

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE

Ciclo XXVIII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/F4

Settore Scientifico disciplinare: MED/08

IL SEQUENZIAMENTO MASSIVO DELL'ESOMA RIVELA
NUOVI TARGET MOLECOLARI NELLA NEOPLASIA
BLASTICA DELLE CELLULE DENDRITICHE
PLASMOCITOIDI (BPDCN).

Presentata da: Federica Melle

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof. Lucio Ildebrando Cocco

Relatore

Chiar.mo Prof. Claudio Agostinelli

Esame finale anno 2016

1.INTRODUZIONE	1
1.1 La neoplasia blastica delle cellule dendritiche plasmacitoidi	2
1.2 Epidemiologia	3
1.3 Eziologia	3
1.4 Caratteristiche Cliniche	4
1.5 Caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche	4
1.6 Le cellule dendritiche plasmacitoidi	6
1.7 Linea cellulare CAL-1	11
1.8 Citogenetica e biologia molecolare	11
1.9 Decorso clinico e Prognosi	14
1.10 Terapia	14
1.11 Next Generation Sequencing	17
1.11.1 Metodo Sanger	17
1.11.2 Sequenziamento Massivo e cancro	18
1.11.3 Sequenziamento dell'intero genoma (Whole Genome Sequencing o WGS)	18
1.11.4 Sequenziamento dell'intero Esoma (<i>Whole Exome Sequencing</i> o WES)	18
1.11.5 Sequenziamento del Trascrittoma (RNA Seq)	19
1.11.6 Targeted sequencing	19
1.12 Meccanismi epigenetici nei disordini emopoietici	19
1.12.1 Metilazione del DNA	20
1.12.2 Enzimi IDH e controllo metabolico	21
1.12.3 Modificazioni istoniche e rimodellamento della cromatina	21
1.12.4 Terapia epigenetica	24
1.13 Modello murino per sperimentazione animale	24
2.OBIETTIVI DELLO STUDIO	26
3.MATERIALI E METODI	27
3.1 Selezione dei casi	28
3.2 Estrazione e quantificazione del DNA	29
3.3 Linea cellulare CAL-1	29
3.4 Whole Exome Sequencing (WES)	30
3.5 Analisi dei dati WES	31
3.6 Sequenziamento Sanger	32

3.7 Target sequencing	32
3.8 Analisi dei dati di target sequencing	33
3.9 Sviluppo di un modello murino con BPDCN umano e trattamento	33
3.10 Trattamento	34
4.RISULTATI	36
4.1 Il sequenziamento genico ad alta risoluzione rivela nel BPDCN la presenza di mutazioni in 1174 geni “cancer-related”	37
4.2 Quasi tutti i campioni di BPDCN analizzati presentano una o più lesioni del pathway epigenetico	40
4.3 La terapia combinata di Azacitidina e Decitabina induce un rapido arresto della progressione tumorale	42
5.CONCLUSIONI	47
6.BIBLIOGRAFIA	52
7.APPENDICE	58

1.INTRODUZIONE

1.1 La neoplasia blastica delle cellule dendritiche plasmacitoidi.

La neoplasia blastica di derivazione dagli elementi dendritici plasmacitoidi (nota come Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm, BPDCN) è una malattia ematologica rara ed è attualmente annoverata nel capitolo relativo alle leucemie mieloidi acute (acute myeloid leukemias, AML) della IV Edizione della Classificazione per i tumori del sistema emolinfopoietico della World Health Organization (WHO) [1]. La malattia è stata descritta originariamente nel 1994 come “*blastic NK cell lymphoma/leukemia*”, ma l'incertezza riguardo la sua istogenesi ha portato ad un frequente cambiamento di nomenclatura per la definizione di questa neoplasia. La definizione originale è stata supportata per anni da dati di citologia e di immunoistochimica che, data la positività del CD56, suggeriva la possibile origine dalle cellule Natural Killer. Nel 1999 Petrella propone una nuova definizione: “*agranular CD4+, CD56+ hematodermic neoplasm*”, basandosi sulla positività del CD4, oltre che del CD56, e sull'assenza di antigeni distintivi della linea mieloide [2-4].

Ulteriori studi sull'origine della neoplasia hanno ipotizzato che le cellule dendritiche plasmacitoidi (pDCs) fossero la normale controparte della malattia. Liu e colleghi dimostrarono che le pDCs esprimono abbondantemente CD123 e possono differenziare in monociti plasmacitoidi secernenti interferone [5]. Successivi studi dimostrano che anche le cellule di BPDCN esprimono CD123, oltre che TCL1 e questo sembra suggerire che le pDC siano effettivamente la controparte fisiologica della neoplasia [4, 6-8].

Alla luce di questi risultati, nel 2008, la neoplasia prende il nome di neoplasia blastica di derivazione dagli elementi dendritici plasmacitoidi e viene inserita nel capitolo relativo alle “AML e neoplasie correlate” della IV Edizione della Classificazione per i tumori del sistema emolinfopoietico (Figura1)[1].

Classificazione delle neoplasie mieloidi	
<p>Myeloproliferative Neoplasms (MPNs)</p> <ul style="list-style-type: none"> Chronic myelogenous leukemia, <i>BCR-ABL1</i> positive Chronic neutrophilic leukemia Polycythemia vera Primary myelofibrosis Essential thrombocythemia Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified Mastocytosis MPN, unclassifiable <p>Myeloid and Lymphoid Neoplasms Associated with Eosinophilia and Abnormalities of <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i>, or <i>FGFR1</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Myeloid and lymphoid neoplasms associated with <i>PDGFRA</i> rearrangement Myeloid neoplasms associated with <i>PDGFRB</i> rearrangement Myeloid and lymphoid neoplasms associated with <i>FGFR1</i> abnormalities <p>Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms (MDS/MPNs)</p> <ul style="list-style-type: none"> Chronic myelomonocytic leukemia Atypical chronic myeloid leukemia, <i>BCR-ABL1</i> negative Juvenile myelomonocytic leukemia Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable Provisional entity: Refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis <p>Myelodysplastic Syndrome (MDS)</p> <ul style="list-style-type: none"> Refractory cytopenia with unilineage dysplasia <ul style="list-style-type: none"> Refractory anemia Refractory neutropenia Refractory thrombocytopenia Refractory anemia with ring sideroblasts Refractory cytopenia with multilineage dysplasia Refractory anemia with excess blasts MDS with isolated del(5q) MDS, unclassifiable 	<ul style="list-style-type: none"> Childhood MDS <ul style="list-style-type: none"> Provisional entity: refractory cytopenia of childhood <p>Acute Myeloid Leukemia and Related Neoplasms</p> <ul style="list-style-type: none"> Acute myeloid leukemia (AML) with recurrent genetic abnormalities <ul style="list-style-type: none"> AML with t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Acute promyelocytic leukemia with t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i> AML with t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i> AML with t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVII</i> AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i> Provisional entity: AML with mutated <i>NPM1</i> Provisional entity: AML with mutated <i>CEBPA</i> AML with myelodysplasia-related changes Therapy-related myeloid neoplasms AML, not otherwise specified <ul style="list-style-type: none"> AML with minimal differentiation AML without maturation AML with maturation Acute myelomonocytic leukemia Acute monoblastic/monocytic leukemia Acute erythroid leukemia <ul style="list-style-type: none"> Pure erythroid leukemia Erythroleukemia, erythroid/myeloid Acute megakaryoblastic leukemia Acute basophilic leukemia Acute panmyelosis with myelofibrosis Myeloid sarcoma Myeloid proliferations related to Down syndrome <ul style="list-style-type: none"> Transient abnormal myelopoiesis Myeloid leukemia associated with Down syndrome <p style="border: 1px solid red; display: inline-block; padding: 2px;">Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm</p>

Figura 1: IV Edizione della Classificazione dei tumori del sistema emolinfopoietico della World Health Organization (WHO); capitolo relativo alle neoplasie mieloidi acute.

Fonte figura: *Facchetti et al. 2008.*

1.2 Epidemiologia

La neoplasia blastica di derivazione dagli elementi dendritici plasmacitoidi è una malattia rara senza predominanza geografica o etnica, rappresenta meno dell'1% delle leucemie acute e ha una prevalenza nel genere maschile (il rapporto uomo: donna è di 3,3:1); la popolazione femminile, oltre ad essere in minor misura affetta, presenta un'età di insorgenza sensibilmente inferiore. La maggior parte dei pazienti sono adulti/anziani, con un'età media alla diagnosi di 61 anni. Sono stati descritti, nei bambini, casi occasionali di malattia, caratterizzati da un più frequente coinvolgimento leucemico e da una migliore prognosi [9, 10].

1.3 Eziologia

L'eziologia della neoplasia è ancora ignota. Sono stati identificati dei rari casi positivi al virus di Epstein Barr (EBV), ma nella maggior parte dei casi questo, come anche gli altri virus linfotropici (HIV, HCV, HH-6, HH-8, CMV HTLV-1, HTLV-2) risultano negativi[3].

1.4 Caratteristiche Cliniche

La clinica della neoplasia blastica di derivazione dagli elementi dendritici plasmacitoidi è piuttosto omogenea nei pazienti e si caratterizza per un coinvolgimento cutaneo predominante e con un successivo o simultaneo coinvolgimento del midollo osseo e del sangue periferico. Nel 90% dei casi l'esordio è indolente, dominato da lesioni cutanee seguite da una inevitabile disseminazione sistemica; il restante 10% dei casi ha le caratteristiche di una leucemia acuta con disseminazione sistemica fin dall'inizio [10-12]. Nel 40-50% dei casi, al presentarsi della malattia, si ha anche un coinvolgimento dei linfonodi, mentre splenomegalia (20%) e localizzazioni mucose (10%) sono infrequenti. Le lesioni cutanee sono asintomatiche e nascondono la natura aggressiva della malattia; queste lesioni possono essere singole o multifocali e possono presentarsi come noduli, placche o aree livide. I noduli hanno dimensioni che vanno da pochi millimetri a 10 cm circa identificati per lo più al livello del capo e negli arti inferiori [1]. La neoplasia nel 15-20% dei casi progredisce come Leucemia Mielomonocitica Cronica (CMML) o come Leucemia Mieloide Acuta (AML). Quest'ultima può derivare da una sindrome mielodisplastica preesistente o insorgere improvvisamente nel corso della progressione o della recidiva [1].

Il peculiare tropismo cutaneo del BPDCN contrasta con l'assenza di pDC normali a livello della cute; tale fenomeno può essere attribuito all'espressione da parte delle cellule neoplastiche di molecole che favoriscono la migrazione in sede dermica (CLA e CD56) e di chemochine (CXCR3, CXCR4, CCR6, CCR7) i cui ligandi sono prodotti negli organi infiltrati [13, 14].

1.5 Caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche

Il BPDCN è caratterizzato da un infiltrato diffuso, denso e monomorfo di cellule indifferenziate (tale da ricordare le caratteristiche di un mieloblasto o di un linfoblasto).

I nuclei presentano forma irregolare, principalmente rotonda o ovale con cromatina finemente dispersa, con uno o più nucleoli eosinofili. Il citoplasma è scarso, agranulare e appare grigio-blu alla colorazione Giemsa. Due peculiarità morfologiche si osservano nella maggior parte dei casi: microvacuoli nel citoplasma che si localizzano lungo la membrana cellulare, come una collana di perle, e pseudopodi citoplasmatici.

Negli infiltrati cutanei, l'attività mitotica è variabile con un Ki67 positivo che va dal 20% e all'80%. Le cellule tumorali colonizzano prevalentemente il derma e l'ipoderma e possono estendersi al grasso sottocutaneo; sporadicamente si osserva epidermotropismo, e quando presente, è minimo. Il coinvolgimento estensivo del sottocute è presente soltanto in tumori con vaste lesioni, mentre il coinvolgimento dei linfonodi è caratterizzato da un *pattern* leucemico di infiltrazione, e può essere di

tipo interfollicolare o diffuso. Un coinvolgimento follicolare, invece, può manifestarsi agli esordi per poi, eventualmente, scomparire. L'interessamento midollare, infine, può essere di entità estremamente variabile [1].

Lo studio immunohistochimico riveste un ruolo fondamentale nel processo diagnostico della lesione. Il BPDCN è caratterizzato dall'espressione di CD4, CD43, CD45RA e CD56 (rarissimi casi negativi sono stati pubblicati in letteratura) insieme a marcatori specifici per le pDC (CD123, TCL1, BDCA-2/CD303, SPIB, MxA, CD2AP e BCL11a), mentre marcatori per le cellule B, cellule T o NK, cellule mieloidi e linfoidi sono solitamente assenti con l'unica eccezione del CD33 e CD7 [4, 11, 15-19] (Tabella 1).

