiche (submicroscopiche), che con la tecnica dell’analisi citogenetica con bandeggio non potevano essere individuate.

La successiva evoluzione di questa metodica è stata lo sviluppo dell’arrayCGH, in cui i cromosomi metafasici sono stati sostituiti da una matrice su cui sono stati spottati cloni YAC/BAC/PAC (Yeast-lievito, Bacterial, Plasmid Artificial Chromosome) di circa 150kb, corrispondenti a loci specifici su un determinato cromosoma. L’utilizzo di questi cloni permette l’immediata correlazione tra l’eventuale alterazione e una precisa posizione all’interno del genoma. La risoluzione dipende quindi dalla lunghezza delle sonde utilizzate e dalla distanza tra un clone e l’altro. Il formato microarray ha permesso la standardizzazione della tecnica garantendo la ripetibilità e l’affidabilità del risultato e portando così allo sviluppo di dispositivi diagnostici basati su arrayCGH. L’arrayCGH è

stata utilizzata con successo per tracciare il profilo genomico di una vasta gamma di tumori; recentemente la sua applicazione allo studio di anomalie cromosomiche costituzionali ha permesso di rilevare delezioni e duplicazioni in singola copia [74]. Il principio su cui si basa la tecnica di array CGH è la coibridazione del DNA in esame e del DNA di controllo, marcati con fluorocromi diversi, su un microarray costituito da sonde genomiche. I fluorocromi solitamente utilizzati sono Cy3, che emette una lunghezza d'onda nel campo del verde, e Cy5 che appare rosso.

Il microarray è costituito da un supporto solido (vetro, plastica o chip silconici) trattato chimicamente, su cui vengono spottate una serie di sonde il cui numero può variare da poche centinaia a molte migliaia. Ogni sonda è presente almeno in duplice copia per minimizzare i possibili errori. A seguito di questa coibridazione sia il DNA in esame che quello di controllo si legheranno alle sonde presenti in ciascuno spot.

Alla fine del processo di coibridazione vengono emessi due distinti segnali; un software specifico analizza quindi i vari spot e calcola il \log_2 del rapporto di fluorescenza dei fluorocromi ibridati (\log_2 ratio) e una serie di parametri utili per definire la qualità dei dati. Il \log_2 riflette il numero di copie di DNA relativo fra i due campioni ibridati. I dati vengono normalizzati affinché il \log_2 medio sia pari a zero; ciò è importante perché una differente efficienza di ibridazione porta una differente luminosità globale delle misure fornite dai microarray. Il potere di risoluzione dell'array CGH va da poche decine di Kb ad alcuni Mb, a seconda del numero, della dimensione e dello spazio fra le sonde presenti sull'array (figura 7) [75].

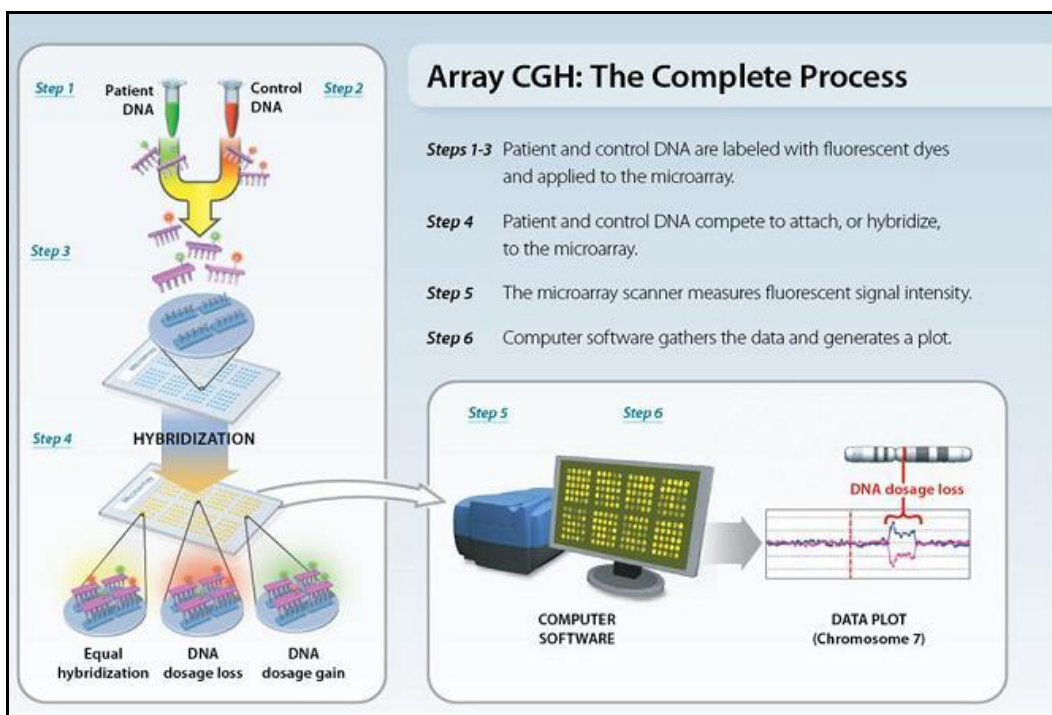


Figura 7. Schema del funzionamento del microArray.

L'arrayCGH associa ai vantaggi già citati della CGH tradizionale, un'elevata specificità caratterizzata da un basso numero di falsi positivi e falsi negativi. La qualità e la specificità della metodica può essere verificata e il risultato validato in ogni singolo laboratorio attraverso l'utilizzo di alcuni accorgimenti tra cui la ripetizione del test e la ripetizione con il "dye swap" che inverte, nel secondo esperimento, i colori con cui viene condotta la marcatura del DNA del paziente e del controllo consentendo di ridurre al minimo gli effetti dovuti al background dei fluorocromi, ossia il segnale di fluorescenza medio dato dai non-target pixels. Questa tecnica inoltre, pur con i limiti derivanti dal tipo di piattaforma utilizzata, garantisce una maggior sensibilità; più alto è il numero delle sonde sull'array, maggiore sarà infatti la risoluzione.

I limiti dell'arrayCGH consistono sostanzialmente nell'incapacità di rilevare aberrazioni bilanciate e nell'impossibilità di identificare i mosaici con coinvolgimento inferiore al 10-30% del numero totale delle cellule. Inoltre a causa del meccanismo di normalizzazione del \log_2 , non è possibile identificare le poliploidie.

I microRNA

I microRNA (miRNA) sono brevi sequenze di RNA non codificante, di circa 22 nucleotidi, la cui funzione principale è la regolazione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale. Sono regioni endogene a doppio filamento localizzate tra introni, tra esoni di geni codificanti per proteine (70%) o nelle regioni intergene (30%) [76]. I miRNA vengono normalmente trascritti dalla polimerasi II in un trascritto primario (pri-miRNA) lungo qualche kbase, che viene successivamente processato nel nucleo (attraverso l'enzima Drosha) ottenendo un pre-miRNA di 70 nucleotidi a doppio filamento. Il pre-miRNA entra così nel citoplasma trasportato dall'esportina 5, dove l'ulteriore clivaggio da parte dell'RNasi DICER porta alla formazione di un miRNA maturo di 22 nt. Ogni microRNA maturo, dopo svolgimento in singola elica e successivo clivaggio, si assembla con un gruppo di proteine per formare un complesso ribonucleoproteico (miRNP), chiamato RISC complex (RNA-induced silencing complex) che a sua volta silenzia l'espressione degli RNA messaggeri (mRNA) contenenti sequenze complementari a quelle del miRNA. Il complesso costituito da RISC e miRNA si associa per complementarità imperfetta alla 3'UTR dell'mRNA target, causando in questo modo il blocco della traduzione di quell'mRNA. Questo effetto inibitorio richiede solitamente il legame di più microRNA a diversi siti parzialmente complementari all'interno di un dato mRNA (Figura 8) [77].

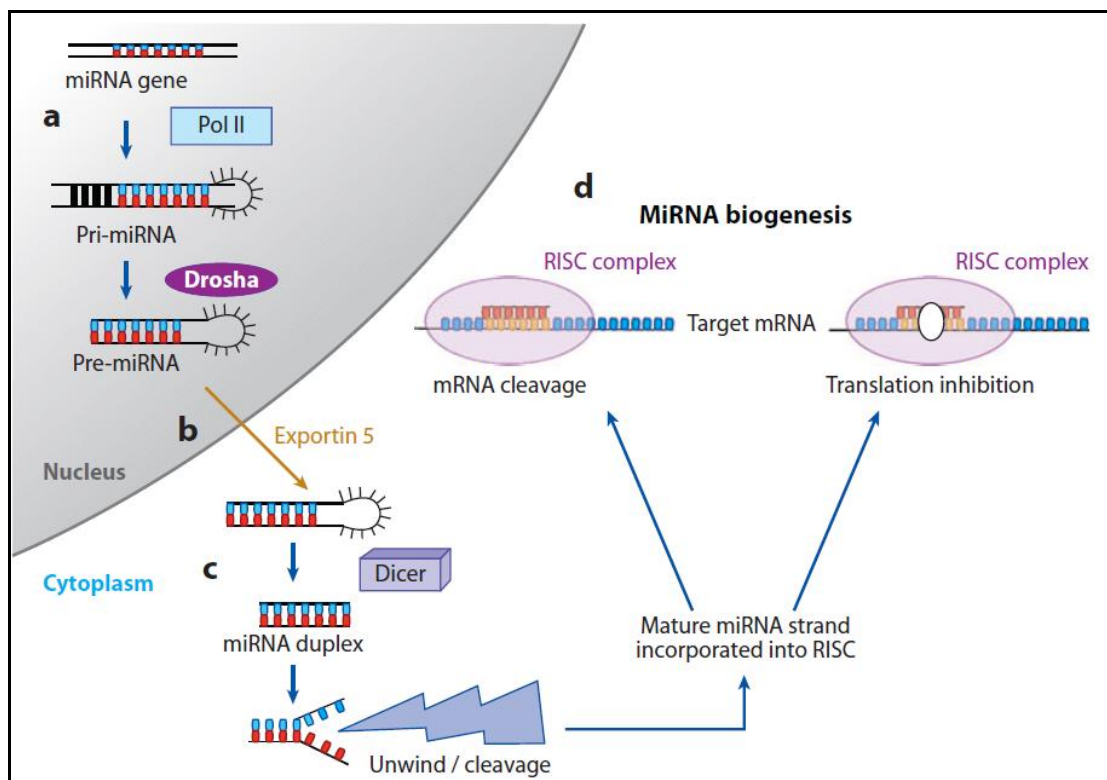


Figura 8. Schema della biogenesi dei microRNA. Carthew, RW, Cell, 2009

Al pari dei geni codificanti per proteine, i miRNAs possono agire come oncosoppressori (quando la loro mancata espressione causa o promuove la crescita tumorale) [78], come oncogeni (quando la loro overespressione favorisce l'oncogenesi) [79], attraverso la degradazione di specifici target genici oppure in seguito ad aberrazioni di espressione. L'espressione dei miRNA, infatti, può essere alterata in seguito ad amplificazioni, delezioni e mutazioni genomiche [80] oppure può essere regolata attraverso meccanismi epigenetici quali l'ipermetilazione [81] o attraverso il controllo diretto da parte di altri geni (ad esempio l'espressione di miR-34 viene aumentata da TP53) [82, 83].

Diversi studi hanno evidenziato come i miRNA siano in grado di condizionare l'azione di circa il 30% dei geni umani, influenzando su svariati processi biologici, quali il ciclo, il differenziamento e la crescita cellulare, l'apoptosi e il metabolismo [84, 85]. Inoltre giocano un ruolo nella patogenesi di diverse malattie, come il diabete, i disordini immunitari e i processi neurodegenerativi [86-88]. Un numero sempre crescente di lavori ha inoltre dimostrato come una disregolazione dell'espressione dei miRNA possa avere un ruolo chiave nello sviluppo dei tumori [89-91]. A supporto di questa ipotesi si è visto che più della metà delle regioni codificanti per i miRNA sono localizzate all'interno o in vicinanza di siti fragili, di minime regioni di delezione, di duplicazione e in concomitanza di "breakpoints" comunemente associati alla tumorigenesi [92]. Per esempio, il cluster di miRNA17-92 è localizzato nella regione cromosomica 13q31 frequentemente amplificata nei linfomi; miR-143 e miR-145 sono localizzati sulla regione 5q33 che è spesso deleta nelle sindromi mielodisplastiche, mentre il riarrangiamento del miR-125b-1, giustapposto al locus delle catene pesanti delle immunoglobuline, è stato descritto nei pazienti affetti da leucemia linfoblastica a cellule B [93].

Studi successivi hanno sistematicamente analizzato i profili miRNA di diversi tipi di neoplasie e dei corrispettivi tessuti normali [80, 94, 95]. Sono state così scoperte delle "signature" di microRNA sia nelle neoplasie solide che in quelle ematologiche, in grado di distinguere le cellule tumorali dalla rispettiva controparte normale, e potenzialmente correlate ad una progressione di malattia e ad una conseguente prognosi sfavorevole [80, 94, 95].

STUDI MOLECOLARI SULLA SS

Fin dai primi anni 70, diversi studi hanno cercato di identificare attraverso tecniche di citogenetica convenzionale aberrazioni cromosomiche ricorrenti che potessero in qualche modo indirizzare verso la comprensione della patogenesi dei linfomi cutanei a cellule T e della SS. Tali tentativi non hanno avuto successo per una serie di ragioni tra le quali la difficoltà di far crescere in coltura cellule tumorali isolate da biopsie cutanee, sia perché tali cellule sono generalmente linfociti T maturi con basso indice proliferativo, sia perché normalmente la cute è un tessuto ricco in linfociti reattivi che inficiano il buon esito dell'esperimento [96, 97]. Ciononostante alcune alterazioni citogenetiche, per lo più associate ad una prognosi peggiore, sono state segnalate in maniera sporadica in casistiche più o meno ampie di pazienti [98, 99]. Tali aberrazioni cromosomiche riguardano essenzialmente delezioni o duplicazioni a carico dei cromosomi 1, 6, 7, 8, 9, 10 e 17 [100, 101]; pur non essendo utile in termini diagnostici, tale osservazione ha permesso di indirizzare la ricerca sulla verosimile instabilità genetica caratteristica dei CTCL e della SS in particolare.

Recenti approcci di array CGH hanno permesso di individuare diverse alterazioni cromosomiche numeriche e strutturali in modo più dettagliato e nello specifico di dimostrare la frequente perdita di materiale genetico (1p, 10p, 10q, and 17p) piuttosto che la presenza di duplicazioni (8q and 17q) [102]. Tuttavia non sono state ancora individuate aberrazioni genetiche altamente ricorrenti. Successivi studi di "gene expression profiling" hanno permesso di scoprire la deregolazione dell'espressione di diversi oncogeni e oncosoppressori tra i quali TGF- β R2, JUNB, STAT4, MMP9, MXI1 e TWIST [63, 103, 104].

Altri gruppi hanno suggerito un coinvolgimento di una serie di altri geni coinvolti nel pathway di NF- κ B, tra cui BAG4 (8p11.23), BTRC (10q24.32), NKIRAS2 (17q21.2), PSMD3 (17q21.1) e TRAF2 (9q34) [105, 106]. Da segnalare il possibile coinvolgimento anche di BUB3 (10q26) coinvolto nel checkpoint del fuso mitotico e dell'oncoproteina SET (9q34) [107].

Di particolare interesse, tra i geni che potrebbero contribuire allo sviluppo e alla progressione della SS, sono l'oncogene cMYC (8q24.21) e l'oncosoppressore TP53 (17p13.1) che risiedono nelle regioni cromosomiche più comunemente interessate da alterazioni. Una overespressione di cMYC contribuisce alla tumorigenesi promuovendo la proliferazione e inibendo la differenziazione cellulare oltre che aumentando l'instabilità genomica [108, 109]. Da sottolineare come, nella maggior parte dei pazienti affetti da

SS, non si rileva la sola overespressione di cMYC, ma anche una down regolazione dell'espressione di due geni antagonisti quali MXI1 e MNT [110].

Basandosi su questi dati Vermeer e coll. hanno proposto un modello ipotetico della patogenesi della SS, nel quale l'alterazione a livello di più pathways indurrebbe un aumento della proliferazione cellulare e una concomitante diminuzione della loro apoptosi (figura 9).

In tale modello un ruolo fondamentale sarebbe giocato dalla proteina cMYC che, per funzionare come fattore di trascrizione, richiede l'eterodimerizzazione con MAX. Di contro, anche MNT e MXI1 interagiscono con MAX inibendo l'attività trascrizionale di cMYC. A supporto di ciò, alcuni studi sui topi hanno dimostrato che la perdita di MNT e MXI1 può promuovere la proliferazione e favorire la tumorigenesi, portando ad un alterato sviluppo delle cellule T e, da ultimo, promuovendo l'insorgenza di neoplasie linfoidi [111, 112]. Nelle cellule di Sézary i livelli di espressione di cMYC sono paragonabili a quelli dei linfociti T CD4+ presenti nei pazienti affetti da dermatite atopica eritrodermica, nei quali è nota la presenza di cellule T attivate altamente proliferanti. In questi ultimi pazienti però, a differenza di quelli affetti da SS, è presente anche un'elevata espressione di MNT e MXI1, che agiscono come regolatori di cMYC [111-113]. Si potrebbe ipotizzare che l'azione di cMYC agisca da soglia nel processo di trasformazione neoplastica e che ulteriori alterazioni geniche a carico di suoi effettori siano in grado di accelerare la progressione neoplastica indotta da cMYC [110]. Alterazioni di TP53 o p14ARF per esempio, potrebbero collaborare con cMYC nella trasformazione neoplastica dei linfociti [114], mentre un'elevata espressione di TWIST potrebbe inibire l'azione proapoptotica di cMYC attraverso la soppressione del pathway p14 ARF/TP53 come nel neuroblastoma [115]. Questo tipo di meccanismo è supportato dal fatto che nella SS il sistema di feedback può risultare abolito nel caso di una delezione della regione cromosomica 17p13.1 (che causa la perdita di TP53), di quella contenente CDKN2A (9p21), così come l'amplificazione di TWIST nel caso della duplicazione della regione cromosomica 7p21 [110]. Oltre a cMYC e ai suoi inibitori, l'altro fattore che potrebbe contribuire a promuovere lo sviluppo e la progressione della SS, è il pathway di JAK/STAT attraverso la fosforilazione delle proteine STAT3 e STAT5 da parte delle citochine IL-2, IL-7 e IL-5 [116-119]. Lo studio di Vermeer ha infatti rilevato elevati livelli di espressione di IL-2, IL-2R α e IL-2R β , in combinazione alla duplicazione del cluster STAT3/STAT5 e alla delezione di DUSP5 e TCF8 [110], i quali normalmente inibiscono rispettivamente la produzione e il "signaling" di IL-2 [120, 121]. È infine da rilevare che l'instabilità genica caratteristica della SS può contribuire ai meccanismi sopracitati attraverso, per esempio, alla delezione della regione

cromosomica 10q24.1, alla perdita di FAS (gene coinvolto nell'apoptosi) e alla delezione delle regioni 17p13.3-p13.1. All'interno di queste ultime sono localizzati TP53, RPA1 e HIC, particolarmente importanti nei meccanismi di riparazione del DNA [122, 123]. Altri studi hanno dimostrato l'amplificazione del protooncogene Her2/neu (17q21-22), l'overespressione del protooncogene JUNB (19p13) e una diminuita espressione degli oncosoppressori p15, p16 (9q21) [124, 125].

