

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
IN EMATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE ED EMATOPATOLOGIA
Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/A4

Settore Scientifico disciplinare: Med08

microRNA Profiling nei Linfomi a Cellule T Periferiche

Presentata da: *Maria Antonella Laginestra*

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof. Stefano Aldo Pileri

Relatore

Chiar.mo Prof. Pier Paolo Piccaluga

Esame finale anno 2013

INDICE

INTRODUZIONE	pag.4
<i>I Linfomi a cellule T periferiche</i>	<i>pag.5</i>
<i>1.1 Linfomi a cellule T periferiche non altrimenti specificati (PTCL/NOS).</i>	<i>pag.8</i>
<i>1.2 I Linfomi Angioimmunoblastici</i>	<i>pag. 10</i>
<i>1.3 I linfomi anaplastici a grandi cellule</i>	<i>pag.12</i>
<i>1.4 I microRNA: Biogenesi e ruolo biologico</i>	<i>pag.13</i>
<i>1.5 microRNA e Linfomi a cellule T periferiche</i>	<i>pag.14</i>
OBIETTIVI DELLO STUDIO	pag. 22
2. MATERIALI E METODI	pag.26
<i>2.1 Caratteristiche campioni</i>	<i>pag. 23</i>
<i>2.2 Isolamento cellule T normali e colture cellulari</i>	<i>pag.23</i>
<i>2.3 Estrazione e quantificazione di RNA</i>	<i>pag.24</i>
<i>2.5 TaqMan Array MicroRNA Cards A</i>	<i>pag. 24</i>
<i>2.6 Whole-Genome DASL HT Assay</i>	<i>pag.27</i>
<i>2.7 Retrotrascrizione e Real Time su campioni del validation set</i>	<i>pag.28</i>
<i>2.8 Trasfezione cellulare</i>	<i>pag.28</i>
<i>2.9 Gene Expression Gene Chip 2.0 Whole Transcript</i>	<i>pag. 29</i>
3. RISULTATI	pag. 30
<i>3.1 L'analisi non supervisionata permette di discriminare campioni PTCLs da cellule T normali in base al profilo di espressione dei miRNA ma non discrimina chiaramente le tre entità di PTCLs</i>	<i>pag. 32</i>
<i>3.2 L'analisi Supervisionata permette di distinguere i tre sottoitipi di linfoma in base all'espressione globale dei miRNA</i>	<i>pag.33</i>
<i>3.3 Gene Expression profiling</i>	<i>pag. 35</i>
<i>3.4 Correlazione miRNA profiling con gene expression profiling</i>	<i>pag.37</i>
<i>3.5 Gene Expression Profiling nelle cellule Fe-Pd trasfettate con hsa-miR-132</i>	<i>pag.37</i>
<i>3.6 Differenti e specifici set di miRNA discriminano i tre sottogruppi di PTCLs</i>	<i>pag.38</i>
<i>3.7 Validazione dei miRNA discriminanti</i>	<i>pag.38</i>

DISCUSSIONE

pag.45

APPENDICE

pag.50

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

I Linfomi a cellule T periferiche

Nella attuale classificazione della World Health Organization (WHO), i linfomi a cellule T periferiche (PTCLs) rappresentano circa il 12% di tutte le neoplasie linfoidi e costituiscono un gruppo eterogeneo con più di venti entità neoplastiche, derivanti da cellule T mature (post-thymic) e da cellule natural killer (NK) coinvolte nella immunità innata e adattativa (Tabella1) [1].

L'approccio della WHO nella classificazione dei PTCLs si basa sulla combinazione di caratteristiche morfologiche, immunofenotipiche, cliniche e genetiche e si pone l'obiettivo di correlare le varie entità patologiche ad una controparte cellulare normale [2]. Anche se esiste una chiara evidenza della importanza della cellula di origine per molte entità di PTCLs, la derivazione cellulare della maggior parte dei sottotipi rimane scarsamente caratterizzata e può essere eterogenea. Questo è principalmente dovuto al complesso differenziamento delle cellule T normali, caratterizzato da una marcata diversità funzionale ma anche dall'evidenza di una sovrapposizione funzionale e da una plasticità tra i compartimenti cellulari T e NK (Appendice, figura1) [3].

Sebbene l'eziologia della maggior parte dei sottotipi di PTCLs sia scarsamente compresa, le infezioni da virus quali Epstein-Barr (EBV) o HTLV-1, contribuiscono allo sviluppo di alcuni sottotipi di linfoma T (per esempio T/Nk nasal type e linfoma/leucemia a cellule T dell'adulto) soprattutto in Asia e in America Latina, dove questi virus sono endemici [4,5]. L'incidenza complessiva dei PTCLs varia in differenti continenti e razze ed è più alta in Asia e Centro / Sud America rispetto ai paesi occidentali. Un recente studio su 1153 casi di PTCLs da 22 centri di tutto il mondo [6] suggerisce che ci possono essere ulteriori variazioni geografiche per alcuni degli altri sottotipi. Per esempio, i linfomi a grandi cellule anaplastiche ALK+ (ALCL_ALK+) sono più frequenti in nord America e le forme angioimmunoblastiche (AITL) sono predominanti in Europa. La ragione dietro queste differenze geografiche è ad oggi ancora sconosciuta[6].

I PTCLs possono essere suddivisi in forme specificate e non altrimenti specificate (NOS). Le forme NOS, corrispondenti a circa il 60% dei linfomi a cellule T periferiche, non possono essere ulteriormente classificate sulla base della morfologia, fenotipo, e convenzionali studi molecolari [7]

In base alla sede anatomica principale di coinvolgimento i PTCLs vengono classificati come forme leucemiche, extranodali, cutanee e nodali.

La diagnosi di PTCLs è spesso difficile a causa di una ampia varietà morfologica e immunofenotipica, per la presenza di significative sovrapposizioni tra entità distinte e per la mancanza(-con poche eccezioni-) di specifiche e ricorrenti alterazioni genetiche [2].

Da un punto di vista fenotipico, i PTCLs mancano tipicamente di uno o più antigeni T cell associati [8, 7], e alcuni di questi antigeni quando presenti, vengono utilizzati come target terapeutici per anticorpi monoclonali mABs (es., CD52) [9], sottolineando l'utilità della determinazione dell'antigene prima dell' inizio della terapia, al fine di massimizzare l'efficacia ed evitare indesiderate tossicità. Inoltre, i PTCLs possono esprimere marcatori diagnostici distintivi e rilevanti, ad esempio, marcatori dei linfociti T follicular helper (FTHs) negli AITL; CD30, perforina negli ALCL; CD25 e FOXP3 nelle leucemie acute linfoblastiche [ATLL][1].

Studi convenzionali di citogenetica, l'impiego di CGH array e SNP array hanno mostrato la presenza di complessi cariotipi e poche alterazioni genetiche ricorrenti quali la traslocazione t(2;5)p(23;q35)nei linfomi anaplastici a grandi cellule (ALCL_ALK+). Tecniche di PCR vengono impiegate nella normale routine di diagnostica per la ricerca di riarrangiamenti clonali per i geni del T cell Receptor (TCR) seguendo il protocollo standardizzato BIOMED2 [10]

Per quanto riguarda la clinica, secondo i risultati della International Peripheral T Cell Lymphoma Project (ITCLP) che ha analizzato più di 1.300 casi in tutto il mondo, con poche eccezioni, i PTCLs hanno un decorso clinico molto aggressivo [5]. Nella maggior parte dei casi, il tasso di sopravvivenza complessivo(overall survival, OS) a 5 anni varia dal 20% al 30% nei PTCL/NOS e negli AITL in contrasto al 70% per il linfoma anaplastico a grandi cellule ALK+ . La maggior parte dei sottotipi extranodali e leucemici hanno un decorso clinico ancora più aggressivo con un OS a 5 anni compreso tra il 7% e il 32%. Questo è dovuto, almeno in parte alla mancanza di sensibilità agli agenti alchilanti e alle antracicline. [5]. Pertanto, vi è la necessità di migliorare e comprendere la patobiologia alla base dei PTCLs e di sviluppare nuove e più efficaci strategie terapeutiche.

In questa tesi sono stati studiati le tre entità piu frequenti di PTCLs nodali: linfomi a cellule T non altrimenti specificati (PTCL/NOS), i linfomi angioimmunoblastici (AITL), i linfomi a grandi cellule anaplastiche (ALCL_ALK+ e ALCL_ALK-)(Figura 1).

Tabella 1

WHO 2008 classification of T-cell neoplasms.

Precursor T-cell neoplasms

Precursor T acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)/lymphoma (T-LBL)

Mature T-cell neoplasms

Leukemic or disseminated

T-cell prolymphocytic leukemia

T-cell large granular lymphocytic leukemia

Adult T-cell lymphoma/leukemia (HTLV1-positive)

Systemic EBV-positive T-cell lymphoproliferative disorders of childhood

Extranodal

Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type^a

Enteropathy-associated T-cell lymphoma

Hepatosplenic T-cell lymphoma

Extranodal–cutaneous

Mycosis fungoides

Sezary syndrome

Primary cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorders

 Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma

 Lymphomatoid papulosis

Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma

Primary cutaneous gamma-delta T-cell lymphoma^b

Primary cutaneous aggressive epidermotropic CD8+ cytotoxic T-cell lymphoma^b

Primary cutaneous small/medium CD4+ T-cell lymphoma^b

Nodal

Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL)

Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive

Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative^b

Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified (PTCL, NOS)

^a Most cases are derived from NK cells and only a minority from T cells.

^b Provisional entities.

1.1 Linfomi a cellule T periferiche non altrimenti specificati (PTCL/NOS)

I PTCL/NOS rappresentano circa il 25% di tutti i linfomi a cellule T periferiche. Nel linfonodo, di PTCL-NOS si evidenzia una paracorticale espansa e infiltrati diffusi con la cancellazione della normale architettura del linfonodo stesso. Lo spettro citologico è molto ampio con cellule chiare e cellule Reed-Sternberg. Spesso è presente un background infiammatorio. I PTCL/NOS sono tipici degli adulti con una età mediana di insorgenza a 60 anni e una alta prevalenza nel sesso maschile. Da un punto di vista clinico i PTCL/NOS si presentano ad uno stadio avanzato (III o IV stadio), occasionalmente con eosinofilia, prurito e sintomi emofagocitici [11]. Il coinvolgimento del midollo osseo è più frequente di quanto osservato nei linfomi diffusi a grandi cellule B [12, 13]. Nella nuova classificazione WHO, sono state descritte alcune nuove varianti morfologiche, ma senza una chiara traslazione all'interno di una precisa entità clinico patologica. Le principali varianti descritte sono:

- la variante linfoepitelioidale (linfoma di Lennert), comunemente CD8+ con piccole cellule T atipiche citotossiche. Confrontata con altre varianti di PTCL/NOS il linfoma di Lennert tende a rimanere confinato nel linfonodo, con infrequente coinvolgimento di siti extranodali; questa forma può essere associata ad una migliore prognosi [14]
- la variante follicolare mostra una derivazione T-helper follicolare e non è stata inclusa nel sottotipo degli AITL a causa della limitata estensione della malattia, del frequente coinvolgimento parziale degli organi e della mancanza di iperplasia delle cellule follicolari dendritiche [14-17]. In particolare, comprende casi con un vero pattern follicolare tanto da mimare il linfoma follicolare o un linfoma T con pattern di crescita perifollicolare o coinvolge la zona mantellare [18, 19]. La traslocazione cromosomica $t(5;9)(q33;q22)$ individuata per la prima volta nel 2006 in un piccolo subset di PTCL/NOS è stata descritta prevalentemente associata alla variante follicolare di PTCL/NOS [20]. In particolare poiché questa traslocazione risulta rara nelle altre forme di PTCL/NOS, l'over espressione e la conseguente attivazione di SYK è stata recentemente descritta come una caratteristica comune a molti sottotipi di PTCLs, rappresentando un possibile target terapeutico [Feldman AL, 2008]. Nonostante l'espressione dei marker tipici delle cellule TFH suggerisca una possibile relazione di questa variante con gli AITL, alcune caratteristiche cliniche, morfologiche e biologiche

permettono la distinzione tra queste due entità; la traslocazione ITK/SYK sembra essere ristretta alla variante follicolare [22,23].

I PTCL/NOS sono generalmente caratterizzati da un aberrante fenotipo con frequente perdita di CD5 e CD7 [8]. La presenza del fenotipo CD4+/CD8- è predominante nei casi nodali, anche se a volte sono stati evidenziati casi double positive (CD4+/CD8+) e double negative (CD4-/CD8-) e casi con fenotipo CD8, CD56 e granuli citotossici. Il CD30 può essere espresso ,eccezionalmente con il CD15, ma il profilo fenotipico globale e la morfologia permettono la distinzione da ALCLs e dal linfoma di Hodgkin. In particolare, la colorazione del CD30 è tipicamente eterogenea di quanto osservato negli ALCLs. L'aberrante espressione di CD20 e/o CD79a è occasionalmente vista [2]. Diversamente dagli AITL i PTCL/NOS generalmente perdono il fenotipo T follicular Helper (CD10+, Bcl6+, PD1+, CXCL13+) con l'eccezione della variante follicolare. La proliferazione è di solito alta e i valori di Ki67 (marcatore di proliferazione cellulare) oltre l'80% sono associati ad una cattiva prognosi [24, 25].

Studi di Gene Expression profiling (GEP), largamente utilizzati negli ultimi dieci anni, hanno apportato nuove evidenze riguardo le caratteristiche genetica molecolari dei PTCL/NOS [26]

In diversi studi è stata evidenziata la tendenza dei PTCL/NOS a formare un gruppo ben distinto in termini di signature molecolare rispetto agli altri sottotipi di PTCLs nodali (ALCL, AITL) [27]. Nel confronto dei PTCL-NOS con la loro più vicina controparte normale, i PTCLs sembrano essere più strettamente correlati a cellule T attivate piuttosto che a cellule T resting, e sono caratterizzati dalla deregolazione di geni coinvolti in processi di proliferazione, apoptosi, adesione cellulare, rimodellamento della matrice e chemioresistenza, simile a quanto osservato in molti altri tipi di tumori. [27]. Alcuni studi basati sull'espressione del profilo genico e / o saggi immunohistochimici suggeriscono frequente deregolazione del pathway NF-κB in PTCL-NOS [27,28]. Diversi gruppi hanno identificato, sempre attraverso il profilo di espressione proteina della famiglia delle tirosin-chinasi (TK) altamente deregolate. [29, 30]. In particolare, il nostro gruppo ha dimostrato che i PTCLs / NOS presentano costante over-espressione del gene per il PDGFRA (platelet derived growth factor receptor α) e quindi, costitutiva attivazione della proteina codificata.

1.2 I Linfomi Angioimmunoblastici

Il linfoma angioimmunoblastico (AITL) è la seconda più frequente entità di PTCLs nel mondo, è maggiormente diffusa in Europa e in nord America, dove rappresenta il 25-30% dei casi [4]. La malattia colpisce gli adulti anziani, e spesso si presenta in modo diffuso al momento della diagnosi. Oltre alla generalizzata linfadenopatia periferica, splenomegalia, e frequente coinvolgimento di vari siti extranodali, molti pazienti presentano sintomi sistemici come febbre e perdita di peso, così come anomalie immunologiche diverse, ipergammaglobulinemia policlonale, anemia emolitica Coombs-positive, linfopenia, trombocitopenia, eosinofilia [31]. Gli AITL hanno distintive caratteristiche patologiche, definite da [2]:

1. un diffuso infiltrato polimorfo tra piccole e medie cellule T neoplastiche in genere meno abbondante rispetto al non-neoplastico contorno fatto da linfociti, istiociti, eosinofili e plasmacellule,
2. importanti vasi sanguigni ramificati,
3. la proliferazione di cellule dendritiche follicolari,
4. la presenza di cellule B spesso infettate dal virus di Epstein-Barr (EBV)

Le cellule neoplastiche negli AITL hanno un immunofenotipo CD4+CD8- con frequenti perdite di uno o diversi marker tipici delle cellule T (in particolare T_{FH}), più comunemente CD7, CD3, CD5 e coespressione di BCL6 e CD10, almeno in una frazione di cellule tumorali[32,33].

Fino a pochi anni fa, gli studi genetici erano relativamente scarsi e non avevano apportato molte evidenze riguardo i pathway oncogenici coinvolti nella patogenesi degli AITL [34, 35, 36].

Le più comuni ricorrenti anomalie cromosomiche sono la trisomia dei cromosomi chr3, chr5 e chr21, acquisizione di un cromosoma X, e delezione del braccio lungo del cromosoma 6 (del6q) [34]. Specifiche anomalie cromosomiche non sembrano essere associate con la sopravvivenza, ma, come riportato per i PTCL/NOS, cariotipi complessi hanno un impatto negativo sull'outcome clinico. Breakpoints a livello dei loci per i geni del TCR sono estremamente rari solo in un caso dei 54 casi che sono stati ultimamente analizzati tramite FISH in, è stato trovato un punto di rottura nel cromosoma che coinvolge il locus TCRA/D. Allora, il riarrangiamento presente nelle cellule T neoplastiche coinvolge il locus delle IGH e conseguente inv (14)(q11q32); tuttavia, il ruolo patogenetico di tale riarrangiamento non è ad oggi chiaro [35, 36].

Approfondimenti molecolari nella patogenesi degli AITL sono stati acquisiti con studi di gene expression profiling (GEP). Nel 2007 in due studi indipendenti [37, 38] è stata definita la signature molecolare globale degli AITL in confronto ai casi di PTCL/NOS e ai linfociti T normali ed è stato possibile distinguere i rispettivi contributi in termini di signature genica delle cellule tumorali e delle cellule non tumorali alla signature genica degli AITL.

In accordo con le caratteristiche patologiche e i criteri diagnostici, il profilo molecolare degli AITL è quindi fortemente influenzato dall'espressione dei geni delle cellule del microambiente tra cui iper-espressione di geni correlati a cellule B, a cellule dendritiche follicolari, chemochine e loro recettori e a geni correlati con la matrice extracellulare. La signature molecolare fornita dalle cellule neoplastiche seppur quantitativamente in maniera minore si arricchisce in geni normalmente espressi dalle cellule T follicolari (TFH). Questa evidente analogia a livello di espressione genica tra le cellule TFH e le cellule neoplastiche AITL ha stabilito in modo definitivo la derivazione cellulare degli AITL da cellule TFH; inizialmente sospettata sulla base dell'espressione di singoli marcatori TFH nelle cellule AITL, (la chemochina CXCL13, CD10, BCL6, PD1, ICOS, SAP, c-MAF, and CCR5,) [39-42]. Questi dati sono stati confermati da studi condotti da Iqbal et al. nel 2010[43].