Il CD123 è il recettore per la catena alfa della interleuchina-3 (IL-3) fondamentale per la funzione e la sopravvivenza delle pDC; questo marcatore è positivo nel 90% dei casi di BPDCN, ma, pur avendo una buona sensibilità, non è specifico per questa neoplasia, in quanto è positivo anche in casi di AML [20, 21] e di istiocitosi a cellule di Langerhans [22].

Analogamente l'oncogene TCL1, coattivatore di *AKT*, positivo nel BPDCN, può essere anche fortemente espresso nel 20% delle AML, nella leucemia prolinfocitica T e in molti disordini linfoproliferativi di linea B [11, 19, 23].

Il BDCA-2 (o CD303) è un recettore per la Lectina di tipo C coinvolto nel riconoscimento dell'antigene e nella regolazione della secrezione di IFN- α da parte delle pDC oltre che nella maturazione delle stesse pDC [24, 25]; questo recettore, allo stato attuale, rappresenta il marcatore con maggiore specificità sia per le pDC normali che neoplastiche.

Altre molecole non specifiche, quali CD68, TdT e S100, risultano espresse in una percentuale di casi variabile: il CD68, per esempio, è un antigene tipicamente presente nelle pDC, con positività citoplasmatica a "dot" in circa il 50% dei casi di BPDCN, mentre nelle pDC e nei macrofagi la reazione è intensa e diffusa [10]. Un nuovo marcatore immunohistochimico, SPIB, risulta espresso nella totalità dei casi di BPDCN ed è invece negativo in casi di leucemia acuta sia mieloide che linfoblastica quindi risulta essere un marcatore molto utile per una diagnosi differenziale [26].

Al momento non esiste un set minimo di marcatori che identificano con certezza la neoplasia blastica di derivazione dagli elementi dendritici plasmacitoidi; per un'accurata diagnosi è necessario che almeno uno dei marcatori specifici per le pDC sia positivo ed è fondamentale andare a valutare quei marcatori specifici per le patologie che più facilmente possono essere confuse con questa neoplasia (leucemia acuta di linea mieloide o monocitica, leucemia/linfoma linfoblastico a cellule T e linfoma di derivazione dai linfociti T/NK periferici) in modo da poterle escludere. Requisiti minimi per la diagnosi, quindi, sono la contemporanea espressione di CD4/CD56/CD123 in associazione all'espressione di BDCA2/CD303 e alla positività ad altri antigeni correlati alle pDC (TCL1,

CD2AP), in assenza di marcatori linfoidi o mieloidi [12].

Neoplasie che esprimono alcuni, ma non tutti gli antigeni specifici del BPDCN vengono classificate come un sottotipo di “Leucemia Acuta di derivazione ambigua”[1].

Tra gli antigeni overespressi generalmente nel BPDCN, il CD123 potrebbe rappresentare un target terapeutico di anticorpi monoclonali ingegnerizzati [27].

Espressione	Marcatori
Positivi nelle pDC normali e nel BPDCN	CD4, CD43, CD45RA, CD68, CD123, BDCA-2/CD303, CD2AP, TCL1, BCL11, CLA, granzima B, MxA, SPI-B.
Positivi nel BPDCN	CD56, CD2, CD7, CD33, CD38, CD117, TdT.
Negativi nelle pDC normali e nel BPDCN	CD1a, CD3, CD5, CD8, CD10, CD11c, CD13, CD14, CD16, CD19, CD20, CD21, CD23, CD25, CD30, CD34, CD45R0, CD57, CD138, FOXP3, LAT, lisozima, mieloperossidasi, elastasi, perforina, T-bet, TCR-AB, E -GD, TIA-1, ZAP-70.

Tabella 1: marcatori immunocistochimici associati al BPDCN e/o alle pDC normali.
Fonte tabella: Facchetti et al. 2008.

1.6 Le cellule dendritiche plasmacitoidi

Le cellule dendritiche plasmacitoidi (pDCs), dai cui precursori si ritiene derivi la neoplasia, sono anche conosciute come IPCs, ovvero le cellule produttrici di interferone di tipo 1 (α , β , ω) e rappresentano lo 0,2 - 0,8% delle cellule mononucleate del sangue [28]. Tali cellule sono presenti, in condizioni ottimali, solo in bassa percentuale nel sangue periferico, nel midollo osseo, nel timo e nei tessuti linfoidi secondari.

Le pDC presentano una morfologia tipo plasmacellula; sono rotonde o ovali, leggermente più piccole dei monociti CD14+, ma più grandi dei linfociti e presentano caratteristiche funzionali tipiche delle cellule plasmacitoidi, specializzate nella produzione e secrezione proteica.

Lennert e Remmele, nel 1958, descrissero per la prima volta queste cellule riportando la presenza di cellule dalla morfologia plasmacellulare all'interno dell'area *T-cell rich* dei linfonodi reattivi [12]. In seguito alla scoperta dell'espressione di CD4 e della secrezione di linfocine proprie delle cellule T,

queste plasmacellule furono denominate "cellule T plasmacitoidi" in quanto si pensava che fossero la controparte T delle plasmacellule [29].

Il termine cellule T plasmacitoidi fu poi ritrattato da Facchetti che scoprì che queste cellule non esprimono il CD3, un componente del T-Cell Receptor, e che al contrario esprimono il MHC di classe II e alcuni antigeni mieloidi. Le pDC vennero quindi rinominate come "monociti plasmacitoidi" [30]. Nel 1993 il gruppo di Liu identificò due sottogruppi di cellule CD4+CD3- nelle tonsille:

- Cellule Dendritiche CD4+ CD3- CD11c+ all'interno del centro germinativo chiamate DC1 o mDC che sono cellule presentanti l'antigene (APCs) e hanno la funzione di attivare/coattivare le cellule T *naive* e le cellule B del centro germinativo;
- Cellule CD4+ CD3- CD11c- localizzate nell'area *Tcell-rich* attorno alle venule endoteliali (HEV), chiamate anche IPCs o pDCs, che presentano una morfologia linfoide-plasmocitoide. Queste cellule producono grandi quantità di IFN e rivestono un ruolo fondamentale nella risposta immune antivirale. Inoltre, possono differenziare in DCs mature quando messe in coltura con IL-3 o IL-3 più CD40. Le pDC possono indurre una risposta immunologica sia di tipo Th1 che Th2, mentre le mDC innescano tipicamente una risposta di tipo Th1 [31].

A seguito di tali studi i "monociti plasmacitoidi" CD4+ CD3- CD11c- furono quindi rinominati "precursori plasmacitoidi delle cellule dendritiche", pDCs [31].

Queste cellule sono prodotte nel midollo osseo (e in minor misura nel timo) a partire da precursori staminali ematopoietici CD34+ (HPC) di natura sia mieloide che linfoide; quindi da una comune cellula dendritica progenitrice derivano sia classici elementi dendritici "mieloidi" (mDC) che pDC (queste ultime in seguito a stimolazione da parte del ligando della Fms-like chinasi 3 o Flt3L) [32-34] (Figura 2).

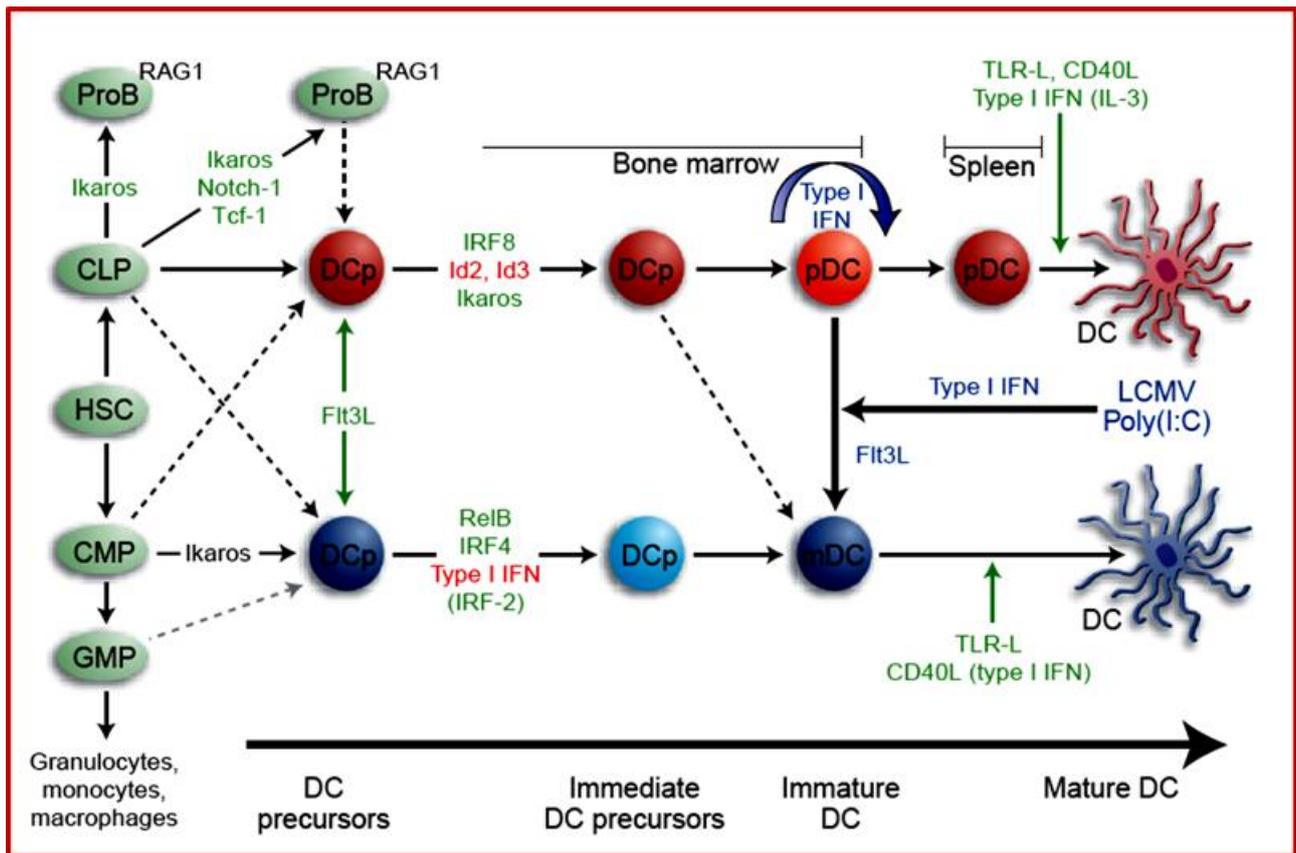


Figura 2: Ontogenesi delle pDC e delle mDC. I fattori di trascrizione, fattori di crescita e i segnali che favoriscono lo sviluppo differenziazione e maturazione delle DC, sono in verde; quelli invece che ne inibiscono lo sviluppo sono in rosso.

ProB= cellule pro-B; CLP= precursore linfoide comune; HSC= precursori pluripotenti delle cellule ematopoietiche; CMP= precursore mieloide comune; GMP= cellule di precursori dei granulociti-macrofagi; IFN= interferone.

Fonte figura: Liu et al, 2005.

Dopo aver lasciato il midollo osseo, le pDC migrano all'interno dell'area *T-cell rich* dei linfonodi attraverso le venule endoteliali (HEV) grazie all'espressione di molecole di homing specifiche quali L-selectina, PSGL1 e CXCR4 (recettore per CXCL12, chemochina omeostatica espressa appunto dalle HEV) [28].

Un ruolo fondamentale nello sviluppo delle pDC è rivestito dal fattore di trascrizione SPIB, la cui assenza rende impossibile la differenziazione delle HPC in pDC, sia in vitro che in vivo [35].

SPIB influenza il destino dei precursori emopoietici: la sua sovraespressione nelle HPC ne impedisce la differenziazione in linfociti T, B e NK, promuovendo la creazione di pDC [36, 37].

Le cellule dendritiche (DC) rappresentano un ponte tra l'immunità innata e adattativa, nel cui contesto le pDC rappresentano un sottogruppo con caratteristiche uniche.