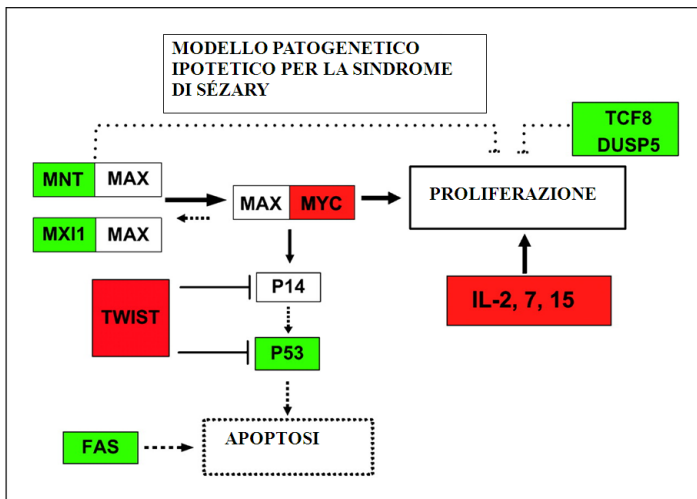


Figura 9. Modello patogenetico della SS proposto da Vermeer et al: in verde i geni deleti, in rosso quelli amplificati; le linee evidenziate indicano un'aumentata attività, quelle tratteggiate un'attività ridotta.

Paragonando la presenza di alterazioni cromosomiche e di alterazioni a livello dell'espressione genica, si è notato come non sempre vi sia una chiara correlazione tra alterazioni genomiche e alterazioni trascrizionali. Recentemente alcuni autori hanno dimostrato come i miRNA possano giocare un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica [126]. Nella SS recenti studi hanno dimostrato soprattutto una down-regolazione (piuttosto che una up-regolazione) di alcuni miRNA senza che ciò si relazioni sempre ad alterazioni dei geni specifici. Ballabio e coll. hanno evidenziato una upregolazione di miR-152, che è codificato nella regione 17q21.32, sede di amplificazione genica nel 70% dei casi analizzati; allo stesso modo il locus 13q14, frequente sede di delezioni nei pazienti affetti da SS, codifica per miR-15 e miR-16, entrambi spesso down-regolati [127]. Allo stesso tempo, come descritto in altri studi [128] tale correlazione non è sempre mantenuta: nello stesso lavoro infatti, alcuni miRNA codificati da regioni cromosomiche sede di amplificazioni (4p16.1, 8q24.1 e 17q25) sono risultati downregolati (miR-95, miR-30, miR-338)[127]. Ciò suggerisce che l'espressione di questi microRNA sia regolata non solo da aberrazioni geniche ma anche da altri meccanismi. È stato recentemente dimostrato che MYC, iperespresso nella SS [110], downregola un certo numero di microRNA, tra cui per esempio miR-30. Effettivamente, è stato dimostrato che tutti i microRNA la cui espressione viene inibita da MYC (miR-22, miR26a, miR-29c, miR-30, miR-146a e miR150) sono downregolati

anche nella SS [129]. Particolare rilevanza clinico-diagnostica sembra assumere miR-223 che appare in grado di distinguere con una specificità del 91% e una sensibilità del 90% i pazienti affetti da SS e MF dai controlli sani [127]. Altrettanto importante sembrerebbe la downregolazione di miR-342, che assumerebbe un ruolo antiapoptotico promuovendo l'espressione di TNFSF11, i cui livelli sono normalmente aumentati nelle cellule quiescenti [130]. TNFSF11 sembra infatti assumere un ruolo antiapoptotico in quanto in grado di promuovere la produzione de parte delle DC di IL15 che è in grado di favorire la sopravvivenza dei linfociti T [131].

Lo studio recentemente pubblicato da Narducci et al ha permesso di confermare in parte i dati di Ballabio et al (tra cui l'anomala espressione di miR-223 e miR-342) e di identificare 45 miRNA espressi in maniera diversa tra i pazienti affetti da SS e i controlli sani; tra questi 45 miRNA è stato inoltre individuato un pannello di 14 miRNA, tra cui miR-21 (17q23.1), miR-214 (1q24.3), miR-486 (8p11.21), miR-18a (13q31.3) e miR-31 (9p21.3), potenzialmente utile nel discriminare i pazienti per classi di rischio [132].

SCOPO DELLA TESI

Questa tesi riporta i risultati di uno studio molecolare condotto su pazienti affetti da sindrome di Sézary seguiti presso l'U.O. di Ematologia-Centro Trapianti di Midollo Osseo in collaborazione con la U.O. di Dermatologia della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico - Università degli Studi di Milano. Lo studio si propone di caratterizzare dal punto di vista biologico e molecolare un gruppo di pazienti affetti da sindrome di Sézary mediante l'utilizzo di due differenti metodiche: l'arrayCGH e lo studio del profilo d'espressione dei microRNA.

In particolare, lo studio si prefigge i seguenti obiettivi:

- ✓ Individuare anomalie citogenetiche ricorrenti e identificare un pattern di espressione di miRNA in una serie di almeno 20 pazienti affetti da sindrome di Sézary indipendentemente dallo stadio di malattia.
- ✓ Per quanto riguarda lo studio con arrayCGH, ci si propone di correlare le eventuali alterazioni ricorrenti riscontrate ad una serie di dati clinici e di laboratorio, per favorire l'individuazione di eventuali markers diagnostici e prognostici.
- ✓ Per ciò che concerne la valutazione del profilo di espressione dei miRNA, ci si propone di valutarne l'impatto prognostico correlando la loro presenza ai dati clinici e laboratoristici raccolti. I miRNA inoltre, potrebbero essere considerati come un possibile target terapeutico essendo essi coinvolti in diversi pathway oncogenici.

PAZIENTI E METODI

SELEZIONE DEI PAZIENTI

Per lo studio di arrayCGH sono stati selezionati 40 pazienti affetti da sindrome di Sézary all'esordio o in follow up, seguiti presso le U.O. di Ematologia della Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, in collaborazione con l'U.O. di Dermatologia dello stesso Ente.

Di tutti è stata dimostrata la presenza di una popolazione clonale di linfociti T nel sangue periferico mediante valutazione dei riarrangiamenti del T-cell receptor (catene gamma e/o beta) effettuata con metodica di PCR e analisi degli heteroduplex.

Tutti i pazienti presentavano un immunofenotipo CD4+ e perdita degli antigeni CD26 e/o CD7.

Il campione in esame era rappresentato da cellule mononucleate separate mediante gradiente di densità (PBL) in 12 pazienti e da linfociti selezionati CD4+ con metodo immunomagnetico in 28 pazienti.

I pazienti che disponevano di campioni PBL presentavano un'espansione linfocitaria con una conta di CD4+ (almeno 60% delle cellule mononucleate) tale per cui il campione dopo separazione su gradiente fosse adeguatamente rappresentativo della popolazione patologica.

Per questi pazienti a livello clinico è stato creato un database in cui sono state inserite le seguenti informazioni, riportate come variabili categoriche: l'età alla diagnosi (<70 anni o >70 anni), il tempo del prelievo rispetto alla diagnosi (<2 anni o >2 anni), i valori dei linfociti totali (normali o alti) e di LDH (normali o alte) al momento del prelievo, e se prima dell'esecuzione del prelievo era stato eseguito uno o più trattamenti chemioterapici (no o sì). In seguito questi dati sono stati messi in relazione ai risultati ottenuti con l'arrayCGH per vedere se vi fossero delle correlazioni tra essi e le alterazioni cromosomiche ricorrenti riscontrate.

L'analisi statistica è stata effettuata ricorrendo a tabelle di contingenza e l'associazione tra variabili è stata analizzata mediante il test esatto di Fisher. Il livello di significatività è stato fissato a 0.05.

Lo studio del profilo di espressione dei microRNA è stato eseguito su 14 pazienti che disponevano di campioni di linfociti selezionati CD4+ e di 6 controlli sani.

I miRNA espressi in modo differenziale (fold change cut-off 2.0) sono stati individuati tramite l'utilizzo di test statistici basati sul T test non accoppiato con varianze eterogenee (procedura di Welch), fissando il livello di significatività a 0.05. I profili miRNA sono quindi stati analizzati mediante clustering gerarchico non supervisionato.

METODOLOGIA

SEPARAZIONE DELLE CELLULE MONONUCLEATE

La separazione delle cellule mononucleate è stata eseguita mediante separazione in gradiente di densità (gradiente Histopaque®, densità: 1,077 g/ml)

SEPARAZIONE CELLULE CD4+ DA CELLULE MONONUCLEATE

La selezione delle cellule CD4+/CD14- è avvenuta mediante metodica immunomagnetica (kit *MACS® Miltenyi Biotec*) partendo da campioni di cellule mononucleate separate secondo gradiente di densità. A questo scopo sono state eseguite due selezioni, la prima per isolare i monociti CD14+ e la successiva sulla frazione negativa (CD14-) per separare i linfociti CD4+.

ANALISI CITOFLUORIMETRICA

Le marcature per l'analisi immunofenotipica al citofluorimetro sono state eseguite a partire da prelievi di sangue intero di 40 pazienti e di 16 controlli sani, su campioni contenenti in media 200000 cellule, utilizzando anticorpi monoclonali coniugati con i fluorocromi isotocianato di fluoresceina (FITC), ficoeritrina (PE), allofococianina (APC) e proteina peridina-clorofilla (PerCP). In tutti i casi sono stati utilizzati pannelli a quattro colori con anticorpi anti CD3-FITC, CD4-PE o -APC, CD7-FITC, CD8-APC, CD19-APC, CD25-PE, CD26-PE, CD45-PerCP e CD56-PE. Le letture e l'analisi dei campioni sono state eseguite con citofluorimetro BD FACSSanto™ II e software BD FACSDiva, acquisendo 50000 eventi e disegnando un gate sulla popolazione di linfociti individuata sulla base dei parametri fisici di FSC (dimensioni cellulari) e SSC (granulosità). I dati ottenuti sui pazienti e sui controlli sono stati confrontati ed analizzati attraverso test parametrico l'Unpaired T Test e non parametrico Mann-Whitney Test.

PREPARAZIONE DEL DNA

1. Estrazione del DNA. Le cellule CD4+ sono state estratte a partire da prelievi di sangue periferico, utilizzando il kit QIAmp DNA mini kit della Qiagen.
2. Quantificazione del DNA al Nanodrop. Il DNA estratto è stato quindi sottoposto a misurazione mediante Nanodrop. Il Nanodrop è uno spettrofotometro che misura la concentrazione del campione di DNA in funzione dell'assorbanza. L'assorbanza è la

frazione di luce incidente assorbita dal campione che, nel caso del DNA, ha lunghezza d'onda pari a 260 nm, ed è direttamente proporzionale alla concentrazione del DNA. Per misurare la concentrazione del DNA, una volta calcolata l'assorbanza di ogni campione, si moltiplica l'assorbanza con l'eventuale fattore di diluizione e l'opportuno fattore di conversione (1 unità A260 = 50µg/mL per il DNA a doppio filamento); si ottiene così la concentrazione del campione in µg/mL. L'integrità dell'acido nucleico viene verificata mediante corsa su gel di agarosio 1%.

3. Concentrazione del DNA estratto. Questa operazione è stata eseguita, quando il DNA estratto non aveva una concentrazione sufficiente per garantire una buona qualità dei risultati degli array, mediante il sistema Microcon (Millipore). Il sistema 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.

IDENTIFICAZIONE DEI RIARRANGIAMENTI TCR-γ E TCR-β

L'identificazione dei riarrangiamenti monoclonali del TCR-γ e del TCR-β è stata effettuata in multiplex PCR mediante kit "TCR-β + TCR-γ T-Cell Clonality Assay" (InVivoScribe).

I campioni di DNA amplificato sono stati successivamente sottoposti ad analisi di heteroduplex [133] (figura 10).

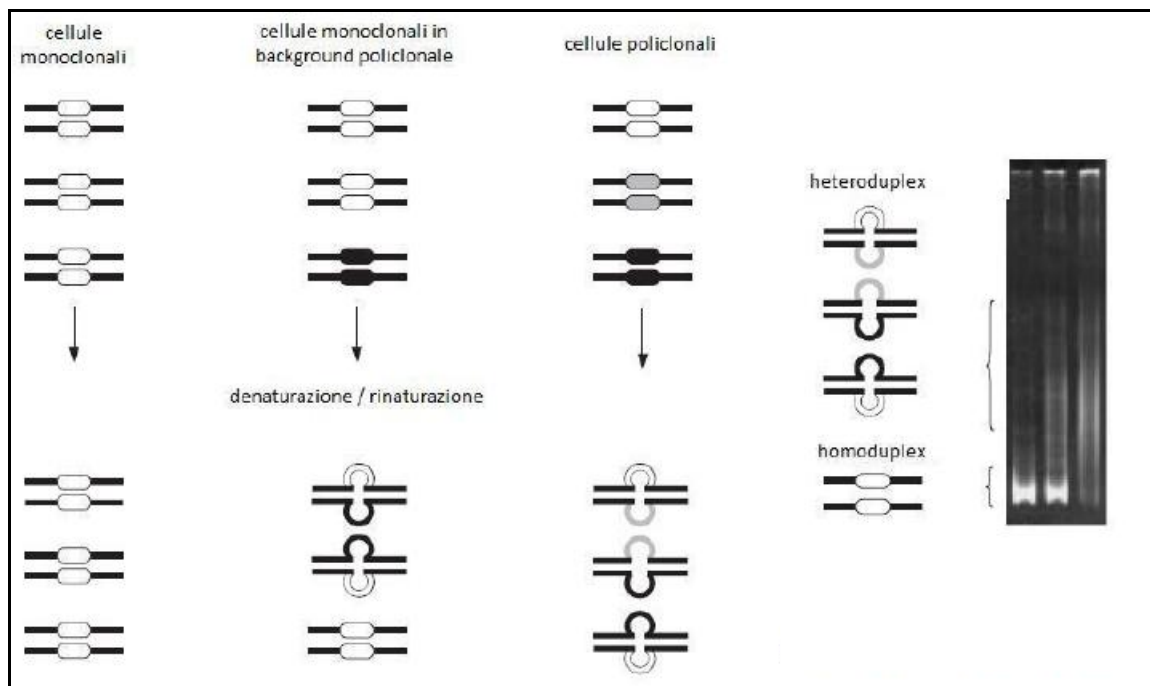


Figura 10. Schema della formazione di homoduplex ed heteroduplex [Modificato da Langerak A.W. et al, 1997]

I campioni sono stati quindi sottoposti a corsa elettroforetica su gel di acrilammide fiancheggiati dal marker (1 μ L MARKER + 19 μ L TBE + 5 μ L blu di metilene) a 70V overnight. Successivamente sono stati colorati in TBE1X/ETIDIO BROMURO 0,5 μ g/mL e fotografati. Tutti i dati sono stati confermati ripetendo l'esperimento almeno due volte.

ARRAY-CGH

La metodica è stata eseguita utilizzando più passaggi, come riportato di seguito.

1. *Digestione del DNA*. Affinchè l'ibridazione possa avvenire, i campioni di DNA devono essere digeriti con enzimi di restrizione. Il DNA è stato innanzitutto letto al nanodrop per misurarne la concentrazione e valutarne l'integrità mediante corsa su gel di agarosio 1%. Per poter comparare l'ibridazione dei campioni in studio è stato quindi necessario preparare in parallelo DNA "reference" la cui unica prerogativa è quella di provenire da un campione dello stesso sesso rispetto a quello in esame (sex-matched reference DNA). I due DNA, quello in esame (DNA test) e il DNA reference, sono stati diluiti separatamente in acqua nucleasi-free; la mix di digestione (per 1 campione) è composta da enzima RSA1, enzima Alu1, albumina sierica bovina(BSA) acetilata e Buffer C.
2. *Marcatura fluorescente del DNA*. La marcatura e i successivi passaggi devono essere eseguiti al buio perché i fluorocromi utilizzati sono sensibili alla luce. Per la marcatura del DNA genomico (gDNA) è stato utilizzato il kit "SureTag Complete DNA Labeling Kit (Agilent) il quale utilizza in modo random primers e una DNA polimerasi (frammento Exo-Klenow) per la marcatura differenziale del DNA con nucleotidi fluorescenti: il campione test è stato marcato con il fluorocromo Cianina-5 (Cy-5) e il "reference" con il fluorocromo Cianina-3 (Cy-3).
3. *Purificazione del DNA marcato*. Da ogni campione di DNA marcato (sia test che reference) sono stati eliminati i nucleotidi marcati non incorporati perché in eccesso attraverso l'utilizzo di colonnine Amicon con filtro da 30kDa. Il DNA raccolto sul filtro è stato quindi eluito e successivamente analizzato al Nanodrop per misurarne la concentrazione e i parametri di resa e attività specifica dei due fluorocromi
4. *Ibridazione del microarray*. L'ibridazione è stata eseguita all'interno di una particolare camera definita "camera d'ibridazione" (Agilent SureHyb chamber). Alla base di questa camera è stato posto uno specifico vetrino coprioggetto su cui sono trasferiti i campioni. Il vetrino coprioggetto è stato quindi posizionato sull'array e l'intero supporto è stato collocato nel "forno di ibridazione" dove è stato posto in rotazione a 20 rpm per 24 ore ad una temperatura di 65°C.

5. Lavaggi. Attraverso due soluzioni di lavaggio, (*Oligo Wash Buffer 1 aCGH* e *Oligo aCGH Wash Buffer 2*), sono stati eliminati i residui di DNA non ibridato e altri reagenti presenti nella miscela che è stata dispersa sul vetrino.
6. Scansione e visualizzazione dei risultati. Gli array sono stati inseriti negli appositi supporti e analizzati attraverso lo Scanner Agilent, che acquisisce l'immagine di ognuno (risoluzione 5 μm) rilevando i segnali di fluorescenza emessi da ogni spot. Appena terminata la scansione viene generato in automatico un QC-Report (Quality Control Report) che attraverso diversi parametri (intensità di segnale, indice di riproducibilità, ecc) permette di valutare se lo studio eseguito è attendibile. Se i parametri sono nella norma, è possibile procedere all'estrazione dei dati 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. In un primo momento tutti i dati di fluorescenza ottenuti vengono normalizzati (il software calcola il \log_2 ratio tra Cy3 e Cy5) così da poter misurare la media per ogni gruppo di spot e la deviazione standard dei valori ottenuti rispetto a quelli di riferimento. Al termine dell'acquisizione dei dati il software genera un rapporto di qualità per ognuno degli array. I dati così ottenuti vengono quindi visualizzati sotto forma di profili di fluorescenza per ogni cromosoma attraverso il software *Agilent Genomic Workbench*; esso colloca 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. La fluorescenza calcolata per ogni 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 quindi esclusi gli spot con segnale di fluorescenza insufficiente (segnale di fluorescenza <20% rispetto al background, derivanti da marcatura fallita) e viene calcolata la media e la deviazione standard del \log_2 ratio della fluorescenza per determinare la presenza di duplicazioni (fluorescence ratios >1) e delezioni (fluorescence ratios <1) del DNA. Per riassumere, se in un campione test 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. I profili CGH sono stati infine confrontati utilizzando il software Integrative Genome Viewer.

MIRNA MICROARRAY SYSTEM

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

1. Estrazione dell'RNA totale da linfociti CD4+/CD14- selezionati da sangue periferico con metodica immunomagnetica ed estratti con Trizol®; successiva analisi della concentrazione e della qualità dell'RNA mediante l'utilizzo del nanodrop ed elettroforesi su gel d'agarosio rispettivamente.
2. Defosforilazione enzimatica dei campioni attraverso l'attività dell'enzima CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), per 30 min a 37°C.
3. Denaturazione dei campioni con DMSO (dimetilsolfossido) a 100°C per 7 min.
4. Marcatura dell'RNA con Cyanine3-pCp (Cy3), grazie all'attività della T4 RNA ligase.
5. Purificazione dei campioni su colonnine Micro Bio-Spin 6 per eliminare il DMSO e la cianina libera.
6. Concentrazione dei campioni utilizzando un concentratore centrifugo sottovuoto a 45-55°C.
7. Risospensione dei campioni in Hi-RPM Hybridization Buffer e denaturazione a 95° - 100°C per 5 min.
8. Ibridazione dei campioni sui vetrini (array) e posizionamento di questi ultimi in forno rotante a 55°C per 20 ore.
9. Lavaggio dei vetrini con appositi wash buffer.