Questi risultati hanno importanti implicazioni: in primo luogo, la signature molecolare degli AITL permette di identificare marcatori proteici utili nella diagnostica emolinfopatologica, e, in secondo luogo, la delineazione di un profilo molecolare degli AITL, come una neoplasia T con una signature genica TFH, rappresenta un modo per meglio definire le caratteristiche di questa neoplasia portando ad una rivalutazione dello spettro degli AITL. Infatti, nell'analisi dei profili di espressione genica sono state descritte signature di derivazione TFH in un subset di PTCL/NOS CD30- suggerendo che lo spettro degli AITL può essere di più ampio dubbio . Inoltre, studi retrospettivi hanno rilevato la presenza di caratteristiche AITL-like in una porzione di alcuni casi inizialmente diagnosticati come PTCL/NOS attraverso criteri convenzionali ma positivi per i marcatori TFH attraverso GEP e immunotipizzazione [37, 44]. Nel 2012 Lemonnier e collaboratori hanno identificato la mutazione nel gene TET2 (Ten-Eleven Translocation 2) in 190 casi di PTCLs alla diagnosi, trovata con una frequenza maggiore nel 47% dei casi AITL e nel 38% dei casi PTCL/NOS mentre non è stata osservata in alcun caso di ALCL. Le mutazioni di TET2 nei casi PTCL/NOS sembrano essere correlate con quei casi che hanno una derivazione cellulare TFH (TFH-like),[45]. Infine, recenti studi di next generation sequencing hanno evidenziato la presenza di una mutazione nel gene IDH2 (isocitrate dehydrogenase 2) in circa il 20% di casi

AITL ma non in altri casi di PTCLs. Questi risultati sono stati confermati in un set indipendente di pazienti con linfoma angioimmunoblastico e la mutazione di IDH2 è risultata approssimativamente nel 45% dei casi. Questa, rappresenta la seconda più comune lesione genetica identificata negli AITL anche se, non è ancora chiaro il ruolo patogenetico di tale mutazione [46].

1.3 I linfomi anaplastici a grandi cellule

- **ALCL/ALK+**

I linfomi anaplastici a grandi cellule ALK+ vengono definiti dall'espressione della proteina chimerica che contiene la porzione citoplasmatica dell'anaplastic lymphoma kinase (ALK) come conseguenza della traslocazione che coinvolge il gene ALK, e quindi rappresenta l'entità di PTCLs meglio delineata. Questo sottotipo comprende alcune varianti con ampio spettro morfologico, ma tipicamente presentano cellule fortemente positive per CD30, immunofenotipo citotossico e spesso assenti o minima espressione di antigeni tipici delle cellule T. Sono più frequentemente conservati antigeni CD2, CD4 e CD45 e nella maggior parte dei casi vengono espressi antigeni citotossici associati (TIA-1, granzyme B e perforina), suggerendo la derivazione degli ALCL/ALK+ da cellule T citotossiche attivate. ALCL/ALK+ è molto frequente nei gruppi pediatrici e nei giovani adulti rappresentando il 10-20% dei linfomi nei bambini e rappresenta circa il 12% di tutti i linfomi T/NK [47]. I pazienti generalmente presentano linfadenopatia, e spesso coinvolgimento di sedi extranodali quali pelle, ossa e tessuti molli. A dispetto del fatto che più della metà dei pazienti si presentano ad uno stadio avanzato della malattia (III o I), questo linfoma ha una buona prognosi con overall survival del 70-80% [48]. Sono state descritte diverse traslocazioni che coinvolgono il gene ALK (2p23), (Tabella 2). La più comune è la traslocazione t(2;5)(p23;q35) che porta alla fusione del gene ALK con il dominio codificante N-terminale del gene della Nucleofosmina (NPM) sul cromosoma 5. Tutte le traslocazioni portano alla giustapposizione del dominio catalitico citoplasmatico di ALK alla proteina partner, formando una proteina chimerica che induce l'attivazione costitutiva della tirosin chinasi ALK [49]. Le proprietà oncogene della proteina NPM-ALK sono state descritte in molti studi e sono mediate dall'interazione con molecole downstream nel pathway di JAK3/STAT3 [50]. Inoltre, non c'è correlazione tra il tipo di traslocazione e le caratteristiche

morfologiche e l’impatto sull’outcome. Oltre alla traslocazione ALK altre mutazioni genetiche secondarie sono state descritte negli ALCL/ALK+. In uno studio di CGH array [51] sono state trovate alterazioni cromosomiche nel 58% degli ALCL/ALK+. In particolare, alcune alterazioni sono definite dall’acquisizione del 17p (compresa una amplificazione di TP53 ma che non presenta un’aparente correlazione con l’espressione della proteina) e perdita del 4q, sembrano essere le più frequenti in ALCL/ALK+. Studi di gene expression profiling hanno evidenziato una signature molecolare ben distinta dalle altre entità di PTCLs [26, 27]. Nel confronto tra ALCL/ALK+ e ALCL/ALK- sono state identificate differenze molecolari tra i due gruppi, in accordo con il concetto che sono due entità distinte di PTCLs [52]. I casi ALCL/ALK+ erano caratterizzati dall’over-espressione di geni che codificano per molecole coinvolte nel processo di trasduzione del segnale quali: *SYK*, *LYN*, *CDC37* e *ciclina D3*. Sono stati identificati 117 geni over-espressi negli ALCL/ALK+, altamente discriminanti ed in accordo con lo stato della proteina ALK. In base a questo i top 4 geni erano BCL6, PTPNP12, CEBPB e SERPINA1 e la signature molecolare legata ad ALK comprende geni associati a pathways di adesione cellulare e migrazione transendoteliale dei leucociti.

Tabella 2

Translocations and fusion proteins in ALK+ ALCL.

Translocation	Partner gene	Frequency	ALK staining pattern
t(2;5)	Nucleophosmin (NPM)	75%	Cytoplasmic and nuclear
t(1;2)	Tropomyosin 3 (TPM3)	10–20%	Cytoplasmic
t(2;3)	TRK fused gene (TFG)	2–5%	Cytoplasmic
inv(2)	ATIC (Pur H gene)	2–5%	Cytoplasmic
t(2;17)	Clathrin heavy chain (CLTC)	2–5%	Cytoplasmic/granular
t(2;22)	Myosin heavy chain (MYH9)	Rare	Cytoplasmic
t(2;17)	ALK lymphoma oligomerization partner on chromosome 17 (ALO17)	Rare	Cytoplasmic
t(2;19)	Tropomyosin 4 (TPM4)	Rare	Cytoplasmic
t(2;X)	Moesin (MSN)	Rare	Membrane-associated

- **ALCL/ALK-**

I linfomi anaplastici ALK-, considerati nella classificazione WHO del 2008 come entità provvisoria, sono definiti come un linfoma a grandi cellule con morfologia comparabile agli ALCL, con uniforme e forte espressione del CD30 e mancanza dell'espressione della proteina ALK. Le neoplasie ALK- mostrano una maggior conservazione degli antigeni tipici delle cellule T, mentre si osserva meno frequentemente l'espressione di molecole tipiche dei linfociti T citotossici rispetto agli ALCL/ALK+ [53, 54].

Le forme ALCL/ALK- tendono ad insorgere in individui adulti, con meno frequente coinvolgimento di siti extranodali. Il decorso clinico e la prognosi risultano essere peggiori rispetto a quelli delle forme ALCL/ALK+, ma sono più favorevoli se paragonati alle forme di PTCL/NOS [49].

In assenza di riarrangiamenti ALK, alterazioni molecolari alla base della patogenesi del sottotipo ALCL ALK- sono sconosciute. Kansal et al. hanno riportato una elevata incidenza della trisomia del cromosoma 3 [55]. Aberrazioni cromosomiche vengono rilevate attraverso profili di espressione genomica in circa due terzi dei casi di ALCL/ALK- e differiscono dalle aberrazioni cromosomiche secondarie viste negli ALCL/ALK+ [56].

Sebbene studi di gene expression profiling abbiano evidenziato una signature genica distinta delle forme ALCL/ALK- in confronto con quelle ALCL/ALK+[52], è stata comunque evidenziata una certa similarità trascrizionale tra le due entità, indipendentemente dall'espressione della proteina ALK, e non sono state fornite significative indicazioni nella patogenesi degli ALCL ALK-[57]. La presenza di copie extra del gene che codifica per PAX-5 in un sottoinsieme di ALCL potrebbe rappresentare un'alterazione che potrebbe essere rilevante per la linfomagenesi[58]. Infine, nuove evidenze per comprendere la patogenesi dei PTCLs saranno probabilmente fornite in futuro grazie all'applicazione di tecniche di sequenziamento massivo/next generation sequencing. In questo contesto, una traslocazione ricorrente t (6, 7) (p25.3; q32.3) è stata da poco scoperta in ALCL/ALK-. Questa lesione, porta alla giustapposizione del gene DUSP22 della (6p25.3) con il gene FRA7H localizzato su un sito fragile sul cromosoma 7 (7q32.3); Inoltre, questa traslocazione è stata associata con la down-regolazione del gene DUSP22 e up-regolazione del miRNA sul cromosoma 7 (q32.3). Questi risultati rappresentano la prima traslocazione ricorrente riportata in ALCL ALK- ed evidenzia l'utilità di tecniche di sequenziamento massivo per scoprire nuove traslocazioni nei PTCL e in altri tipi di tumore [59].

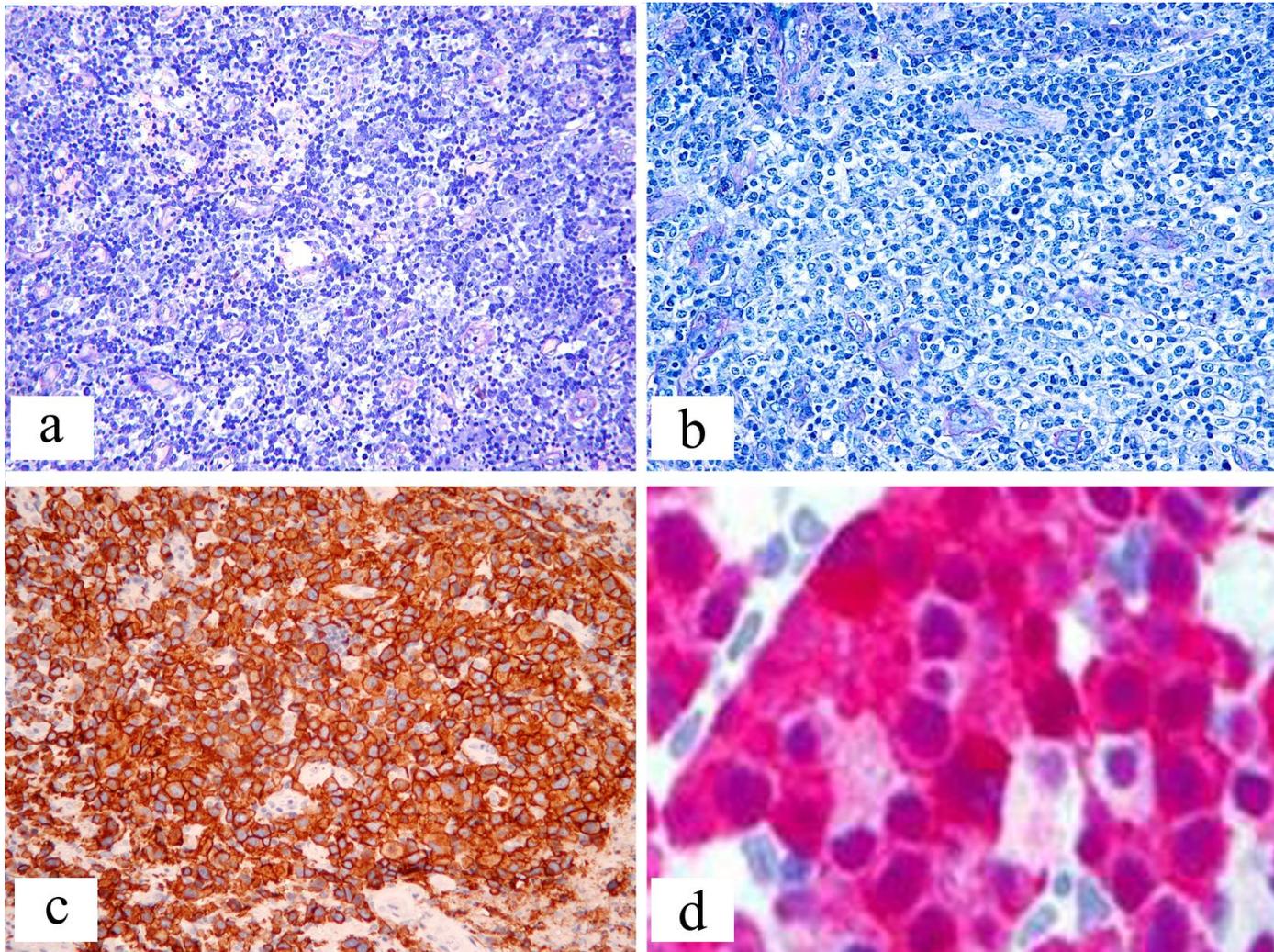


Figura 1 a) PTCL/NOS_Giemsia X200; variabilità di forma e dimensioni (dalla piccola alla media taglia) delle cellule neoplastiche di PTCL/NOS; b) AITL_Giemsia X200; cellule linfoidi atipiche di piccole e medie dimensioni associate ad un'alta proliferazione di venule endoteliali; c) ALCL ALK- X200; cellule di grandi dimensioni reniformi positive per CD30; d) ALCL ALK+ X200; colorazione per epitopo ALCLc (colorazione nucleare e citoplasmatica tipica della traslocazione t(2,5))

1.4 I microRNA: Biogenesi e ruolo biologico

Negli ultimi dieci anni, in diverse specie e in una varia gamma di tessuti, sono stati identificati piccole molecole di RNA non codificanti a singolo filamento di circa 18-25 nucleotidi, filogeneticamente molto conservati ,coinvolti in processi post trascrizionali che prendono il nome di microRNA. La scoperta dei microRNA, risale al 1993 quando un piccolo RNA codificato dal locus lin-4 fu associato al tempo di sviluppo del nematode *Caenorhabditis elegans*, attraverso la modulazione della proteina lin- 14; ma è solo negli ultimi anni che i miRNA sono entrati a far parte del complesso circuito della biologia cellulare, rivelando il loro ruolo chiave come modulatori negativi dell'espressione genica[60]. Ad oggi, centinaia di miRNA sono stati predetti in genomi di animali, piante e virus attraverso differenti approcci sia di clonaggio tradizionale che con metodi sperimentali bioinformatici e analisi di sequenze genomiche EST [61,62], individuando e validando sperimentalmente circa 721 miRNA umani, le cui sequenze sono depositate in miRBase (<http://www.mirbase.org>).

I geni che codificano per queste molecole sono presenti su tutti i cromosomi, ad eccezione del cromosoma Y, e possono trovarsi in regioni introniche o in porzioni intergeniche, talvolta in regioni esoniche. Circa la metà dei geni codificanti microRNA è espresso come singolo gene, mentre l'altra metà è organizzata in clusters; microRNA appartenenti ad uno stesso cluster sono regolati dallo stesso promotore e vengono trascritti in un'unica unità trascrizionale (unità policistroniche) (Figura 2)[63, 64].

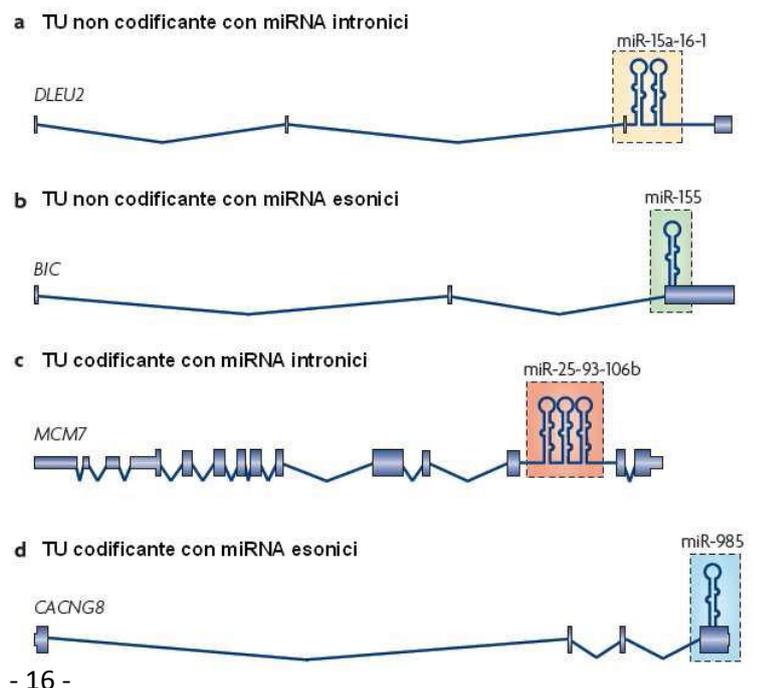


Figura 2: Localizzazione genomica e struttura dei microRNA. (Figura da: Kim, VN. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009. 10: 126-39).

I miRNAs, vengono generalmente trascritti dall'RNA Polimerasi II come lunghi precursori, pri-miRNA che, processati nel nucleo dall'enzima RNase III; Drosha e Pasha (anche conosciuta come DGCR8) vengono convertiti in un RNA di circa 70 nucleotidiche, pre-miRNA che si ripiega a formare una struttura a forcina "stem-loop" [65-68]. I pre-miRNA vengono trasportati fuori dal nucleo, nel citoplasma dall'Esportina 5 (RAN GTPdependent Transporter) [68] dove vanno incontro ad un ulteriore processo di maturazione che porta all'excisione dall'RNase III, Dicer della struttura stem-loop e formazione di una molecola di RNA a doppio filamento il miRNA:miRNA* duplex [69] (Figura 3). Successivamente, il miRNA:miRNA* duplex viene legato dalla proteina Argonaute (Ago) e reclutato nel complesso proteico noto come 'complesso che induce il silenziamento di RNA' (RISC). A questo punto, uno dei due filamenti (filamento guida o miRNA) rimane legato ad Argonaute e costituirà il miRNA maturo, mentre l'altro filamento (filamento passeggero) sarà sottoposto a degradazione da parte di un enzima con attività di elicasi. Tuttavia in alcuni casi entrambi i filamenti possono dare origine a microRNA maturi; in questo caso i microRNA derivanti da due diversi filamenti dello stesso duplex vengono chiamati con lo stesso nome e distinti mediante il suffisso -5p o -3p. La stabilità termodinamica di entrambe le estremità del dsRNA è fondamentale nella determinazione di quale sarà il filamento guida.

L'attività biologica del microRNA maturo, legato al complesso RISC, si esplica mediante il riconoscimento di sequenze ad esso complementari di solito presenti sulla porzione 3' non tradotta (3'utr) dell'RNA messaggero del gene bersaglio; l'interazione tra le due molecole provoca inibizione della traduzione o degradazione della molecola di mRNA. Il legame tra il microRNA e l'mRNA è mediato da una complementarità imperfetta, tuttavia la porzione all'estremità 5' del microRNA, corrispondente ai nucleotidi 2-8 (talvolta anche 1-8) della molecola, appaia sempre con perfetta complementarità all'mRNA bersaglio: questa porzione del microRNA viene detta seed sequence [70] ed è responsabile dello specifico riconoscimento dei bersagli genici da parte del microRNA. Sul web sono disponibili svariati programmi di predizione dei geni bersaglio dei microRNA e questi algoritmi bioinformatici si basano proprio sulla ricerca delle sequenze complementari alle seed sequences dei microRNA sui 3'UTR degli RNA messaggeri.