Il gruppo di Liu, ma anche altri gruppi, hanno dimostrato che i monociti/macrofagi ed i neutrofili esprimono per lo più recettori *Toll-Like* quali: TLR1, -2, -4, -5, -6 e sono deputati alla fagocitosi e all'uccisione dei batteri, mentre le pDC/IPCes esprimono fortemente i TLR7 e TLR9 in risposta a virus a DNA, agli oligodeossinucleotidi CpG (TLR9) o a virus a RNA a singolo filamento (TLR7)

Le cellule dendritiche di origine mieloide (mDCs) CD11c⁺ esprimono TLR3, suggerendo che queste giochino un ruolo fondamentale nel riconoscimento dei virus a dsRNA.

La peculiare differenza nei pattern di espressione dei recettori TLR di mDC e pDC suggerisce che queste potrebbero avere sviluppato, attraverso diversi cammini evolutivi, un riconoscimento ed una responsività preferenziale agli agenti microbici (Figura 3) [32, 38].

Dopo l'attivazione da parte di un virus, le pDC/IPCs producono una grossa quantità di IFN di tipo 1 con una velocità anche 1000 volte maggiore rispetto alle altre cellule del sangue [39]. Le pDC non contengono trascritti di mRNA preesistenti per IFN-1 rintracciabili prima della stimolazione virale che però può essere rilevato già 4h dopo la stimolazione virale, ed i livelli raggiungono il picco dopo 12 h. Tra le 6 e le 12 ore dopo la stimolazione virale, circa il 50% dell'RNA totale espresso dalle pDC/IPCs codifica per vari tipi di INF (IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- λ , IFN- τ). La maggior parte di IFN viene prodotto entro le prime 24h a seguito dell'induzione virale; in seguito le pDC attivate diventano refrattarie ad una successiva stimolazione, sia dallo stesso virus che da virus diversi [40]. Oltre a elevate quantità di IFN- α , le pDC secernono sia altre citochine (TNF- α , IL-6 e CXCL8) che chemochine infiammatorie (CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4 e CCL5) [41, 42].

Le pDC appena isolate dal sangue periferico hanno scarsa capacità di presentazione antigenica; solo in seguito a stimolazione da parte di virus, CpG, IL-3 e CD40L esse maturano tale funzione (sebbene con minor efficienza rispetto alle mDC) e acquisiscono una piena morfologia dendritica [28, 43-45].

Le pDC/IPCs, quindi, dopo stimolazione virale producono moderate quantità di TNF- α e di IL-6 ma non producono IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 e fattore stimolante colonie di granulociti e macrofagi (GM-CSF), inoltre la produzione di IFN di tipo 1 non solo ha effetti inibitori diretti sulla replicazione virale, ma contribuisce anche alla stimolazione della proliferazione antigene-specifica delle cellule T, all'attivazione delle B, delle cellule NK e delle mDCs. Le pDC rappresentano cellule professionali che agiscono come effettori chiave della risposta immune antivirale innata [28]. Le pDC tendono ad accumularsi per ragioni ancora poco chiare in determinate condizioni patologiche, di natura sia autoimmune (lupus eritematoso, psoriasi e artrite reumatoide) [46, 47] che tumorale. Quando associate a condizioni tumorali, le pDC si caratterizzano per una difettività funzionale, con ridotta capacità di produzione di IFN- α ; il loro ruolo nel controllo immunologico delle neoplasia resta ancora materia di dibattito.

Ad uno stadio tardivo dell'infezione virale, le pDC attivate vanno incontro ad importanti cambiamenti morfologici e funzionali, differenziando in cellule dendritiche (DCs): acquisiscono una morfologia tipica e diventano capaci di stimolare le cellule T naive in maniera antigene-specifica e regolarle direttamente modulando la risposta immune adattativa.

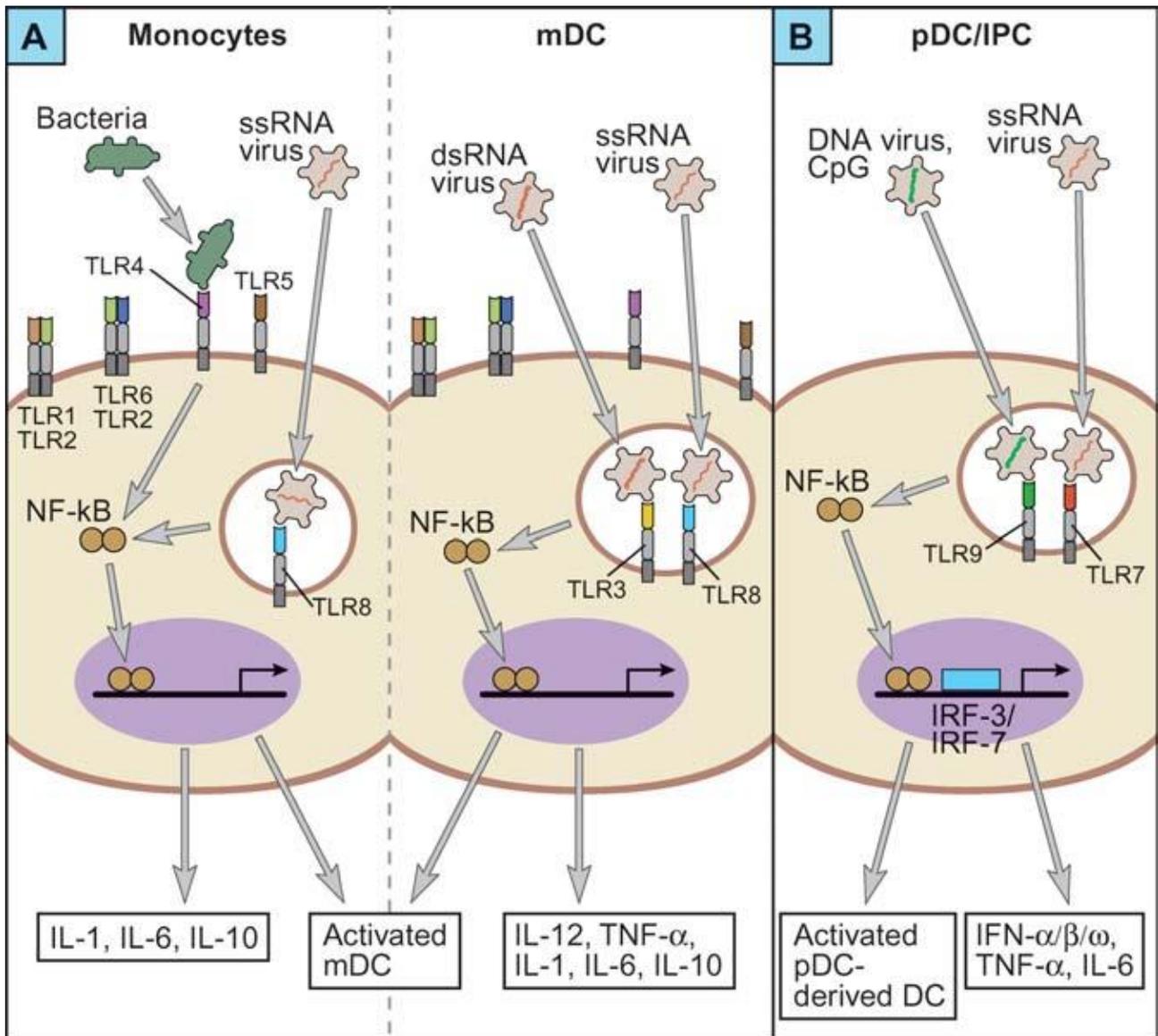


Figura 3: All'interno degli endosomi, le cellule pDC/IPC esprimono selettivamente TLR7 e TLR9, che riconoscono rispettivamente virus a RNA a singolo filamento e DNA a doppio filamento (B). Il *signaling* attraverso TLR7 e TLR9 porta all'attivazione di pDCs che vanno a secernere grandi quantità di IFN di tipo 1 e vanno a differenziarsi in cellule dendritiche mature. I monociti esprimono preferenzialmente TLR1, -2, -4, -5, -6 che riconoscono diversi prodotti batterici. Il *signaling* di questi TLR porta all'attivazione dei monociti che vanno a secernere TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10, e vanno a differenziarsi in cellule dendritiche mature (A, a sinistra). Come nei monociti, le mDCs esprimono TLR1, -2, -4, -5, -6; tuttavia, le mDC al contrario dei monociti, esprimono anche il TLR3, che riconosce i virus a RNA a doppio filamento (A, a destra). Il *signaling* del TLR3 porta all'attivazione delle mDC con la produzione di grandi quantità di IL-12, IL-1 e IL-6 e una piccola quantità di IFN di tipo 1.
 Fonte figura: Liu et al, 2005.

Le prime ipotesi circa la derivazione del BPDCN dalle pDC sono state avanzate verso la fine degli anni '90, grazie ai progressi ottenuti nella definizione di tali elementi e al contributo dato da successivi studi immuno-funzionali [6, 8, 15, 23, 31].

In particolare, nel 2001, Chaperot identifica le pDC come origine della neoplasia, dimostrando la capacità degli elementi neoplastici di produrre IFN- α se esposte a virus e di arrestare il processo apoptotico in presenza di IL-3 o di GM-CSF, entrambe caratteristiche funzionali tipiche delle pDC.

Inoltre, in seguito all'esposizione a IL-3 e all'attivazione del segnale innescato da CD40, le cellule tumorali assumono una morfologia simil-pDC (formando aggregati e sviluppando prolungamenti dendritici citoplasmatici) e acquisiscono la capacità di indurre la proliferazione dei linfociti T. Parallelamente, viene osservata una over-espressione di molecole costimolatorie e correlate alla presentazione antigenica, quali CD80, CD86, CD40, HLA-I e -II [8].

1.7 Linea cellulare CAL-1

Nel 2004 Maeda e collaboratori hanno creato una linea cellulare, denominata CAL-1, a partire da elementi neoplastici isolati dal sangue periferico di un paziente di 76 anni affetto da neoplasia blastica di derivazione dagli elementi dendritici plasmacitoidi.

Da queste cellule è stata sviluppata quindi una linea cellulare a lungo termine, stabilizzata per 4 anni. Le cellule CAL-1 crescono in sospensione, esibiscono una morfologia linfoblastoide-plasmacitoide e hanno caratteristiche comuni alle cellule tumorali primarie. Sono caratterizzate da un nucleo leggermente irregolare e RE ruvido senza corpi di Russel e hanno caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche affini a quelle delle cellule neoplastiche primarie, sebbene il profilo di espressione antigenica risulti lievemente diverso (con debole positività per CD11c, CD7 e CD116). Le cellule in coltura esprimono inoltre CCR5 (a bassa densità), CXCR4 e CXCR3 (a elevata densità). Le CAL-1, incubate in presenza di GM-CSF o IL-3, acquisiscono caratteristiche tipiche delle pDC, quali lo sviluppo di prolungamenti dendritici, l'aumentata espressione di CD80 e di CD86 e la ridotta espressione di CXCR4. Da un punto di vista della produzione citochinica, le CAL-1 mostrano la capacità di secernere TNF- α , ma solo basse quantità di IFN- α , in seguito a stimolazione con oligodeossinucleotidi CpG (ODN2216) [48].

1.8 Citogenetica e biologia molecolare

Nella maggioranza dei casi i geni che codificano per il T-cell receptor (TCR) e per le immunoglobuline sono germinali; sono stati riportati solo eccezionali casi con riarrangiamento del TCR, ma circa i due terzi dei pazienti affetti da BPDCN hanno multiple lesioni del cariotipo (Tabella 2) [49-58].

Leroux e il suo gruppo hanno riportato 6 alterazioni citogenetiche che coinvolgono i cromosomi: 5q (72%), 12p (64%), 13q (64%), 6q (50%), 15q (43%) e una monosomia del cromosoma 9 (28%) in 21 pazienti, ma nessuna di queste alterazioni è risultata specifica per la malattia o utile per la diagnosi [49]. In seguito, sono state identificate delezioni ricorrenti mediante tecniche combinate di *array-*

based comparative genomic hybridization (aCGH) e di *gene expression profiling* (GEP): le perdite cromosomiche più frequenti si localizzano nelle regioni 9p21.3, 12p13.2-p13.1, 13q11-q12 4q34 e nel cromosoma 9 e si associano ad una ridotta espressione del RNA dei geni oncosoppressori *RBI* e *LATS2*; inoltre viene descritta un'aumentata espressione degli oncogeni *HES6*, *RUNX2* e *FLT3* [50, 52]. La perdita biallelica del 9p21.3 è associata a una cattiva prognosi [51]. Weisner, nel 2010, conferma che le delezioni cromosomiche più frequenti nel BPDCN sono quelle che colpiscono i cromosomi 9, 12, 13 e 15. Ulteriori studi identificano delezioni ricorrenti di geni codificanti proteine coinvolte nel controllo della transizione G1/S del ciclo cellulare, quali *RBI* e *LATS2*, *CDKN1B*, *CDKN2A* e *TP53* [53, 54].