La scansione dei dati avviene infine attraverso lo Scanner Agilent, che acquisisce l'immagine di ognuno di essi rilevando i segnali di fluorescenza emessi da ogni spot. Come per la CGH viene generato in automatico un QC Report. L'analisi dei dati viene infine elaborata attraverso il software *Agilent GeneSpring GX*.

RISULTATI

CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

Lo studio è stato effettuato su una casistica di 40 pazienti con Sindrome di Sézary, di cui 27 con forma “de novo” e 13 con forma secondaria a Micosi Fungoide (tabella 4).

Caratteristica		n	%
Sesso	M	16	40
	F	24	60
Stadio alla diagnosi	IIIB	5	13
	IVA1	28	70
	IVA2	7	17
Fase di malattia al prelievo	esordi	12	30
	follow-up	28	70

Caratteristica	Mediana	range
Età alla diagnosi	67	29-86
Linfociti al prelievo	6700	1400-26700
LDH al prelievo	422	215-1142
Linee di trattamento	2	0-7

A

Parametro		n	%
Età	<70	13	32,5
	>70	27	67,5
T da diagnosi a prelievo	<2 anni	27	67,5
	>2 anni	11	27,5
	NA	2	5,0
LDH al prelievo	normali	20	50,0
	aumentate	12	30,0
	NA	8	20,0
Leucociti al prelievo	normali	21	52,5
	aumentati	13	32,5
	NA	6	15,0
Chemioterapia	no	23	57,5
	si	17	42,5

B

Tabella 4. Caratteristiche epidemiologiche dei pazienti inclusi nello studio (A), Parametri presi in considerazione per l'analisi dei dati (B).

Tra i pazienti che erano stati sottoposti a trattamento prima della raccolta del campione, 3 pazienti avevano ricevuto poli-chemioterapia, 13 mono-chemioterapia e 23 non avevano ricevuto alcun trattamento chemioterapico (solo fotoaferesi o terapia steroidea od entrambi).

ANALISI IMMUNOFENOTIPICHE

L'analisi immunofenotipica è stata effettuata al citofluorimetro su cellule mononucleate a bassa densità da sangue periferico, ottenute in seguito a separazione su gradiente Histopaque® 1077. I dati ottenuti sono stati confrontati con un gruppo di controllo composto da 16 donatori sani. In particolare, lo studio di citofluorimetria è stato effettuato acquisendo 50×10^3 eventi per ogni marcatura. Le percentuali sono state calcolate sia sul totale dei linfociti (selezionati sulla base dei parametri fisici SSC e FSC), che sulle cellule CD4+/CD45+.

Per la caratterizzazione immunofenotipica sono state seguite le indicazioni suggerite dalla letteratura per la Sindrome di Sézary [134]. In particolare è stato studiato il rapporto CD4+/CD8+, che è stato dimostrato aumentare con il progredire della malattia. Si è osservata, quindi, la percentuale di linfociti CD4+/CD45+, paragonandola ai campioni di controllo.

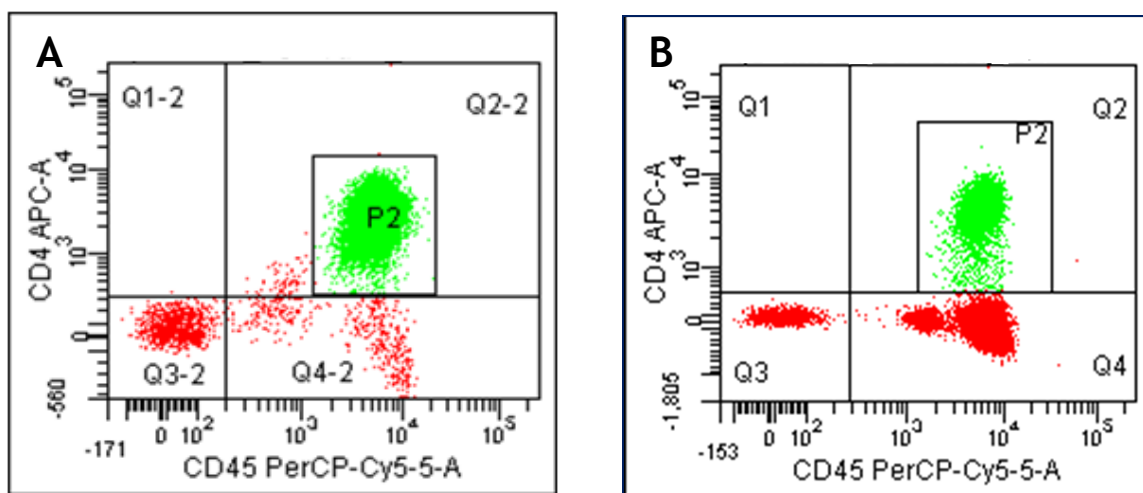


Figura 11. Esempio di marcatura CD4+/CD45+ in un paziente con SS (A) e un campione di controllo (B): le cellule CD4+/CD45+ rappresentano in A il 96% dei linfociti totali, mentre in B il 47%.

Come si può notare dai grafici FACS presi ad esempio nella figura 13, le cellule CD4+ di un paziente affetto da SS sono significativamente aumentate rispetto al controllo.

Nella popolazione totale presa in esame, mentre la mediana di CD4+ dei campioni di controllo si attestava su valori di riferimento fisiologici pari a 46% (range 36%-65%), i campioni patologici hanno evidenziato valori nettamente superiori con una mediana di CD4+ dell'85% (range 31%-96%), che è risultata essere significativamente superiore rispetto al controllo ($p < 0.0003$). Conseguentemente anche il rapporto CD4+/CD8+ si è confermato aumentato nei pazienti in studio rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.002$). Infatti, mentre per i primi è stata calcolata una mediana pari a 33 (range 2-207) per il

gruppo di controllo la mediana del rapporto assumeva valori normali pari a 2 (range 1-5).

Sulle cellule CD4+ sono state infine calcolate le percentuali di marcatura per gli antigeni CD26 e CD7, la cui mancata espressione nella SS rappresenta l'aberrazione fenotipica più frequente.

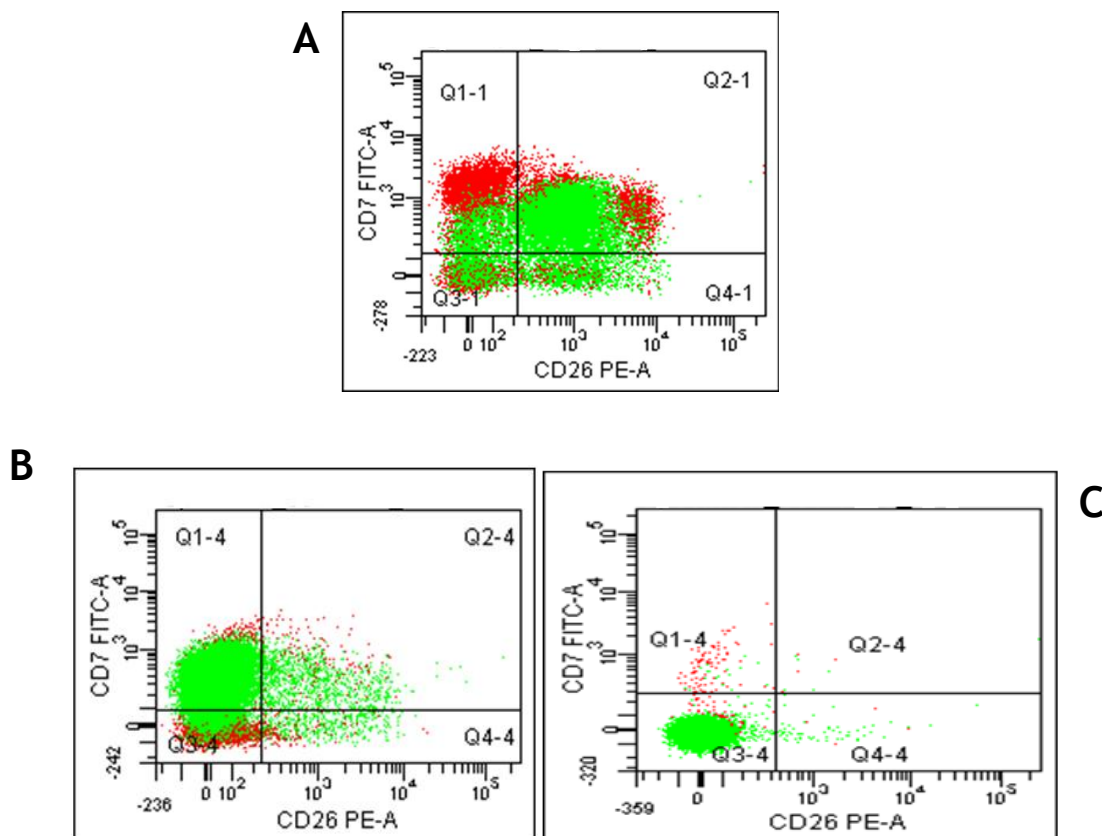


Figura 12: CD7-/CD26- riferite alla popolazione CD4+/CD45+. Il pannello A rappresenta un caso del gruppo di controllo, il pannello B un caso di SS con fenotipo CD7+/CD26-, mentre il pannello C rappresenta il classico esempio di Sindrome di Sézary con perdita di CD7 e CD26.

Nella nostra casistica, infatti, la perdita del CD26 è stata osservata in tutti i pazienti; in particolare, 6 pazienti hanno mostrato fenotipo CD7+/CD26- (figura 12b), mentre in tutti gli altri casi è stato rilevato un fenotipo classico CD7-/CD26- (figura 12c).

Da segnalare inoltre il mantenimento dell'espressione del CD52 sui linfociti CD4+ di tutti i pazienti.

Conseguentemente all'espansione patologica dei linfociti CD4+, è stata infine osservata una diminuzione delle percentuali delle altre popolazioni linfocitarie T CD8+, B CD19+ e NK CD56+, in accordo con quanto riportato in letteratura [23].

Nei casi in cui è stato possibile monitorarlo nel tempo, l'immunofenotipo di ciascun paziente ha mostrato una buona stabilità.

ANALISI MOLECOLARE DEI RIARRANGIAMENTI DEL TCR

La valutazione della clonalità è stata fatta mediante studio dei riarrangiamenti delle catene γ e/o β del T-cell receptor con metodica di PCR e successiva analisi heteroduplex degli amplificati [40-45]. In questo modo è stato possibile documentare a livello molecolare la presenza di espansioni clonali di T linfociti, caratteristica dei pazienti affetti da SS. Sono stati inclusi nello studio solo i casi in cui è stata documentata la presenza di un riarrangiamento clonale del TCR- γ e/o β (figure 13-14).

RIARRANGIAMENTI TCR- γ

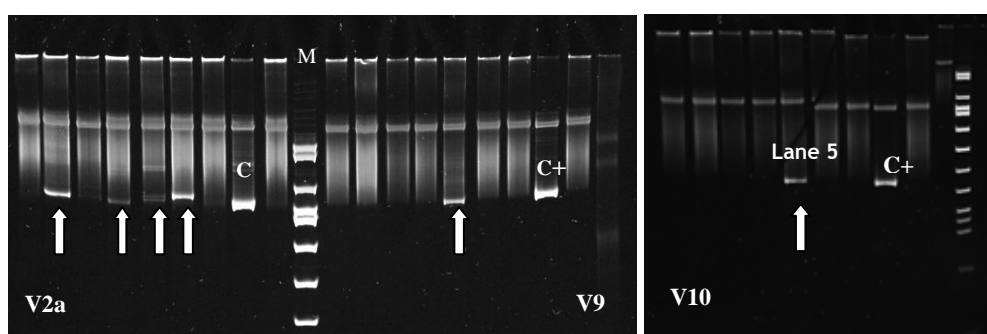


Figura 13. Esempi di riarrangiamenti monoclonali per TCR γ (amplificati 217-320 bp)

RIARRANGIAMENTI TCR-B

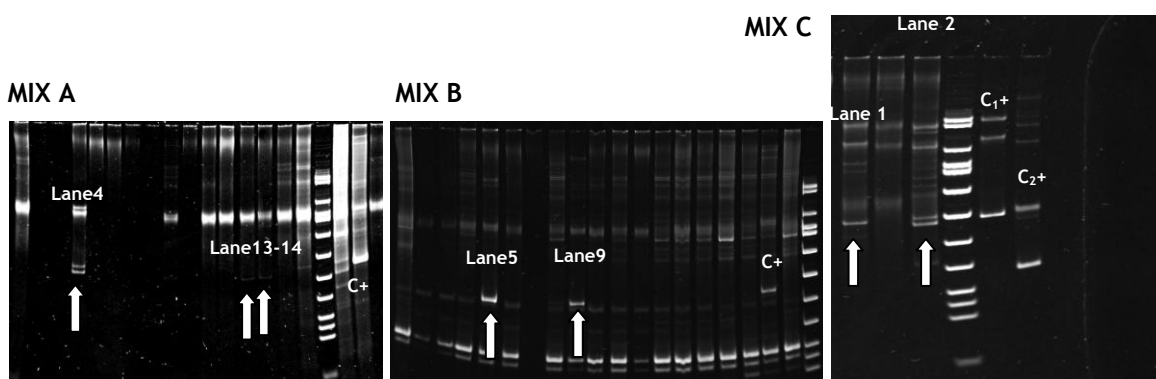


Figura 14. Esempi di riarrangiamenti monoclonali per TCR β (dimensioni amplificati: MIX A e B 240-285 bp; MIX C o 170-210 bp o 285- 325 bp)

Complessivamente è stato identificato un riarrangiamento TCR- γ in 32 pazienti (80%). La presenza di un riarrangiamento TCR- β è stata valutata solo su una parte dei pazienti (n=17), tra i quali tutti quelli risultati negativi per TCR- γ ; un riarrangiamento TCR- β è stato identificato nell'82% dei campioni testati, mentre la contemporanea presenza di un riarrangiamento TCR γ e/o β è stata identificata nel 60% dei casi.

ANALISI CGH

I dati ottenuti dallo studio di arrayCGH sui campioni di ogni paziente sono stati analizzati attraverso l'utilizzo del software di analisi Genomic Workbench Lite v 6.5.0.18 fornito da Agilent Technologies. Questo sistema permette di evidenziare, per ogni singola sonda oligonucleotidica, le amplificazioni e le delezioni presenti sui cromosomi. I dati sono stati valutati con l'intento di evidenziare le alterazioni comuni significativamente presenti nei pazienti affetti da SS (figura 15).

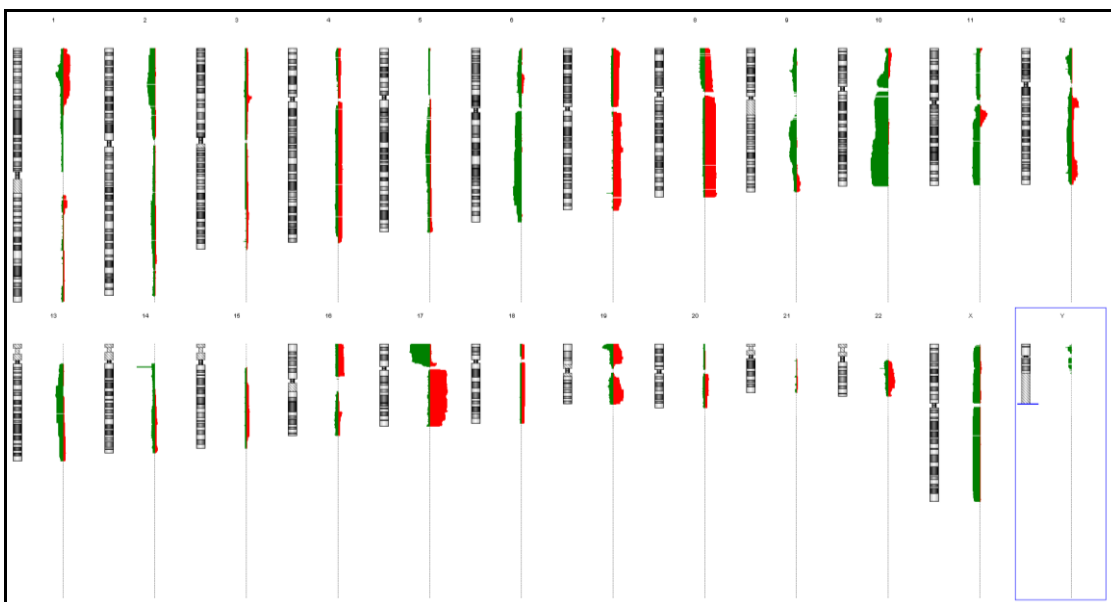


Figura 15. Rappresentazione riassuntiva delle alterazioni cromosomiche complessive presenti nella popolazione in studio (in rosso le amplificazioni e in verde le delezioni)

Nei 40 pazienti esaminati sono state messe in evidenza le seguenti anomalie:

- Amplificazione della regione cromosomica 7q22.1, presente nel 40% dei pazienti
- Amplificazione della regione cromosomica 8q, presente in almeno il 50% dei pazienti, con punte del 55% per quanto riguarda 8q24.3; amplificazioni della regione 8q24.21 (MYC) sono state evidenziate nel 45% dei pazienti.
- Delezioni interessanti il braccio lungo del cromosoma 10 in almeno il 70% dei pazienti con punte del 63% e 65% per quanto riguarda le regioni 10q24 e 10q25 rispettivamente; per quanto riguarda il braccio corto, la delezione della regione 10p11.22-11.21 è risultata presente nel 45% dei pazienti.
- Isocromosoma 17 nel 52% dei pazienti, del 17p13.1 (TP53) nel 75% dei casi.
- Delezione della regione cromosomica 19p13.3 presente nel 35% dei pazienti; amplificazione della regione 19q13.3 nel 40% dei casi.
- Delezione della regione cromosomica 9p21 (CDKN2A) evidenziata nel 30% dei pazienti.