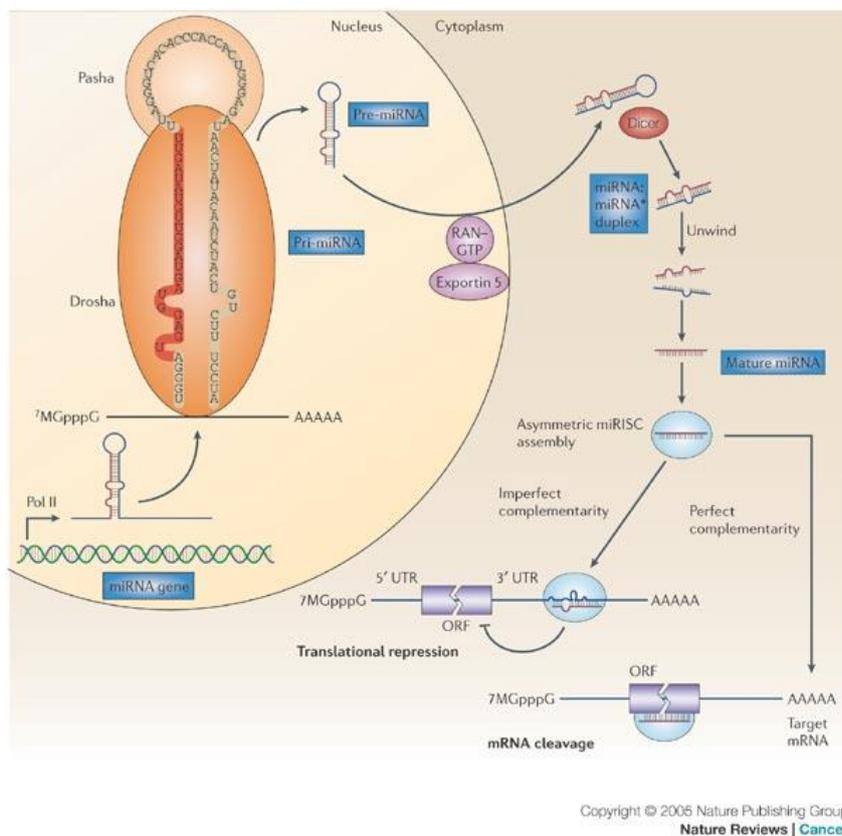


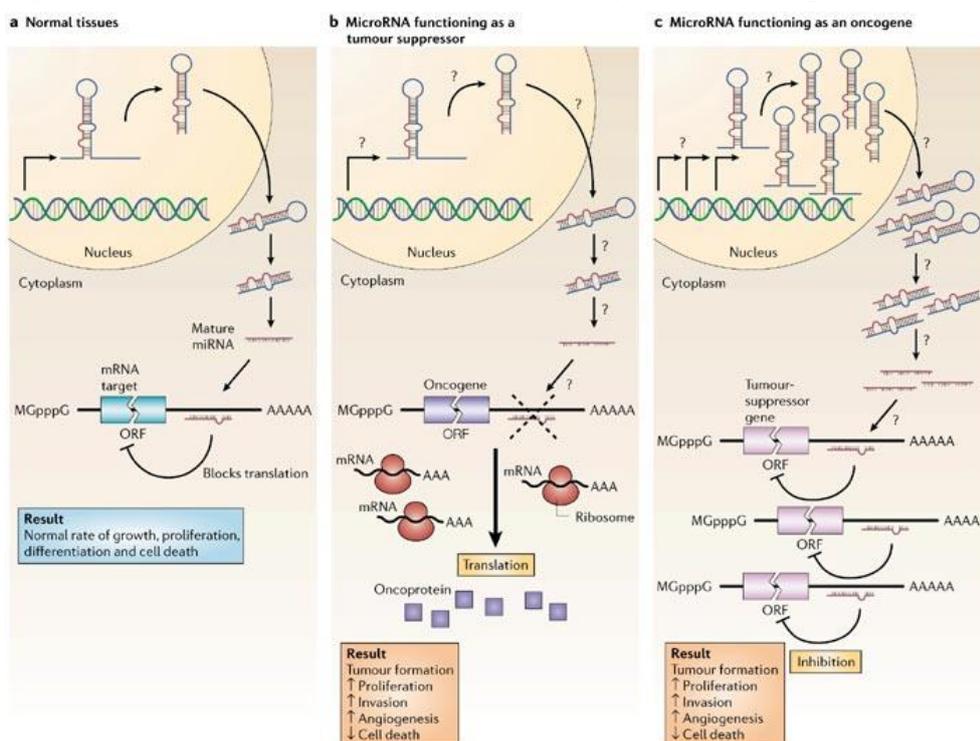
Figura 3: Biogenesi dei microRNA [Esquela-Kerscher et al. Nature Reviews Cancer 6, 259–269]

Nonostante siano state riconosciute condizioni in cui i microRNA sembrano indurre l'espressione dei loro geni bersaglio[71], tuttavia nella maggioranza dei casi finora studiati, queste molecole provocano inibizione dell'espressione dei loro bersagli genici. Se si considera che, in base a quanto calcolato mediante approcci bioinformatici, ogni microRNA può agire su un centinaio o più geni bersaglio[72] e che ogni gene cellulare viene regolato da moltissimi microRNA, si intuisce l'importante ruolo di queste molecole nella fine regolazione di tutti i processi fisiologici (sviluppo, differenziamento, proliferazione, apoptosi) e patologici della cellula.

È stato dimostrato che generalmente nelle neoplasie umane si ha una globale riduzione dei livelli totali di microRNA[73]. In effetti, circa il 50% dei geni che li codificano si trova in regioni cromosomiche frequentemente soggette a mutazione nei tumori (detti siti fragili)[74]. I geni che codificano per microRNA possono essere soggetti agli stessi tipi di mutazioni che avvengono nei geni codificanti per proteine (mutazioni puntiformi, delezioni, amplificazioni), che ne possono inibire o favorire l'espressione. Inoltre possono essere regolati in maniera epigenetica, mediante metilazione del promotore (per esempio il miR-9-1 nel tumore mammario) [75]. Accanto alle mutazioni, genetiche o epigenetiche, l'espressione dei microRNA

può essere regolata anche indirettamente, mediante meccanismi di controllo trascrizionale; infatti la trascrizione dei microRNA è regolata da proteine, la cui espressione o funzione è frequentemente alterata nei tumori (per es. p53, c-MYC). Un altro meccanismo indiretto di controllo dell'espressione dei microRNA riguarda l'insorgenza di mutazioni a carico dei geni codificanti per le proteine coinvolte nella biogenesi dei microRNA (tra cui DICER, DGCR8); per esempio, è stato dimostrato che la perdita di funzionalità di un allele codificante per DICER1, contribuiva ad una diminuzione globale dei livelli di microRNA cellulari e favoriva la trasformazione e la progressione neoplastica [76]. Considerando che ogni microRNA può regolare anche cento o più geni bersaglio, risulta chiaro come l'aberrante espressione di un solo microRNA possa causare variazioni consistenti nell'espressione genica della cellula e quindi nelle sue vie di segnale. Nello sviluppo neoplastico, analogamente ai geni codificanti per proteine, i microRNA possono essere soggetti a mutazioni gain of function, se le mutazioni acquisite causano una sovra-espressione aberrante del gene o a loss of function, qualora venga inibita l'espressione o la normale funzione fisiologica del microRNA. Per questo motivo alcuni microRNA possono essere classificati come oncogeni o oncosoppressori, a seconda di come varia la loro espressione nelle neoplasie umane e della loro funzione nei processi cellulari, legata ai bersagli genici che regolano (Figura 4).

Figura 4: Ruolo dei microRNA come tumor suppressor e oncogene



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Tuttavia, accanto ai microRNA che si comportano da oncogeni o oncosoppressori nella maggioranza delle neoplasie umane, altri microRNA hanno espressione variabile a seconda del tipo di tumore. Lo studio di questi ultimi è comunque interessante, se vengono considerati non come singole molecole, ma nel loro insieme a formare il “miRNoma”, ossia l’espressione di tutti i microRNA della cellula. Ultimamente, con l’avvento e il miglioramento delle tecnologie di indagine “high-throughput”, quali le piattaforme microarray, che permettono di indagare in un’unica analisi l’espressione di tutti i geni o di tutti i microRNA espressi da un campione, sta diventando pratica frequente la definizione del profilo di espressione dei microRNA di un determinato tipo tumorale. La generazione di questi profili-tessuto/tumore specifici, oltre ad apportare nuove molteplici informazioni utili per ampliare la conoscenza dei microRNA nella ricerca di base, si prestano anche per potenziali utilizzi clinici. Infatti lo studio del profilo di espressione dei microRNA “miRNoma” può essere utilizzato per distinguere la neoplasia dal corrispondente tessuto sano o per distinguere neoplasie che differiscono per tipo, stadio, responsività a trattamenti terapeutici o altri parametri clinici [77], suggerendo un possibile utilizzo di queste metodiche nella definizione della diagnosi e della prognosi di una patologia neoplastica. Inoltre negli ultimi anni si stanno diffondendo studi finalizzati a valutare l’utilizzo dei microRNA come marcatori sierici di patologia, che permetterebbero di effettuare diagnosi precoce di neoplasia, semplicemente analizzando il profilo di espressione dei microRNA presenti nel siero dei pazienti [78].

1.5 microRNA e Linfomi a cellule T periferiche

Ad oggi soltanto pochi lavori descrivono il coinvolgimento dei microRNA nella tumorigenesi dei PTCLs. In un recente studio di miRNA profiling, Merkel et al. sono stati descritti 5 membri del miR17–92 cluster, trovati over-espressi nelle forme di ALCL/ALK+; mentre il livello di espressione del miR-155 risultava maggiore di 10 volte nelle forme di ALCL/ALK-. Di particolare interesse è risultato essere il miR101, trovato down-regolato in entrambe le entità di ALCL, e considerato di potenziale interesse terapeutico dal momento che mTOR è un suo target [79]. Desjobert C et al e Matsuyama H et al., hanno recentemente riportato dati di miRNA profiling che evidenziano il potenziale ruolo patogenetico dei miR-29a e miR-135b negli ALCL/ALK+ (80, 81). E’ stato dimostrato che ALCL/ALK+ mostano bassi livelli di espressione del miR-29a e che questa down-regolazione richiede l’espressione di NPM-ALK kinase. In particolare è stato

riportato che bassi livelli di espressione del miR-29a, probabilmente a causa di meccanismi di regolazione negativa mediata da processi di metilazione, sembrano svolgere un importante ruolo nella regolazione di MCL-1, portando a promuovere la via di proliferazione e sopravvivenza cellulare attraverso l'inibizione della via apoptotica. In particolare, l'espressione del miR-29a modula processi apoptotici attraverso l'inibizione dell'espressione di MCL-1 con conseguente riduzione della crescita tumorale in vivo [81]. E' stato dimostrato che l'espressione della proteina ALK nei linfomi ALCL/ALK+ porta alla down-regolazione del miR-16 e aumento dei livelli di espressione del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF); suggerendo per il miR-16 un ruolo importante nella regolazione a livello post-trascrizionale di VEGF, in condizioni di ipossia [82]. In questo ultimo anno, miRNAs profiling condotti nei Primary cutaneous ALCL (C-ALCL) ha identificato la presenza dei miR-155, miR-27b, miR-93, miR-29b and miR-92a differenzialmente espressi tra la Micosi Fungoide e i linfomi C-ALCL, suggerendo il possibile contributo di questi miRNA alla patogenesi di questi tipi di linfoma [83]. Infine bassi livelli di espressione del miR-96 sono stati correlati con l'aberrante espressione della proteina alk negli ALCL/ALK+ [84].

OBIETTIVI DELLO STUDIO

La diagnosi di PTCLs risulta spesso molto difficile a causa di una ampia varietà morfologica e immunofenotipica, per la presenza di significative sovrapposizioni tra entità distinte e per la mancanza (con poche eccezioni) di specifiche e ricorrenti alterazioni genetiche. La scoperta, che i miRNA possano avere un ruolo centrale nella tumorigenesi umana, risulta di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuovi marcatori diagnostici e bersagli terapeutici.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di identificare miRNAs deregolati nei linfomi a cellule T periferiche al fine di:

- individuare e caratterizzare un loro possibile ruolo biologico nella patogenesi e progressione dei PTCLs
- identificare miRNAs differenzialmente espressi in diversi sottotipi di PTCLs nodali e valutarne il possibile ruolo nella routine diagnostica.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Caratteristiche campioni

I campioni considerati in questo studio fanno parte di un'ampia casistica di materiale fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE). Abbiamo suddiviso i campioni in : training set su cui sono stati eseguiti il miRNA profiling e la Gene Expression Profiling e validation set costituito da campioni indipendenti su cui è stata eseguita l'analisi di validazione.

TRAINING SET:

25 campioni di PTCL/NOS

10 campioni di AITL

12 campioni di ALCL (6 ALK+ e 6 ALK-)

VALIDATION SET per miRNA profiling:

10 campioni di PTCL/NOS

10 campioni di AITL

10 campioni ALCL_ALK+

10 campioni ALCL_ALK-

Per verificare la robustezza della signature genica di campioni FFPE abbiamo utilizzato un metodo di validazione in silico su 132 casi fresh/frozen (GEO data sets: GSE6338 and GSE19069) per (Piccaluga 2007; Iqbal 2010)

78 PTCL/NOS;

43 AITL;

11 ALCL ALK-

Come controllo (controparte normale) sono stati utilizzati 13 campioni di cellule T provenienti da donatori sani. Abbiamo isolato cellule CD4+ naive e CD4+ attivate (PHA, IL-2) e CD8+ naive e CD8+ attivate (PHA, IL-2).

2.2 Isolamento cellule T normali e colture cellulari

I campioni di sangue intero, dai quali sono state estrette le cellule T utilizzate come controllo, provengono da prelievi venosi di donatori sani.

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state separate per gradiente di Ficoll (Ficoll-Hystopaque, Pharmacia, Uppsala, Svezia).

Le cellule T CD4 + e CD8 + naive sono state isolate da PBMC utilizzando rispettivamente i kit human naïve CD4+ T cell isolation kit II, (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germania) e human naïve CD8+ T cell isolation kit, (Miltenyi), seguendo le istruzioni dei protocolli. L'efficacia dell'isolamento di queste cellule è stato poi analizzato mediante citometria a flusso (FACScalibur, Becton-Dickinson, San Diego, CA), e la purezza delle cellule è risultata maggiore del 94% rispettivamente per le CD4 +/CD45RA + o CD8 +/CD45RA +.

Le cellule, una volta isolate, vengono messe in coltura in un terreno RPMI 1640 (Lonza, Basilea, Svizzera) con il 10% di siero fetale bovino (FBS, GIBCO, Paisley, UK) e attivate con fitoemagglutinina PHA (5 ug / ml, Sigma, St. Louis, MO) più IL-2 (10 U / ml; Miltenyi) per 4 giorni.

2.3 Estrazione e quantificazione di RNA

L'RNA totale dei campioni FFPE di PTCLs è stato estratto a partire da 5 fettine di 10 µm di spessore. Abbiamo utilizzato il kit Recoverall (Total Nucleic Acid Isolation Kit, Ambion), specifico per estrarre acidi nucleici da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina.

Brevemente, i campioni paraffinati vengono dapprima incubati in Histoclear per solubilizzare e rimuovere la paraffina dal tessuto e successivamente lavati in soluzioni 100% di alcool; i campioni deparaffinati sono poi soggetti ad un passaggio di proteasi per digerire le proteine covalentemente legate all'RNA. L'RNA viene purificato tramite cattura su colonnina (filtro di fibra di vetro), e trattato con DNase per rimuovere l'eccesso di DNA genomico presente nel campione. Infine l'RNA totale viene eluito in 60 ul di elution buffer.

L'estrazione dell' RNA dalle cellule T normali è stata effettuata mediante TRIZOL (Invitrogen, Milan, Italy).

La concentrazione di RNA è stata valutata mediante l'utilizzo dello spettrofotometro Nanodrop ND-1000 della (Nanodrop Technology) attraverso la lettura dell'assorbanza a 260nm, utilizzando 1ul di RNA. La qualità dell'RNA è stata valutata attraverso la lettura dei rapporti di assorbanza a 260/280 e 260/230 al fine di saggiare la purezza dell' RNA e l'assenza di solventi che avrebbero potuto alterare i successivi step di studio.

2.4. Retrotrascrizione e Preamplificazione per microRNA Profiling

La retrotrascrizione a partire dall'RNA totale per l'analisi del profilo di espressione dei miRNA è stata effettuata mediante l'uso del TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit e di Megaplex Primers (Applied Biosystems Applied Biosystems, Italy).

La reazione di retrotrascrizione ha un volume finale di 7,5 µL, composta da 3 µL di RNA totale (con una concentrazione compresa tra 1 e 350 ng) e 4,5 µL di mix di reazione (0,80 µL di Primers 10X; 0,20 µL di dNTPs con dTTP 100 mM; 1,5 µL di Trascrittasi Inversa 50 U/µL; 0,80 µL di Tampone RT 10X; 0,90 µL di MgCl₂ 25 mM; 0,10 µL di Inibitore dell'RNasi 20 U/µL; 0,20 µL di acqua Nucleasi-free). Le condizioni di retrotrascrizione sono riportate nella tabella 1 (Appendice) . Il cDNA così ottenuto può essere mantenuto ad una temperatura di -20 °C per massimo una settimana. Successivamente i prodotti di retrotrascrizione sono stati preamplificati allo scopo di incrementare la quantità di cDNA usato per l'analisi di espressione dei miRNA. Nella reazione di preamplificazione i prodotti di PCR sono uniformemente amplificati a partire da templati di cDNA usando la Master Mix TaqMan PreAmp e i Primers Megaplex PreAmp . La reazione di pre amplificazione ha un volume finale di 25 µL, contenente 2,5 µL di prodotto di retrotrascrizione e 22,5 µL di mix di reazione (12,5 µL di TaqMan PreAmp Master Mix 2X; 2,5 µL Megaplex PreAmp Primers 10X; 7,5 µL di acqua Nuclease-free). Le condizioni per reazione di preamplificazione sono riportate nella tabella 2 (Appendice) Il prodotto di preamplificazione così ottenuto viene diluito con 75 µL di soluzione TBE 0.1X a pH 8.0 e caricato sulla card per l'analisi quantitativa

2.5 TaqMan Array MicroRNA Cards A

Il profilo di espressione dei microRNA è stato analizzato mediante TaqMan MicroRNA Array Card A v2.0 (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Italy) (Figura 1, Appendice). TaqMan Array MicroRNA Card A è un array con 384 pozzetti, contenenti al loro interno primers e probes liofilizzati. L'array permette di quantificare i livelli di espressione di 377 miRNA, 4 controlli endogeni mammU6; e di 2 ulteriori controlli endogeni, RNU 44 e RNU 48, utilizzati come controllo interno della procedura della card, e infine di un campione non correlato alla specie mammifera (ath-miR159-a) che funge da controllo negativo della card. I 4 replicati del controllo endogeno

mammU6, contenuti all'interno della card, vengono utilizzati per normalizzare i valori di Ct dei miRNA target. Ogni card è costituita da 8 porte, all'interno delle quali vanno caricati 100 uL di campione (50 uL di Master Mix, No Amperase UNG, 49 uL di acqua Nuclease-free, 1 uL di preamplificato diluito). La card viene centrifugata in appositi adattatori a 1200 rpm per 1 minuto, per 2 volte. Al termine della centrifugazione, la card viene caricata su uno specifico strumento chiamato "sealer" che permette di sigillare i singoli pozzetti. A questo punto la card viene caricata sullo strumento 7900 HT Fast Real Time System (Applied Biosystem) per l'analisi quantitativa.