Nel 2013 ulteriori elementi circa il panorama mutazionale della neoplasia sono emersi nel corso di uno studio condotto da Menez con metodiche di *next generation sequencing*: confrontando i dati ottenuti con il sequenziamento dell'intero esoma (*whole exome sequencing*, WES) dei campioni tumorali e dei rispettivi campioni di tessuto "sano" (mucosa orale) di tre pazienti, sono stati identificati 15 geni mutati già coinvolti in neoplasie mieloidi e con funzioni di particolare interesse, quali: metilazione del DNA (*TET1* e *TET2*): rimodellamento cromatinico (*ASXL1*), famiglia delle proteine RAS (*NRAS*, *KRAS*) e fattori di *splicing* (*U2AF1*). Tali geni, unitamente ad altri, precedentemente descritti per un ruolo leucemogenico, sono stati validati con un *target resequencing* di 24 ulteriori casi di BPDCN, confermando la presenza di alterazioni di *TET2* e *TP53* e identificando frequenti mutazioni in geni con ruolo di controllo epigenetico (*IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *ATRX*, *EZH2*) [55].

Nel 2014, il nostro gruppo di ricerca ha definitivamente riconosciuto la derivazione cellulare del BPDCN a livello di profilo di espressione genica, che dimostra come la neoplasia provenga dalle *pDC resting* di origine mieloide. Sorprendentemente, nonostante la chiara origine mieloide, il BPDCN non appariva così strettamente associato alle Leucemie Mieloidi Acute (AML), presentava un profilo molecolare piuttosto ambiguo e in parte correlato sia alle AML che alle Leucemie Linfoblastiche Acute (ALL), condividendo con entrambe circa 50 geni. Sulla base di questo risultato, è sicuramente giustificata la scelta casuale del trattamento simil-ALL oltre che simil-AML.

Lo stesso studio ha identificato un'attivazione aberrante del *pathway* di NF- κ B, dimostrando, mediante immunohistochimica, una *up*-regolazione del *pathway* con iperespressione e *down*-regolazione di due geni a valle (*BCL2* e *IRF4* rispettivamente). Inoltre è stato dimostrato che sia l'inibitore del proteosoma (Bortezomib) che l'inibitore selettivo di I κ B portano la linea cellulare CAL-1 trattata ad un arresto del ciclo cellulare e ad apoptosi [56].

Referenza	N° pazienti	Metodo	Anormalità cromosomiche	Alterazioni genetiche	GEP
Leroux et al [49]	21	Citogenetica	5q, 12p, 13q, 6q, 15q, Monosomia del 9	ND	ND
Lucioni et al [50]	21	aCGH	Delezioni di 9p21.3, 13q13.1-q14.3, 12p13.2-p13.1, 13q11-q12	<i>CDKN2A/CDKN2B, RB1, CDKN1B, LATS2</i>	ND
Wiesner et al [53]	14	aCGH	Perdite dei cromosomi 9, 12, 13, 15	<i>CDKN1B, CDKN2A/ARF/CDKN2B, RB1</i>	ND
Tokuda et al [54]	1	Citogenetica	t(2; 17; 8) (p23; q23; p23)	Proteina di fusione CLTC-ALK	ND
Sapienza et al [56]	27	GEP	ND	ND	<i>IRF4, NFkB, BCL2</i>
Dijkman et al [52]	13	GEP	ND	ND	<i>HES6, RUNX2, FLT3</i>
Alayed et al [57]	16	NGS	ND	<i>TET2</i>	ND
Menezes et al [55]	3	NGS	ND	<i>TET2, ASXL1, NPM1, NRAS, IKZF1, IKZF1-3, ZEB2, HOXB9, UBE2G2</i>	ND
Taylor et al [58]	7	NGS	ND	<i>TET2, TP53, ASXL1, IDH2, KRAS, ABL1, ARID1A, GNA13, U2AF1, SRSF2, IRF8, ZRSR2</i>	ND

Tabella 2: Alterazioni genetiche riportate nella neoplasia blastica di derivazione dagli elementi plasmacitoidi dendritici (BPDCN). *aCGH* = array-based comparative genomic hybridization, *GEP* = gene expression profiling, *ND* = non disponibile, *NGS* = next-generation sequencing, *TS* = target sequencing, *WES* = whole-exome sequencing. Fonte tabella: Riaz et al 2014.

1.9 Decorso clinico e Prognosi

Il decorso clinico del BPDCN è molto aggressivo, con una sopravvivenza media di 10-19,8 mesi, indipendentemente dal *pattern* d'insorgenza della patologia [10, 12, 16, 23]. Le cellule tumorali sono molto sensibili ad agenti chemioterapici e steroidi che inducono la remissione nell'80-90% dei casi; nonostante ciò si verificano inevitabilmente recidive a 9-11 mesi in sede cutanea e/o con coinvolgimento extra-emopoietico (tessuti molli, sistema nervoso) [10, 16]. Nella maggior parte dei casi l'ultima fase della malattia è caratterizzata da una leucemia fulminante.

Molti studi di meta-analisi hanno dimostrato che caratteristiche quali: l'età, lo stadio della neoplasia, la presentazione clinica alla diagnosi o il fenotipo delle cellule tumorali, possono influenzare la prognosi della malattia; per esempio i pazienti giovani hanno una prognosi migliore rispetto agli anziani, ma questo può esser dato dal fatto che, a parità di caratteristiche cliniche, viene scelto un regime terapeutico più aggressivo nei giovani rispetto che negli anziani.

Nei pazienti adulto/anziani la prognosi è più favorevole nei pazienti con sola localizzazione cutanea rispetto ai casi avanzati infatti il riscontro di un'elevata percentuale di blasti nel sangue periferico o midollare risulta essere un fattore prognostico sfavorevole, mentre l'espressione di TdT è correlata con una maggiore sopravvivenza [56, 59-61].

Una remissione a lungo termine o cure efficaci sono state riportate sporadicamente [1].

1.10 Terapia

Ad oggi non è stato ancora descritto un protocollo terapeutico che sia efficace contro questa neoplasia; la chemioterapia locale e la radioterapia sono insufficienti e solo i pazienti che ricevono una polichemioterapia sistemica possono raggiungere una remissione completa. Sono stati applicati protocolli diversi, inclusi regimi utilizzati per altre neoplasie ematologiche quali il linfoma non-Hodgkin (CHOP o simil-CHOP), terapia per ALL o trapianti allogenici/autologhi di cellule staminali. Il regime terapeutico che più porta a remissione completa è il CHOP o simil-CHOP, ma la recidiva è molto frequente e la sua evoluzione è fatale.

Uno dei primi e dei più ampi studi condotti al fine di trovare una terapia efficace, analizza retrospettivamente la risposta clinica di 97 pazienti (di cui 91 già descritti in letteratura), ripartendo i protocolli terapeutici utilizzati in quattro gruppi:

1. regimi CHOP o simil-CHOP;
2. regimi chemio o chemioradioterapeutici meno aggressivi ("*less than CHOP*", prevalentemente a base di ciclofosfamide);
3. terapie aggressive normalmente usate in caso di leucemia acuta;

4. terapie mieloablativa seguita da trapianto di cellule staminali autologo (auto-SCT) o allogenico (allo-SCT).

Da tale confronto si evince come i risultati più durevoli in termini di sopravvivenza (adattati per età) si ottengano con regimi chemio/radioterapici seguiti da allo-SCT, in caso il trapianto venga effettuato in prima remissione completa (CR1)[59]. Tuttavia, resta aperta la diatriba circa la terapia di scelta nella popolazione non eleggibile al trapianto (spesso in percentuale non trascurabile, essendo maggiormente colpita la popolazione anziana) (Figura 4).

Dato il fallimento dei maggiori approcci terapeutici verso questa neoplasia, sono stati fatti numerosi studi allo scopo di identificare nuove possibili terapie per trattare pazienti con BPDCN.

Il gruppo di Agliano, nel 2011 ha creato un ceppo di topi immunodeficienti (*NOD scid gamma*) a cui sono state iniettate le cellule tumorali provenienti dal midollo osseo di un paziente con BPDCN. I topi dopo aver sviluppato la neoplasia, con caratteristiche simili a quelle dell'uomo, sono stati trattati con Lenalidomide (un farmaco immunomodulatore e anti-angiogenico già utilizzato in neoplasie ematologiche) la cui somministrazione ha portato ad una sopravvivenza maggiore rispetto ai controlli [62]. Laribi ha inoltre riportato 2 pazienti con BPDCN sottoposti a terapia di prima linea con 5-Azacitidina, farmaco ad elevata attività demetilante, che ha portato ad una risoluzione delle loro lesioni cutanee e una stabilizzazione dei parametri ematologici. Questa terapia potrebbe essere efficace, in particolare tra i pazienti con BPDCN con simultanea neoplasia mieloida (ad esempio, MDS, AML) [63]. Sono stati riportati anche risultati di pazienti con BPDCN dopo trattamento con SL-401, una proteina ricombinante dell'interleuchina umana 3 α unita da un gruppo di amminoacidi ad una tossina difterica (DT) che è stata troncata nella sua regione di legame al recettore. In uno studio preclinico, la proteina SL-401 ha rivelato un'attività antitumorale contro le linee cellulari di BPDCN. Di questi pazienti 7 (78%) hanno raggiunto ottime risposte (5 CR, 2 PR) Questi risultati incoraggianti suggeriscono che una terapia mirata ha un potenziale nel migliorare i risultati dei pazienti [64].

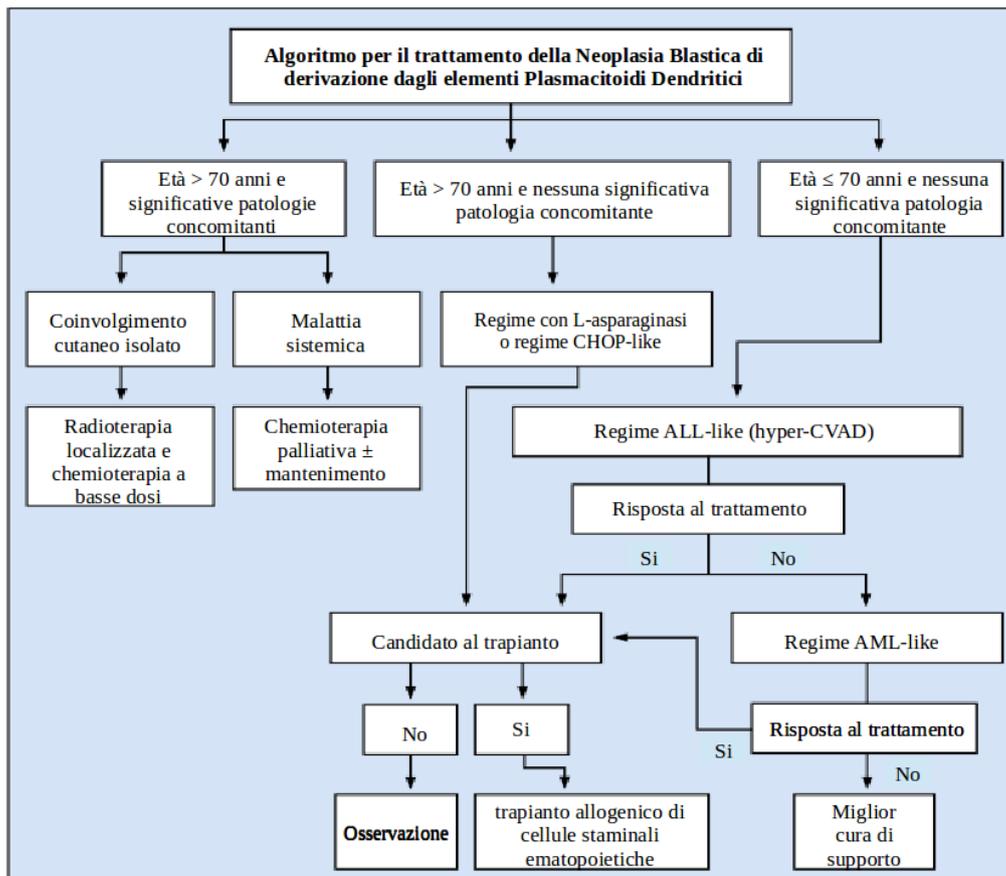


Figura 4: Algoritmo terapeutico ad oggi utilizzato nel BPDCN.