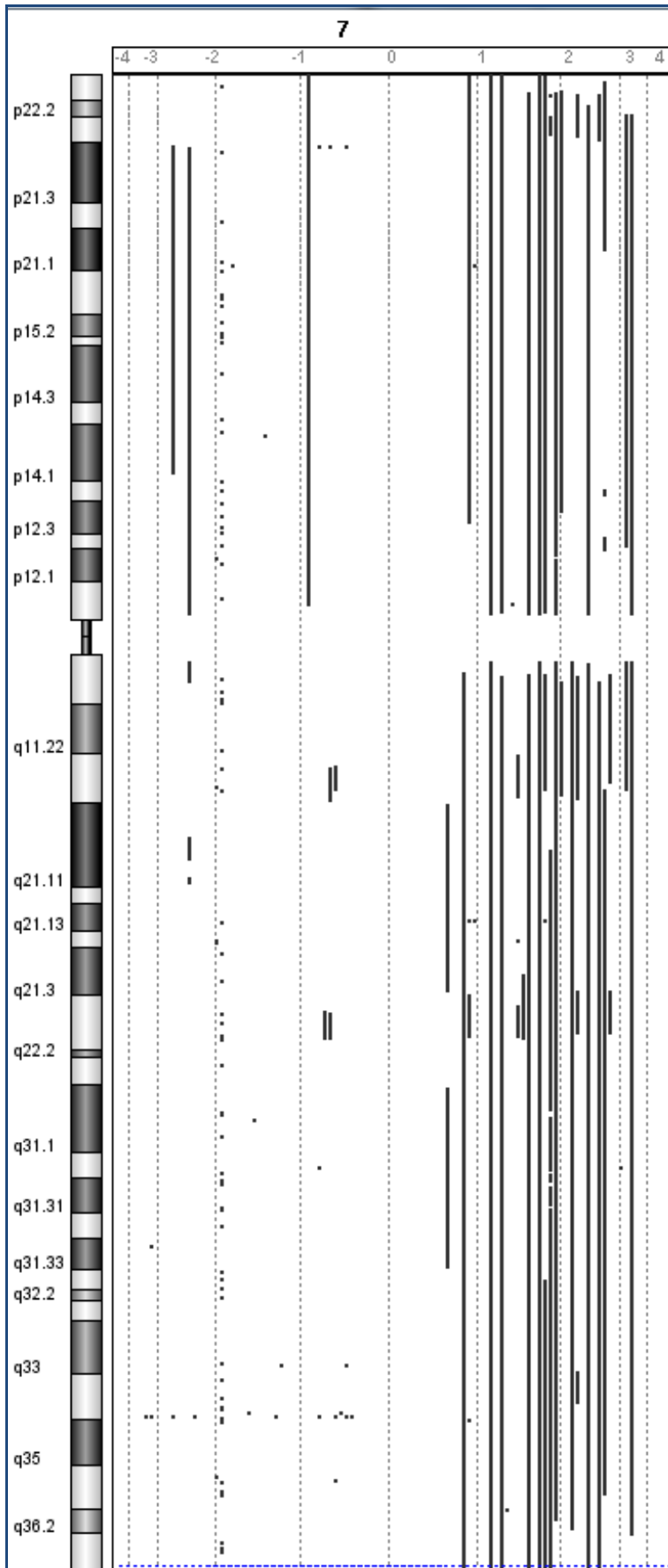


Figura 16. Amplificazione della regione cromosomica 7q22.1 presente nel 40% dei pazienti

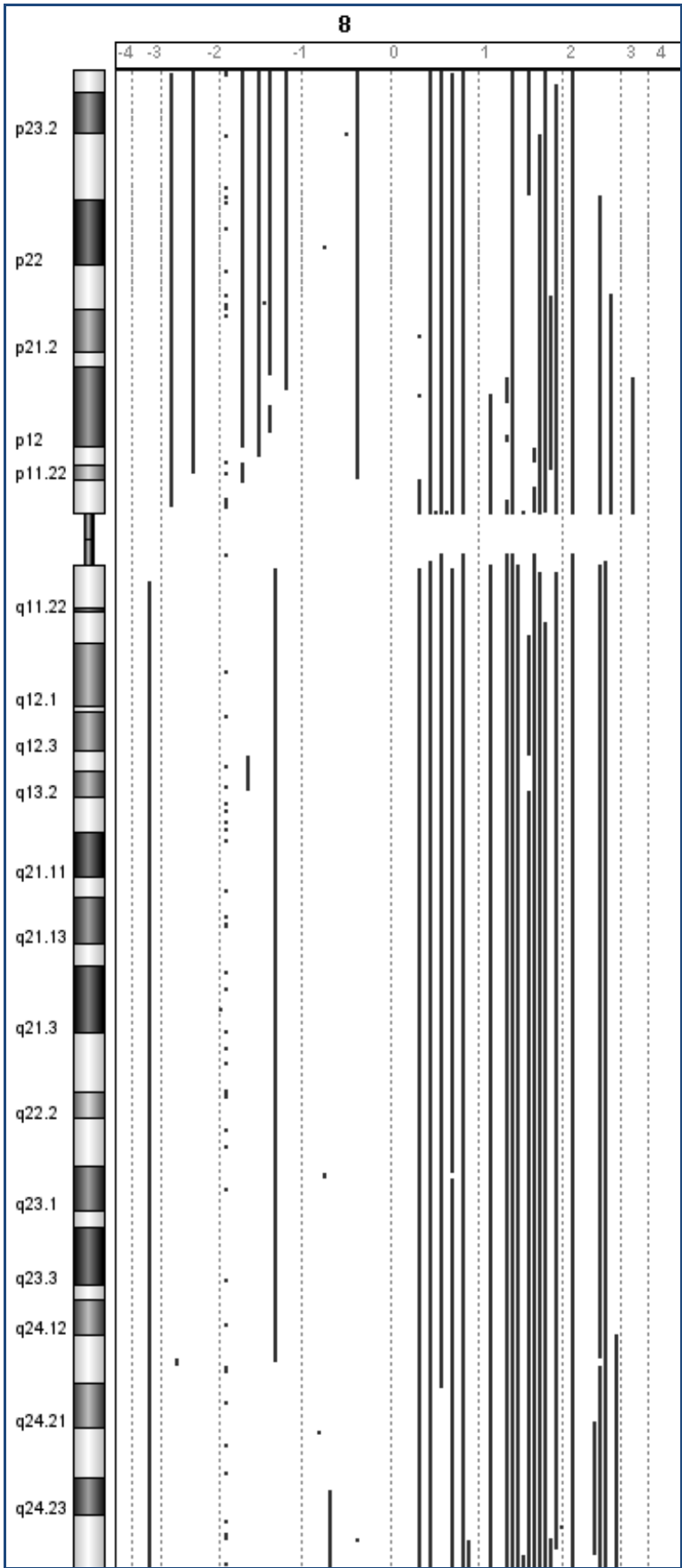


Figura 17. Amplificazione della regione cromosomica 8q presente in almeno il 50% dei pazienti, con punte del 55% per quanto riguarda 8q24.3

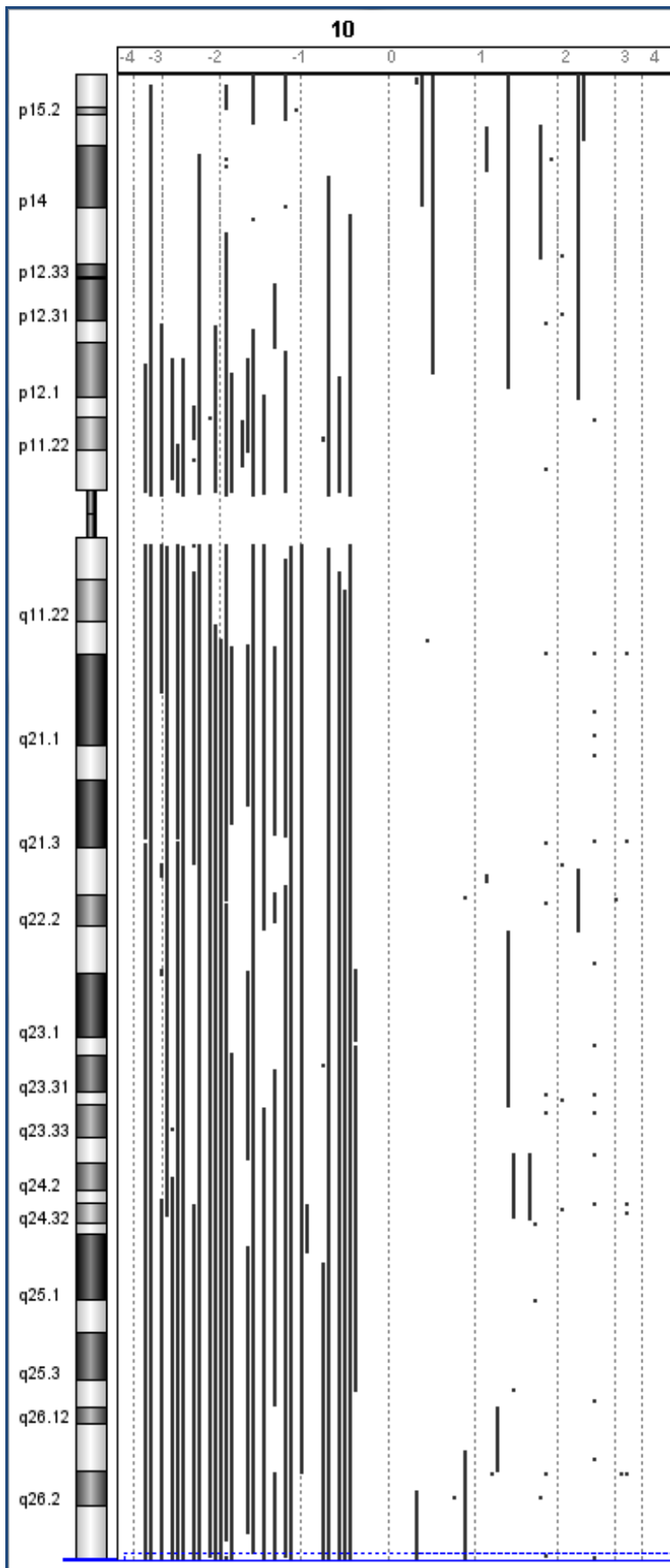


Figura 18. Delezioni interessanti il cromosoma 10: del 10p11.22-11.21 nel 45% dei pazienti, del 10q in almeno il 70% dei pazienti

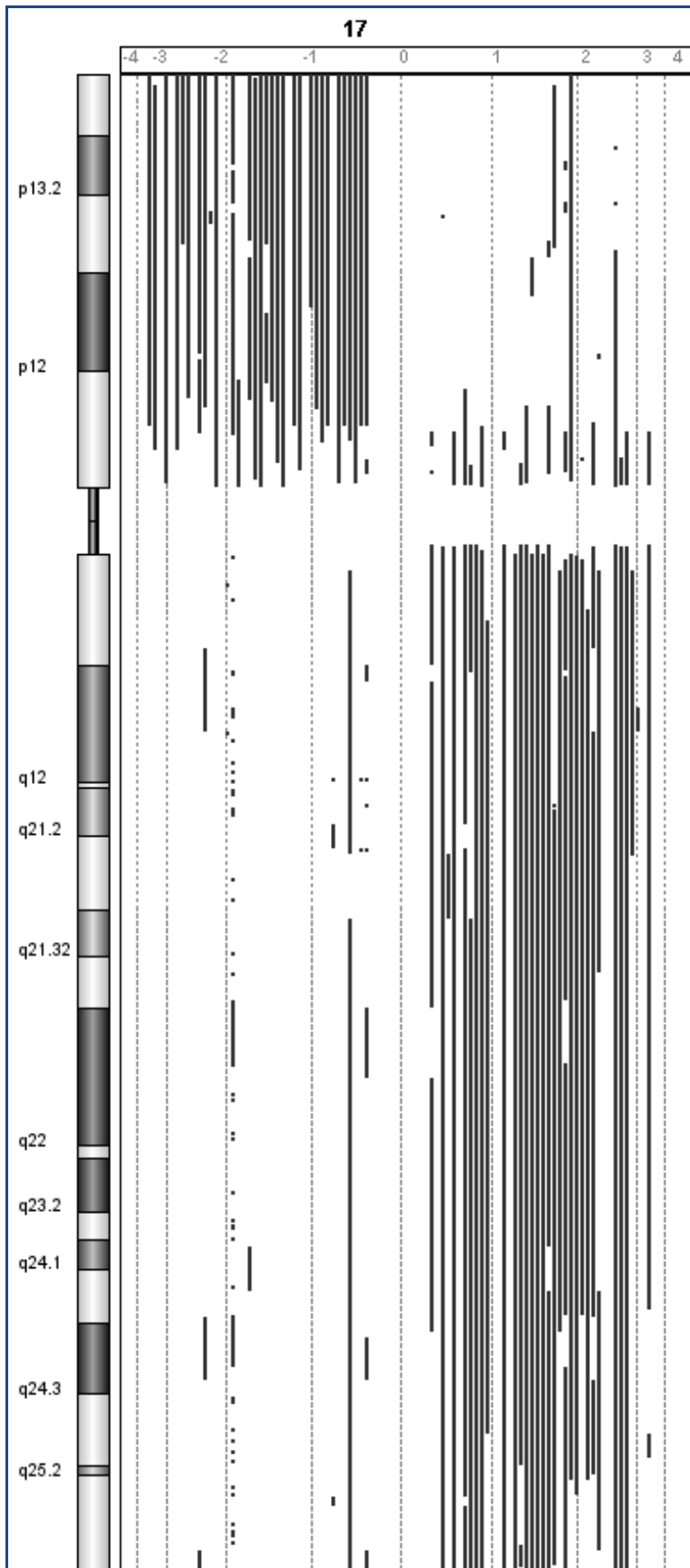


Figura 19. Isocromosoma 17 nel 52% dei pazienti, del 17p13.1 nel 75%

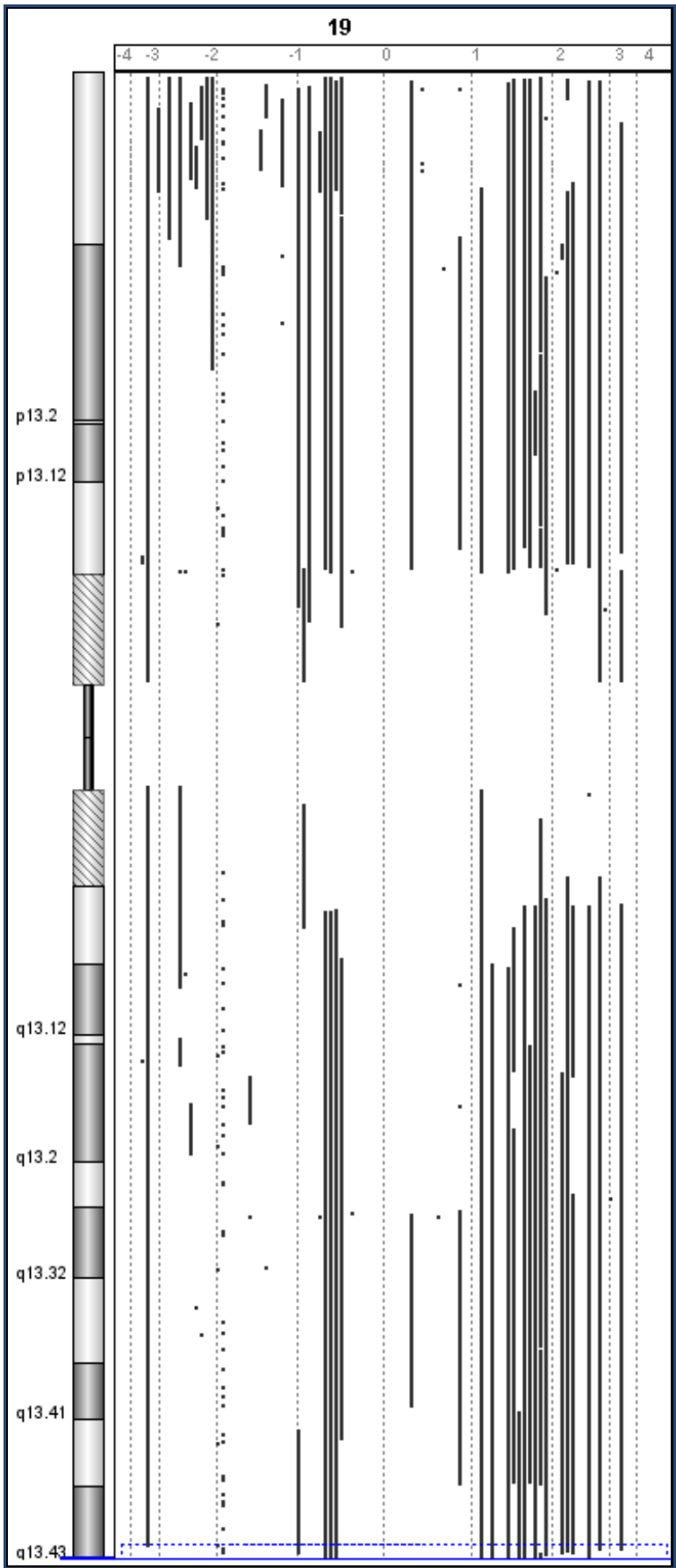


Figura 20. Delezione della regione cromosomica 19p13.3 nel 35% dei pazienti

I risultati dell'arrayCGH sono stati successivamente messi in relazione con i dati clinici e di laboratorio raccolti.

A tal fine è stato utilizzato il software IGV (Integrative Genomics Viewer), che consente di visualizzare in modo intuitivo i diversi dati clinici e molecolari e di metterli in relazione tra loro (figura 21).

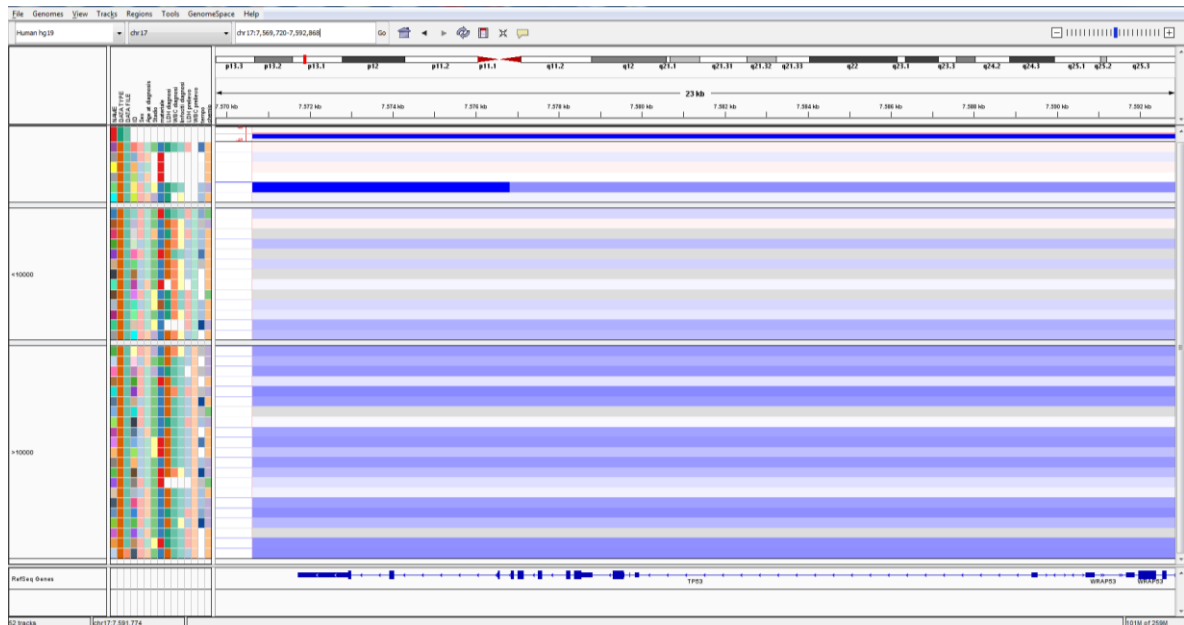


Figura 21. Esempio di immagine IGV, in cui è raffigurato la regione cromosomica 17p13.1 (in blu le delezioni, in rosa le amplificazioni) in 3 gruppi di pazienti in base alla conta linfocitaria (aumentata vs normale vs dato non disponibile). In questo caso è facilmente visibile come la maggior parte delle delezioni di questa specifica regione cromosomica (sede del gene TP53) siano più frequenti nei pazienti con linfocitosi (in basso).

Nello specifico sono state messe in evidenza le seguenti correlazioni che sono state di seguito riportate in base alla regione di pertinenza.

Amplificazione della regione 7q22.1 e della regione 8q24 (gene MYC)

L'amplificazione della regione 7q22.1 è risultata relativamente più rara nei pazienti con conta linfocitaria superiore alla norma al momento del prelievo, seppur con un p-value non statisticamente significativo.

L'amplificazione della regione cromosomica 8q24 su cui si trova il gene MYC, non è risultata significativamente associata ad alcun parametro tra quelli presi in esame.