2.6 Whole-Genome DASL HT Assay

Il materiale istologico fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE) può essere usato per fornire importanti informazioni circa i profili di espressione genica associati al complesso sviluppo della malattia. Precedentemente la parziale degradazione e la scarsa concentrazione dell'RNA limitavano le informazioni ricavabili dai campioni paraffinati, soprattutto per le alterazioni indotte dalla formalina sull'RNA stesso e quindi era possibile eseguire saggi di Gene Expression a partire da materiale fresco o congelato. Oggi, grazie alla tecnologia "Whole-Genome DASL HT Assay" dell'Illumina è possibile studiare i profili di espressione genica a partire da piccole concentrazioni di RNA (50-100ng) parzialmente o totalmente degradato. L'RNA totale viene convertito in cDNA usando oligo dT biotinilati e primers nonameric random. Il cDNA biotinilato va ad appaiarsi a gruppi di sonde DAP (DASL Assay Pool). I DAP contengono oligonucleotidi specificamente progettati per "interrogare" ogni sequenza target nei trascritti. Queste sonde permettono il riconoscimento di frammenti di circa 50bp e sono ancorate a microsfere mobili capaci di catturare RNA fortemente degradato.

Il set di sonde consiste di un oligo upstream contenente una sequenza gene specifica e dei primers universali (P1) all'estremità 5', e un oligo downstream contenente una sequenza gene specifica e dei primers universali (P2) all'estremità 3'. L'oligo upstream ibridizza al sito del cDNA target e quindi si estende e lega il suo oligo downstream corrispondente per creare un template di PCR che può essere amplificato con i primers universali (P1 e P2) (Figura?). I prodotti di PCR ottenuti sono ibridizzati sull'array "HumanHT-8 v4 Expression BeadChip" per determinare il completo profilo di espressione genica.

2.7 Retrotrascrizione e Real Time su campioni del validation set

I miRNA risultati differenzialmente espressi nei tre sottotipi di PCTL sono stati validati su 40 campioni di PTCLs (validation set) attraverso la tecnica TaqMan qRT-PCR.

Per la reazione di retrotrascrizione dei singoli miRNA di interesse è stato utilizzato TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem).

Nella reazione di retrotrascrizione sono stati utilizzati 10ng totali di RNA totale in un volume finale di 15 μ L, composto da : 5 μ L di RNA totale, 3 μ L di Primers e 7 μ L di mix di reazione (0,15 μ L di dNTPs, 1 μ L di Trascrittasi Inversa 50 U/ μ L, 1,5 μ L di Reverse Transcription Buffer, 0,19 μ L di Inibitore dell'RNasi 20 U/ μ L e 7,16 μ L di acqua Nucleasi-free) .

I Primers utilizzati per questa reazione sono esclusivamente Primers-miRNA specifici che devono avere specifiche caratteristiche quali:

- alta specificità: si legano solo a miRNA maturi e non ai loro precursori;
- alta sensibilità: necessitano solo di 1-10ng di RNA totale.

Come controllo endogeno è stato utilizzato RNU6B (un microRNA di localizzazione nucleare). Le condizioni di retrotrascrizione sono riportate nella tabella 3 (Appendice)

La Real-time PCR è stata preformata usando Taqman probes specifiche per i miRNA in esame (tabella Sequenze dei miRNAs maturi identificati) (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Italy). Sono stati utilizzati 2 μ L del retrotrascritto in un volume finale di 20 μ L. Le condizioni di real time sono riassunte nella tabella 4 (Appendice).

2.8 Trasfezione cellulare

Gli esperimenti di trasfezione , effettuati al fine di vagliare l'attività del miRNA -132 risultato differenzialmente espresso dall'analisi del miRNA profiling nei PTCLs rispetto alle cellule T normali, sono stati condotti in vitro su una linea cellulare umana di PTCL/NOS, le Fe-Pd. Questa linea cellulare è stata mantenuta alla temperatura di 37°C con 5% di CO₂, in terreno di coltura RPMI addizionato con 10% FBS, 1% L-glutamine, penicillin/streptomycin.

Il mimic-132 (corrispettivo sintetico del miRNA-132) è stato trasfettato in maniera transiente mediante nucleoporazione grazie all'utilizzo dell'apparecchiatura Amaxa, programma X-01 e soluzione di trasfezione V (Amaxa, Cologne, Germany). L'efficienza della metodica, valutata mediante FACS analysis for a GFP reporter, è del 45%. Le cellule sono state trasfettate con 100nM del miRNA sintetico, mimic-132 (Dharmacon, Celbio, Italy).

L' RNA è stato estratto dopo 48 ore dalla nucleoporazione e l'efficienza della trasfezione è stata valutata mediante specifica Real-Time RT-PCR per il miRNA in esame. Le trasfezioni cellulari sono state eseguite in triplicato (replicato tecnico e biologico).

2.9 Gene Expression Gene Chip 2.0 Whole Transcript

Come validazione funzionale del miRNA-132 ,trasfettato nella linea cellulare Fe-Pd, abbiamo utilizzato Gene Expression Gene Chip 2.0 Whole Transcript Assay (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

In particolare, Affymetrix next-generation GeneChip Human Transcriptome Array 2.0 contiene circa 6 milioni di probe di cui il 70% sono state disegnate per andare a coprire trascritti codificanti e il 30 % di probe vanno a coprire trascritti non codificanti (long non coding RNA e microRNA). Le probe oligonucleotidiche complementari sono sintetizzate in situ sul chip per ciascun sequenza corrispondente. Al fine di garantire una copertura uniforme del trascrittoma, GeneChip Array 2.0 è stato progettato con circa dieci sonde per esone e quattro sonde per le giunzioni di splicing esone-esone Questa copertura permette di ottenere dati completi, accurati e riproducibili con ogni esperimento.

L'RNA totale (100ng) viene retrotrascritto a partire da primers contenenti una sequenza promotrice T7. La reazione sintetizza singoli filamenti di cDNA contenenti la sequenza promotrice T7. A questa mix vengono aggiunti Poly-A spike controls diluiti come controllo interno del chip.

Al termine di questa reazione il cDNA a singolo filamento, agendo come template per la trascrizione, viene convertito in cDNA a doppio filamento. La reazione utilizza una DNA polimerasi e l'enzima RNasi H per, simultaneamente degradare l'RNA e sintetizzare il secondo filamento di cDNA. Il secondo filamento di cDNA neo sintetizzato funge da template per la sintesi del cRNA ad opera della T7 RNA polymerase. Il cRNA viene purificato su biglie magnetiche e retrotrascritto in un filamento senso di cDNA usando primers random; il cRNA viene degradato dall'azione dell' RNase H. Dopo purificazione si procede con frammentazione e labeling. Infine i campioni vengono caricati su Gene Chip 2.0 array per l'ibridizzazione e dopo opportuni lavaggi viene effettuata la lettura allo scanner (GeneChip 3000 scanner con 7G Upgrade Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).Gli esperimenti di GEP sono stati condotti in triplicato.

2.10 Analisi Statistiche

L'analisi di espressione genica è stata effettuata utilizzando come supporto informatico GeneSpring 7.3.1; il dendrogramma è stato generato utilizzando uno "hierarchical clustering algorithm" considerando la correlazione di Pearson come misura di distanza tra due campioni e l' "average-linkage method" come metodo di raggruppamento dei diversi casi. Per generare lo "hierarchical clustering" sono stati scelti solo geni che mostravano una variazione del livello di espressione maggiore o pari a 2 volte la media di espressione genica. Per eseguire la "supervised gene expression analysis" è stata usata la "Gene@Work software platform". Nella matrice ogni colonna rappresenta un campione e ogni riga rappresenta un gene. La barra di scala di colori indica le relative variazioni di espressione genica normalizzate per la deviazione standard (0 è il livello di espressione medio di un dato gene). I geni differenzialmente espressi sono stati selezionati attraverso un test t di Student e filtrati in modo da considerare solo i geni con fold change maggiore di 2 e un p-value associato al test minore di 0,05.

Per l'analisi del miRNA Profiling, i valori di espressione ottenuti sono stati normalizzati usando il metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$. Il valore di espressione di ciascun miRNA è stato successivamente normalizzato in modo da aver un valore medio di espressione uguale a zero e deviazione standard unitaria. Dopo la normalizzazione dei dati per identificare i miRNA differenzialmente espressi tra PTCLs e cellule T normali è stato utilizzato un metodo bioinformatico a 4 step, mentre nel confronto di espressione dei miRNA nelle tre entità di PTCL (PTCL/NOS, ALCL, AITL) abbiamo utilizzato un metodo a 2 step (Figure 4-5)

Il modello statistico di analisi discriminante lineare è stato utilizzato per ridurre le signature dei miRNA differenzialmente espressi tra vari sottotipi di PTCLs e cellule T normali e tra i tre sottotipi di PTCLs in modo da selezionare solo quei miRNA che meglio discriminano i vari gruppi. E' stata creata una funzione discriminante come combinazione lineare dei valori di espressione dei miRNA differenzialmente espressi e significativi.

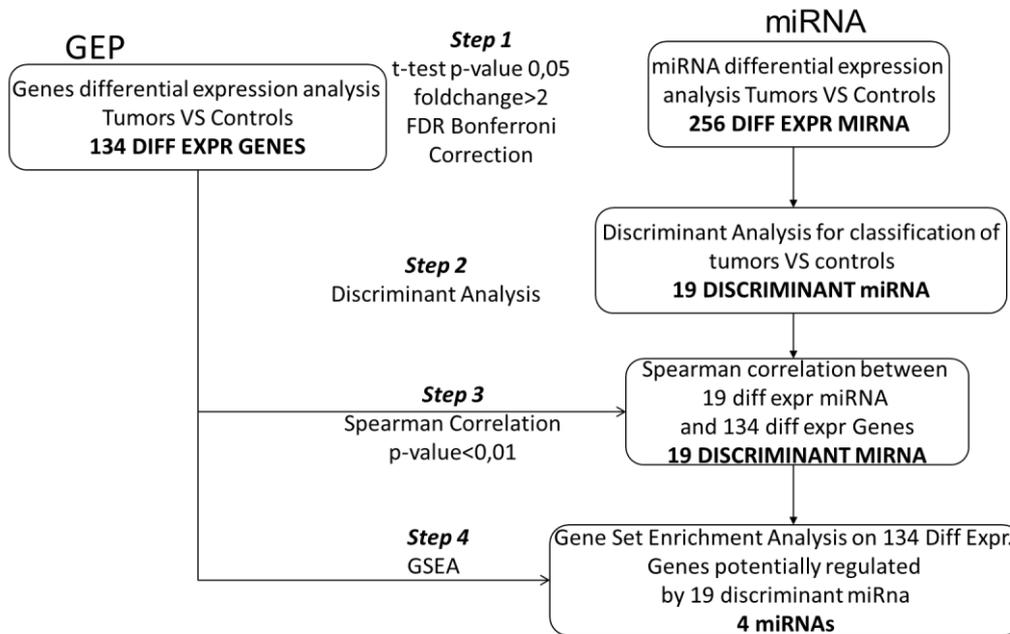


Figura 4: Metodo bioinformatico a 4 step per individuare miRNA differenzialmente espressi tra PTCLS vs cellule T normali.

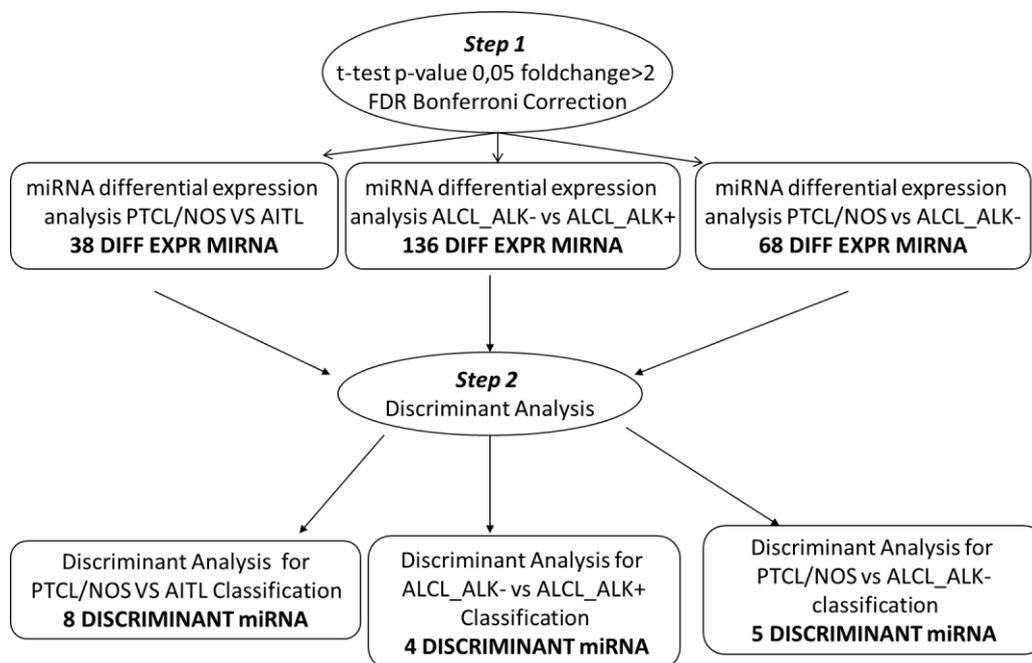


Figura 5: Metodo a due step per identificare i miRNA differenzialmente espressi tra PTCL/NOS vs AITL; ALCL/ALK+ vs ALCL/ALK-; PTCL/NOS vs ALCL/ALK.

3. RISULTATI

3.1 L'analisi non supervisionata permette di discriminare campioni PTCLs da cellule T normali in base al profilo di espressione dei miRNA ma non discrimina chiaramente le tre entità di PTCLs.

L'analisi delle componenti principali (Principal Component Analysis, PCA) ha permesso di distinguere, in base al profilo di espressione dei miRNA i campioni di PTCLs dalle cellule T normali attivate CD4+ e CD8+ in modo chiaro e ben definito (Figura 4). Tale risultato è stato confermato mediante un'analisi di clustering gerarchico non supervisionato (Figura 5). Questo tipo di analisi, permette di raggruppare in base alla similarità dei rispettivi profili di espressione dei miRNA. In particolare, è stato possibile definire in maniera distinta due gruppi, quello dei campioni tumorali e quello delle cellule T normali; inoltre, i valori di espressione dei miRNA risultano omogenei all'interno dei rispettivi gruppi di appartenenza. Diversamente, non è possibile avere una netta distinzione dei tre diversi sottotipi (PTCL/NOS, ALCL e AITL) in quanto, appartenendo ad una classe più ampia di PTCLs, presentano delle caratteristiche molecolari molto simili.

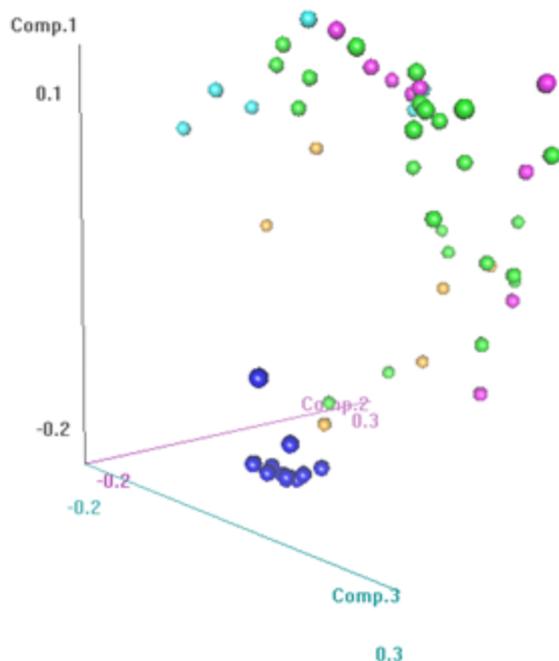


Figura 4: Analisi PCA non supervisionata mostra la distribuzione dei gruppi di PTCLs (PTCL/NOS verde; AITL viola; ALCL/ALK+ azzurro e ALCL/ALK- giallo) e cellule T normali (in blu).

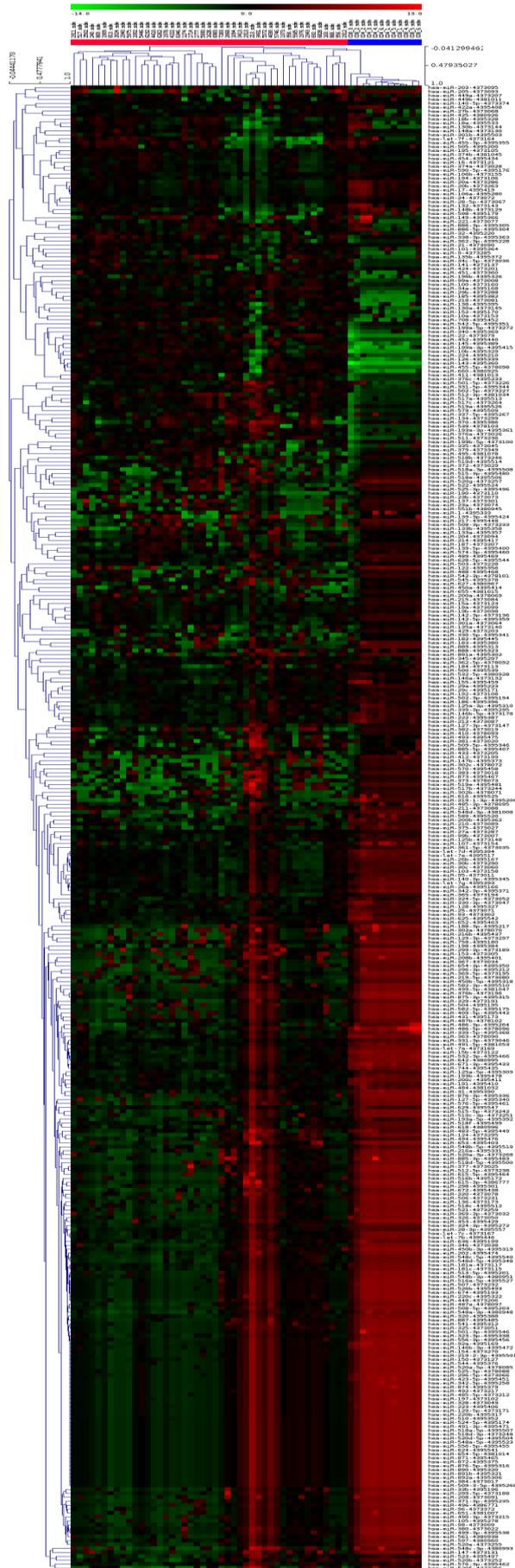


Figura 5: Lo “hierarchical clustering non supervisionato” mostra due gruppi nettamente distinti di PTCLs e cellule T normali in base al profilo di globale espressione dei miRNA.