ALL = acute lymphocytic leukemia, AML = acute myeloid leukemia,

CHOP=cyclophosphamide/hydroxydaunomycin/vincristine/prednisone,

Hyper-CVAD = hyperfractionated cyclophosphamide/vincristine/doxorubicin/dexamethasone.

Fonte figura: Riaz, et al 2014.

1.11 Next Generation Sequencing

Il sequenziamento del DNA è un ambito di ricerca in piena evoluzione. Per anni la maggior parte delle applicazioni si sono basate su variazioni ed evoluzioni del metodo Sanger, in grado di generare *reads* lunghe fino a 800bp. Da una decina d'anni tuttavia le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) sono arrivate a soppiantare le tecnologie precedenti grazie all'evolversi delle conoscenze bioinformatiche e delle nuove chimiche di sequenziamento che permettono di sequenziare interi genomi in tempi brevi e a prezzi contenuti

Negli anni, il sequenziamento ha aiutato molto i clinici a classificare, dal punto di vista molecolare, neoplasie che non erano state ancora ben inquadrare tramite studi morfologici e con l'avvento del sequenziamento di nuova generazione questa operazione è molto più facilitata. Inoltre una conoscenza dettagliata delle mutazioni presenti nel genoma di una neoplasia può aiutare ad ottimizzare l'approccio terapeutico, specialmente per quelle neoplasie per le quali non si è ancora identificata la terapia giusta per debellarle.

1.11.1 Metodo Sanger

Nel 1977 Fred Sanger pubblicò il primo documento metodologico sul sequenziamento del DNA, che trasformò lo studio della biologia molecolare, fornendo uno strumento per decifrare geni completi e successivamente interi genomi: quello che noi oggi chiamiamo sequenziamento "Sanger"[65]. Questa tecnica fu successivamente migliorata e gli evidenti vantaggi portarono rapidamente il *Sanger sequencing* ad essere l'unico metodo di sequenziamento del DNA usato per i successivi 30 anni.

Con questa strategia, il DNA viene amplificato mediante PCR con dei *primers* specifici per la regione di interesse e successivamente sequenziate da entrambi gli *strand* mediante l'incorporazione di dideossinucleotidi (ddNTP) terminatori di catena fluorescenti. Il risultato è una miscela di frammenti di DNA complementare (cDNA) di lunghezze diverse che, vengono separati mediante elettroforesi capillare. I fluorocromi presenti nei ddNTP di terminazione di ciascun filamento vengono eccitati con un laser e, a seconda del tipo di nucleotide presente, viene emesso un segnale luminoso di diverso colore (ossia a differente lunghezza d'onda) che, una volta decodificato, fornisce la sequenza del tratto di cDNA esaminato.

Un approccio utilizzato per sequenziare quantità di DNA *de novo* molto grandi (ad esempio un intero genoma) è lo *shotgun sequencing*. Con questa strategia, il DNA viene frammentato random in frammenti di circa 1000 paia di basi (bp) e clonato in un plasmide (vettore di clonaggio universale) che viene successivamente utilizzato per transfettare colonie di E.coli. Gli inserti di plasmidi scelti in modo random vengono poi sequenziati utilizzando *primers* universali [66, 67].

1.11.2 Sequenziamento Massivo e cancro

Lo sviluppo del sequenziamento *high throughput* (ad alta resa) detto sequenziamento di seconda generazione o *next generation sequencing*, ha rivoluzionato il nostro modo di studiare il genoma del cancro generando milioni di piccoli frammenti di DNA (50-100 nucleotidi) simultaneamente. Queste sequenze sono poi allineate sul genoma di riferimento per generare un quadro completo del genoma della neoplasia [43, 44, 55].

Per lo studio dei tumori è fondamentale che venga sequenziato sia il tessuto tumorale che quello normale (saliva o cute, per esempio) di ogni individuo. Ci sono più di 3 milioni di varianti ereditate nel genoma umano e centinaia di variazioni del numero di copie (CNV). Queste mutazioni germinali, non associate alla neoplasia, vanno escluse durante l'analisi dei dati sequenziati, in modo da avere solo mutazioni somatiche.

Ad oggi esistono molti approcci di sequenziamento massivo con funzioni e approcci diversi e che spesso vengono combinati per avere una visione completa della neoplasia.

1.11.3 Sequenziamento dell'intero genoma (Whole Genome Sequencing o WGS)

Questo approccio ha l'obiettivo di sequenziare l'intero genoma e non solo le regioni codificanti al fine di identificare varianti strutturali quali: mutazioni puntiformi, inserzioni, delezioni, amplificazioni e traslocazioni cromosomiche. La grande limitazione di questo metodo sono i costi e la complessità dell'analisi dei dati [68, 69].

1.11.4 Sequenziamento dell'intero Esoma (Whole Exome Sequencing o WES)

Un'alternativa meno costosa al WGS è rappresentata dal sequenziamento delle sole regioni esoniche. Dal momento che le regioni oggetto di trascrizione rappresentano una minima percentuale dell'intero genoma (poco più del 1%), più campioni possono essere sequenziati durante un'unica sessione di sequenziamento NGS. Rispetto alla procedura di sequenziamento genomico, è necessario effettuare una fase di *enrichment* delle regioni esoniche preliminare alla fase di sequenziamento [70]. In breve questa fase è caratterizzata dalla cattura delle regioni esoniche tramite biglie (o un *array*) che contengono *probes* (o sonde) disegnate per catturare circa 200.000 esoni nel genoma umano. Una volta "catturati" i frammenti esonici vengono amplificati e quindi sequenziati.

Un altro vantaggio del WES rispetto al WGS è la maggiore probabilità di trovare mutazioni che abbiano conseguenze a livello proteico; d'altra parte, però, viene perso circa il 98-99% del restante genoma, che non viene sequenziato e quindi non vengono identificate varianti al di fuori degli esoni

come traslocazioni con *break-points* negli introni.

1.11.5 Sequenziamento del Trascrittoma (RNA Seq)

L'obiettivo di questo approccio è quello di sequenziare tutti i geni trascritti compresi tutti gli mRNA codificanti e non. Un vantaggio di questo metodo è sicuramente la possibilità di avere informazioni quantitative del livello di espressione genica, ma anche informazioni su *splicing* alternativo e cambiamenti post-trascrizionali nell'espressione genica. Inoltre tramite l'RNA Seq è possibile identificare trascritti di fusione prodotti dopo una traslocazione cromosomica.

Come nel WES, con questo approccio si perdono informazioni riguardo mutazioni nella regione non-codificante del genoma. Il sequenziamento del trascrittoma inoltre non vede mutazioni che causano la perdita di una o di entrambe le copie di un gene o mutazioni che causano un *turnover* dell'RNA accelerato (per esempio mutazioni *frameshift* o *nonsense*)[71].

1.11.6 Targeted sequencing

Il sequenziamento di regioni o geni specifici (definito appunto *targeted sequencing*) viene utilizzato per studiare aree genomiche di particolare interesse, attraverso la creazione di *panel* di ampliconi che comprendono i geni e/o le regioni *hot-spot* selezionati. I vantaggi di tale tecnica sono legati ai costi e al tempo di lavoro (notevolmente più contenuti rispetto al sequenziamento dell'intero genoma o dell'intero esoma) e all'elevato *coverage* (numero di reads che coprono una determinata sequenza) [72]. Questo metodo consente di indagare, in un ampio numero di pazienti, geni identificati con altri approcci come potenzialmente coinvolti nella patogenesi della malattia e, grazie all'alto *coverage*, di estendere l'analisi a livello subclonale. Lo svantaggio è quello di avere solo sequenze target specifiche e quindi di avere una visione ristretta e non globale della malattia.

1.12 Meccanismi epigenetici nei disordini emopoietici

Nel corso degli ultimi due decenni si è assistito ad un notevole progresso anche nella comprensione dei fenomeni epigenetici. Attualmente con "epigenetica" si indica l'insieme dei processi che si trasmettono attraverso le generazioni cellulari e che regolano in maniera stabile l'espressione genica senza alterare la sequenza del DNA.

Le nuove tecnologie hanno ora reso disponibile una quantità enorme di informazioni sulla struttura della cromatina e sul meccanismo nucleare che regola le strutture DNA-proteine. Questi dati hanno rivelato che gli interruttori epigenetici lavorano a molti livelli tra cui: a livello di modificazione degli istoni, rimodellamento della cromatina, metilazione del DNA, tempi di replicazione e localizzazione

nucleare [73].

Il differenziamento cellulare viene ad oggi considerato come il risultato dell'equilibrio tra i programmi di trascrizione e le modificazioni epigenetiche, che rendono stabile l'espressione genica e limitano la plasticità cellulare. I processi epigenetici sono stati associati ai vari *step* dei processi maturativi della ematopoiesi, per esempio molti geni che nelle cellule staminali emopoietiche (HSC) risultano metilati, subiscono una selettiva demetilazione nel passaggio a progenitore multipotente (MPP)[73]. D'altra parte, accanto a questi processi di demetilazione, un altro set di geni subisce una metilazione *de novo* durante lo sviluppo da cellule multipotenti in una linea specifica.

Inoltre, dati recenti indicano che la metilazione del DNA ha un ruolo diretto nella regolazione del auto-rinnovamento delle HSC e dà un contributo nel destino delle cellule verso una linea linfoide o mieloide. I promotori dei geni deputati a mantenere le cellule in uno stato staminale o di progenitore (come *MEIS1* e *HOXA9*) aumentano progressivamente il loro livello di metilazione, con una conseguente inibizione trascrizionale; in maniera speculare, i promotori dei geni che influenzano la maturazione e il destino cellulare vengono demetilati con conseguente aumento della espressione genica [74, 75]. Nel corso degli ultimi anni, vari lavori basati sulla tecnologia NGS hanno messo in luce nel campo delle neoplasie emopoietiche alterazioni somatiche a carico di geni coinvolti nei processi epigenetici [76].

1.12.1 Metilazione del DNA

La metilazione del DNA avviene tipicamente nelle isole CpG: regioni insolitamente arricchite in dinucleotidi CpG e consiste nell'aggiunta di un gruppo metilico (CH₃) alla posizione 5' dell'anello pirimidinico della citosina, formando 5-metilcitosina (5-mC). La metilazione delle isole CpG in prossimità dei promotori inibisce la trascrizione genica reclutando sia proteine specifiche per il DNA metilato sia enzimi deputati al rimodellamento cromatinico.

Un esempio di DNA metiltransferasi è DNMT3A, proteina espressa ad alti livelli nelle cellule staminali emopoietiche.

Al contrario di DNMT3A, le proteine della famiglia TET (1-3) sono enzimi che catalizzano la produzione di 5-idrossimetil-citosina (5-hmC) a partire da 5-metil-citosina (5-mC), portando a una demetilazione del DNA, attraverso una reazione dipendente dalla presenza di α -chetoglutarato come substrato [77]. TET1 contribuisce ulteriormente al controllo epigenetico dell'espressione genica attraverso il reclutamento dei membri dei *Polycomb repressive complexes* (PRCs) (Figura 5) [78].

Sono state riportate frequenti mutazioni di *TET2* in pazienti con neoplasie ematopoietiche mieloidi, specialmente in pazienti con CMML dove la mutazione è presente nel 50% dei casi. Mutazioni in *TET2*, come in *DNMT3A*, coinvolgono entrambi gli alleli in meno del 10% dei pazienti, suggerendone

un ruolo oncosoppressivo aploinsufficiente [79]. Esperimenti in vitro hanno dimostrato come il silenziamento trascrizionale di *TET2* interferisca con i processi differenziativi delle cellule emopoietiche; modelli murini *knock-down* per *TET2* presentano un'espansione del compartimento staminale e dei progenitori emopoietici, con tendenza a sviluppare CMML [80, 81].