Amp7q22.1		si	no	p-value		
Età	<70	11	41%	16	59%	ns
	>70	6	46%	7	54%	
T da diagnosi a prelievo	<2 anni	11	41%	16	59%	ns
	>2 anni	4	36%	7	64%	
LDH al prelievo	normali	9	45%	11	55%	ns
	aumentate	3	25%	9	75%	
Linfociti al prelievo	normali	8	62%	5	38%	0,0785
	aumentati	5	24%	16	76%	
Chemioterapia	no	11	48%	12	52%	ns
	si	6	35%	11	65%	

Amp8q24 (MYC)		si	no	p-value		
Età	<70	12	44%	15	56%	ns
	>70	6	46%	7	54%	
T da diagnosi a prelievo	<2 anni	9	33%	18	67%	ns
	>2 anni	7	64%	4	36%	
LDH al prelievo	normali	9	45%	11	55%	ns
	aumentate	5	42%	7	58%	
Linfociti al prelievo	normali	4	31%	9	69%	ns
	aumentati	11	52%	10	48%	
Chemioterapia	no	11	48%	12	52%	ns
	si	7	41%	10	59%	

Delezione della regione 17p (in corrispondenza del gene TP53)

Per quanto riguarda la del17p (sede di TP53) è stata rilevata una possibile associazione con la presenza di linfocitosi (90% rispetto al 62%), seppur con un p-value non statisticamente significativo (0,07).

Non sono state riscontrate correlazioni significative per quanto riguarda l'amplificazione del braccio corto del cromosoma 7 che coincide con l'area di codifica dei geni STAT3-5 e che è presente nel 64% dei pazienti esaminati.

Del17p(TP53)				si		no		p-value	
Età	<70	19	70%	8	30%	ns			
	>70	11	85%	2	15%				
T da diagnosi a prelievo	<2 anni	21	78%	6	22%	ns			
	>2 anni	9	82%	2	18%				
LDH al prelievo	normali	16	80%	4	20%	ns			
	aumentate	8	67%	4	33%				
Linfociti al prelievo	normali	8	62%	5	38%	0,07			
	aumentati	19	90%	2	10%				
Chemioterapia	no	16	70%	7	30%	ns			
	si	14	82%	3	18%				

Amp17q (STAT3-5)				si		no		p-value	
Età	<70	15	56%	12	44%	ns			
	>70	9	69%	4	31%				
T da diagnosi a prelievo	<2 anni	16	59%	11	41%	ns			
	>2 anni	6	55%	5	45%				
LDH al prelievo	normali	14	70%	6	30%	ns			
	aumentate	5	42%	7	58%				
Linfociti al prelievo	normali	6	46%	7	54%	ns			
	aumentati	13	62%	8	38%				
Chemioterapia	no	15	65%	8	35%	ns			
	si	8	47%	9	53%				

Delezione della regione 10q25

La delezione di questa regione, all'interno della quale è presente il gene MXI1, non ha mostrato correlazioni significative ai dati clinici-laboratoristici presi in esame.

Del10q25 (MXI1)		si		no		p-value	
Età	<70	18	67%	9	33%	ns	
	>70	8	62%	5	38%		
T da diagnosi a prelievo	<2 anni	18	67%	9	33%	ns	
	>2 anni	6	55%	5	45%		
LDH al prelievo	normali	12	60%	8	40%	ns	
	aumentate	9	75%	3	25%		
Linfociti al prelievo	normali	7	54%	6	46%	ns	
	aumentati	14	67%	7	33%		
Chemioterapia	no	17	74%	6	26%	ns	
	si	9	53%	8	47%		

PROFILO DEI miRNA

Per quanto riguarda lo studio miRNA, sono stati individuati 24 miRNA espressi in modo differenziale tra il gruppo dei 14 pazienti affetti da sindrome di Sézary e quello composto da 6 controlli sani (tabella 5).

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

Tabella 5. Elenco dei miRNA differenzialmente espressi; è stato indicato per ognuno la relativa up o down-regolazione, e il cromosoma su cui sono codificati.

I profili miRNA sono quindi stati analizzati mediante clustering gerarchico non supervisionato, il quale ha permesso di individuare 4 gruppi di pazienti caratterizzati da differente profilo d'espressione, come riportato nella figura sottostante (figura 22).

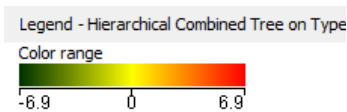
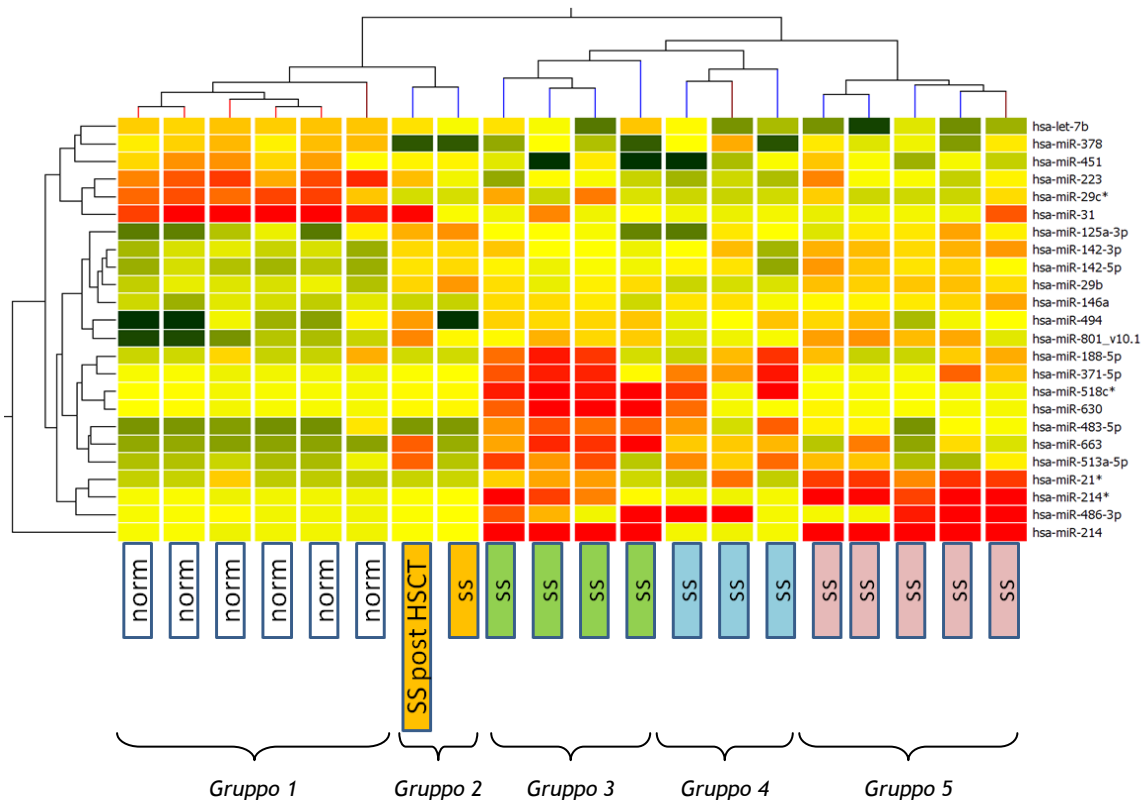


Figura 22. *Clustering gerarchico non supervisionato. In rosso sono indicati i miRNA overespressi, in verde quelli downregolati. I controlli sani sono indicati come "norm", i pazienti come "SS" e il caso post-trapianto come "SS post HSCT".*

Tutti i controlli sani mostrano un analogo profilo di clusterizzazione (gruppo 1), caratterizzato da una elevata espressione di un gruppo di 6 miRNA (tra i quali in particolare miR-31, miR-223, miR-29c*), e da una bassa espressione di miR-483-5p e miR-663. Il gruppo 2, evidenziato in giallo, costituito da due pazienti con SS sottoposti a trattamento intensivo, mostra un profilo di espressione simile ai sani. Gli altri tre gruppi di clusterizzazione, evidenziati rispettivamente in verde (gruppo 3), azzurro (gruppo 4) e rosa (gruppo 5), mostrano un profilo di espressione dei miRNA globalmente abbastanza simile tra loro. Nello specifico, la clusterizzazione sembra essere fondata sull'aumentata espressione di miR-518c*, miR-630, miR-483-5p e miR-663 per il gruppo verde, la ridotta espressione di miR-223 e miR-29c* per il gruppo azzurro e l'up-regolazione di miR-21*, miR-214*, miR-214 nel gruppo rosa.

DISCUSSIONE

Gli obiettivi principali di questo studio condotto su una casistica di 40 pazienti affetti da SS, è stata l'identificazione tramite arrayCGH delle regioni cromosomiche interessate da amplificazione e delezione e la valutazione del profilo miRNA in un sottogruppo di pazienti (n=14) rispetto a 6 controlli sani.

Per quanto riguarda i dati emersi dall'analisi arrayCGH, sono stati selezionati dalle banche dati di Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), dell'Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (<http://AtlasGeneticsOncology.org>) e di Genecards (<http://www.genecards.org>), una serie di geni che potrebbero essere implicati nel processo di tumorigenesi andando ad agire su svariate funzioni cellulari, come la proliferazione, la riparazione del DNA, l'apoptosi e la differenziazione. Le alterazioni cromosomiche ricorrenti evidenziate mediante arrayCGH sono state inoltre messe in relazione con alcuni parametri clinico-laboratoristici quali l'età alla diagnosi (<70 anni o >70 anni), il tempo del prelievo rispetto alla diagnosi (<2 anni o >2 anni), i valori dei linfociti totali (normali o alti) e di LDH (normali o alte) al momento del prelievo, e se prima dell'esecuzione del prelievo era stato eseguito uno o più trattamenti chemioterapici (no o sì). A tal fine è stato utilizzato il programma IGV (Integrative Genomics Viewer), che consente di visualizzare in modo intuitivo i diversi dati clinici e molecolari e di metterli in relazione tra loro attraverso un'analisi statistica basata sul test esatto di Fisher.

Amplificazione della regione 7q22.1

I geni di maggior interesse in questa regione sono:

- **TRRAP (7q21.2-q22.1)**: codifica per l'omonima proteina adattatrice (transformation/transcription domain-associated protein) coinvolta nella regolazione della trascrizione e in particolare nella regolazione dell'attivazione trascrizionale di MYC. È stato descritto un suo ruolo come possibile oncogene in diversi tipi di tumore come l'epatocarcinoma, il melanoma e il glioblastoma multiforme [135-137].
- **SMURF1 (7q22.1)**: l'omonima proteina (SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1) è coinvolta nel processo di ubiquitinazione ed è stato descritto un suo ruolo nella degradazione degli oncosoppressori P53 e ING2. È stata associata a una maggiore invasività nel tumore del pancreas [138, 139].
- **COPS6 (7q22.1)**: la proteina omonima COP9 (constitutive photomorphogenic homolog subunit 6) codificata da questo gene è una delle 8 subunità della proteina COP9 che è coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare. È stata descritta come inibitore dell'ubiquitinazione di Mdm2, un importante inibitore di P53. Il gene e la proteina sono risultati aumentati nel carcinoma mammario e tiroideo rispettivamente [140].

L'amplificazione di questa regione è risultata più frequente nei pazienti con una conta linfocitaria normale. La rilevazione di questo dato, tuttavia, sebbene possa suggerire per esempio un incremento dell'attività pro-apoptotica mediata da p53, risulta di difficile interpretazione in assenza di ulteriori elementi clinico-biologici, a causa delle diverse funzioni espletate dai geni sopra citati.

Amplificazione della regione 8q

In questa regione sono codificati il gene cMYC e il gene codificante per IL7.

- cMYC (8q24.21): questo gene codifica per un fattore di trascrizione, il quale svolge un ruolo importante nella tumorigenesi favorendo la progressione del ciclo cellulare, inibendo la differenziazione e aumentando l'instabilità genomica. Una sua amplificazione è stata descritta in diversi tipi di tumore tra cui il cancro al seno, della cervice uterina, del colon, dell'ovaio, i carcinomi a cellule squamose della testa e del collo, il mieloma multiplo, i linfomi non Hodgkin e l'adenocarcinoma gastrico [109]
- IL7 (8q12-q13): la proteina codificata da questo gene è una citochina che svolge un ruolo importante nello sviluppo delle cellule B e T. Studi eseguiti sui topi suggeriscono che questa citochina giochi un ruolo essenziale nella sopravvivenza delle cellule linfatiche. Diversi studi hanno descritto come essa sia coinvolta nello sviluppo di alcune patologie ematologiche quali la leucemia linfoblastica acuta e i linfomi a cellule T [141, 142].

L'amplificazione del braccio lungo del cromosoma 8 è risultata presente in almeno il 50% dei pazienti con SS; ciò potrebbe suggerire che in tale regione siano presenti geni il cui ruolo possa essere determinante nella proliferazione neoplastica delle cellule di Sézary.

Delezioni delle regioni 10p e 10q

I geni di possibile interesse in questa regione per il loro ruolo di oncosoppressori sono:

- ZEB1 (10p11.2): la proteina codificata da questo gene agisce come inibitore trascrizionale di IL-2, una citochina che promuove il differenziamento e l'espansione dei linfociti T [143].
- PTEN (10q23.3): questo oncosoppressore è un inibitore del pathway di AKT. L'inattivazione o una ridotta espressione di PTEN è stata descritta in svariati tipi di cancro come il glioblastoma, il cancro dell'endometrio, della prostata, del seno e del polmone [144-146].

- FAS (10q24.1): la proteina codificata da questo gene è un membro della superfamiglia dei recettori del TNF. Questo recettore contiene un death domain, ed è in grado di favorire l'apoptosi; una sua ridotta espressione è implicata nella patogenesi di diverse patologie maligne e malattie del sistema immunitario, tra cui i CTCL [147].
- MXI1 (10q24-q25): l'espressione del gene cMYC è frequentemente soggetta a disregolazione nei tumori umani. Questa proteina agisce come repressore trascrizionale di MYC ed è quindi un potenziale oncosoppressore. Essa va a competere con MYC per MAX, una proteina necessaria per la funzione di quest'ultimo [148].
- DUSP5 (10q25): questa proteina agisce come inibitore della produzione di IL-2 e delle MAPK, che sono associate alla proliferazione cellulare [121, 149].
- CASP7 (10q25): questa proteina fa parte della famiglia delle caspasi, le quali giocano un ruolo centrale nell'attivazione dell'apoptosi [150].
- BUB3 (10q26): proteina coinvolta nel checkpoint del fuso mitotico, che contribuisce al "segnale di attesa" e blocca il complesso che promuove l'anafase [151].

La delezione del braccio lungo del cromosoma 10 è stata riscontrata in almeno il 70% dei pazienti affetti da SS; le zone maggiormente coinvolte da questa perdita di materiale genico, sono state 10q24 e 10q25 (63% e 65% rispettivamente), al cui interno sono presenti geni che promuovono l'apoptosi (FAS, CASP7) e che inibiscono la proliferazione cellulare attraverso la l'inibizione di MYC (MXI1), del pathway IL2/MAPK (DUSP5) e della replicazione cellulare (BUB3).

Delezione della regione 17p

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

- TP53 (17p13.1): è un gene oncosoppressore che codifica per la proteina p53, la quale, in presenza di danni al DNA, si accumula promuovendo così l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi. L'arresto del ciclo cellulare avviene attraverso l'attivazione di p21, che inibisce l'attività dei complessi cdk-ciclina; l'apoptosi è invece mediata da altre proteine quali BAX, PUMA e NOXA. Alterazioni di questo gene sono state descritte in svariati tumori solidi ed ematologici [151, 152].
- MNT (17p13.3): come MXI1 agisce come repressore trascrizionale di MYC e può quindi essere considerato un oncosoppressore [153, 154].
- RPA1 (17p13.3): è implicata nei processi di riparazione del DNA e una sua perdita può comportare un aumento dell'instabilità genomica [155].

- HIC1 (17p13.3): questo gene agisce come regolatore della crescita cellulare e come oncosoppressore; la perdita di HIC1 si traduce infatti in una iperespressione di SIRT1 che inattiva p53 tramite deacetilazione. L'ipermetilazione o la delezione di questo gene sono state descritte in associazione ad alcuni tumori [122, 123, 156, 157].

Nel nostro studio la Del17p13.1 (TP53) sembra essere associata ad una conta linfocitaria aumentata nella popolazione di pazienti presa in esame.

Nell'immediata vicinanza della regione cromosomica in cui è localizzato il gene TP53, si trovano 3 geni il cui silenziamento si potrebbe associare ad un'iperattivazione di MYC (MNT), ad un aumento dell'instabilità cromosomica (RPA1) e all'inibizione dell'espressione di TP53 (HIC1). Quest'osservazione potrebbe rafforzare l'ipotesi che la downregolazione di TP53 e l'iperespressione di MYC (sia diretta che mediata da altri geni) possano essere entrambe sottese alla proliferazione neoplastica dei pazienti con SS.

Amplificazione della regione 17q

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

- STAT3, STAT5A e STAT5B (17q11.2): sono geni che codificano per le omonime proteine appartenenti alla famiglia di STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription); agiscono come fattori di trascrizione in risposta a citochine e fattori di crescita. Fanno parte della pathway di JAK/STAT e la loro attivazione esita in un aumento della proliferazione cellulare e resistenza all'apoptosi. Il loro ruolo è stato ampiamente descritto nello sviluppo sia di tumori solidi che di neoplasie ematologiche, tra cui la sindrome di Sézary appunto [116-119].
- ERBB2 (17q12): detto anche Her-2/neu, è un oncogene che codifica per un recettore dell'EGF con attività tirosin chinasi intrinseca, localizzato sulla membrana cellulare. È coinvolto nei pathways di MAPK, di PI3K/AKT e di STAT, e la sua attivazione causa un aumento della proliferazione cellulare e una ridotta apoptosi. L'amplificazione o l'overespressione di questo gene sono coinvolte in numerose neoplasie tra cui quella della mammella e dell'ovaio [158].
- GRB2 (17q24-q25): il reclutamento della proteina codificata da questo gene è coinvolto nella cascata del segnale coinvolgente RAS, Raf-1, MEK1/MEK2, ERK1/ERK2, che porta all'attivazione di fattori di trascrizione quali Elk-1, STAT1, STAT3 e MYC; è stato inoltre descritto un ruolo di questa proteina nell'attivazione del pathway di PI3K/AKT. Questi pathways promuovono la proliferazione, la crescita, la differenziazione e la sopravvivenza cellulare. In qualità di attivatore del ciclo

cellulare, GRB2 è coinvolto nell'oncogenesi di diversi tipi di tumori solidi e di neoplasie ematologiche [158-161].

- CCR10 (17q21): è un gene codificante per il recettore della chemochina CCL27. Come già accennato nell'introduzione, queste molecole svolgono un ruolo importante nell'homing cutaneo delle cellule T [162].
- BIRC5 (17q25): è un gene che appartiene alla famiglia degli "Inhibitor of Apoptosis" (IAP), che codificano per proteine aventi ruolo di prevenire la morte cellulare programmata. La loro overespressione è stata riscontrata in molti tumori ed è stata considerata come possibile target terapeutico in alcune patologie neoplastiche [163-165].
- CDK3 (17q25): questo gene codifica per una proteinchinasi ciclina-dipendente che svolge un ruolo importante nella regolazione del ciclo cellulare. Essa promuove la transizione dalla fase G0 alla fase G1 interagendo con RB1, e dalla fase G1 alla fase S andando ad attivare la famiglia delle E2F.

Nessuno dei fattori clinici o laboratoristici presi in considerazione in questo studio è risultato significativamente associato all'amplificazione del braccio lungo del cromosoma 17. E comunque interessante notare come BIRC5, CDK3 e GRB2, codificati nella regione cromosomica 17q25 (che risulta amplificata in più del 50% dei pazienti in esame), rivestano un ruolo chiave nella tumorigenesi favorendo l'inibizione dell'apoptosi, la progressione del ciclo cellulare e la proliferazione cellulare rispettivamente.

Delezione della regione 19p13.3

Tra i geni di possibile interesse in questa regione sono da citare GADD45B e PIAS4.