3.2 L'analisi Supervisionata permette di distinguere i tre sottotipi di linfoma in base all'espressione globale dei miRNA

Al fine di identificare differenze nel profilo di espressione dei miRNA tra campioni tumorali e cellule T normali e tra i tre sottotipi di linfoma (PTCL/NOS, AITL, ALCL/ALK+ e ALCL/ALK-), è stata quindi utilizzata un'analisi supervisionata

Applicando un test t di Student con parametri stringenti ($pvalue < 0.01$ e $fold\ change > 2$, FDR Bonferroni Correction) è stato possibile identificare una lista di 256 miRNA differenzialmente espressi tra campioni tumorali e cellule T normali. In base all'espressione dei 256 miRNA è possibile osservare come i campioni tumorali e i controlli clusterizzino in due gruppi ben distinti e omogenei tra loro, a dimostrazione di come tale signature sia molto robusta nel distinguere i campioni tumorali dai rispettivi controlli (Figura 6). Applicando un test t di Student con i medesimi parametri di filtraggio sopra riportati è stato inoltre possibile identificare un set di miRNA (signature) in grado di discriminare diverse coppie di sottotipi di PTCL (38 miRNA differenzialmente espressi tra PTCL/NOS vs AITL, 68 miRNA tra PTCL/NOS vs ALCL/ALK- e 136 miRNA tra ALCL/ALK- vs ALCL/ALK+). (Figure 2-3-4, Appendice).

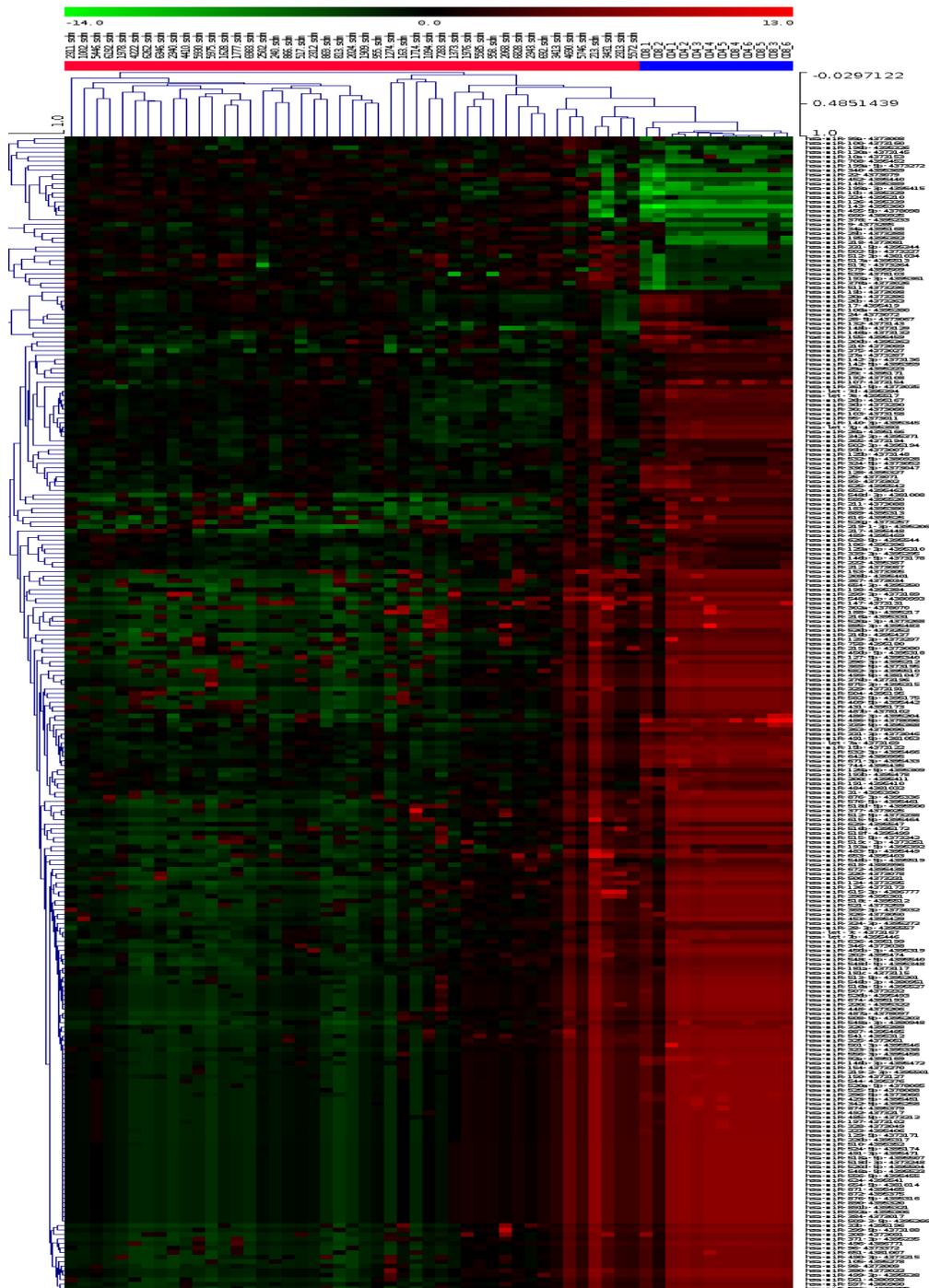


Figura 6: L'analisi supervisionata ha identificato 256 miRNA differenzialmente espressi nei PTCLs Vs. le cellule T normali.

3.3 Gene Expression profiling

L'analisi del profilo di espressione genica di 45 campioni di PTCL e 13 campioni di cellule normali CD4+ e CD8+ ci ha poi permesso di discriminare in maniera netta e distinta tumori e controlli già con le analisi non supervisionate. In particolare PCA e HC hanno mostrato come i campioni di PTCLs e le cellule T normali clusterizzano in due gruppi ben distinti . Tuttavia, analogamente a quanto visto per l'analisi del miRNA profiling non è stato possibile distinguere i tre sottotipi di PTCLs. Per identificare i geni differenzialmente espressi tra campioni tumorali e cellule T normali è stata eseguito un test t di Student sui campioni del training set con parametri di filtraggio ($pvalue < 0.01$ e $fold\ change > 2$, FDR Bonferroni Correction) che han permesso di rivelare la presenza di 134 geni differenzialmente espressi (Figura 7).

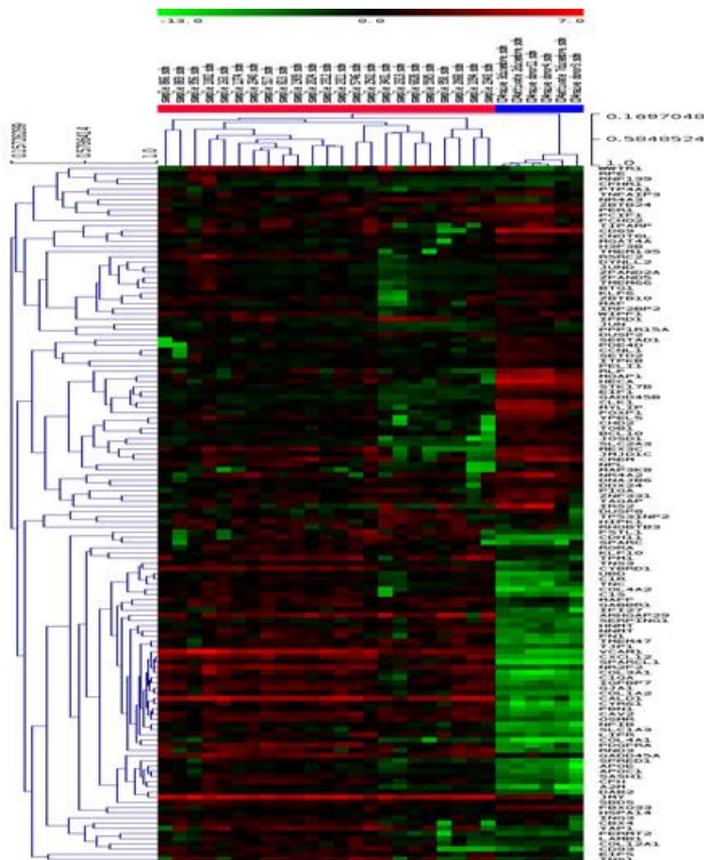


Figura 7 L'analisi supervisionata ha identificato 134 geni differenzialmente espressi nei PTCLs Vs. le cellule T normali.

3.4 Correlazione miRNA profiling con gene expression profiling

Al fine di identificare i miRNA maggiormente responsabili del profilo trascrizionale dei PTCLs e quindi, verosimilmente quelli maggiormente coinvolti nella loro patogenesi, abbiamo utilizzato un approccio bioinformatico a 4 step .

Inanzitutto un'analisi discriminante lineare ci ha permesso di individuare un set minimo di 19 miRNA (tabella 5, Appendice) in grado di classificare nel miglior modo i campioni tumorali verso le cellule T normali. Con il secondo step abbiamo verificato che a ciascuno dei 19 miRNA corrispondeva almeno un gene differenzialmente espresso nei PTCLs vs le cellule normali ed inversamente correlato con il miRNA stesso, selezionando poi tali geni quali potenziali target. Successivamente attraverso un Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) abbiamo identificato 4 miRNA (Tabella 6, Appendice) i cui target (predetti attraverso un sistema bioinformatico) sono risultati significativamente enriched tra i 134 geni della signature.

3.5 Gene Expression Profiling nelle cellule Fe-Pd trasfettate con hsa-miR-132

Per valutare effettivamente l'impatto della deregolazione dei miRNA sul profilo trascrizionale, abbiamo eseguito test funzionali.

Dei quattro miRNA differenzialmente espressi tra PTCLs e cellule T normali e filtrati attraverso l'applicazione di un'analisi multistep, è stato valutato, il ruolo del miR-132 che presentava un fold-change maggiore rispetto a quello degli altri tre miRNA. È stata quindi eseguita una trasfezione cellulare e successivo profilo di espressione genica al fine di valutare la possibile signature genica da poter validare nei primary tumors (PTCLs). L'efficienza di trasfezione valutata con GFP è risultata al facs analysis del 45% ed è stata valutata in real time, in base all'espressione del miRNA nelle cellule trasfettate rispetto alle cellule non trasfettate (controllo negativo) (Figura 5, Appendice). L'analisi del profilo di espressione genica fatta sulle cellule Fe-Pd trasfettate rispetto alle non trasfettate, ci ha permesso di delineare, attraverso un'analisi supervisionata, una netta e chiara distinzione tra cellule trasfettate e non trasfettate (Figura 8). In particolare, è stato possibile identificare una signature di 468 geni differenzialmente espressi a seguito della trasfezione. Abbiamo quindi ricercato nei profili di espressione genica dei primary tumors, se questi 468 geni risultassero over-rappresentati. L'analisi di GSEA ha confermato che i PTCLs risultano particolarmente enriched in questi geni $p\text{-value} < 0.05$ (Figure 9)(Figura 6, Appendice)

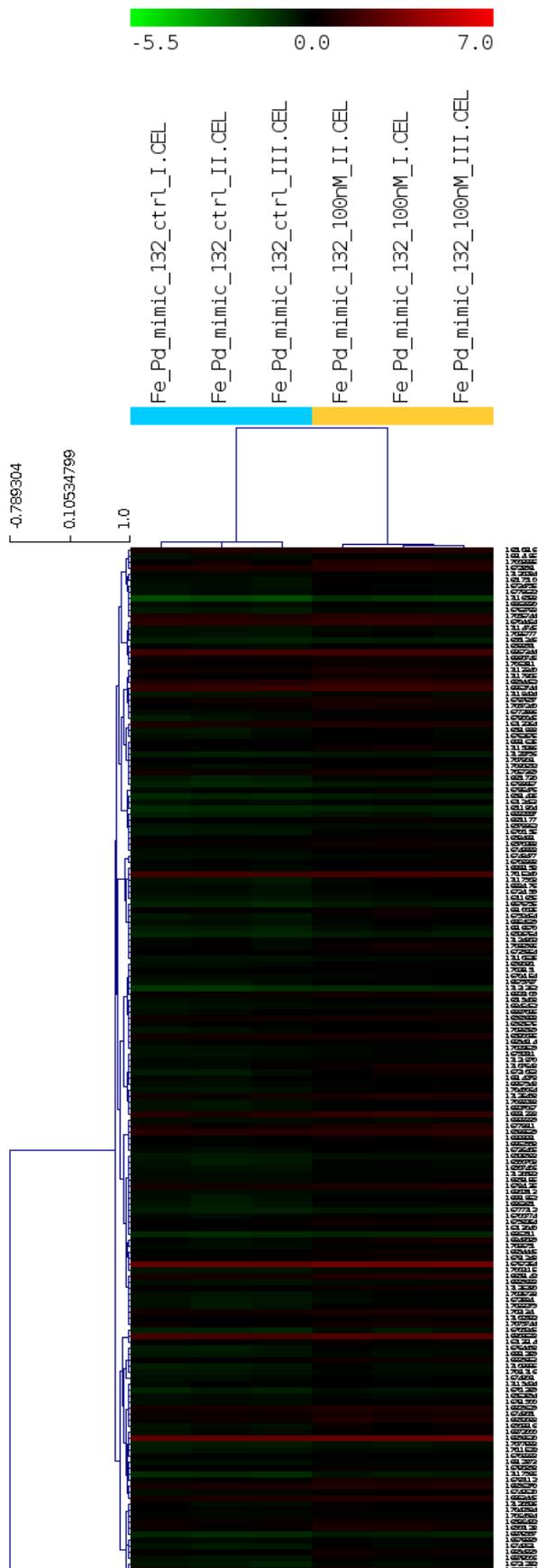


Figura 8: L'analisi supervisionato ha identificato 468 geni differenzialmente espressi nelle cellule trasfettate rispetto alle non trasfettate.

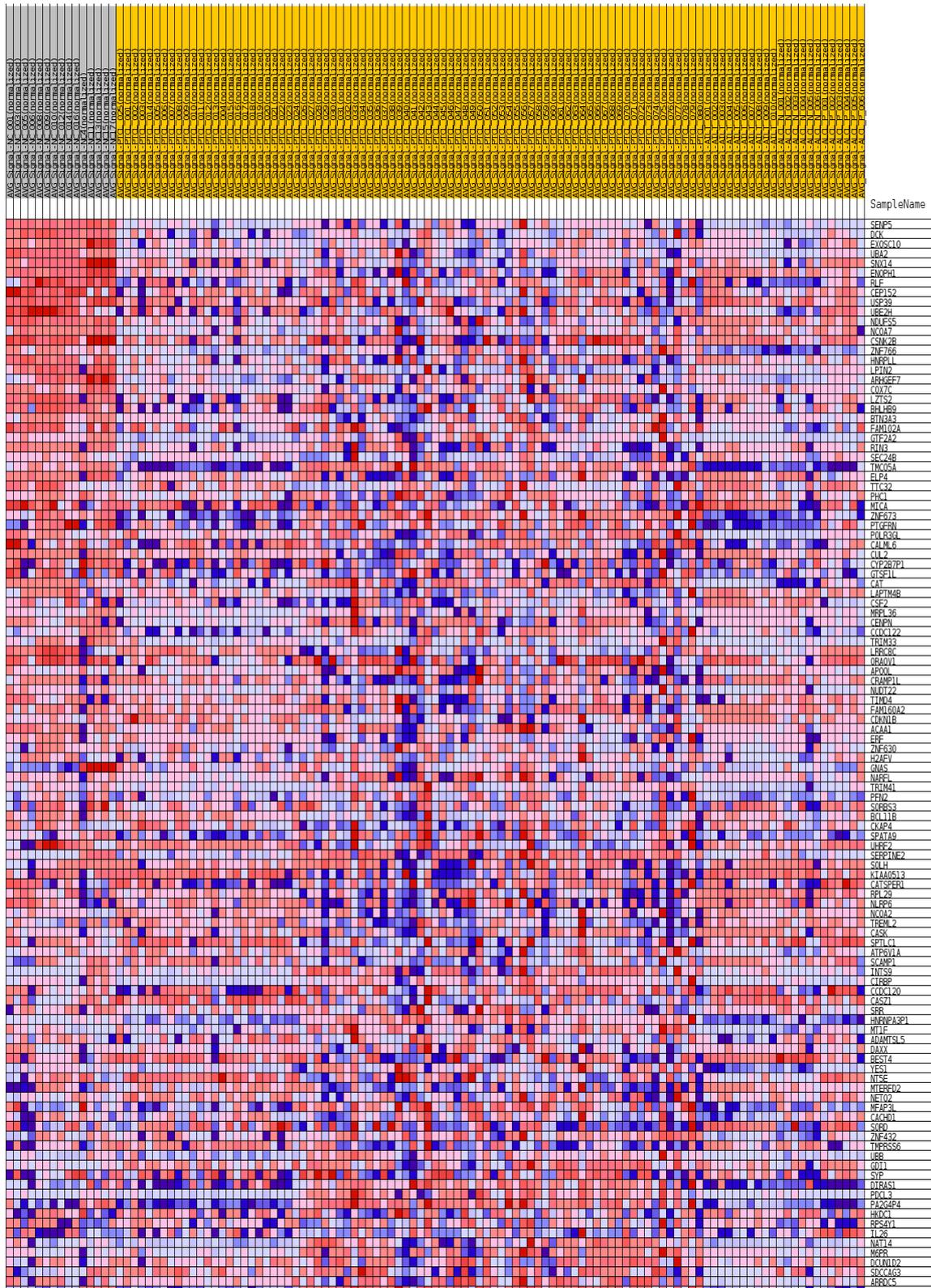


Figura 9: Il clustering del profilo di espressione genica dei 468 geni differenzialmente espressi tra cellule trasfettate e non trasfettate, mostra un enrichment significativo nei campioni di PTCL

3.6 Differenti e specifici set di miRNA discriminano i tre sottogruppi di PTCLs

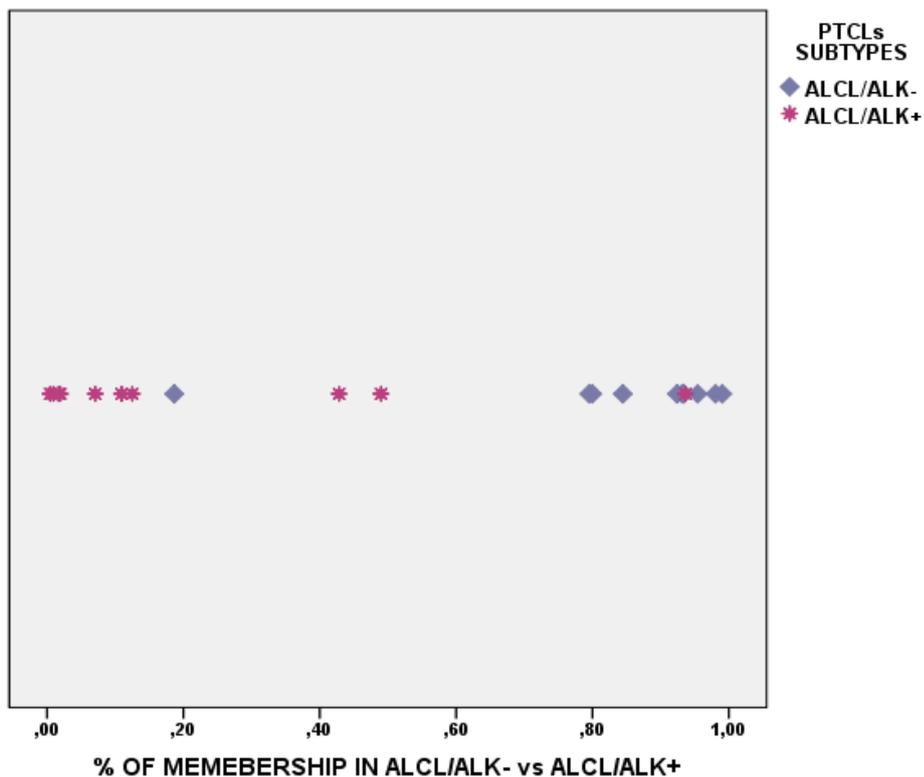
Nel confronto, tra le tre entità di PTCLs nodali abbiamo identificato miRNA differenzialmente espressi al fine di individuare nuovi possibili markers diagnostici.