1.12.2 Enzimi IDH e controllo metabolico

Le proteine IDH1 e IDH2 catalizzano la conversione di isocitrato ad α -chetoglutarato (α -KG), in un passaggio fondamentale del ciclo di Krebs portando alla riduzione di NADP⁺ a NADH [77]. I geni *IDH1/2* sono mutati nelle neoplasie mieloidi dove le mutazioni sono sempre in eterozigosi e i residui amminoacidici maggiormente colpiti sono residui di arginina altamente conservati come R132 e R140 in *IDH1* e R172 in *IDH2*. Queste mutazioni portano ad un mal funzionamento della proteina e quindi alla trasformazione del α -chetoglutarato in 2-idrossi-glutarato (2-HG) e ad un'ossidazione del NADP. L'anormale accumulo di 2HG riduce la disponibilità di α -KG, cofattore indispensabile alle proteine TET e ad altri enzimi coinvolti nella demetilazione del DNA e dei residui istonici di lisina [81].

Le mutazioni dei geni *IDH* e *TET* sono mutualmente esclusive e esperimenti funzionali hanno dimostrato come inducano il medesimo profilo di ipermetilazione; al contrario, le alterazioni di *IDH1* o *IDH2* risultano significativamente associate a mutazioni di *NPM1* e i casi co-mutati appartengono ad un sottogruppo di AML a rischio intermedio con prognosi favorevole [82].

1.12.3 Modificazioni istoniche e rimodellamento della cromatina

Il nucleosoma è l'unità strutturale e funzionale della cromatina e consiste di circa 147 paia di basi di DNA avvolto due volte intorno ad un ottamero istonico costituito da due copie di ciascun istone del core H2A, H2B, H3, e H4. I nucleosomi sono collegati da tratti di " *DNA linker* " e "istoni *linker*", come l'istone H1, che sono coinvolti nella compattazione della cromatina [83]. Modifiche nella coda istonica includono: acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione, acetilazione e altre modificazioni post-traduzionali [84]. La combinazione di queste modifiche, e la loro interazione con la metilazione del DNA e con il rimodellamento della cromatina, regolano la struttura della cromatina in maniera dinamica. Infatti, la cromatina può esistere in uno stato inattivo condensato (eterocromatina) o in uno stato non-condensato e trascrizionalmente attivo (eucromatina) [84].

L'acetilazione e la metilazione delle code istoniche rappresentano i due meccanismi più studiati tra le modificazioni istoniche. L'acetilazione dei residui di lisina sulle code istoniche neutralizza la loro carica positiva e diminuisce la loro affinità per il DNA, portando ad una maggiore accessibilità alla cromatina da parte delle proteine regolatrici della trascrizione. L'istone acetiltransferasi (HATs) e deacetilasi (HDAC) catalizzano rispettivamente l'acetilazione e la deacetilazione della lisina [84].

Nei mammiferi sono noti diciotto enzimi HDAC che sono suddivisi in quattro classi (I-IV). La metilazione sui residui di lisina o arginina delle code istoniche può essere associato ad una condensazione o rilassamento della struttura della cromatina a seconda del diverso sito di metilazione colpito. Un'interazione tra acetilazione e metilazione in specifici residui può ulteriormente influenzare l'attivazione trascrizionale, ad esempio, la di- e tri-metilazione di H3K4 (H3K4me2 o H3K4me3) e l'acetilazione di H3/H4 (H3K9Ac e H4K9Ac) sono generalmente legati a una struttura della cromatina aperta che permette la trascrizione genica, mentre l'ipoacetilazione degli istoni, e la tri-metilazione nel H3K9 (H3K9me3) e nel H3K27 (H3K27me3) sono considerati marcatori repressivi.

Dopo la replicazione, il vecchio *pattern* di metilazione può essere ristabilito nel nuovo filamento di DNA [85].

La proteina KDM6A, chiamata anche UTX (*Ubiquitously Transcribed Tetrapeptide Repeat on Chromosome X*) è un membro della famiglia delle istone-lisina-metiltrasferasi che sono componenti importanti per la regolazione trascrizionale ed anch'essi dipendenti dalla presenza di α -KG. KDM6A, nello specifico, catalizza la demetilazione dei gruppi di- e tri-metili sulla lisina 27 nell'istone H3 (H3K27me3). Questa proteina ha un ruolo fondamentale nello sviluppo embrionale e nella differenziazione tessuto-specifica; un'inattivazione del gene può portare a un disordine ereditario, la sindrome di Kabuki [86].

I *Polycomb repressive complexes* (PRC1 e PRC2) sono complessi proteici atti a regolare l'espressione genica attraverso specifiche modificazioni post-traduzionali della struttura istonica, rivestendo anch'essi un ruolo cruciale nell'embriogenesi e nella differenziazione cellulare.

Il complesso PRC2 è caratterizzato da 3 membri principali (EED, SUZ12, EZH1/EZH2) coinvolti nel silenziamento trascrizionale su specifici istoni attraverso la metilazione di H3K27me3 (Figura 5).

Con la denominazione di PRC1, invece, si indica un complesso dato dalla combinazione di due unità proteiche principali (RING1A e RING1B) e di un'unità secondaria (BMI1, MEL18 o NSPC1). Il PRC1 lega H3K27 metilato ed è coinvolto nel mantenimento della repressione genica mediante l'ubiquitinazione dell'istone H2A e il reclutamento del metiltrasferasi [87].

Nel corso dell'ultimo decennio alterazioni nelle subunità PRC sono state descritte in un'ampia gamma di neoplasie dal momento che, sia l'incremento che la diminuzione di tale attività, sembrano essere potenzialmente oncogenici.

EZH2 e *SUZ12* rivestono un ruolo da oncogeni in numerosi tumori solidi e in alcune neoplasie linfoidi (linfoma a grandi cellule DLBCL), mentre sono oggetto di mutazioni inattivanti, agendo quindi come oncosoppressori, in patologie di linea mieloide (soprattutto in casi di MDS, CMML e mielofibrosi primaria, PMF) [88-90].

Un altro gene implicato indirettamente nel *pathway* di PRC2 è *ASXL1* che risulta alterato in maniera ricorrente in diversi disordini mieloidi (6-30% in AML e 43% in CML); le mutazioni inattivanti del gene compromettono l'attività dell'istone metil-trasferasi con riduzione del livello globale di H3K27me3 e conseguente perdita della repressione di geni specifici [55, 91]. Grazie a studi di immunoprecipitazione cromatinica seguiti da *high-throughput sequencing* (ChIP-seq) è stato dimostrato come ASXL1 interagisca direttamente con PRC2: in particolare il reclutamento di EZH2, in prossimità del DNA, risulta compromesso in assenza di ASXL1 [90-92].

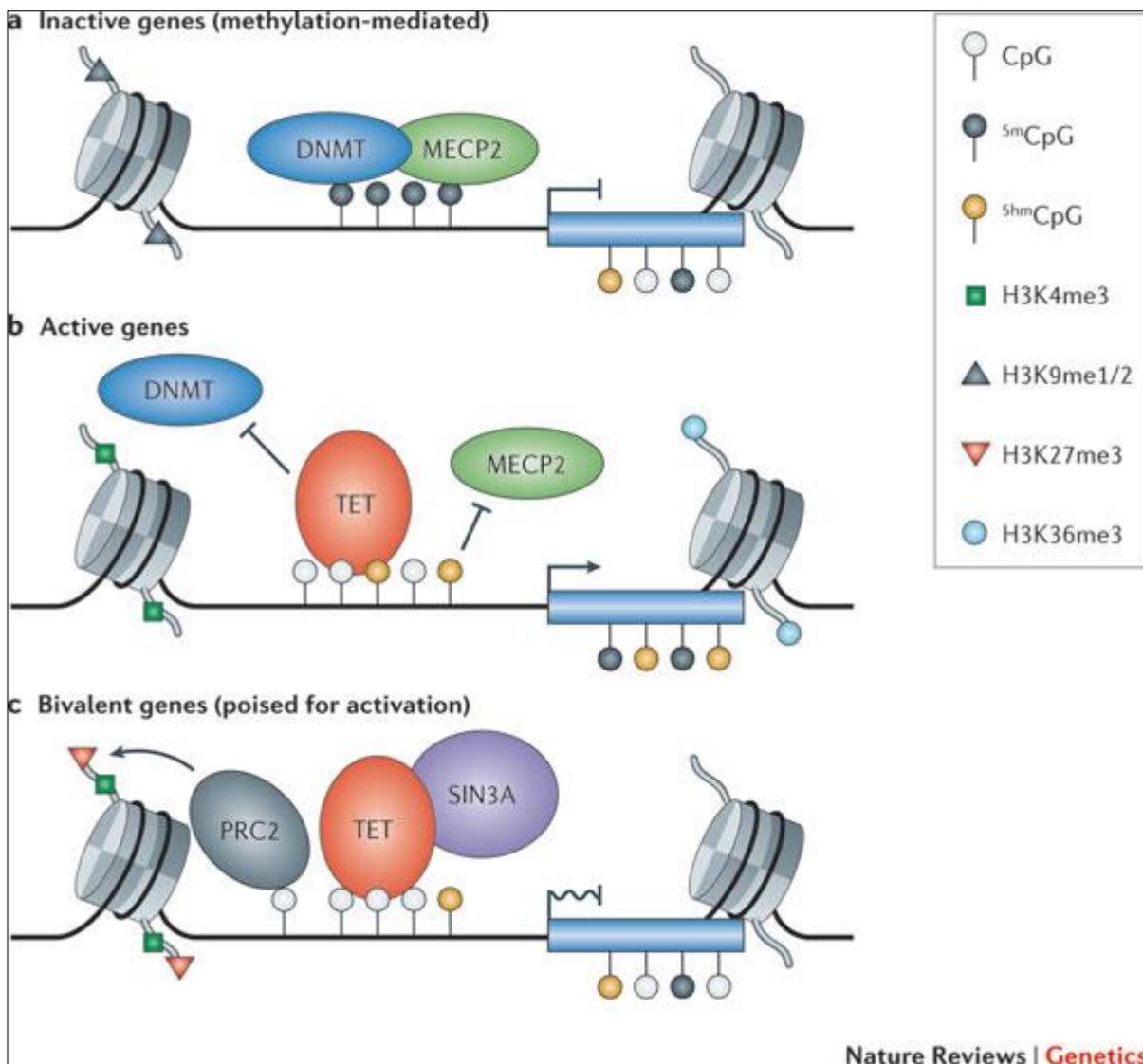


Figura 5: a) La metilazione del DNA in regioni promotrici è normalmente associato con geni silenziati, dove legame di proteine contenenti il dominio metil-CpG (MBD), come MeCP2, alla 5-metilcitosina (5mC) media il rimodellamento della cromatina e la repressione genica. b) L'ossidazione di 5mC a 5-idrossimetilcitosina (5hmC) da parte delle proteine TET può alleviare gli effetti repressivi di 5mC e, non permette quindi a MECP2 di legarsi alla 5hmC. Inoltre, TET può impedire l'accesso al DNA metiltransferasi (DNMTs), contribuendo ulteriormente al mantenimento di un promotore non metilato. c) La 5hmC e gli enzimi TET sono anche associati alla repressione genica attraverso l'interazione con il complesso co-repressore SIN3A. La rimozione di 5mC favorisce anche il reclutamento del complesso repressivo Polycomb 2 (PRC2) e, di conseguenza, la metilazione dell'istone H3 sulla lisina 27 (H3K27me) di geni che sono silenziati ma trascrizionalmente pronti per l'attivazione [93]

Fonte figura: Branco et al, 2012.

1.12.4 Terapia epigenetica

Le modifiche epigenetiche sono generalmente reversibili permettendo cambiamenti specifici nell'espressione genica durante il differenziamento, la divisione cellulare e la riparazione del DNA. Ed è proprio la plasticità intrinseca delle modificazioni epigenetiche che le rende suscettibili ad un intervento farmacologico [94].

La scoperta di mutazioni ricorrenti in modificatori della cromatina in molte neoplasie ematopoietiche, ha fornito ulteriori conoscenze sulla patogenesi delle malattie, nonché lo sviluppo di nuove terapie epigenetiche potenti e dirette. Tra le attuali terapie epigenetiche utilizzate, prevalgono gli inibitori della DNA-Metiltransferasi e gli inibitori delle istone-deacetilasi che sono stati i primi inibitori mirati ad essere stati approvati dalla FDA per il trattamento del cancro negli Stati Uniti. L'Azacitidina e la Decitabina sono analoghi nucleosidici che causano l'inibizione della DNA-metiltrasferasi con conseguente ipometilazione del DNA. Si pensa che questi farmaci agiscano ipometilando geni oncosoppressori andandoli ad attivare; la 5-Azacitidina è utilizzata in prima linea in pazienti con MDS ad alto rischio e sono stati rilevati risultati incoraggianti al termine dei primi studi di fase 2 [94]. Le combinazioni di questi inibitori sono attualmente in corso di valutazione in studi clinici per AML e MDS [95]. Gli inibitori delle istone-deacetilasi (tra cui la Romidepsina) hanno dimostrato un modesto potenziale terapeutico nei primi studi clinici per il linfoma a cellule B, nel mieloma, nelle MDS e nelle AML [96].