- GADD45B (19p13.3): questo gene (Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible, Beta) fa parte di un gruppo di geni i cui livelli trascrizionali aumentano in presenza di stress cellulare ed esposizione ad agenti inducenti danno del DNA; codifica per la proteina GA45B, che favorisce la riparazione del DNA e impedisce l'entrata in fase S. Il suo ruolo è stato descritto soprattutto in alcune neoplasie di pertinenza epatica e gastrointestinale [166-168].
- PIAS4 (19p13.3): l'omonima proteina codificata da questo gene fa parte della famiglia di PIAS (protein inhibitor of activated STAT), proteine coinvolte nella regolazione di molti pathways tra cui JAK/STAT appunto, ma anche p53/PT53 e Wnt [169].

La delezione di questa regione è stata riscontrata in circa il 35% dei pazienti esaminati; l'eventuale coinvolgimento dei geni sopra riportati potrebbe spiegare come

l'immortalizzazione e la proliferazione delle cellule neoplastiche non sia dovuta all'interessamento di un unico pathway, ma piuttosto all'iperespressione/silenziamento di più oncogeni/oncosoppressori in grado di coordinarsi simultaneamente a più livelli con lo stesso obiettivo finale.

Delezione della regione 9p21

Il gene di maggior interesse presente in questa regione è CDKN2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2), un importante oncosoppressore i cui prodotti proteici (presenti in diverse isoforme), sono in grado di inibire la degradazione della p53, sequestrando MDM2 che fisiologicamente lega l'ubiquitina E2 contribuendo al processo di ubiquitinazione. Un suo ruolo è stato descritto in diversi tumori solidi [170, 171], ma soprattutto sembra essere correlato ad una prognosi peggiore nei CTCL [172-174].

I nostri dati di arrayCGH suggeriscono un possibile coinvolgimento di diversi geni che potrebbero essere implicati nell'oncogenesi della malattia (PT53, PTEN, MYC etc.), il cui sviluppo potrebbe quindi essere il risultato del coinvolgimento sinergico di diversi pathways.

Di particolare interesse sembra essere il possibile coinvolgimento del pathway di JAK/STAT, come già ipotizzato da Vermeer et al [28]; questa via, infatti, determina la trascrizione di geni che regolano la proliferazione, la sopravvivenza e la differenziazione cellulare. Alterazioni che attivano costituzionalmente questo pathway sono state descritte in varie forme di tumori solidi, linfomi e leucemie [175], tanto da essere considerato un possibile target terapeutico in molti ambiti oncologici [176-179].

I nostri risultati suggeriscono come tale via possa essere coinvolta a diversi livelli, attraverso la possibile amplificazione di alcuni geni che la promuovono (STAT3, STAT5A, STAT5B, ERBB2, GRB2 sul cromosoma 17; TRRAP sul cromosoma 7; cMYC e IL7 sul cromosoma 8) e delezioni a livello di geni che la inibiscono (FAS, PTEN, MXI1, DUSP5 sul cromosoma 10; p53, MNT, HIC1 sul cromosoma 17; PIAS sul cromosoma 19). Questo sembrerebbe non essere completamente vero per alcune proteine della famiglia SOCS (Suppressors Of Cytokine Signalling) [180]; i geni SOCS3 e SOCS7 per esempio, che sono implicati nella regolazione negativa del pathway di JAK/STAT, si trovano sul braccio lungo del cromosoma 17 che appare inaspettatamente amplificato nella nostra casistica.

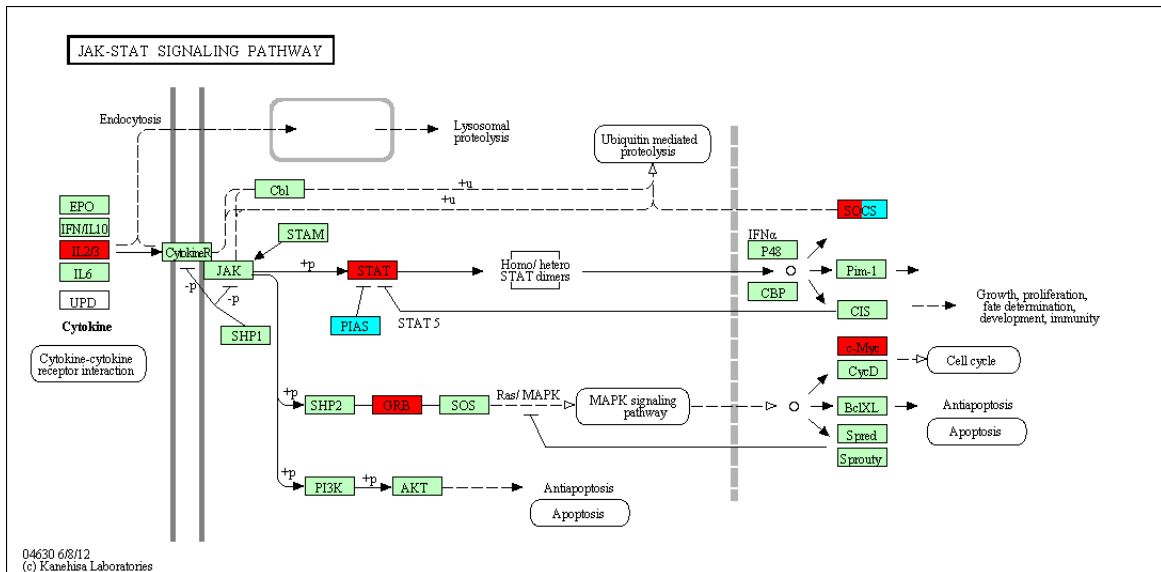


Figura 23. JAK-STAT signaling pathway. Nei rettangoli sono rappresentati dei gruppi di geni. Basandoci sui risultati del nostro studio di arrayCGH, sono stati evidenziati in rosso i geni caratterizzati da amplificazione, in azzurro i geni caratterizzati da delezione (fonte figura: KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

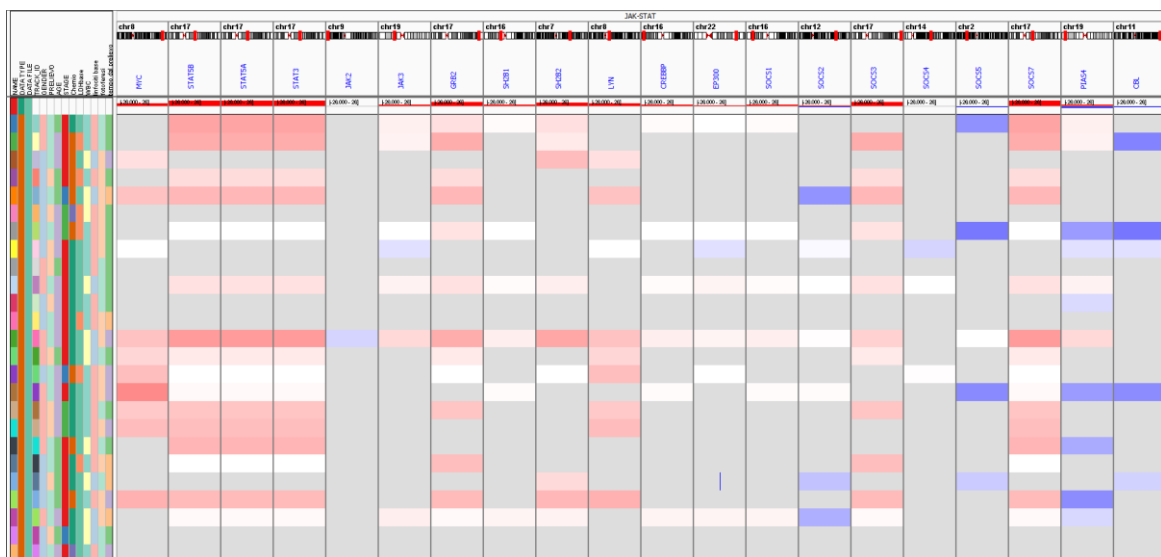


Figura 24. JAK-STAT signaling pathway, mostrato con il programma IGV. In rosa sono rappresentati i geni amplificati, in blu quelli deleti.

L'eventuale conferma di tali ipotesi patogenetica necessita obbligatoriamente di una casistica più ampia e della validazione dei risultati ottenuti con ulteriori studi di biologia molecolare (per valutare la presenza/assenza dei trascritti di mRNA con gene expression e RT-PCR) e di proteomica (western blot, immunistochemica, ELISA).

In aggiunta a ciò devono essere considerati i limiti intrinseci dell'arrayCGH, quali l'incapacità di rilevare le aberrazioni cromosomiche bilanciate e la bassa sensibilità per i mosaicismi. L'eventuale presenza di una traslocazione bilanciata, ad esempio, non verrebbe rilevata all'arrayCGH. È noto altresì che diversi studi di citogenetica standard

e FISH non hanno evidenziato aberrazioni citogenetiche bilanciate nella SS, ma piuttosto poliploidie [181].

Studio sui MicroRNA

I risultati ottenuti dall'analisi del profilo di espressione dei miRNA confermano in parte i dati già precedentemente descritti in letteratura nei pazienti affetti da neoplasie maligne e in alcuni casi da sindrome di Sézary; in particolare, tra i miRNA risultati downregolati:

- MiR-let-7b (cr. 22q13.31), downregolato nel 67% dei nostri pazienti e in particolare nei gruppi 4 e 5 del dendrogramma, è riportato essere downregolato anche in altre neoplasie come ad esempio il carcinoma della mammella; tra i geni identificati come target della famiglia let-7 vi sono gli oncogeni RAS e HMGA2 [182-186].
- MiR29c* (cr. 1q32.2), downregolato nel 67% dei casi, è stato descritto come inibitore del ciclo cellulare attraverso la modulazione dell'espressione della ciclina E, e la promozione del processo apoptotico. Una sua downregolazione è stata osservata anche nella leucemia linfatica cronica, nel melanoma, nel carcinoma dell'esofago e nell'epatocarcinoma [187-191].
- MiR31 (cr.9p21.3), down regolato nell'83% dei pazienti, è stato descritto come downregolato anche in altri tipi di neoplasie quali quelle uroteliali, gastriche, ovariche, il mesotelioma e la leucemia a cellule T dell'adulto [192-197].
- MiR223 (cr.Xq12), downregolato soprattutto nei gruppi 3 e 4 della nostra casistica, è descritto come tale anche in altre neoplasie quali per esempio l'epatocarcinoma, pur essendo segnalato in letteratura come overespresso nella leucemia linfoblastica T [198, 199].
- MiR378a (cr.5q32) seppur precedentemente descritto un suo ruolo come oncogene da alcuni Autori, nella nostra casistica appare downregolato in più dell'80% dei casi [200, 201].
- MiR451 (cr.17q11.2) sembra avere un ruolo come oncosoppressore anche nei gliomi, negli adenocarcinomi gastrici e del colon, nel carcinoma polmonare e nella leucemia linfoblastica T ed è risultato downregolato in tutti i pazienti tranne uno; in tre pazienti la sua downregolazione risulta essere inoltre quantitativamente molto rilevante rispetto agli altri [202-205].

Per quanto riguarda i miRNA upregolati:

- MiR-21 (cr.17q23.1) è ampiamente descritto come oncogene ed è risultato upregolato in tutti i pazienti del gruppo 5 del dendrogramma. Una sua

overespressione è stata riportata in svariati tipi di cancro (glioblastoma, nel cancro del seno, della tiroide etc) in quanto capace di inibire l'espressione di geni favorenti l'apoptosi. Uno dei target indicati di questo gene è l'oncosoppressore PTEN [95, 206, 207].

- MiR29b (cr.7q32.3), appare upregolato nel 67% dei pazienti della nostra casistica, pur essendo stato precedentemente descritto come oncosoppressore [82].
- MiR125a (cr.19q13.41) è risultato upregolato nella nostra casistica; degno di nota è il fatto che esso risulti particolarmente upregolato nei due pazienti del gruppo 2 (che clusterizzano con i controlli normali). Sono tuttavia presenti dati in letteratura che lo identificano come probabile oncosoppressore nel carcinoma della mammella, della prostata e nel neuroblastoma [208, 209].
- MiR142 (cr.17q22), upregolato in più del 90% dei nostri pazienti, è stato segnalato come overespresso nella leucemia linfoblastica T e nella leucemia mieloide acuta [210, 211].
- MiR146 (cr.5q34), upregolato in tutti i pazienti tranne uno, è descritto in letteratura in modo sporadico; le poche segnalazioni presenti ne suggeriscono tuttavia un ruolo antiapoptotico correlato al "Fas-associated death domain - FADD" [212-214].
- MiR214 (cr.1q24.3) è stato già descritto come oncogene promuovente la sopravvivenza cellulare nella sindrome di Sézary e nel melanoma, ed è risultato significativamente overespresso nei pazienti del gruppo 3 e del gruppo 5 [137, 215].
- MiR486 (cr.8p11.21) risulta upregolato in tutti i pazienti, nel 67% dei quali in misura significativamente maggiore; esso sembra avere un ruolo nei meccanismi di resistenza all'apoptosi [132].
- Mir494 (cr.14q32.31), risulta upregolato in più del 90% dei nostri pazienti, pur essendo descritto in letteratura come possibile oncosoppressore [216, 217].

Oltre ai miRNA sopracitati, il nostro studio ha evidenziato un gruppo di miRNA upregolati (presente nello specifico nei gruppi 3 e 4 del dendrogramma) ancora poco studiati e soprattutto non ancora descritti in letteratura come associati alla SS. Essi sono rappresentati da: miR-801, miR-188-5p, miR-371-5p, miR-518c, miR-630, miR-483-5p, miR-663 e miR-513a-5p. In particolare:

- MiR-483-5p (cr.11p15.5), è risultato upregolato in tutti i pazienti tranne uno, in particolare all'interno del gruppo 3; esso sembra avere come target il trascritto di SOCS3 (suppressor of cytokine signalling 3) proteina coinvolta nell'inibizione della via di JAK/STAT. È stato indicato inoltre un suo probabile ruolo come oncosoppressore nei gliomi [218, 219].

- MiR-663 (cr.20p11.1), upregolato nella grande maggioranza dei nostri pazienti e soprattutto in quelli del gruppo 3, sembra promuovere la proliferazione cellulare nel tumore polmonare tramite la regolazione diretta e indiretta di TGFB1, P53, Bax e Fas. Alcune segnalazioni lo descrivono tuttavia come induttore dell'arresto del ciclo cellulare nel carcinoma gastrico [220, 221].

Questo gruppo di miRNA potrebbe rappresentare un interessante campo di studio per eventuali future ricerche nei linfomi cutanei, in particolare per quanto riguarda il loro possibile ruolo patogenetico e il loro significato diagnostico/prognostico. Allo stato attuale, tuttavia, vista la scarsità di dati presenti in letteratura e l'esiguo numero di pazienti testati, mancano gli elementi per poter giungere a conclusioni definitive.

Per quanto riguarda i diversi gruppi di clusterizzazione, è da sottolineare che il gruppo 2, che nel dendrogramma appare clusterizzato in prossimità del gruppo dei controlli sani, è composto da un paziente sottoposto a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche in remissione clinica e molecolare completa e con chimerismo 100% donatore al momento del prelievo, e da un secondo paziente appena sottoposto a 3 cicli di chemioterapia secondo schema CHOP con conseguente assenza di cellule di SS nel sangue periferico al momento del prelievo.

Il gruppo 3, rispetto agli altri, mostra un'importante upregolazione dei miRNA non ancora descritti in letteratura, in particolare miR-518c*, miR-630, miR-188-5p, miR-371-5p. Il gruppo 5 mostra un'upregolazione di intensità paragonabile a quella del gruppo 3 per quanto riguarda miR-214 e miR-214*, una maggior espressione del miR-21*, e un'espressione nettamente inferiore di miR-518c*, miR-630, miR-188-5p, miR-371-5p.

Il gruppo 4, infine, sembra presentare caratteristiche intermedie rispetto ai gruppi 3 e 5.

Si è cercato inoltre di correlare i risultati ottenuti sui pazienti studiati con arrayCGH e contemporaneamente valutati per il profilo di espressione dei miRNA.

Tra i miRNA identificati e codificati su regioni cromosomiche interessate da aberrazioni evidenziate con arrayCGH, è stata rilevata una concordanza per miR142-3p, miR142-5p e miR-21. Essi infatti risultano upregolati nella nostra casistica e sono tutti codificati sul braccio lungo del cromosoma 17, all'interno di una regione soggetta ad amplificazione (17q22-23). Allo stesso modo miR-29b e mir-486, risultati upregolati, sono codificati rispettivamente nelle regioni cromosomiche 7q32 e 8p11.21, le quali appaiono amplificate in arrayCGH.

Da segnalare inoltre che la regione cromosomica 19p21, la cui delezione (riscontrata nel 30% dei nostri pazienti) sembra avere un significato prognostico negativo nei CTCL, è sede di codifica anche di miR-31, che appare downregolato nell'83% dei casi.

Una discordanza è stata invece rilevata per miR-451, che appare downregolato in tutti i pazienti tranne 1, pur facendo parte di una regione amplificata nella maggior parte dei pazienti (17q11.2); allo stesso modo miR-125a è risultato overespresso in circa l'80% dei casi, pur essendo codificato su una regione cromosomica (19q13.3) soggetta ad amplificazione in arrayCGH.

Degno di nota è infine il riscontro, di un'upregolazione di miR-483-5p che ha come target il trascritto di SOCS3, implicato nella regolazione negativa del pathway di JAK/STAT. I geni codificanti per questa proteina sono localizzati infatti in una regione che abbiamo già descritto risultare inaspettatamente amplificata nella nostra casistica (17q25.3). Si può quindi ipotizzare che l'eventuale iperespressione di questo gene (che porterebbe ad un'inibizione del pathway di JAK/STAT), sia controbilanciata dall'upregolazione di miR-483-5p con il risultato finale netto di un silenziamento di SOCS3 favorente il signaling di JAK/STAT. È chiaro che la conferma di questa ipotesi non può prescindere dall'esecuzione di più approfonditi studi di biologia molecolare non solo a livello genomico, ma anche a livello proteico.

CONCLUSIONI

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche con metodica di arrayCGH, eseguita su un campione di 40 pazienti affetti da SS, ha confermato il coinvolgimento dei cromosomi 8, 10 e 17 come descritto in letteratura. In particolare nella nostra casistica sono state rilevate amplificazioni del braccio lungo dei cromosomi 8 e 17 e delezioni a carico delle regioni cromosomiche 10p11.22-11.21, 10q e 17p, con presenza di un isocromosoma 17 in circa la metà dei casi. È stata inoltre riscontrata, nel 40% dei pazienti, la presenza di un'amplificazione a carico della regione 7q22.1 (già stata descritta in letteratura nei casi di micosi fungoide in stadio tumorale [10]), la delezione della regione cromosomica 19p13.3 (nel 35% dei casi) e la delezione della regione cromosomica 9p21, la quale, seppur presente solo nel 30% dei pazienti, sembra associata ad una prognosi peggiore nei CTCL [172-174].

Lo studio di arrayCGH è stato poi utilizzato come punto di partenza per indagare la possibile associazione fra le regioni maggiormente soggette ad amplificazione e delezione e i geni più comunemente coinvolti nella proliferazione neoplastica maligna. A tal proposito potrebbero essere particolarmente rilevanti i geni coinvolti nel pathway di JAK/STAT oltre all'oncogene MYC e agli oncosoppressori TP53 e PTEN.

Per quanto riguarda la correlazione tra le variabili clinico-laboratoristiche prese in considerazione e i dati di arrayCGH, è stata osservata una possibile associazione tra la presenza di linfocitosi assoluta (>4000/mcL) e la delezione della regione cromosomica 17p13.1 (sede dell'oncosoppressore TP53). Tale associazione non è tuttavia risultata statisticamente significativa, verosimilmente a causa dell'insufficiente numerosità del campione.