Nello specifico, a partire dai set di miRNA differenzialmente espressi tra i diversi sottotipi di PTCL (NOS VS AITL, NOS VS ALC ALK-, ALCL ALK+ VS ALCL ALK-), è stata applicata un'analisi discriminante lineare in grado di ridurre le specifiche signature in modo da classificare correttamente i tre sottotipi di PTCL con un set minimo di miRNA. A tal riguardo sono stati identificati 8 miRNA differenzialmente espressi tra PTCL/NOS vs. AITL; 5 miRNA tra PTCL/NOS e ALCL/ALK- e 4 miRNA tra ALCL/ALK- e ALCL/ALK+ (Tabella 8). Per ogni set di miRNA identificati è stata quindi calcolata una funzione discriminante.

3.7 Validazione dei miRNA discriminanti

Al fine di validare l'efficienza della funzione discriminante, l'abbiamo quindi applicata a 40 casi indipendenti (validation set). In particolare, applicando la funzione discriminante è stato possibile classificare ogni campione tumorale nel rispettivo sottogruppo in base all'espressione del set di miRNA (Figure 10-11-12).

Di conseguenza nel confronto tra PTCL/NOS Vs. AITL è stato possibile classificare correttamente 10/10 campioni di AITL e 9/10 campioni di PTCL/NOS con un'accuratezza di classificazione del 95% (Fisher Exact Test P-value =0.0004); mentre nel confronto tra ALCL/ALK- Vs. ALCL/ALK+ 9/10 campioni di ALCL/ALK+ e 9/10 campioni di ALCL/ALK- vengono classificati correttamente con un'accuratezza di classificazione del 95% (Fisher Exact Test P-value =0.0001). Infine, nel classificare i PTCL/NOS vs. ALCL/ALK- vengono classificati correttamente 9/10 campioni di PTCL/NOS e 8/10 campioni di ALCL/ALK-, con un'accuratezza globale l'85% (Fisher Exact Test P value=0.0054). Tali risultati suggeriscono la possibilità di impiegare la quantificazione dei miRNA in ambito diagnostico.

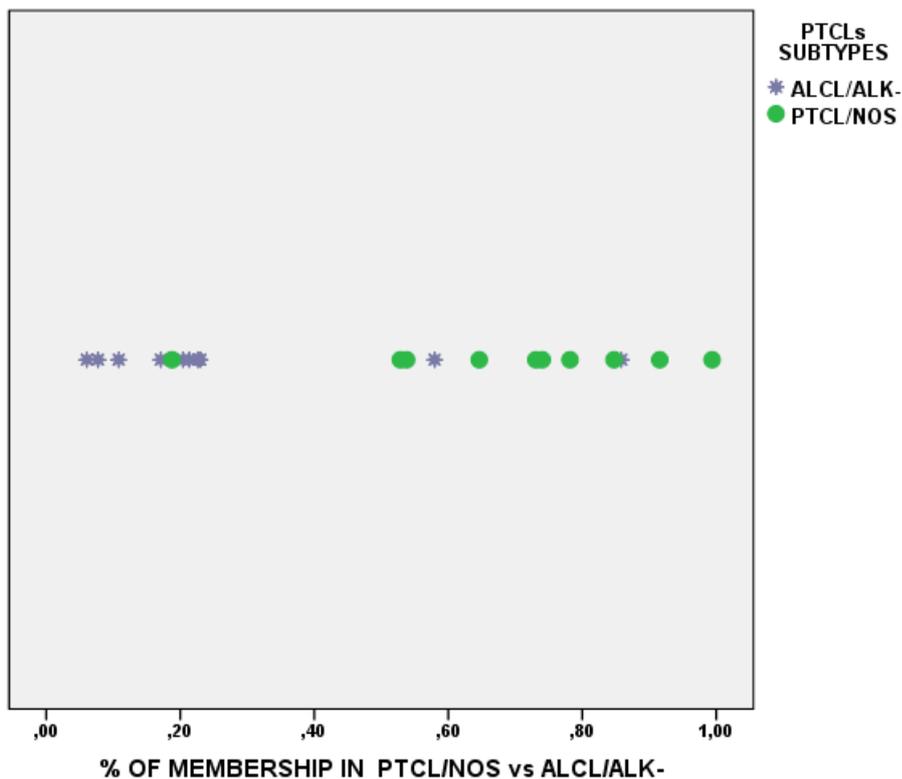


		Group	Predicted Group Membership		Total
			ALCL/ALK-	ALCL/ALK+	
Original	Count	ALCL/ALK-	9	1	10
		ALCL/ALK+	1	9	10
	%	ALCL/ALK-	90%	10%	100%
		ALCL/ALK+	10%	90%	100%

Fisher Exact Test P value=0.001

	Estimate	95% CI
Sensitivity	0.9	[0.596 to 0.982]
Specificity	0.9	[0.596 to 0.982]
PPV	0.9	[0.596 to 0.982]
NPV	0.9	[0.596 to 0.982]
LR+	9	[1.386 to 58.443]
LR-	0.111	[0.017 to 0.722]

Figura 10 Analisi discriminante per la classificazione: ALCL_ALK- Vs. ALCL_ALK+

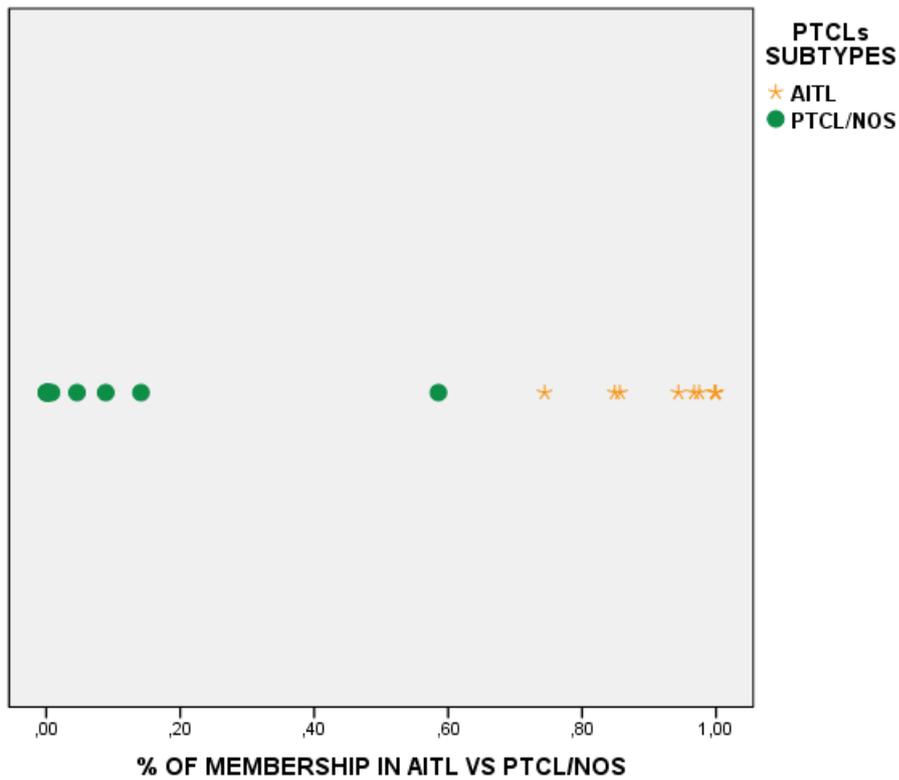


		Group	Predicted Group Membership		Total
			PTCL/NOS	ALCL/ALK-	
Original	Count	NOS	9	1	10
		ALK-	2	8	10
	%	NOS	90%	10%	100%
		ALK-	20%	80%	100%

Fisher Exact Test P value=0.0054

	Estimate	95% CI
Sensitivity	0.818	[0.523 to 0.949]
Specificity	0.889	[0.565 to 0.98]
PPV	0.9	[0.596 to 0.982]
NPV	0.8	[0.49 to 0.943]
LR+	7.364	[1.136 to 47.718]
LR-	0.205	[0.057 to 0.732]

Figura 11 Analisi discriminante per la classificazione: ALCL_ALK- Vs. PTCL/NOS



		Group	Predicted Group Membership		Total
			AITL	NOS	
Original	Count	AITL	10	0	10
	%	NOS	1	9	10
		AITL	100%	0%	100%
		NOS	10%	90%	100%

Fisher Exact Test P value=0.0001

	Estimate	95% CI
Sensitivity	0.846	[0.578 to 0.957]
Specificity	0.909	[0.623 to 0.984]
PPV	1.000	[0.646 to 1.000]
NPV	0.900	[0.552 to 0.953]
LR+	9.308	[1.416 to 61.186]
LR-	0.169	[0.047 to 0.614]

Figura 12 Analisi discriminante per la classificazione: AITL vs. PTCL/NOS

DISCUSSIONE

I linfomi a cellule T periferiche (PTCLs) sono, da punto di vista morfologico ed immunofenotipico, un gruppo eterogeneo di neoplasie, con prognosi estremamente negativa e per le quali, ad oggi, non esiste una terapia efficace [47]. La pato-biologia di questi tumori è ancora poco conosciuta. Studi high throughput di GEP hanno contribuito in maniera significativa alla conoscenza dei linfomi T per quanto riguarda soprattutto istogenesi, profilo molecolare, stratificazione prognostica e identificazione di nuovi possibili bersagli terapeutici . In particolare, risultati, ottenuti presso il nostro Istituto, indicano che i PTCLs sono un gruppo di neoplasie relativamente omogeneo con una signature genica ben distinta dai linfociti T normali. La comparazione del profilo di espressione genica dei PTCLs rispetto alla controparte cellulare normale, oltre a fornire importanti dettagli per una corretta classificazione di tali entità evidenzia una rilevante de-regolazione di geni che controllano funzioni tipicamente alterate nelle cellule neoplastiche quali proliferazione cellulare, apoptosi, rimodellamento della matrice extracellulare, adesione, regolazione della trascrizione [26]. In questo studio si descrive l'utilizzo di tecnologie high throughput miRNA profiling e gene expression profiling per cercare di identificare i meccanismi patogenetici alla base della formazione e progressione del tumore e per la diagnosi differenziale delle più comuni entità di PTCLs nodali, concentrandosi sulla distinzione delle tre entità di PTCLs, AITL, ALCL e PTCL / NOS, che può essere di notevole interesse clinico e che non sempre risulta essere chiara in base ai criteri di classificazione WHO. È interessante notare che, in questo studio abbiamo applicato una nuova tecnologia microarray (DASL whole genome) in grado di generare GEP da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), ottenendo un profilo di espressione genica coerente in tutti i casi esaminati[85]. Infatti, finora la GEP non è riuscita a diventare parte integrante della diagnostica emolinfopatologica, soprattutto a causa della necessità di materiale fresco o congelato, spesso non è disponibile nella routine di laboratorio. Inoltre, le signature molecolari identificate in questo studio sono state validate in una serie di casi per i quali in precedenza sono state generate signature geniche a partire da tessuti congelati con piattaforme diverse (Illumina vs. Affymetrix) , dimostrando che è possibile ottenere profili di espressione genica robusti a partire da campioni FFPE [86]. Questo rappresenta un elemento di notevole importanza per l'elevato numero di campioni FFPE presenti in archivio e quindi, poter effettuare studi su un maggior numero di casi.

Di recente, è stato dimostrato il ruolo cruciale dei microRNA nella regolazione di importanti

processi fisiologici, quali lo sviluppo, la proliferazione, il differenziamento, l'apoptosi e la risposta a differenti segnali extracellulari e di stress.

La scoperta dei microRNA, risale al 1993 [60] ma è solo negli ultimi anni che i miRNA sono entrati a far parte del complesso circuito della biologia cellulare, rivelando il loro ruolo chiave come modulatori dell'espressione genica.

Negli ultimi anni, lo sviluppo di microarray per l'analisi dell'espressione del profilo globale dei microRNA ha rivelato che molti miRNA sono aberrantemente espressi nei tumori umani, suggerendo che essi potrebbero rappresentare una nuova classe di oncogeni o geni oncosoppressori [87]. Numerosi studi riportano la deregolazione dell'espressione dei microRNA nelle neoplasie umane, sottolineando il loro contributo fondamentale nei processi di iniziazione e progressione tumorale. A tale riguardo, l'identificazione di miRNA tumore-specifici e dei loro bersagli molecolari rappresenta un passaggio chiave per caratterizzare il ruolo dei miRNA nella tumorigenesi umana e potrebbe essere importante per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici. Alcuni recenti lavori testimoniano come analisi di miRNomes permettevano una categorizzazione molecolare ottenuta da un'analisi di hierarchical cluster di vari subsets linfocitari che erano in accordo con la loro caratterizzazione fenotipica e suggeriva che certi miRNAs hanno un ruolo nel regolare il differenziamento di questi subsets cellulari.[88, 89]. In particolare, l'identificazione di miRNA target genes evidenziava che il miR-125b, uno dei miRNA altamente specifici per le cellule T naive CD4+, regolava direttamente un set di geni codificante per molecole importanti per il differenziamento in linfociti effector-memory. Inoltre, una prolungata espressione di miR-125b durante il differenziamento risultava in una minor acquisizione della funzione effettrice.[90]. Tuttavia, ad oggi, sono ancora pochi i lavori di miRNA profiling effettuati nel campo delle neoplasie di tipo linfoide, ed in particolare in quelle del comparto T. Recenti lavori, si basano sull'analisi di miRNA profiling soltanto nelle forme ALCL, mentre non ci sono evidenze di miRNA profiling nelle altre due entità di PTCLs nodali (AITL, PTCL/NOS).

In questo lavoro di tesi, abbiamo eseguito per la prima volta un'analisi completa del profilo di espressione dei microRNA in campioni di PTCLs attraverso la tecnica TaqMan Array MicroRNA Cards A. L'analisi supervised ci ha fornito una signature molecolare di 256 miRNA differenzialmente espressi tra PTCLs e cellule T normali CD4+ e CD8+ ben definita in grado di discriminare campioni tumorali rispetto alla loro controparte normale. In seguito all'applicazione della funzione di Analisi Discriminante Lineare sulla signature di 256 miRNA è

stato possibile filtrare ulteriormente i dati, andando a considerare i 19 miRNA statisticamente significativi ($p\text{-value} < 0.001$). L'intergrazione dei dati del miRNA profiling (19 miRNA differenzialmente espressi) con i dati di GEP (134 geni differenzialmente espressi) al fine di identificare i miRNA potenzialmente più coinvolti nella deregolazione del trascrittoma di questi linfomi, ci ha permesso di selezionare 4 miRNA significativamente e differenzialmente espressi, hsa-miR-511, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-196b up-regolati e hsa-miR-132 down-regolato. Abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul miR-132 in quanto presentava un fold-change maggiore rispetto agli altri 3 miRNA deregolati.

L'analisi di microarray riportava infatti una down-espressione del miR-132 in tutti i campioni di PTCLs considerati rispetto alle cellule T normali dato confermato in q-RT-PCR su 40 campioni del validation set di PTCLs, lasciando ipotizzare un possibile coinvolgimento di questo miRNA nella patogenesi dei PTCLs.

La comprensione dei meccanismi molecolari associati alla deregolazione dei miRNA nei PTCLs rimane un compito difficile da investigare; lo scenario è enormemente complicato dalla capacità dei miRNA di bersagliare multipli pathway molecolari, a volte correlati tra loro ed a volte con funzioni opposte, ed allo stesso tempo la capacità dei 134 geni deregolati nei PTCLs di essere regolati da molteplici miRNA in modo diretto o indiretto. Questo dà origine ad un complesso network di regolazione nel quale gli effetti biologici e le proprietà di un singolo miRNA non consentono sempre una spiegazione lineare. Infatti, sebbene programmi bioinformatici possano aiutare nella predizione di ipotetici geni bersaglio, procedure sperimentali in vitro sono necessarie per la validazione dei target molecolari. In base a quanto detto, in questo studio per cercare di capire quali fossero i geni target del miR-132 abbiamo effettuato un saggio di trasfezione cellulare con un mirna sintetico in una linea cellulare stabile Fe-Pd di PTCL/NOS e siamo andati a valutare con un saggio di gene expression profiling se fosse possibile identificare una signature genica che potesse discriminare cellule non trasfettate (controllo negativo) rispetto alle cellule trasfettate. Individuata tale signature genica siamo andati a verificarne la presenza nella signature dei 134 geni differenzialmente espressi tra i casi di primary tumor (PTCLs) e cellule T normali, confermando che i miRNA hanno effettivamente un ruolo nella deregolazione genica in questo contesto.

Secondo obiettivo di questo studio è stato quello di andare ad indagare quali fossero i miRNA differenzialmente espressi nelle tre più comuni entità di PTCLs. Dall'analisi del miRNA Profiling sul training set, applicando l'analisi discriminante lineare, sono stati individuati tre specifici set

di miRNA differenzialmente e significativamente espressi nei PTCL/NOS vs AITL (8 miRNA); PTCL/NOS vs ALCL/ALK- (5 miRNA) e ALCL/ALK- vs ALCL/ALK+ (4 miRNA). Tale risultato è stato validato in un validation set di 40 campioni indipendenti in qRT-PCR confermando i diversi profili di espressione dei miRNA che caratterizzano ciascun sottogruppo di linfoma. Per testare la funzione discriminante associata alla signature ridotta dei miRNA, ogni caso proveniente dai differenti gruppi di PTCLs è stato riclassificato in modo da ottenere un punteggio discriminante associato ad una probabilità di appartenenza ad ogni specifico gruppo. In particolare quanto più alto è il punteggio discriminante, tanto più è probabile che il tipo cellulare studiato sia correlato ad un determinato subset cellulare. Secondo questa evidenza, abbiamo provato a sviluppare un tool bioinformatico in cui, in base alla diversa espressione di un determinato set di miRNA, un campione può essere classificato come AITL o PTCL/NOS o ALCL.

In conclusione, nel nostro studio è stata individuata una signature genica in grado di differenziare in modo efficiente i PTCLs nodali, a partire da tessuti FFPE, che possono diventare utili strumenti per il lavoro di diagnosi di queste neoplasie.