E' stato descritto un grosso successo nell'approccio terapeutico in combinazione di una terapia epigenetica con altre classi di inibitori. Gli inibitori delle istone-deacetilasi hanno mostrato promettenti risultati in combinazione con farmaci chemioterapici, inibitori delle proteine da shock termico, proteine del proteasoma e tirosine chinasi [97].

1.13 Modello murino per sperimentazione animale

Negli ultimi anni, sono stati molti gli sforzi effettuati per sviluppare degli animali ottimali per xenotrapianti e quindi per creare modelli animali di malattie umane e per indagare meccanismi coinvolti nella crescita e differenziazione delle cellule tumorali [98].

In passato, sono state studiati diversi ceppi di topi NOD (*Non Obese Diabetic*) immunodeficienti per generare modelli di leucemia mieloide acuta umana (AML) e leucemia linfoblastica acuta (ALL), per indagare come le cellule si trasformano dando vita a queste neoplasie e per valutare la sensibilità ai farmaci. Il NOD.CB17-Prkdc^{scid} (NOD/SCID, NS) è stato il ceppo più utilizzato in questi studi [99, 100]. I topi NOD-SCID IL2-R γ –null (NSG) nei quali è combinata l'immunodeficienza (SCID) con un deficit della catena gamma del recettore IL-2, sono carenti di cellule mature T, cellule B o cellule

NK funzionali, e sono carenti del *signaling* delle citochine e hanno molti difetti di immunità innata che includono un assente sistema del complemento, una riduzione della funzione delle cellule dendritiche, e attività difettosa dei macrofagi.

Più in dettaglio le caratteristiche di un topo NSG sono:

- la mutazione di *Prkdc*, comunemente nota come "SCID" o "immunodeficienza combinata grave", essenzialmente elimina l'immunità adattativa [101]. Questa è una mutazione con perdita di funzione nel gene omologo dell'umano PRKDC nel topo, che codifica per una proteina che ripara le rotture del DNA che si verificano durante la ricombinazione di V (D) J nello sviluppo dei linfociti T e B. Un topo omozigote per la mutazione ha un numero di cellule B mature T gravemente ridotto [101-103].
- La mutazione di *IL2R γ* è una mutazione nulla nel gene che codifica per la catena gamma del recettore dell'interleuchina 2 (*IL2R γ* è l'omologo del *IL2RG* umano). *IL2R γ* è un comune componente dei recettori di superficie delle cellule che legano e trasducono segnali da sei distinte interleuchine. Il *signaling* attraverso il *IL2R γ* è richiesto per la differenziazione e la funzione di molte cellule ematopoietiche. In particolare, l'assenza di *IL2R γ* blocca la differenziazione delle cellule NK, e rimuove così un grave ostacolo che impedisce l'attecchimento efficiente di cellule umane primarie. Queste caratteristiche portano quindi ad un migliore attecchimento delle cellule inoculate rispetto a qualsiasi altro ceppo di topi utilizzato in passato

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Abbiamo eseguito uno studio di WES su un totale di 16 campioni: 15 campioni di pazienti affetti da neoplasia blastica a cellule dendritiche plasmacitoidi (BPDCN) e la linea cellulare CAL-1 al fine di:

- Fornire maggiori informazioni sul panorama delle lesioni geniche somatiche che caratterizzano il genoma codificante del BPDCN;
- Identificare nuove lesioni geniche che meglio possano caratterizzare la patogenesi nel BPDCN;
- Identificare nuovi *pathways* deregolati nella neoplasia;
- Identificare nuovi *marker* genetici come potenziali target terapeutici nel BPDCN.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Selezione dei casi

Grazie ad una collaborazione con altri Centri Ematologici (Brescia, Milano, Pavia, Napoli, Perugia e Genova) sono stati raccolti, presso la Unità Operativa di Emolinfopatia del Policlinico S.Orsola-Malpighi, i campioni relativi a 16 biopsie cutanee di pazienti affetti da BPDCN alla diagnosi (15 con materiale criopreservato e 1 campione fissato in formalina e incluso in paraffina, FFPE) e la linea cellulare CAL-1. Tutti i casi selezionati sono stati diagnosticati come BPDCN in accordo con i criteri presenti nella IV Edizione della *Classificazione per i tumori del sistema emolinfopoietico* della Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO). Di 10 dei 16 pazienti era disponibile anche DNA non tumorale, proveniente dalla saliva. Le principali caratteristiche cliniche dei pazienti sono riportate nella tabella 3.

Campione	Provenienza	Sesso	Età	Tessuto	F. Up	OS (mesi)	Terapia
BPDCN_40	Brescia	F	9	Skin	DOD	71,5	AIEOP AML 2002/HR
BPDCN_32	Brescia	M	73	Skin	DOD	2	CHOP
BPDCN_23	Pavia	M	19	Skin	AWD	44	CHOP + MTX
BPDCN_43	Napoli	M	67	Skin	DOD	6,3	GIFOX
BPDCN_25	Pavia	M	62	Skin	ADF	13,2	Hyper-CVAD
BPDCN_45	Milano	F	66	Skin	DOD	36	Hyper-CVAD
BPDCN_46	Milano	M	29	Skin	ADF	34	Hyper-CVAD
BPDCN_41	Brescia	M	60	Skin	DOD	41,3	ICE
BPDCN_47	Milano	M	78	Skin	ADF	50	Local RT
BPDCN_49	Milano	F	49	Skin	ADF	3	Local RT
BPDCN_42	Brescia	F	73	Skin	DOD	7,6	MICE
BPDCN_37	Genova	M	75	Skin	AWD	8	NA
BPDCN_38	Brescia	M	NA	Skin	LOST	NA	NA
BPDCN_50	Perugia	M	37	Skin	ADF	36	NA
BPDCN_48	Milano	M	69	Skin	DOD	6,4	NILG AML 02/06
BPDCN_39	Brescia	M	89	Skin	LOST	NA	No treatment

Tabella 3.: caratteristiche cliniche pazienti e terapia. *Abbreviazioni:* BPDCN: blastoid plasmacytoid dendritic cell neoplasm; M: maschio; F: femmina; DOD: dead of disease=morto di malattia; AWD: alive with disease=vivo con malattia; ADF: alive disease free=vivo senza malattia; NA: not available=non disponibile; [AIEOP AML 2002/HR]: Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica Protocollo Leucemia Mieloide Acuta bambini ad alto rischio 2002/01[104]; [CHOP]: ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina, prednisone; [CHOP+ MTX]: chemioterapia con alta dose di methotrexate e CHOP; [GIFOX]: gemcitabina, ifosfamide e oxaliplatina; [Hyper-CVAD]: cicli alterati di ciclofosfamide, vincristina, doxorubicina, dexamethasone, methotrexate e citarabina iperfrazionate; [ICE]: idarubicina, citarabina, etoposide; [RT]:radioterapia; [MICE]: mitoxantrone, citarabina, etoposide; [NILG AML 02/06][105], Gruppo Leukemia del Nord Italia Protocollo Leucemia Mieloide

3.2 Estrazione e quantificazione del DNA

Il DNA proveniente sia dalle biopsie cutanee criopreservate che dalle salive è stato estratto utilizzando l'estrattore semi-automatico *MagCore nucleic Acid Extractor* utilizzando il kit per estrazione di DNA da tessuto *MagCore Genomic DNA Tissue Kit* (RBC Bioscience Corp, Taiwan) secondo protocollo.

Ciascun campione è stato trattato con proteinasi K e buffer GT per lisare le cellule e degradare le proteine. In seguito, il DNA è stato purificato mediante biglie magnetiche rivestite di cellulosa e, dopo aver lavato via i contaminanti; il DNA purificato è stato eluito con un tampone di eluizione a basso contenuto di sali.

Il DNA totale del campione FFPE è stato estratto a partire da 3 sezioni di 10 μ di spessore seguendo la stessa procedura dei campioni criopreservati, ma con uno step aggiuntivo in cui il tessuto è stato lavato in *Histoclear* per sciogliere la paraffina. L'*Histoclear* è stato poi rimosso effettuando lavaggi con etanolo. L'aggiunta della proteinasi K e seguente incubazione over-night ha permesso la digestione delle proteine legate covalentemente al DNA. Terminata la fase di preparazione, i campioni sono stati inseriti nell'estrattore semi-automatico.

Il DNA estratto è stato poi quantificato mediante il kit *Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit* (*Invitrogen Life technologies, UK*), un intercalante fluorescente del DNA a doppia elica (dsDNA).

La curva di taratura per la quantificazione del DNA genomico è stata creata usando una quantità nota di DNA a doppia elica di fago *lambda* (λ) diluita in TE per formare 4 campioni *standard* a 1 - 0,1 - 0,01 - 0,001ng/ μ L in un volume finale di 100 μ L. I campioni di DNA genomico da quantificare sono stati diluiti 1:100 (1 μ L di DNA e 99 μ L di TE). La lettura della piastra è stata eseguita mediante lo strumento *Tecan Infinity 2000* (*Tecan Group Ltd, Seestrasse, Manneford*) che, utilizzando filtri di eccitazione a 485nm e di emissione a 530 nm, è in grado di rilevare la fluorescenza, la cui intensità dipende direttamente dalla quantità di DNA presente in ogni campione. La concentrazione dei campioni da quantificare è stata calcolata andando ad interpolare il valore di fluorescenza di questi ultimi alla retta di taratura ottenuta con gli standard a concentrazione nota.

3.3 Linea cellulare CAL-1

La linea cellulare CAL-1 è stata coltivata con un terreno RPMI 1640 contenente 10% siero fetale bovino e 5% di antibiotici penicillina-streptavidina (tutti da Lonza, Milano, Italia) ed incubato a 37°C e 5% CO₂. Il terreno fresco è stato aggiunto ogni 2 giorni, e le cellule sono state coltivate ad una concentrazione finale di 1 \times 10⁶/mL. Una cultura di 5 \times 10⁶ cellule CAL-1 è stata centrifugata e lavata

in PBS, e dal pellet è stato estratto il DNA utilizzando l'estrattore semi-automatico *MagCore nucleic Acid Extractor* utilizzando il kit per l'estrazione di DNA da cellule in coltura. Il DNA estratto è stato quantificato con il kit *Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay*.

3.4 Whole Exome Sequencing (WES)

Per il sequenziamento di tutto l'esoma sono stati selezionati 15 campioni cripreservati 10 dei quali avevano il rispettivo campione normale di riferimento (saliva) e la linea cellulare CAL-1.

Le *libraries* di sequenziamento sono state create utilizzando il kit *Illumina Nextera Rapid Capture Enrichment Kit (Illumina, San Diego, CA, USA)* che permette di sequenziare tutti gli esoni codificanti (circa 37Mb). Questo è un kit detto *all-in-one* in quanto ha sia i reagenti per la preparazione dei campioni che quelli per l'arricchimento esonico (Figura 1 in appendice). Brevemente, 100ng di DNA genomico sono stati "Tagmentati" da trasposoni che contemporaneamente frammentano il gDNA in frammenti di circa 300bp e aggiungono gli adattatori universali per la successiva reazione di amplificazione. A questo punto, attraverso una reazione di ligazione, sono state aggiunte, all'estremità dei frammenti di DNA tagmentato, brevi sequenze di oligonucleotidi chiamati *adapters index sequences* che identificano in modo univoco ogni campione e permettono di mettere insieme più campioni (*pool*) in una stessa *lane* del supporto solido (*flow-cell*, costituita da 8 lane) su cui sono state caricate successivamente le *libraries* per il sequenziamento; l'*adapter*, invece, permette al template di ibridizzarsi sulla *flow-cell* nella fase di sequenziamento.