Attraverso lo studio del profilo di espressione dei microRNA sono stati individuati un gruppo di 24 miRNA espressi in modo differenziale nei pazienti affetti da sindrome di Sézary rispetto ai controlli normali; alcuni di essi sono già stati descritti in letteratura come espressi in modo aberrante e attivamente coinvolti in questa malattia (è il caso ad esempio di miR21, miR29c e miR214), mentre altri (miR-801, miR-188-5p, miR-371-5p, miR-518c, miR-630, miR-483-5p, miR-663 e miR-513a-5p) sono stati descritti solo in modo sporadico e comunque non associati alla SS; soprattutto in relazione a quest'ultimo gruppo di microRNA, un ampliamento della casistica per poter confermare con ulteriori indagini molecolari i dati finora ottenuti sarebbe senza dubbio auspicabile.

I dati provenienti dall'analisi di arrayCGH e del profilo di espressione dei miRNA valutati complessivamente hanno permesso di ipotizzare, seppur su una casistica ristretta di pazienti, che il processo di proliferazione neoplastica possa essere regolato a livello

trascrizionale e post-trascrizionale da diversi prodotti genici che interagiscono su più pathways per favorire la proliferazione e l'espansione del clone patologico.

La conferma delle ipotesi patogenetiche qui riportate non può ovviamente prescindere dalla necessità di una validazione dei risultati ottenuti valutando ad esempio la presenza/assenza di specifici trascritti di mRNA e dei relativi prodotti proteici.

In considerazione del decorso clinico naturale della Sindrome di Sézary, spesso caratterizzato da un esordio subdolo con diagnosi tardiva, questo studio ha posto le basi per un successivo progetto di ricerca nel quale, oltre a prevedere un ampliamento della casistica, ci si propone di eseguire la raccolta dei campioni cellulari in diversi time point nelle varie fasi di malattia. Uno studio condotto in maniera longitudinale su una casistica più ampia di pazienti, infatti, potrebbe consentire di distinguere le aberrazioni genomiche precoci da quelle eventualmente insorte più tardivamente, così da favorire l'identificazione di possibili markers molecolari diagnostici e/o indicatori prognosticamente significativi, sia per facilitare la precocità diagnostica che al fine di indirizzare le scelte terapeutiche più appropriate in relazione al rischio clinico (tra cui il trapianto allogenico di cellule staminali).

L'approfondimento e il completamento di questo complesso percorso clinico-laboristico, che necessita obbligatoriamente di una stretta collaborazione interdisciplinare, potrebbe infine permettere di individuare nuovi target per lo sviluppo di agenti terapeutici mirati.

BIBLIOGRAFIA

1. Jaffe, E.S., et al., *World Health Organization Classification of lymphomas: a work in progress*. Ann Oncol, 1998. **9 Suppl 5**: p. S25-30.
2. Jaffe, E.S., *Pathobiology of peripheral T-cell lymphomas*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006: p. 317-22.
3. Kupper, T.S. and R.C. Fuhlbrigge, *Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences*. Nat Rev Immunol, 2004. **4(3)**: p. 211-22.
4. Liu, Y.J., *IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 275-306.
5. MacLennan, I.C., et al., *The evolution of B-cell clones*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. **159**: p. 37-63.
6. Hummel, M., et al., *Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle*. Blood, 1994. **84(2)**: p. 403-7.
7. Jaffe, E.S., et al., *Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery*. Blood, 2008. **112(12)**: p. 4384-99.
8. van den Oord, J.J., C. de Wolf-Peeters, and V.J. Desmet, *Marginal zone lymphocytes in the lymph node*. Hum Pathol, 1989. **20(12)**: p. 1225-7.
9. Swerdlow, S.H., E. Campo, and N. Harris, eds. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. IARC: Lyon (France); . 439 p. Vol. 4th ed. 2008, IARC press.
10. Janeway, C.A., ed. *Immunobiology*. 5th ed. 2001, Garland Publishing: New York.
11. Parham, P., ed. *The Immune System*. 3rd ed. January 15, 2009, Garland Science.
12. Garcia, K.C., et al., *An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 A and its orientation in the TCR-MHC complex*. Science, 1996. **274(5285)**: p. 209-19.
13. Swerdlow, S.H., et al., *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2008, Lyon: IARC. 439.
14. Harris, N.L., et al., *A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group*. Blood, 1994. **84(5)**: p. 1361-92.
15. Project, T.N.-H.s.L.C., *A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma*. . Blood, 1997. **89(11)**: p. 3909-18.
16. Anderson, J.R., J.O. Armitage, and D.D. Weisenburger, *Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations*. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Ann Oncol, 1998. **9(7)**: p. 717-20.
17. Girardi, M., P.W. Heald, and L.D. Wilson, *The pathogenesis of mycosis fungoides*. N Engl J Med, 2004. **350(19)**: p. 1978-88.
18. Willemze, R., et al., *WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas*. Blood, 2005. **105(10)**: p. 3768-85.
19. Burg, G., et al., *WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas 2005: histological and molecular aspects*. J Cutan Pathol, 2005. **32(10)**: p. 647-74.

20. Sander, C.A., M.J. Flaig, and E.S. Jaffe, *Cutaneous manifestations of lymphoma: a clinical guide based on the WHO classification*. World Health Organization. Clin Lymphoma, 2001. 2(2): p. 86-100; discussion 101-2.
21. Willemze, R., 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*. Blood, 1997. 90(1): p. 354-71.
22. Hudak, S., et al., *Immune surveillance and effector functions of CCR10(+) skin homing T cells*. J Immunol, 2002. 169(3): p. 1189-96.
23. Kim, E.J., et al., *Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma*. J Clin Invest, 2005. 115(4): p. 798-812.
24. Groves, F.D., et al., *Cancer surveillance series: non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995*. J Natl Cancer Inst, 2000. 92(15): p. 1240-51.
25. Mirvish, J.J., et al., *Role of infectious agents in cutaneous T-cell lymphoma: facts and controversies*. Clin Dermatol, 2013. 31(4): p. 423-31.
26. Massone, C., et al., *Histopathologic features of early (patch) lesions of mycosis fungoides: a morphologic study on 745 biopsy specimens from 427 patients*. Am J Surg Pathol, 2005. 29(4): p. 550-60.
27. Vergier, B., et al., *Transformation of mycosis fungoides: clinicopathological and prognostic features of 45 cases*. French Study Group of Cutaneous Lymphomas. Blood, 2000. 95(7): p. 2212-8.
28. Vermeer, M.H., et al., *Expression of cytotoxic proteins by neoplastic T cells in mycosis fungoides increases with progression from plaque stage to tumor stage disease*. Am J Pathol, 1999. 154(4): p. 1203-10.
29. Ralfkiaer, E., *Immunohistological markers for the diagnosis of cutaneous lymphomas*. Semin Diagn Pathol, 1991. 8(2): p. 62-72.
30. Ponti, R., et al., *T-cell receptor gamma gene rearrangement by multiplex polymerase chain reaction/heteroduplex analysis in patients with cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides/Sezary syndrome) and benign inflammatory disease: correlation with clinical, histological and immunophenotypical findings*. Br J Dermatol, 2005. 153(3): p. 565-73.
31. Bunn, P.A., Jr. and S.I. Lamberg, *Report of the Committee on Staging and Classification of Cutaneous T-Cell Lymphomas*. Cancer Treat Rep, 1979. 63(4): p. 725-8.
32. Sausville, E.A., et al., *Histologic assessment of lymph nodes in mycosis fungoides/Sezary syndrome (cutaneous T-cell lymphoma): clinical correlations and prognostic import of a new classification system*. Hum Pathol, 1985. 16(11): p. 1098-109.
33. Scheffer, E., C.J. Meijer, and W.A. Van Vloten, *Dermatopathic lymphadenopathy and lymph node involvement in mycosis fungoides*. Cancer, 1980. 45(1): p. 137-48.
34. Olsen, E., et al., *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(6): p. 1713-22.

35. van Doorn, R., et al., *Mycosis fungoides: disease evolution and prognosis of 309 Dutch patients*. Arch Dermatol, 2000. **136**(4): p. 504-10.
36. Wieselthier, J.S. and H.K. Koh, *Sezary syndrome: diagnosis, prognosis, and critical review of treatment options*. J Am Acad Dermatol, 1990. **22**(3): p. 381-401.
37. Criscione, V.D. and M.A. Weinstock, *Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002*. Arch Dermatol, 2007. **143**(7): p. 854-9.
38. Hwang, S.T., et al., *Mycosis fungoides and Sezary syndrome*. Lancet, 2008. **371**(9616): p. 945-57.
39. Sokolowska-Wojdylo, M., et al., *Absence of CD26 expression on skin-homing CLA+ CD4+ T lymphocytes in peripheral blood is a highly sensitive marker for early diagnosis and therapeutic monitoring of patients with Sezary syndrome*. Clin Exp Dermatol, 2005. **30**(6): p. 702-6.
40. Hoeller, C., et al., *In vivo imaging of cutaneous T-cell lymphoma migration to the skin*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 2704-8.
41. Lu, D., et al., *The T-cell chemokine receptor CXCR3 is expressed highly in low-grade mycosis fungoides*. Am J Clin Pathol, 2001. **115**(3): p. 413-21.
42. Kallinich, T., et al., *Chemokine receptor expression on neoplastic and reactive T cells in the skin at different stages of mycosis fungoides*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(5): p. 1045-52.
43. Vowels, B.R., et al., *Extracorporeal photochemotherapy induces the production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes: implications for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and systemic sclerosis*. J Invest Dermatol, 1992. **98**(5): p. 686-92.
44. Vonderheid, E.C. and M.G. Bernengo, *The Sezary syndrome: hematologic criteria*. Hematol Oncol Clin North Am, 2003. **17**(6): p. 1367-89, viii.
45. De Smedt, T., et al., *Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function*. Eur J Immunol, 1997. **27**(5): p. 1229-35.
46. Zinzani, P.L., *I Linfomi Cutanei*. III ed. 2012: Percorsi Editorial
47. Zackheim, H.S. and T.H. McCalmont, *Mycosis fungoides: the great imitator*. J Am Acad Dermatol, 2002. **47**(6): p. 914-8.
48. Wysocka, M., et al., *Sezary syndrome patients demonstrate a defect in dendritic cell populations: effects of CD40 ligand and treatment with GM-CSF on dendritic cell numbers and the production of cytokines*. Blood, 2002. **100**(9): p. 3287-94.
49. Berger, C.L., et al., *Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1640-7.
50. Karube, K., et al., *Expression of FoxP3, a key molecule in CD4CD25 regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells*. Br J Haematol, 2004. **126**(1): p. 81-4.
51. Axelrod, P.I., B. Lorber, and E.C. Vonderheid, *Infections complicating mycosis fungoides and Sezary syndrome*. JAMA, 1992. **267**(10): p. 1354-8.

52. Goldgeier, M.H., et al., *An unusual and fatal case of disseminated cutaneous herpes simplex. Infection in a patient with cutaneous T cell lymphoma (mycosis fungoides)*. J Am Acad Dermatol, 1981. 4(2): p. 176-80.
53. Pielop, J.A., I. Brownell, and M. Duvic, *Mycosis fungoides associated with malignant melanoma and dysplastic nevus syndrome*. Int J Dermatol, 2003. 42(2): p. 116-22.
54. Molin, L., K. Thomsen, and G. Volden, *Serum IgE in mycosis fungoides*. Br Med J, 1978. 1(6117): p. 920-1.
55. Tancrede-Bohin, E., et al., *Prognostic value of blood eosinophilia in primary cutaneous T-cell lymphomas*. Arch Dermatol, 2004. 140(9): p. 1057-61.
56. Yoo, E.K., et al., *Complete molecular remission during biologic response modifier therapy for Sezary syndrome is associated with enhanced helper T type 1 cytokine production and natural killer cell activity*. J Am Acad Dermatol, 2001. 45(2): p. 208-16.
57. Trotter, M.J., et al., *Cutaneous histopathology of Sezary syndrome: a study of 41 cases with a proven circulating T-cell clone*. J Cutan Pathol, 1997. 24(5): p. 286-91.
58. Scheffer, E., et al., *A histologic study of lymph nodes from patients with the Sezary syndrome*. Cancer, 1986. 57(12): p. 2375-80.
59. Sibaud, V., et al., *Bone marrow histopathologic and molecular staging in epidermotropic T-cell lymphomas*. Am J Clin Pathol, 2003. 119(3): p. 414-23.
60. Bernengo, M.G., et al., *The relevance of the CD4+ CD26- subset in the identification of circulating Sezary cells*. Br J Dermatol, 2001. 144(1): p. 125-35.
61. Narducci, M.G., et al., *Skin homing of Sezary cells involves SDF-1-CXCR4 signaling and down-regulation of CD26/dipeptidylpeptidase IV*. Blood, 2006. 107(3): p. 1108-15.
62. Whittaker, S.J. and N.P. Smith, *Diagnostic value of T-cell receptor beta gene rearrangement analysis on peripheral blood lymphocytes of patients with erythroderma*. J Invest Dermatol, 1992. 99(3): p. 361-2.
63. Mao, X., et al., *Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas*. Blood, 2003. 101(4): p. 1513-9.
64. Diwan, A.H., et al., *Primary Sezary syndrome commonly shows low-grade cytologic atypia and an absence of epidermotropism*. Am J Clin Pathol, 2005. 123(4): p. 510-5.
65. Sentis, H.J., R. Willemze, and E. Scheffer, *Histopathologic studies in Sezary syndrome and erythrodermic mycosis fungoides: a comparison with benign forms of erythroderma*. J Am Acad Dermatol, 1986. 15(6): p. 1217-26.
66. Vonderheid, E.C., et al., *Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: report of the International Society for Cutaneous Lymphomas*. J Am Acad Dermatol, 2002. 46(1): p. 95-106.
67. Russell-Jones, R., *Diagnosing erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma*. Br J Dermatol, 2005. 153(1): p. 1-5.
68. Shapiro, P.E. and F.J. Pinto, *The histologic spectrum of mycosis fungoides/Sezary syndrome (cutaneous T-cell lymphoma). A review of 222 biopsies, including newly described patterns and the earliest pathologic changes*. Am J Surg Pathol, 1994. 18(7): p. 645-67.

69. Vonderheid, E.C., J. Pena, and P. Nowell, *Sezary cell counts in erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: implications for prognosis and staging*. *Leuk Lymphoma*, 2006. **47**(9): p. 1841-56.
70. Vonderheid, E.C., *On the diagnosis of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma*. *J Cutan Pathol*, 2006. **33** Suppl 1: p. 27-42.
71. Olsen, E., et al., *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**(6): p. 1713-22.
72. Vidulich, K.A., et al., *Overall survival in erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: an analysis of prognostic factors in a cohort of patients with erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma*. *Int J Dermatol*, 2009. **48**(3): p. 243-52.
73. Kallioniemi, A., et al., *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors*. *Science*, 1992. **258**(5083): p. 818-21.
74. Oostlander, A.E., G.A. Meijer, and B. Ylstra, *Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics*. *Clin Genet*, 2004. **66**(6): p. 488-95.
75. Weiss, M.M., et al., *Comparative genomic hybridisation*. *Mol Pathol*, 1999. **52**(5): p. 243-51.
76. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. *Genome Res*, 2004. **14**(10A): p. 1902-10.
77. Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer, *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. *Cell*, 2009. **136**(4): p. 642-55.
78. Calin, G.A., et al., *MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(13): p. 5166-71.
79. Metzler, M., et al., *High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004. **39**(2): p. 167-9.
80. Calin, G.A., et al., *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(17): p. 1793-801.
81. Diederichs, S. and D.A. Haber, *Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression*. *Cell*, 2007. **131**(6): p. 1097-108.
82. Garzon, R., G.A. Calin, and C.M. Croce, *MicroRNAs in Cancer*. *Annu Rev Med*, 2009. **60**: p. 167-79.
83. Chang, T.C., et al., *Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis*. *Mol Cell*, 2007. **26**(5): p. 745-52.
84. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 281-97.
85. Carleton, M., M.A. Cleary, and P.S. Linsley, *MicroRNAs and cell cycle regulation*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(17): p. 2127-32.
86. Poy, M.N., et al., *A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion*. *Nature*, 2004. **432**(7014): p. 226-30.

87. Landthaler, M., A. Yalcin, and T. Tuschl, *The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis*. *Curr Biol*, 2004. **14**(23): p. 2162-7.
88. Jin, P., R.S. Alisch, and S.T. Warren, *RNA and microRNAs in fragile X mental retardation*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(11): p. 1048-53.
89. Croce, C.M., *Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(10): p. 704-14.
90. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. *Nature*, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
91. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(7): p. 2257-61.
92. Calin, G.A., et al., *MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(32): p. 11755-60.
93. Sonoki, T., et al., *Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2005. **19**(11): p. 2009-10.
94. Yanaihara, N., et al., *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. *Cancer Cell*, 2006. **9**(3): p. 189-98.
95. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. *Cancer Res*, 2005. **65**(16): p. 7065-70.
96. So, C.C., et al., *Large cell transformation of Sezary syndrome. A conventional and molecular cytogenetic study*. *Am J Clin Pathol*, 2000. **113**(6): p. 792-7.
97. Karenko, L., et al., *Notable losses at specific regions of chromosomes 10q and 13q in the Sezary syndrome detected by comparative genomic hybridization*. *J Invest Dermatol*, 1999. **112**(3): p. 392-5.
98. Whang-Peng, J., et al., *Clinical implications of cytogenetic studies in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)*. *Cancer*, 1982. **50**(8): p. 1539-53.
99. Karenko, L., et al., *Chromosomal abnormalities in cutaneous T-cell lymphoma and in its premalignant conditions as detected by G-banding and interphase cytogenetic methods*. *J Invest Dermatol*, 1997. **108**(1): p. 22-9.
100. Mohr, B., et al., *Complex cytogenetic and immunophenotypic aberrations in a patient with Sezary syndrome*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1996. **90**(1): p. 33-6.
101. Izykowska, K. and G.K. Przybylski, *Genetic alterations in Sezary syndrome*. *Leuk Lymphoma*, 2011. **52**(5): p. 745-53.
102. Caprini, E., et al., *Identification of key regions and genes important in the pathogenesis of sezary syndrome by combining genomic and expression microarrays*. *Cancer Res*, 2009. **69**(21): p. 8438-46.
103. Kari, L., et al., *Classification and prediction of survival in patients with the leukemic phase of cutaneous T cell lymphoma*. *J Exp Med*, 2003. **197**(11): p. 1477-88.
104. van Doorn, R., et al., *Aberrant expression of the tyrosine kinase receptor EphA4 and the transcription factor twist in Sezary syndrome identified by gene expression analysis*. *Cancer Res*, 2004. **64**(16): p. 5578-86.