Questo lavoro rappresenta il primo studio del profilo di espressione globale dei miRNA nei PTCLs e ci ha permesso di identificare specifiche signature molecolari di espressione dei miRNA al fine di distinguere campioni tumorali da cellule T normali e di classificare le tre entità di PTCLs in modo corretto in base all'espressione di un set minimo di miRNA.

APPENDICE

STAGE	TEMP	TIME
CYCLE (40 CYCLES)	16° C	2 min
	42° C	1 min
	50° C	1 sec
HOLD	85° C	5 min
HOLD	4° C	∞

Tabella 1: Condizioni per la reazione di retrotrascrizione

STAGE	TEMP	TIME
HOLD	95° C	10 min
HOLD	55° C	2 min
HOLD	72° C	2 min
CYCLE (12 CYCLES)	95° C	15 sec
	60° C	4 min
HOLD	99,9° C	10 min
HOLD	4° C	∞

Tabella 2: Condizioni per la reazione di Preamplificazione

TaqMan[®] Array Human MicroRNA Card A v2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	hsa-let-7a	hsa-let-7c	hsa-let-7d	hsa-let-7e	hsa-let-7f	hsa-let-7g	hsa-let-7i	hsa-miR-9	hsa-miR-10a	hsa-miR-10b	hsa-miR-10c	hsa-miR-10d	hsa-miR-10e	hsa-miR-10f	hsa-miR-10g	hsa-miR-10h	hsa-miR-10i	hsa-miR-10j	hsa-miR-10k	hsa-miR-10l	hsa-miR-10m	hsa-miR-10n	hsa-miR-10o	hsa-miR-10p
B	hsa-miR-22a	hsa-miR-23b	hsa-miR-24	hsa-miR-25	hsa-miR-26a	hsa-miR-26b	hsa-miR-27a	hsa-miR-27b	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-28-5p	hsa-miR-28-5p	hsa-miR-29a	hsa-miR-29b	hsa-miR-29c	hsa-miR-30a	hsa-miR-30b	hsa-miR-30c	hsa-miR-30d	hsa-miR-30e	hsa-miR-30f	hsa-miR-30g	hsa-miR-30h	hsa-miR-30i	hsa-miR-30j
C	hsa-miR-95	hsa-miR-130a	hsa-miR-132	hsa-miR-133a	hsa-miR-133b	hsa-miR-134	hsa-miR-135a	hsa-miR-135b	hsa-miR-136	hsa-miR-137	hsa-miR-138	hsa-miR-139-3p	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-141	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-143	hsa-miR-144	hsa-miR-145	hsa-miR-146a	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-147
D	hsa-miR-130a	hsa-miR-146b	hsa-miR-149	hsa-miR-150	hsa-miR-152	hsa-miR-153	hsa-miR-154	hsa-miR-155	hsa-miR-181c	hsa-miR-182	hsa-miR-183	hsa-miR-184	hsa-miR-185	hsa-miR-186	hsa-miR-187	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-188-5p	hsa-miR-190	hsa-miR-191	hsa-miR-192	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-194	hsa-miR-194
E	hsa-miR-148a	hsa-miR-190b	hsa-miR-197	hsa-miR-198	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-200a	hsa-miR-200b	hsa-miR-200c	hsa-miR-200d	hsa-miR-200e	hsa-miR-200f	hsa-miR-200g	hsa-miR-200h	hsa-miR-200i	hsa-miR-200j	hsa-miR-200k	hsa-miR-200l	hsa-miR-200m	hsa-miR-200n	hsa-miR-200o	hsa-miR-200p	hsa-miR-200q
F	hsa-miR-195	hsa-miR-223	hsa-miR-224	hsa-miR-286-3p	hsa-miR-286-5p	hsa-miR-299-3p	hsa-miR-299-5p	hsa-miR-301a	hsa-miR-301b	hsa-miR-302a	hsa-miR-302b	hsa-miR-302c	hsa-miR-302d	hsa-miR-302e	hsa-miR-302f	hsa-miR-302g	hsa-miR-302h	hsa-miR-302i	hsa-miR-302j	hsa-miR-302k	hsa-miR-302l	hsa-miR-302m	hsa-miR-302n	hsa-miR-302o
G	hsa-miR-222	hsa-miR-335	hsa-miR-336-3p	hsa-miR-336-5p	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-338-5p	hsa-miR-340	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-343	hsa-miR-345	hsa-miR-346	hsa-miR-347	hsa-miR-348	hsa-miR-349	hsa-miR-350	hsa-miR-351	hsa-miR-352	hsa-miR-353	hsa-miR-354	hsa-miR-355	hsa-miR-356	hsa-miR-357
H	hsa-miR-335	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-338-5p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-340	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-343	hsa-miR-345	hsa-miR-346	hsa-miR-347	hsa-miR-348	hsa-miR-349	hsa-miR-350	hsa-miR-351	hsa-miR-352	hsa-miR-353	hsa-miR-354	hsa-miR-355	hsa-miR-356	hsa-miR-357	hsa-miR-358	hsa-miR-359
I	hsa-miR-374b	hsa-miR-375	hsa-miR-376a	hsa-miR-376b	hsa-miR-377	hsa-miR-379	hsa-miR-380	hsa-miR-381	hsa-miR-382	hsa-miR-383	hsa-miR-384	hsa-miR-385	hsa-miR-386	hsa-miR-387	hsa-miR-388	hsa-miR-389	hsa-miR-390	hsa-miR-391	hsa-miR-392	hsa-miR-393	hsa-miR-394	hsa-miR-395	hsa-miR-396	hsa-miR-397
J	hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-451	hsa-miR-452	hsa-miR-453	hsa-miR-454	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-455-5p	hsa-miR-456-3p	hsa-miR-456-5p	hsa-miR-457	hsa-miR-458	hsa-miR-459	hsa-miR-460	hsa-miR-461	hsa-miR-462	hsa-miR-463	hsa-miR-464	hsa-miR-465	hsa-miR-466	hsa-miR-467	hsa-miR-468	hsa-miR-469	hsa-miR-470	hsa-miR-471
K	hsa-miR-499-3p	hsa-miR-499-5p	hsa-miR-500	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-501-5p	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-502-5p	hsa-miR-503	hsa-miR-504	hsa-miR-505	hsa-miR-506	hsa-miR-507	hsa-miR-508-3p	hsa-miR-508-5p	hsa-miR-509	hsa-miR-510	hsa-miR-511	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-512-5p	hsa-miR-513	hsa-miR-514	hsa-miR-515	hsa-miR-516	hsa-miR-517
L	hsa-miR-518a-3p	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-518b	hsa-miR-518c	hsa-miR-518d	hsa-miR-518e	hsa-miR-518f	hsa-miR-518g	hsa-miR-518h	hsa-miR-518i	hsa-miR-518j	hsa-miR-518k	hsa-miR-518l	hsa-miR-518m	hsa-miR-518n	hsa-miR-518o	hsa-miR-518p	hsa-miR-518q	hsa-miR-518r	hsa-miR-518s	hsa-miR-518t	hsa-miR-518u	hsa-miR-518v	hsa-miR-518w
M	hsa-miR-539	hsa-miR-541	hsa-miR-542-3p	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-544	hsa-miR-545	hsa-miR-546a-3p	hsa-miR-546a-5p	hsa-miR-546b-3p	hsa-miR-546b-5p	hsa-miR-546c-3p	hsa-miR-546c-5p	hsa-miR-546d-3p	hsa-miR-546d-5p	hsa-miR-546e-3p	hsa-miR-546e-5p	hsa-miR-546f-3p	hsa-miR-546f-5p	hsa-miR-546g-3p	hsa-miR-546g-5p	hsa-miR-546h-3p	hsa-miR-546h-5p	hsa-miR-546i-3p	hsa-miR-546i-5p
N	hsa-miR-582-5p	hsa-miR-589	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-597	hsa-miR-598	hsa-miR-615-3p	hsa-miR-615-5p	hsa-miR-616	hsa-miR-618	hsa-miR-624	hsa-miR-625	hsa-miR-626	hsa-miR-627	hsa-miR-628	hsa-miR-629	hsa-miR-630	hsa-miR-631	hsa-miR-632	hsa-miR-633	hsa-miR-634	hsa-miR-635	hsa-miR-636	hsa-miR-637	hsa-miR-638
O	hsa-miR-672	hsa-miR-674	hsa-miR-708	hsa-miR-744	hsa-miR-758	hsa-miR-871	hsa-miR-872	hsa-miR-873	hsa-miR-874	hsa-miR-875-3p	hsa-miR-875-5p	hsa-miR-876-3p	hsa-miR-876-5p	hsa-miR-877	hsa-miR-878	hsa-miR-879	hsa-miR-880	hsa-miR-881	hsa-miR-882	hsa-miR-883	hsa-miR-884	hsa-miR-885	hsa-miR-886	hsa-miR-887
P	hsa-miR-208	hsa-miR-211	hsa-miR-212	hsa-miR-219-1-3p	hsa-miR-219-2-3p	hsa-miR-220	hsa-miR-220b	hsa-miR-220c	hsa-miR-220d	hsa-miR-220e	hsa-miR-220f	hsa-miR-220g	hsa-miR-220h	hsa-miR-220i	hsa-miR-220j	hsa-miR-220k	hsa-miR-220l	hsa-miR-220m	hsa-miR-220n	hsa-miR-220o	hsa-miR-220p	hsa-miR-220q	hsa-miR-220r	hsa-miR-220s

Figura 1: Rappresentazione schematica della distribuzione delle probes all'interno della card per il miRNA Profiling

STAGE	TEMP	TIME
HOLD	16° C	30 min
HOLD	42° C	30 min
HOLD	85° C	5 min
HOLD	4° C	∞

Tabella 3: Condizioni per la reazione di retrotrascrizione per singolo miRNA

STEP	OPTIONAL AMPERASE UNG ACTIVITY*	ENZYME ACTIVATION	PCR	
	HOLD	HOLD	CYCLES (40 cycles)	
			denature	Anneal/extend
temperature	50° C	95° C	95° C	60° C
time	2 min	10 min	15 sec	60 se

*Non necessaria quando l'AmpErase UNG non è nella reazione

Tabella 4: Condizioni di tempo e temperatura nella real time

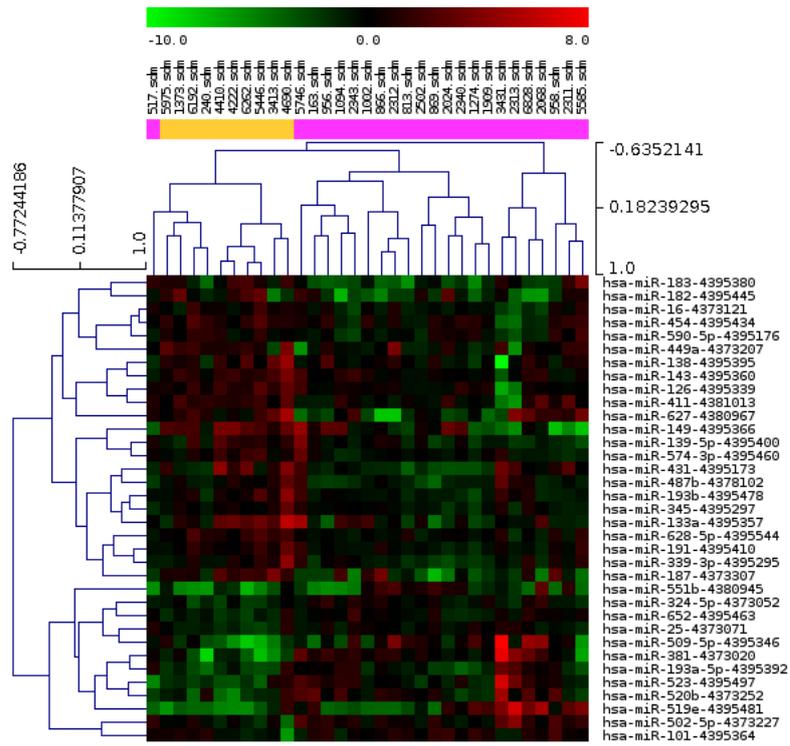


Figura 2: L'analisi supervisionata ha identificato 38 miRNA differenzialmente espressi nei PTCL/NOS vs AITL

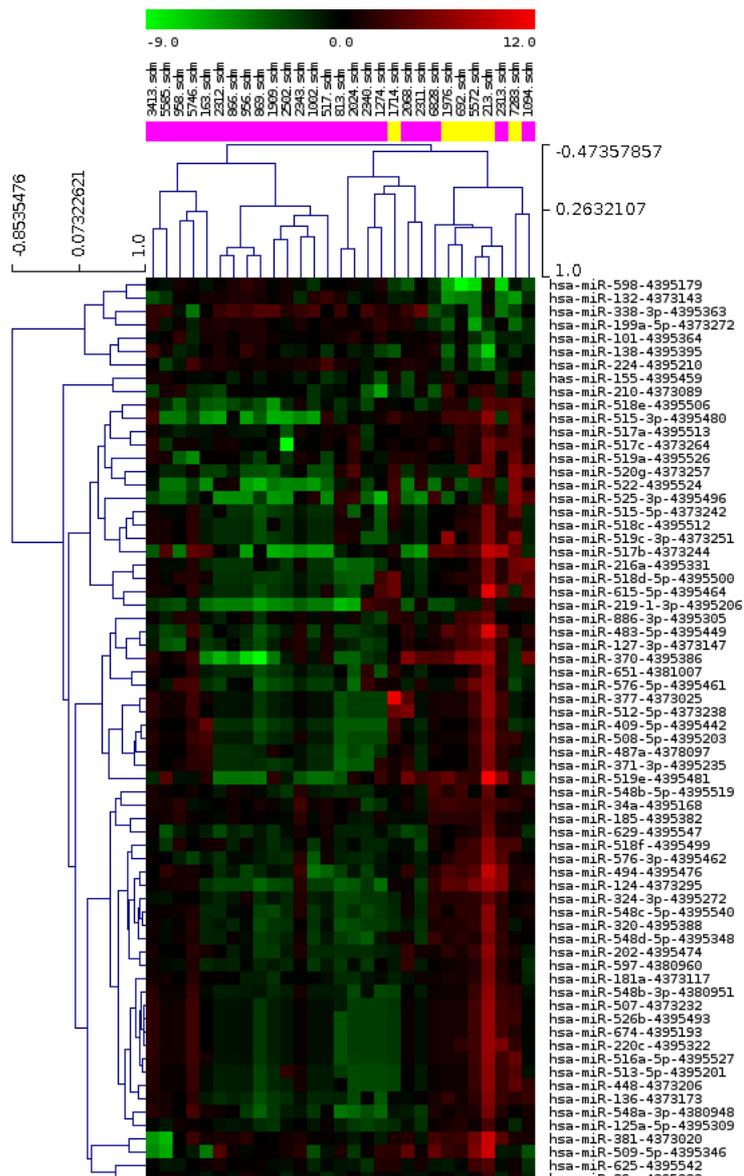


Figura 3: L'analisi supervised ha identificato 136 miRNA differenzialmente espressi nei PTCL/NOS vs ALCL/ALK-

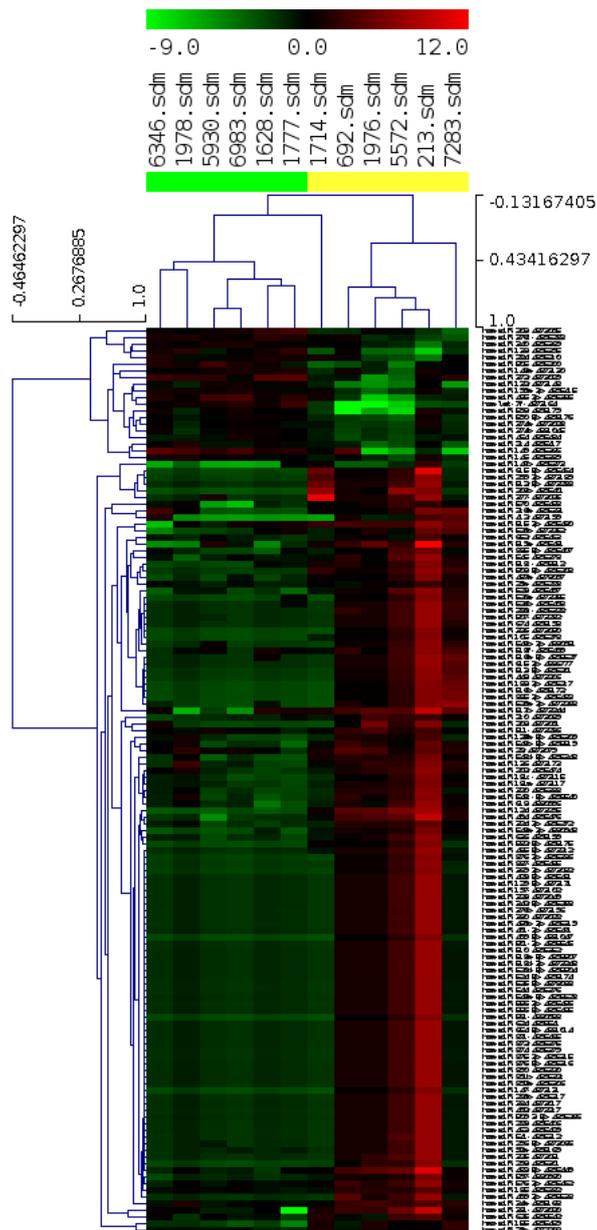


Figura 4: L'analisi supervised ha identificato 68 miRNA differenzialmente espressi nei ALCL/ALK+ vs. ALCL/ALK-

miRna_ID	
hsa-miR-143-4395360	hsa-let-7d-4395394
hsa-miR-532-5p-4380928	hsa-miR-126-4395339
hsa-miR-185-4395382	hsa-miR-512-3p-4381034
hsa-miR-511-4373236	hsa-miR-146b-3p-4395472
hsa-miR-455-5p-4378098	hsa-miR-196b-4395326
hsa-miR-22-4373079	hsa-miR-376b-4373196
hsa-miR-132-4373143	hsa-miR-193a-3p-4395361
hsa-miR-99a-4373008	hsa-miR-93-4373302
hsa-miR-107-4373154	hsa-miR-499-3p-4395538
hsa-miR-125b-4373148	

Tabella 6: L'analisi discriminante ha identificato 19 miRNA differenzialmente espressi tra PTCLs e cellule T normali

MiRna	Genes overlapped	p-value	Gene List
hsa-miR-511	7	5,99E-002	PELI1, NR4A2, TOB1, CREM, BTG1, GJA1, FN1
hsa-miR-455-5p	3	7,32E-002	NR4A2, MYLIP, TJP1
hsa-miR-196b	5	1,02E-001	MGAT4A, PDGFRA, COL1A2, COL3A1, OSMR
hsa-miR-132	5	1,59E-001	NR4A2, MAF, H3F3B, DYNLL2, SPRED1

Tabella 7: l'analisi di GSEA ha permesso di selezionare 4 miRNA differenzialmente espressi e i potenziali geni target

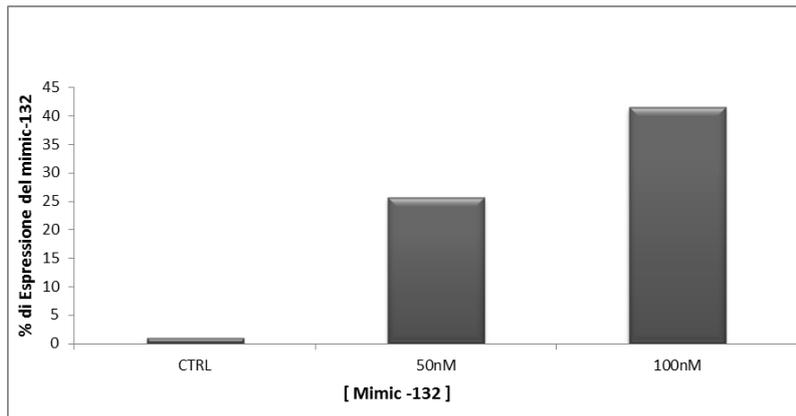


Figura 5: Efficienza di trasfezione valutata in real time per il miRNA-132(mimic-132) a due diverse concentrazioni di 50nM e 100nM

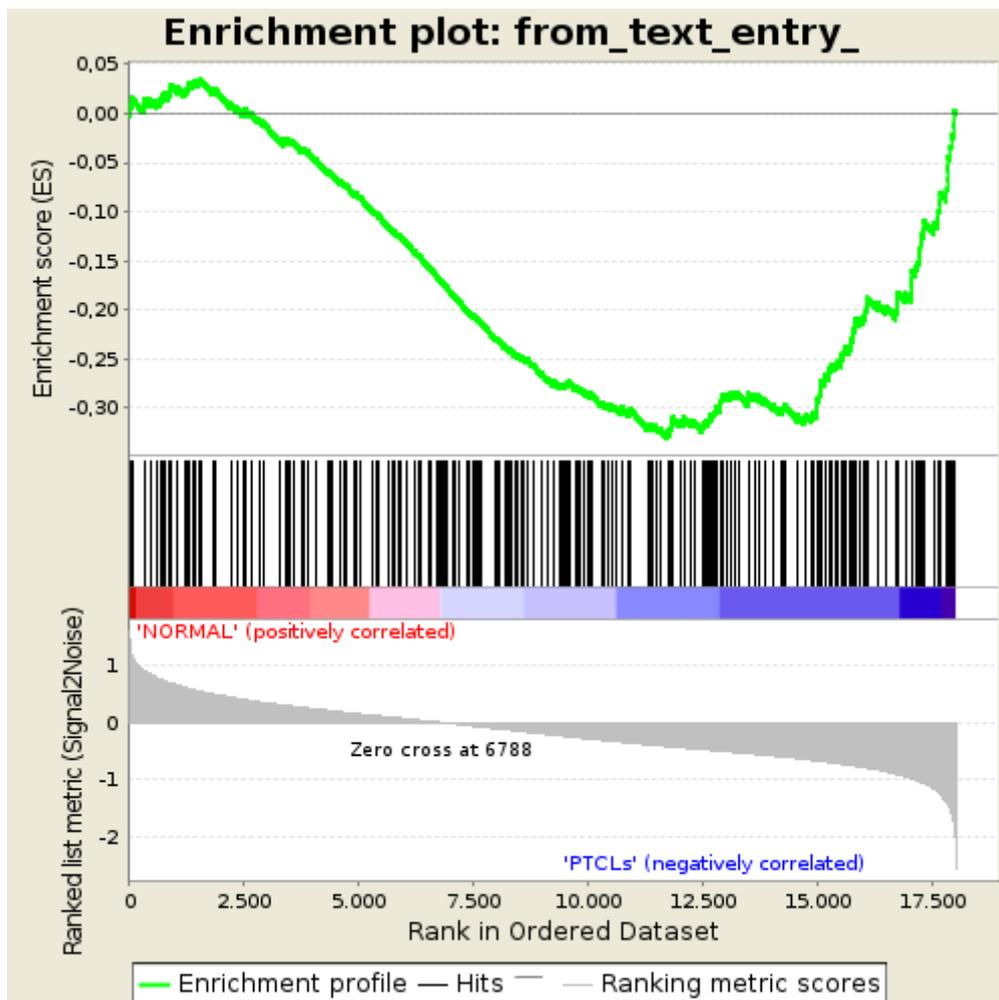


Figura 6: L'enrichment plot ottenuto tramite GSEA mostra una overespressione dei PTCLs statisticamente significativa per la signature dei 468 geni differenzialmente espressi tra cellule trasfettate e non trasfettate.

a)

miRNA_ID
hsa-miR-652-4395463
hsa-miR-627-4380967
hsa-miR-519e-4395481
hsa-miR-487b-4378102
hsa-miR-324-5p-4373052
hsa-miR-449a-4373207
hsa-miR-381-4373020
hsa-miR-574-3p-4395460

b)

miRNA_ID
hsa-miR-124-4373295
hsa-miR-325-4373051
hsa-miR-181a-4373117
hsa-miR-618-4380996

c)

miRNA_ID
hsa-miR-515-3p-4395480
hsa-miR-155-4395459
hsa-miR-598-4395179
hsa-miR-625-4395542
hsa-miR-199a-5p-4373272

Tabella 8: L'analisi discriminante ha identificato 8 miRNA differenzialmente espressi tra PTCL/NOS e AITL (a), 4 tra ALCL ALK- e ALC ALK+ (b), 5 tra PTCL/NOS e ALCL ALK- (c)

Bibliografia

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Campo E, Pileri SA, Swerdlow SH. Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. In: Swerdlow S, et al., eds. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency For Research On Cancer; 2008:158–166.
2. Swerdlow S, Campo E, Harris N et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press, 2008.
3. Laurence de Leval¹ e Philippe Gaulard. "Pathology and biology of peripheral T-cell lymphomas". *Histopathology* 2011, 58, 49–68.
4. Rudiger T, Weisenburger DD, Anderson JR et al. Peripheral T-cell lymphoma (excluding anaplastic large-cell lymphoma): results from the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann. Oncol.* 2002; 13; 140–149.
5. Vose J, Armitage J, Weisenburger D. International peripheral T-cell and natural killer / T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26; 4124–4130.
6. International T-Cell Lymphoma Project. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol* 2008; 26:4124–4130. A large collaborative study involving 1314 patients with NK/T-cell lymphoma from 22 centres in North America, Europe and Asia, looking at frequency of subtypes by geographical region, clinicopathologic features and outcomes across each subtype of PTCL.
7. Pileri S, Ralfkiaer E, Weisenburger D, et al.: Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified. In WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, edn 4. Edited by Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al. Lyon: IARC; 2008:429.
8. Went P, Agostinelli C, Gallamini A, et al. Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score. *J Clin Oncol* 2006;24:2472–9.
9. Piccaluga PP, Agostinelli C, Righi S, Zinzani PL, Pileri SA. Expression of CD52 in peripheral T-cell lymphoma. *Haematologica* 2007;92:566–7.
10. JJM van Dongen, AW Langerak, M Bru[¨]ggemann, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* (2003) 17, 2257–2317
11. Falini B, Pileri S, De Solas I, et al. Peripheral T-cell lymphoma associated with hemophagocytic syndrome. *Blood* 1990;75:434–44
12. Gallamini A, Stelitano C, Calvi R, et al. Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood* 2004;103:2474–9.
13. Piccaluga PP, et al. Peripheral T-cell lymphoma classification: the matter of cellular derivation. *Expert Rev Hematol.* 2011;4(4):415–425
14. Geissinger E, Odenwald T, Lee SS, et al. Nodal peripheral T-cell lymphomas and, in particular, their lymphoepithelioid (Lennert's) variant are often derived from CD8(+) cytotoxic T-cells. *Virchows Arch* 2004;445:334–43.
15. Lennert K. Malignant lymphomas: other than Hodgkin's disease: histology, cytology, ultrastructure, immunology. Berlin: Springer-Verlag; 1978.
16. Paulli M, Berti E. Cutaneous T-cell lymphomas (including rare subtypes). *Current concepts II.* *Haematologica* 2004;89:1372–88.
17. Chan JK. Splenic involvement by peripheral T-cell and NK-cell neoplasms. *Semin Diagn Pathol* 2003;20:105–20.
18. Ikonomidou IM, Tierens A, Troen G et al. Peripheral T-cell lymphoma with involvement of the expanded mantle zone. *Virchows Arch.* 2006; 449; 78–87.
19. Huang Y, Moreau A, Dupuis J et al. Peripheral T-cell lymphomas with a follicular growth pattern are derived from follicular helper T cells (TFH) and may show overlapping features with angioimmunoblastic T-cell lymphomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 2009; 33; 682–690.

- 20 Streubel B, Vinatzer U, Willheim M, et al. Novel t(5;9)(q33;q22) fuses ITK to SYK in unspecified peripheral T-cell lymphoma. *Leukemia* 2006;20:313–8.
- 21 Feldman AL, Sun DX, Law ME, et al. Overexpression of Syk tyrosine kinase in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia* 2008;22:1139–43
- 22 Rodriguez-Pinilla SM, Atienza L, Murillo C, et al. Peripheral T-cell lymphoma with follicular T-cell markers. *Am J Surg Pathol* 2008;32:1787–99.
- 23 Zhan HQ, Li XQ, Zhu XZ, et al. Expression of follicular helper T cell markers in nodal peripheral T cell lymphomas: a tissue microarray analysis of 162 cases. *J Clin Pathol* 2011;64:319–24
24. Grogg KL, Attygalle AD, Macon WR, et al. Expression of CXCL13, a chemokine highly upregulated in germinal center T-helper cells, distinguishes angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Mod Pathol* 2006;19:1101–7.
25. Attygalle AD, Kyriakou C, Dupuis J, et al. Histologic evolution of angioimmunoblastic T-cell lymphoma in consecutive biopsies: clinical correlation and insights into natural history and disease progression. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1077–88.
26. Pier Paolo Piccaluga, Claudio Agostinelli, Andrea et al. Gene expression analysis of peripheral T cell lymphoma, unspecified, reveals distinct profiles and new potential therapeutic targets. *J Clin Invest.* 2007;117(3):823–834
27. Ballester B, et al. Gene expression profiling identifies molecular subgroups among nodal peripheral T-cell lymphomas. *Oncogene* 2006;25(10):1560–70.
28. Martinez-Delgado B, et al. Expression profiling of T-cell lymphomas differentiates peripheral and lymphoblastic lymphomas and defines survival related genes. *Clin Cancer Res.* 2004;10(15):4971–4982.
29. Piccaluga PP, et al. Expression of platelet-derived growth factor receptor alpha in peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified. *Lancet Oncol.* 2005;6(6):440
30. Piva R, et al. Gene expression profiling uncovers molecular classifiers for the recognition of anaplastic large-cell lymphoma within peripheral T-cell neoplasms. *J Clin Oncol.* 2010;28(9):1583–1590
31. Lachenal F, et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: clinical and laboratory features at diagnosis in 77 patients. *Medicine (Baltimore)* 2007;86(5):282–92.
- 32 Merchant SH, Amin MB, Viswanatha DS. Morphologic and immunophenotypic analysis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma: emphasis on phenotypic aberrancies for early diagnosis. *Am J Clin Pathol* 2006;126(1):29–38.
- 33 Attygalle A, et al. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood* 2002;99(2):627–33.
34. Nelson M, et al. Cytogenetic abnormalities and clinical correlations in peripheral T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141(4):461–9.
- 35 . Gesk S, et al. Molecular cytogenetic detection of chromosomal breakpoints in T-cell receptor gene loci. *Leukemia* 2003;17(4):738–45.
- 36 Leich E, et al. Tissue microarray-based screening for chromosomal breakpoints affecting the T-cell receptor gene loci in mature T-cell lymphomas. *J Pathol* 2007;213(1):99–105
37. de Leval L, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood.* 2007;109(11):4952–4963.
38. Piccaluga PP, et al. Gene expression analysis of angioimmunoblastic lymphoma indicates derivation from T follicular helper cells and vascular endothelial growth factor deregulation. *Cancer Res.* 2007;67(22):10703–10710
39. Grogg KL, et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a neoplasm of germinal-center T-helper cells? *Blood* 2005;106(4):1501–2.
40. Dupuis J, et al. Expression of CXCL13 by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL): a new diagnostic marker providing evidence that AITL derives from follicular helper T cells. *Am J Surg Pathol* 2006;30(4):490–4.
41. Grogg KL, et al. Expression of CXCL13, a chemokine highly upregulated in germinal center T-helper cells, distinguishes angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Mod Pathol* 2006;19(8):1101–7.

42. Ortonne N, et al. Characterization of CXCL13+ neoplastic t cells in cutaneous lesions of angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL). *Am J Surg Pathol* 2007;31(7):1068–76.
43. Iqbal J, et al. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2010;115(5):1026–1036
44. Dupuis J, et al. Expression of CXCL13 by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL): a new diagnostic marker providing evidence that AITL derives from follicular helper T cells. *Am J Surg Pathol* 2006;30(4):490–4.
45. Lemonnier F, et al. Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with TFH like features and adverse clinical parameters. *Blood*. 2012;120(7):1466–1469.
46. Cairns RA, et al. IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2012;119(8):1901–1903.
47. Savage KJ. Aggressive peripheral T-cell lymphomas (specified and unspecified types). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005: 267-277
48. Savage KJ, et al. ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma (ALCL) is clinically and immunophenotypically different from both ALK-positive ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood* 2008;111(12):5496–504
49. Amin HM, Lai R. Pathobiology of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 2007;110(7):2259–67.
50. Chiarle R, et al. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8(1):11–23.
51. Salaverria I, et al. Genomic profiling reveals different genetic aberrations in systemic ALK-positive and ALK-negative anaplastic large cell lymphomas. *Br J Haematol* 2008;140(5):516–26.
52. Lamant L, et al. Gene-expression profiling of systemic anaplastic large-cell lymphoma reveals differences based on ALK status and two distinct morphologic ALK+ subtypes. *Blood* 2007;109(5):2156–64.
53. Ambrogio C, Martinengo C, Voena C et al. NPM-ALK oncogenic tyrosine kinase controls T-cell identity by transcriptional regulation and epigenetic silencing in lymphoma cells. *Cancer Res*. 2009; 69; 8611–8619.
54. Geissinger E, Sadler P, Roth S et al. Disturbed expression of the T-cell receptor / CD3 complex and associated signaling molecules in CD30+ T-cell lymphoproliferations. *Haematologica* 2010; 95; 1697–1704
55. Kansal R, et al. Extra copies of chromosome 2 are a recurring aberration in ALK-negative lymphomas with anaplastic morphology. *Mod Pathol* 2005;18(2):235–43
56. Roden AC, Macon WR, Keeney GL, Myers JL, Feldman AL, Dogan A. Seroma-associated primary anaplastic large-cell lymphoma adjacent to breast implants: an indolent T-cell lymphoproliferative disorder. *Mod. Pathol*. 2008; 21; 455–463
57. Piva R, Agnelli L, Pellegrino E et al. Gene expression profiling uncovers molecular classifiers for the recognition of anaplastic large-cell lymphoma within peripheral T-cell neoplasms. *J. Clin. Oncol*. 2010; 28; 1583–1590
58. Feldman AL, Law ME, Inwards DJ, Dogan A, McClure RF, Macon WR. PAX5-positive T-cell anaplastic large cell lymphomas associated with extra copies of the PAX5 gene locus. *Mod. Pathol*. 2010; 23; 593–602
59. Feldman AL, et al. Discovery of recurrent t(6;7) (p25.3;q32.3) translocations in ALK-negative anaplastic large cell lymphomas by massively parallel genomic sequencing. *Blood*. 2011;117(3):915–919.
60. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843-854, 1993
61. Zhang, B.H., Pan, X.P., Wang, Q.L., Cobb, G P., and Anderson, T.A. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Res*, 15: 336-360, 2005.
62. Zhang, B., Pan, X., and Anderson, T.A. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. *FEBS Lett*, 580: 3753-3762, 2006.
63. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;294:853-858.

- 64 Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 2006;22:165-173.
- 65 Lee, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419 (2003)
- 66 Zeng, Y. & Cullen, B. R. Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells. *RNA* 9, 112–123 (2003).
- 67 Gregory, R. I. et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432,235–240 (2004).
- 68 Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F. & Hannon, G. J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231–235 (2004).
68. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95–98 (2004).
69. Bagga, S. et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122, 553–563 (2005).
70. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003;115:787-798.
- 71 Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007;318:1931-1934.
- 72 Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005;3:e85
- 73 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-838.
- 74 Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2999-3004
- 75 Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Muller M, Romermann D, Langer F, Kreipe H. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol* 2008;214:17-24.
- 76 . Lambertz I, Nittner D, Mestdagh P, Denecker G, Vandesompele J, Dyer MA, Marine JC. Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo. *Cell Death Differ* 2010;17:633-641.
77. Miller TE, Ghoshal K, Ramaswamy B, Roy S, Datta J, Shapiro CL, Jacob S, et al. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* 2008;283:29897-29903.
78. Schrauder MG, Strick R, Schulz-Wendtland R, Strissel PL, Kahmann L, Loehberg CR, Lux MP, et al. Circulating Micro-RNAs as Potential Blood-Based Markers for Early Stage Breast Cancer Detection. *PLoS One* 2012;7:e29770.
- 79 Merkel O, et al. Identification of differential and functionally active miRNAs in both anaplastic lymphoma kinase (ALK)+ and ALK- anaplastic large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(37):16228–16233
- 80 Desjobert C, et al. MiR-29a down-regulation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas contributes to apoptosis blockade through MCL-1 overexpression. *Blood*. 2011;117(24):6627–6637.
- 81 Matsuyama H, et al. miR-135b mediates NPMALK- driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2011;118(26):6881–6892.
82. . Dejean E, Renalier MH, Foisseau M, Agirre X, Joseph N, de Paiva GR, Al Saati T, Soulier J, Desjobert C, Lamant L, Prósper F, Felsher DW, Cavaillé J, Prats H, Delsol G, Giuriato S, Meggetto F, 2011 Hypoxia-microRNA-16 downregulation induces VEGF expression in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large-cell lymphomas
83. F. Benner¹, Erica Ballabio², Marloes et al. Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma shows a distinct miRNA expression profile and reveals differences from tumor-stage mycosis fungoides. *Trends* 2012
84. Vishwamitra D, Li Y, Wilson D, Manshouri R, Curry CV, Shi B, Tang XM, Sheehan AM, Wistuba II, Shi P, Amin HM. 2012 MicroRNA 96 is a post-transcriptional suppressor of anaplastic lymphoma kinase expression.
85. April C, Klotzle B, Royce T, et al: Whole-genome gene expression profiling of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples. *PLoS One* 4:e8162, 2009

86. Piccaluga PP et al. Molecular profiling improves classification and prognostication of nodal peripheral T-cell lymphomas. Results of a phase 3 diagnostic accuracy study. 2012 JCO(in press)
87. Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., Iuliano, R., Palumbo, T., Pichiorri, F., Roldo, C., Garzon, R., Sevignani, C., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., and Croce, C.M. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 353: 1793-1801, 2005
88. Kuchen, S et. Al Regulation of microRNA expression and abundance during lymphopoiesis. 2010. *Immunity* 32, 828-839..
89. Li, Q.J. et al. miR-181 is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. 2007. *Cell*.129, 147-161
90. Rossi RL, et al. Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4+ T cells by the microRNA miR-125b. *Nat Immunol*. 2011 Jun 26;12(8):796-803