105. Izban, K.F., et al., *Constitutive expression of NF-kappa B is a characteristic feature of mycosis fungoides: implications for apoptosis resistance and pathogenesis*. Hum Pathol, 2000. 31(12): p. 1482-90.
106. Sors, A., et al., *Down-regulating constitutive activation of the NF-kappaB canonical pathway overcomes the resistance of cutaneous T-cell lymphoma to apoptosis*. Blood, 2006. 107(6): p. 2354-63.
107. Logarinho, E., et al., *The human spindle assembly checkpoint protein Bub3 is required for the establishment of efficient kinetochore-microtubule attachments*. Mol Biol Cell, 2008. 19(4): p. 1798-813.
108. Henriksson, M. and B. Luscher, *Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation*. Adv Cancer Res, 1996. 68: p. 109-82.
109. Soucek, L. and G. Evan, *Myc-Is this the oncogene from Hell?* Cancer Cell, 2002. 1(5): p. 406-8.
110. Vermeer, M.H., et al., *Novel and highly recurrent chromosomal alterations in Sezary syndrome*. Cancer Res, 2008. 68(8): p. 2689-98.
111. Nilsson, J.A., et al., *Mnt loss triggers Myc transcription targets, proliferation, apoptosis, and transformation*. Mol Cell Biol, 2004. 24(4): p. 1560-9.
112. Dezfouli, S., et al., *Inflammatory disease and lymphomagenesis caused by deletion of the Myc antagonist Mnt in T cells*. Mol Cell Biol, 2006. 26(6): p. 2080-92.
113. Hurlin, P.J., et al., *Deletion of Mnt leads to disrupted cell cycle control and tumorigenesis*. EMBO J, 2003. 22(18): p. 4584-96.
114. Hemann, M.T., et al., *Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants*. Nature, 2005. 436(7052): p. 807-11.
115. Valsesia-Wittmann, S., et al., *Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells*. Cancer Cell, 2004. 6(6): p. 625-30.
116. Zhang, Q., et al., *Activation of Jak/STAT proteins involved in signal transduction pathway mediated by receptor for interleukin 2 in malignant T lymphocytes derived from cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma and Sezary syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(17): p. 9148-53.
117. Eriksen, K.W., et al., *Constitutive STAT3-activation in Sezary syndrome: tyrphostin AG490 inhibits STAT3-activation, interleukin-2 receptor expression and growth of leukemic Sezary cells*. Leukemia, 2001. 15(5): p. 787-93.
118. Mitchell, T.J., S.J. Whittaker, and S. John, *Dysregulated expression of COOH-terminally truncated Stat5 and loss of IL2-inducible Stat5-dependent gene expression in Sezary Syndrome*. Cancer Res, 2003. 63(24): p. 9048-54.
119. Qin, J.Z., et al., *Constitutive and interleukin-7- and interleukin-15-stimulated DNA binding of STAT and novel factors in cutaneous T cell lymphoma cells*. J Invest Dermatol, 2001. 117(3): p. 583-9.
120. Williams, T.M., et al., *The TCF8 gene encoding a zinc finger protein (Nil-2-a) resides on human chromosome 10p11.2*. Genomics, 1992. 14(1): p. 194-6.
121. Kovanen, P.E., et al., *Analysis of gamma c-family cytokine target genes. Identification of dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a regulator of mitogen-*

- activated protein kinase activity in interleukin-2 signaling.* J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 5205-13.
122. Wales, M.M., et al., *p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3.* Nat Med, 1995. **1**(6): p. 570-7.
 123. Issa, J.P., et al., *HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms.* Cancer Res, 1997. **57**(9): p. 1678-81.
 124. Laharanne, E., et al., *Genome-wide analysis of cutaneous T-cell lymphomas identifies three clinically relevant classes.* J Invest Dermatol, 2010. **130**(6): p. 1707-18.
 125. Barba, G., et al., *Comparative genomic hybridization identifies 17q11.2 approximately q12 duplication as an early event in cutaneous T-cell lymphomas.* Cancer Genet Cytogenet, 2008. **184**(1): p. 48-51.
 126. Garzon, R., G. Marcucci, and C.M. Croce, *Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges.* Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(10): p. 775-89.
 127. Ballabio, E., et al., *MicroRNA expression in Sezary syndrome: identification, function, and diagnostic potential.* Blood, 2010. **116**(7): p. 1105-13.
 128. Zhang, L., et al., *microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9136-41.
 129. Chang, T.C., et al., *Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis.* Nat Genet, 2008. **40**(1): p. 43-50.
 130. Lawrie, C.H., et al., *MicroRNA expression in lymphocyte development and malignancy.* Leukemia, 2008. **22**(7): p. 1440-6.
 131. Josien, R., et al., *TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells.* J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2562-8.
 132. Narducci, M.G., et al., *MicroRNA profiling reveals that miR-21, miR486 and miR-214 are upregulated and involved in cell survival in Sezary syndrome.* Cell Death Dis, 2011. **2**: p. e151.
 133. Langerak, A.W., et al., *Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations.* Leukemia, 1997. **11**(12): p. 2192-9.
 134. Hristov, A.C., E.C. Vonderheid, and M.J. Borowitz, *Simplified flow cytometric assessment in mycosis fungoides and Sezary syndrome.* Am J Clin Pathol, 2011. **136**(6): p. 944-53.
 135. Wei, X., et al., *Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma.* Nat Genet, 2011. **43**(5): p. 442-6.
 136. Liu, X., et al., *c-Myc transformation domain recruits the human STAGA complex and requires TRRAP and GCN5 acetylase activity for transcription activation.* J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 20405-12.
 137. Wurdak, H., et al., *An RNAi screen identifies TRRAP as a regulator of brain tumor-initiating cell differentiation.* Cell Stem Cell, 2010. **6**(1): p. 37-47.

138. Kwei, K.A., et al., *SMURF1 amplification promotes invasiveness in pancreatic cancer*. PLoS One, 2011. 6(8): p. e23924.
139. Nie, J., et al., *Smad ubiquitylation regulatory factor 1/2 (Smurf1/2) promotes p53 degradation by stabilizing the E3 ligase MDM2*. J Biol Chem, 2010. 285(30): p. 22818-30.
140. Zhao, R., et al., *Subunit 6 of the COP9 signalosome promotes tumorigenesis in mice through stabilization of MDM2 and is upregulated in human cancers*. J Clin Invest, 2011. 121(3): p. 851-65.
141. Appasamy, P.M., *Biological and clinical implications of interleukin-7 and lymphopoiesis*. Cytokines Cell Mol Ther, 1999. 5(1): p. 25-39.
142. Or, R., A. Abdul-Hai, and A. Ben-Yehuda, *Reviewing the potential utility of interleukin-7 as a promoter of thymopoiesis and immune recovery*. Cytokines Cell Mol Ther, 1998. 4(4): p. 287-94.
143. Williams, T.M., et al., *Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression*. Science, 1991. 254(5039): p. 1791-4.
144. Li, J., et al., *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer*. Science, 1997. 275(5308): p. 1943-7.
145. Steck, P.A., et al., *Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers*. Nat Genet, 1997. 15(4): p. 356-62.
146. Maehama, T. and J.E. Dixon, *The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 1998. 273(22): p. 13375-8.
147. Dereure, O., et al., *Decreased expression of Fas (APO-1/CD95) on peripheral blood CD4+ T lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas*. Br J Dermatol, 2000. 143(6): p. 1205-10.
148. Kawamata, N., et al., *Mxi1 isoforms are expressed in hematological cell lines and normal bone marrow*. Int J Oncol, 2005. 26(5): p. 1369-75.
149. Kovanen, P.E., et al., *T-cell development and function are modulated by dual specificity phosphatase DUSP5*. J Biol Chem, 2008. 283(25): p. 17362-9.
150. Jang, M., et al., *Caspase-7 mediated cleavage of proteasome subunits during apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 363(2): p. 388-94.
151. Becker, W.M., Kleinsmith, L.J., Hardin, J., *The World of the Cell*. fifth edition ed. 2003, San Francisco. 802.
152. Petitjean, A., et al., *TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes*. Oncogene, 2007. 26(15): p. 2157-65.
153. Wahlstrom, T. and M. Henriksson, *Mnt takes control as key regulator of the myc/max/mxd network*. Adv Cancer Res, 2007. 97: p. 61-80.
154. Popov, N., et al., *Mnt transcriptional repressor is functionally regulated during cell cycle progression*. Oncogene, 2005. 24(56): p. 8326-37.
155. Haring, S.J., et al., *Cellular functions of human RPA1. Multiple roles of domains in replication, repair, and checkpoints*. J Biol Chem, 2008. 283(27): p. 19095-111.

156. Chen, W.Y., et al., *Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses*. *Cell*, 2005. **123**(3): p. 437-48.
157. Chen, W., et al., *Epigenetic and genetic loss of Hic1 function accentuates the role of p53 in tumorigenesis*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(4): p. 387-98.
158. Roy, V. and E.A. Perez, *Beyond trastuzumab: small molecule tyrosine kinase inhibitors in HER-2-positive breast cancer*. *Oncologist*, 2009. **14**(11): p. 1061-9.
159. Dharmawardana, P.G., et al., *Molecular targeting of growth factor receptor-bound 2 (Grb2) as an anti-cancer strategy*. *Anticancer Drugs*, 2006. **17**(1): p. 13-20.
160. Gishizky, M.L., D. Cortez, and A.M. Pendergast, *Mutant forms of growth factor-binding protein-2 reverse BCR-ABL-induced transformation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(24): p. 10889-93.
161. Watanabe, T., et al., *Significance of the Grb2 and son of sevenless (Sos) proteins in human bladder cancer cell lines*. *IUBMB Life*, 2000. **49**(4): p. 317-20.
162. Notohamiprodo, M., et al., *CCR10 is expressed in cutaneous T-cell lymphoma*. *Int J Cancer*, 2005. **115**(4): p. 641-7.
163. Obexer, P., et al., *Repression of BIRC5/survivin by FOXO3/FKHRL1 sensitizes human neuroblastoma cells to DNA damage-induced apoptosis*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(7): p. 2041-8.
164. Tracey, L., et al., *Expression of the NF-kappaB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively*. *J Pathol*, 2005. **206**(2): p. 123-34.
165. Kucukzeybek, Y., et al., *Enhancement of docetaxel-induced cytotoxicity and apoptosis by all-trans retinoic acid (ATRA) through downregulation of survivin (BIRC5), MCL-1 and LTbeta-R in hormone- and drug resistant prostate cancer cell line, DU-145*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008. **27**: p. 37.
166. ùv, et al., *Decreased expression and aberrant methylation of Gadd45G is associated with tumor progression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma*. *Clin Exp Metastasis*, 2013: p. Clin Exp Metastasis.
167. Wang, L., et al., *Abnormal expression of GADD45B in human colorectal carcinoma*. *J Transl Med*, 2012. **10**: p. 215.
168. Liebermann, D.A., et al., *Gadd45 stress sensors in malignancy and leukemia*. *Crit Rev Oncog*, 2011. **16**(1-2): p. 129-40.
169. Shuai, K., *Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins*. *Oncogene*, 2000. **19**(21): p. 2638-44.
170. Petrini, I., et al., *Copy number aberrations of BCL2 and CDKN2A/B identified by array-CGH in thymic epithelial tumors*. *Cell Death Dis*, 2012. **3**: p. e351.
171. Tsuchiya, T., et al., *Disruptive cell cycle regulation involving epigenetic downregulation of Cdkn2a (p16(Ink4a)) in early-stage liver tumor-promotion facilitating liver cell regeneration in rats*. *Toxicology*, 2012. **299**(2-3): p. 146-54.
172. Laharanne, E., et al., *CDKN2A-CDKN2B deletion defines an aggressive subset of cutaneous T-cell lymphoma*. *Mod Pathol*, 2010. **23**(4): p. 547-58.

173. Sanchez-Schmidt, J.M., et al., *Primary cutaneous CD30+ anaplastic large-cell lymphomas show a heterogeneous genomic profile: an oligonucleotide arrayCGH approach*. *J Invest Dermatol*, 2011. **131**(1): p. 269-71.
174. Salgado, R., et al., *Oligonucleotide array-CGH identifies genomic subgroups and prognostic markers for tumor stage mycosis fungoides*. *J Invest Dermatol*, 2010. **130**(4): p. 1126-35.
175. Vainchenker, W. and S.N. Constantinescu, *JAK/STAT signaling in hematological malignancies*. *Oncogene*, 2013. **32**(21): p. 2601-13.
176. Poage, G.M., Z.C. Hartman, and P.H. Brown, *Revealing targeted therapeutic opportunities in triple-negative breast cancers: A new strategy*. *Cell Cycle*, 2013. **12**(17).
177. Shimada, K., et al., *The molecular mechanism underlying anti-proliferative effect of SOCS-1 in non-small cell lung cancer cells*. *Cancer Sci*, 2013.
178. Akinleye, A., et al., *Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development*. *J Hematol Oncol*, 2013. **6**(1): p. 59.
179. Macha, M.A., et al., *Guggulsterone decreases proliferation and metastatic behavior of pancreatic cancer cells by modulating JAK/STAT and Src/FAK signaling*. *Cancer Lett*, 2013.
180. Larsen, L. and C. Ropke, *Suppressors of cytokine signalling: SOCS*. *APMIS*, 2002. **110**(12): p. 833-44.
181. Espinet, B., et al., *Genetic characterization of Sezary's syndrome by conventional cytogenetics and cross-species color banding fluorescent in situ hybridization*. *Haematologica*, 2004. **89**(2): p. 165-73.
182. Yu, F., et al., *let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells*. *Cell*, 2007. **131**(6): p. 1109-23.
183. Quesne, J.L., et al., *Biological and prognostic associations of miR-205 and let-7b in breast cancer revealed by in situ hybridization analysis of micro-RNA expression in arrays of archival tumour tissue*. *J Pathol*, 2012. **227**(3): p. 306-14.
184. Johnson, S.M., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. *Cell*, 2005. **120**(5): p. 635-47.
185. Lee, Y.S. and A. Dutta, *The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene*. *Genes Dev*, 2007. **21**(9): p. 1025-30.
186. Roush, S. and F.J. Slack, *The let-7 family of microRNAs*. *Trends Cell Biol*, 2008. **18**(10): p. 505-16.
187. Stamatopoulos, B., et al., *microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification*. *Blood*, 2009. **113**(21): p. 5237-45.
188. Mraz, M., et al., *miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities*. *Leukemia*, 2009. **23**(6): p. 1159-63.
189. Ding, D.P., et al., *miR-29c induces cell cycle arrest in esophageal squamous cell carcinoma by modulating cyclin E expression*. *Carcinogenesis*, 2011. **32**(7): p. 1025-32.

190. Wang, C.M., et al., *miR-29c targets TNFAIP3, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **411**(3): p. 586-92.
191. Nguyen, T., et al., *Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma*. *Epigenetics*, 2011. **6**(3): p. 388-94.
192. Veerla, S., et al., *MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(9): p. 2236-42.
193. Valastyan, S., et al., *A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis*. *Cell*, 2009. **137**(6): p. 1032-46.
194. Zhang, Y., et al., *Down-regulation of miR-31 expression in gastric cancer tissues and its clinical significance*. *Med Oncol*, 2010. **27**(3): p. 685-9.
195. Creighton, C.J., et al., *Molecular profiling uncovers a p53-associated role for microRNA-31 in inhibiting the proliferation of serous ovarian carcinomas and other cancers*. *Cancer Res*, 2010. **70**(5): p. 1906-15.
196. Ivanov, S.V., et al., *Pro-tumorigenic effects of miR-31 loss in mesothelioma*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(30): p. 22809-17.
197. Yamagishi, M., et al., *Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF-kappaB pathway in adult T cell leukemia and other cancers*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(1): p. 121-35.
198. Wong, Q.W., et al., *MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(1): p. 257-69.
199. Chiaretti, S., et al., *Gene expression profiling identifies a subset of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia with myeloid-like gene features and over-expression of miR-223*. *Haematologica*, 2010. **95**(7): p. 1114-21.
200. Lee, D.Y., et al., *MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(51): p. 20350-5.
201. Feng, M., et al., *Myc/miR-378/TOB2/cyclin D1 functional module regulates oncogenic transformation*. *Oncogene*, 2011. **30**(19): p. 2242-51.
202. Wang, R., et al., *MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14)*. *Oncogene*, 2011. **30**(23): p. 2644-58.
203. Bandres, E., et al., *microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(7): p. 2281-90.
204. Nan, Y., et al., *MiRNA-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cells*. *Brain Res*, 2010. **1359**: p. 14-21.
205. Li, X., et al., *Repression of tumor suppressor miR-451 is essential for NOTCH1-induced oncogenesis in T-ALL*. *J Exp Med*, 2011. **208**(4): p. 663-75.
206. Chan, J.A., A.M. Krichevsky, and K.S. Kosik, *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(14): p. 6029-33.

207. He, H., et al., *The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(52): p. 19075-80.
208. Laneve, P., et al., *The interplay between microRNAs and the neurotrophin receptor tropomyosin-related kinase C controls proliferation of human neuroblastoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 7957-62.
209. Ozen, M., et al., *Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer*. Oncogene, 2008. **27**(12): p. 1788-93.
210. Lv, M., et al., *An oncogenic role of miR-142-3p in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by targeting glucocorticoid receptor-alpha and cAMP/PKA pathways*. Leukemia, 2012. **26**(4): p. 769-77.
211. Wang, X.S., et al., *MicroRNA-29a and microRNA-142-3p are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **119**(21): p. 4992-5004.
212. Curtale, G., et al., *An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes*. Blood, 2010. **115**(2): p. 265-73.
213. Tomita, M., Y. Tanaka, and N. Mori, *MicroRNA miR-146a is induced by HTLV-1 tax and increases the growth of HTLV-1-infected T-cells*. Int J Cancer, 2012. **130**(10): p. 2300-9.
214. Paik, J.H., et al., *MicroRNA-146a downregulates NFkappaB activity via targeting TRAF6 and functions as a tumor suppressor having strong prognostic implications in NK/T cell lymphoma*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(14): p. 4761-71.
215. Penna, E., et al., *microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C*. EMBO J, 2011. **30**(10): p. 1990-2007.
216. Kim, W.K., et al., *MicroRNA-494 downregulates KIT and inhibits gastrointestinal stromal tumor cell proliferation*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(24): p. 7584-94.
217. Ohdaira, H., et al., *MicroRNA-494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells*. Cell Prolif, 2012. **45**(1): p. 32-8.
218. Ma, N., et al., *Coexpression of an intronic microRNA and its host gene reveals a potential role for miR-483-5p as an IGF2 partner*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **333**(1): p. 96-101.
219. Wang, L., et al., *MiR-483-5p suppresses the proliferation of glioma cells via directly targeting ERK1*. FEBS Lett, 2012. **586**(9): p. 1312-7.
220. Pan, J., et al., *Tumor-suppressive mir-663 gene induces mitotic catastrophe growth arrest in human gastric cancer cells*. Oncol Rep, 2010. **24**(1): p. 105-12.
221. Liu, Z.Y., et al., *MicroRNA-663 targets TGFB1 and regulates lung cancer proliferation*. Asian Pac J Cancer Prev, 2011. **12**(11): p. 2819-23.

RINGRAZIAMENTI

Sono felice di poter ringraziare innanzitutto la mia famiglia.

I miei genitori che da sempre credono in me e mi supportano in ogni piccolo grande traguardo conquistato. Grazie mamma e papà per il magnifico esempio d'amore e rispetto che siete stati per me e che continuate oggi ad essere per i miei figli. Grazie per la voglia e la pazienza con cui li accompagnate in questo loro procedere più o meno incerto nella vita.

Mio marito, con cui sto crescendo. Grazie Fra per aver creduto in noi prima ancora che un "noi" esistesse. Grazie perché continui a pensare che io possa arrivare ovunque, anche quando io stessa non so dove andare. Grazie perché, nonostante i tuoi mille impegni quotidiani, sei riuscito a trovare il tempo di correggere ed arricchire questo mio lavoro.

I miei fratelli, che mi sono sempre accanto anche se fisicamente lontani.

Grazie ai miei colleghi e amici, Daniele, Cecilia, Barbara ed Elena che sopportano, loro malgrado, il mio continuo borbottare quotidiano.

Un ringraziamento particolare va al Prof. Berti, per tutto ciò che mi ha insegnato e mi insegnerà; perché la sua straordinaria conoscenza e passione per queste eterogenee e rare patologie ha reso possibile questo lavoro. Grazie mille anche ai suoi preziosi collaboratori e soprattutto alla dott.ssa Laura Corti che, oltre ad aver condotto in prima persona la maggior parte del lavoro riportato in questa tesi, ha trovato anche il tempo per assecondare le mie richieste e rispondere alle mie mille domande. Grazie al dott. Gianelli che, oltre ad essere per noi un grande supporto e un riferimento nell'ambito delle emopatie maligne, con grande pazienza mi ha accompagnato nel suo ruolo di tutor in questi tre anni di dottorato.

E infine mi piace ricordare il Prof. Davide Soligo, al quale devo tutto ciò che sono. L'averlo conosciuto mi ricorda costantemente che il regalo più grande per chi fa questo mestiere, è la possibilità di vivere e condividere con i nostri pazienti non solo il dolore, ma soprattutto la gioia che deriva dalle loro piccole conquiste quotidiane.