I prodotti di PCR ottenuti, sono stati purificati per eliminare i prodotti indesiderati e quantificati con il kit *Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay*. La lunghezza media dei frammentati di DNA è stata validata con il *Bioanalyzer 7500* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) che sfrutta il principio dell'elettroforesi capillare permettendo la verifica della distribuzione delle lunghezze dei frammenti.

A questo punto abbiamo combinato le *libraries* in pool di 3 campioni e siamo passati ai successivi due *step* di ibridazione nei quali delle *probes* specifiche per le regioni esoniche hanno catturato la regione di interesse. Un ulteriore lavaggio ha permesso di eliminare i frammenti che non sono stati catturati e infine un ultimo *step* di PCR ha permesso di amplificare il DNA arricchito. A questo punto, le *libraries* pronte per essere sequenziate, sono state nuovamente quantificate con il kit *Quant-iT PicoGreen* e valutate nella qualità con il kit *Agilent 7500 DNA assay*. Le condizioni di PCR e ibridazione sono riportate nelle tabelle 1 e 2 in appendice.

Prima della reazione di sequenziamento è stata eseguita la *clusters generation* attraverso il sistema *cBot* (Illumina, San Diego, CA) che consente l'amplificazione del DNA da sequenziare sulla *flow-cell*. Una reazione di "amplificazione a ponte" ha permesso la formazione di milioni di *cluster* ognuno

dei quali contenente copie identiche di un singolo frammento di DNA.

Dopo la *cluster generation* è stata effettuata la reazione di sequenziamento sullo strumento HiScanSQ (*Illumina, San Diego CA*) che utilizza la chimica SBS (*Sequencing by Synthesis*) per generare delle *reads* di 200 paia di basi *paired-end* ($2 \times 100\text{PE}$). Con questo approccio vengono utilizzati terminatori reversibili per rilevare le singole basi nucleotidiche man mano che vengono incorporate nei filamenti di DNA da sequenziare. Durante ciascun ciclo di sequenziamento, alla catena dell'acido nucleico viene aggiunto un solo deossinucleotide trifosfato (dNTP) marcato. Il nucleotide marcato funge da terminatore reversibile per la sintesi del nuovo filamento di DNA nascente, così dopo ogni incorporazione, la fluorescenza viene rilevata da un sistema ottico che permette di identificare la base incorporata. Infine il nucleotide è sottoposto a scissione enzimatica per consentire l'incorporazione del nucleotide successivo.

3.5 Analisi dei dati WES

L'analisi dei dati prodotti dal sequenziamento dell'esoma è stata effettuata dai bioinformatici della Columbia University (*Department of Biomedical Informatics, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York*). Le *paired ends reads* ottenute sono state allineate ad un genoma umano di riferimento, hg19/NCBI GRCh37, utilizzando il software BWA alignment tool version 0.7.9 [106]. Le varianti di sequenza sono state identificate separatamente per ciascun campione tumorale e non tumorale. La frequenza di ogni variante è stata stimata a partire dal numero totale di *reads* relative alla posizione occupata dalla variante in esame. Per calcolare la distribuzione di probabilità a priori delle frequenze delle varianti è stato utilizzato l'algoritmo SAVI (*Statistical Algorithm for Variant Identification*) creato presso la Columbia University (Figura 2 in appendice) [107].

Partendo dal valore precedente, abbiamo ottenuto un corrispondente intervallo di alta-credibilità (probabilità a posteriori $\geq 1-10^{-5}$) per la frequenza di ogni variante e un intervallo di alta-credibilità per la corrispondente variazione di frequenza tra il tumore e i campioni normali. Le varianti sono state successivamente filtrate rimuovendo le varianti sinonime (ossia variazioni nucleotidiche che non comportano sostituzione aminoacidica), le varianti germinali (ossia presenti nei campioni salivari di controllo) e le forme ritenute come probabili errori di lettura dall'algoritmo SAVI. Per identificare eventuali *SNPs* (noti nella popolazione generale o descritti in condizioni tumorali) i dati sono stati confrontati con i seguenti database: dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP), 1000 genomes (www.1000genomes.org) e COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk>).

Le conseguenze a livello funzionale, dovute alle varianti genomiche osservate, sono state interpretate

con sistemi di predizione come: *SIFT*, *PolyPhen-2 HDIV*, *PolyPhen-2 HVAR* e *MutationTaster* [108].

3.6 Sequenziamento Sanger

Le mutazioni somatiche non silenti selezionate dal WES sono state validate con il sequenziamento convenzionale Sanger sia nel campione tumorale che nel controllo negativo (saliva).

I *primers* utilizzati per l'amplificazione e il sequenziamento Sanger sono stati disegnati con Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Tabella 3 in appendice). I prodotti della reazione di amplificazione effettuata mediante PCR sono stati sequenziati sia in direzione *forward* che *reverse* con ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Version 3)* e con ABI PRISM 3730 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, CA). I cromatogrammi sono stati analizzati con il *software FinchTV version 1.4* (Geospiza) e successivamente studiati manualmente per confrontare la sequenza tumorale mutata e quella normale *wild tipe*.

3.7 Target sequencing

La fase di *target sequencing* è stata condotta in tutti i 16 campioni di BPDCN selezionati e in 7 salive utilizzando la piattaforma MiSeq (Illumina) oltre che nella linea cellulare CAL-1. Abbiamo disegnato un pannello che comprendesse i geni e/o le regioni hot-spot di nostro interesse utilizzando il software online dell'Illumina DesignStudio (<http://designstudio.illumina.com/>) ottenendo così un panel di 614 ampliconi di 250bp relativi a 36 geni (Tabella 4 in appendice). I 36 geni compresi nel pannello sono costituiti da 9 geni identificati con il WES e da 27 geni noti in letteratura per essere frequentemente mutati nei disordini mieloidi o coinvolti nella metilazione del DNA e nel rimodellamento della cromatina.

A disegno ultimato, è stato dato il via alla processazione degli oligo specifici per ciascun amplicone (*CAT*) che sono stati utilizzati nella preparazione delle *libraries*.

Le *libraries* di DNA sono state preparate in accordo con il *TruSeq Custom Amplicon Library kit*, (Illumina) secondo protocollo. In base alla concentrazione del campione è stato dispensato un volume di DNA tra i 10µL e i 15µL al fine di raggiungere una concentrazione di DNA di partenza richiesta di 250ng.

Dopo aver dispensato i campioni è stata eseguita una reazione di ibridazione del pool di oligonucleotidi *Custom (CAT)*. Le condizioni della reazione di ibridazione secondo gradiente sono riportate nella tabella 5 in appendice. Al termine della reazione di ibridazione, i campioni sono stati trasferiti su una piastra (*filter plate*) che permette di intrappolare il DNA target nella membrana e,

con una serie di lavaggi, di eliminare gli oligonucleotidi che non si sono legati. Dopo questi lavaggi è stata effettuata una reazione di estensione-ligazione che mediante l'incubazione a 37 °C per 45 minuti ha portato alla formazione di prodotti contenenti le regioni d'interesse fiancheggiate dalle sequenze richieste per l'amplificazione. Alla fine di questo processo i campioni sono stati eluiti con NaOH 50mM in modo da permettere al DNA di staccarsi dalla membrana. I prodotti così ottenuti sono stati amplificati mediante una reazione di PCR utilizzando *primers* che contengono sequenze campione specifico (index i5 e i7) e sequenze di cattura (P5 e P7) necessarie per la generazione dei cluster sulla *flow-cell*. Le condizioni della reazione di PCR sono riportate nella tabella 6 in appendice. Dopo lo *step* di amplificazione, un'aliquota di DNA delle *libraries* è stata sottoposta ad un controllo qualitativo mediante *Bioanalyzer 7500* (Agilent, Santa Clara, CA, USA). La presenza di un picco di circa 300bp ha confermato l'avvenuta amplificazione delle *libraries* (Figura 3 in appendice). A questo punto è stato eseguito un *clean up* (purificazione) dei prodotti di PCR attraverso l'utilizzo di biglie magnetiche (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter, Inc.). Tutte le *libraries* così ottenute sono state messe insieme in un pool dopo normalizzazione e sono state caricate nel *cartridge*, in cui erano già contenuti tutti i reagenti necessari per la *cluster generation* e per la fase di sequenziamento sul MiSeq (Illumina) attraverso la tecnologia di sequenziamento mediante sintesi (SBS) per generare delle *reads* di 300 paia di basi *paired-end* ($2 \times 150PE$).

3.8 Analisi dei dati di target sequencing

Anche l'analisi dei dati prodotti dal sequenziamento di regioni target (TruSeq Custom Amplicon) è stata effettuata dai bioinformatici della Columbia University (*Department of Biomedical Informatics, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York*) seguendo la stessa pipeline (Figura 2 in appendice) [107]. Come nell'analisi WES, anche in questo caso, siamo andati ad effettuare dei filtri in modo da restringere il numero totali di SNV e da escludere i possibili falsi positivi: abbiamo escluso SNV con una frequenza tumorale più bassa del 10%, SNV presenti anche nel DNA germinale (salive), SNV riportati in dbSNP e 1000genomi e quindi descritti come polimorfismi.

3.9 Sviluppo di un modello murino con BPDCN umano

Per questo studio è stato adottato il modello murino NSG (NOD-SCID-IL2R-gammanull) con topi di 6-8 settimane di età, dove, grazie all'assenza di cellule NK, cellule T e cellule B, si può ottenere un miglior attecchimento delle cellule umane rispetto al classico modello NOD/SCID.

Questa sperimentazione è stata effettuata dal gruppo del Dott. Francesco Bertolini presso l'Istituto

Europeo di Oncologia-Fondazione italiana per la Ricerca sul Cancro (FIRC), Istituto di Oncologia Molecolare (IFOM-IEO, Milano, Italia). Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati eseguiti in conformità con le leggi italiane (D.L.vo 26/14 e successive integrazioni) e le linee guida istituzionali. Tutti gli studi in vivo sono stati approvati dal Ministero della Salute italiano.

Per l'induzione del BPDCN nei topi, 5.000 cellule CAL-1 sono state iniettate per via endovenosa (e.v.) attraverso la vena caudale laterale in topi non irradiati.

L'attecchimento è stato definito mediante la percentuale di cellule umane nel sangue periferico dalla vena caudale degli animali riceventi mediante citometria a flusso 30 giorni dopo il trapianto. Il fenotipo delle cellule umane in topi NSG è stata valutata utilizzando i seguenti anticorpi anti-umani: anti-CD38-APC (clone LS198-4-3), anti-CD45-APC-Cy7 (clone J33), anti-CD56-PE (clone N901) (Beckman Coulter) e l'anti-mouse CD45-FITC (clone 30-F11) (BD), in modo da escludere dall'analisi la contaminazione cellule murine.

Dopo l'incubazione con gli anticorpi e la lisi dei globuli rossi, una sospensione di 1×10^6 cellule è stata acquisita tramite un FACSCalibur (BD) e appropriati *gating* sono stati utilizzati al fine di escludere le cellule morte, le piastrine e i detriti. La percentuale di cellule colorate è stata determinata e confrontata con opportuni controlli negativi. Il 7-aminoactinomycin D (7AAD; Sigma-Aldrich) è stato utilizzato per contare le cellule vive, in apoptosi e morte.

3.10 Trattamento

I topi sono stati trattati con dosi specifiche di Azacitidina, Decitabina, Romidepsina e Bortezomib basandosi su esperimenti in vivo già descritti in letteratura [62, 109-112].

Il Bortezomib, la 5-Azacitidina e la 5-Aza-2'-deossicitidina (Decitabina) sono stati forniti da Sigma-Aldrich, la Romidepsina è stata fornita da Santa Cruz; sono stati sciolti in soluzione fisiologica (0,9% w/v di NaCl) e iniettati per via intraperitoneale nei topi: il Bortezomib è stato somministrato a 0,5 mg/kg due volte alla settimana per 4 settimane, l'5-Azacitidina a 5 mg/kg per 5 dosi (intervalli di 2 al giorno), la Decitabina 2,5 mg/kg 3 dosi (intervalli di 2 al giorno) e la Romidepsina 0,5 mg/kg ogni altro giorno per 4 settimane.

La somministrazione è partita un giorno dopo l'iniezione della linea cellulare CAL-1. I topi sono stati monitorati quotidianamente per la sopravvivenza fino al raggiungimento di endpoint umani.

Uno schema dell'approccio terapeutico scelto è riportato nella tabella 4.

Farmaco	Dosi (30 giorni di trattamento)	Ref.
DECITABINA	2.5 mg/kg i.p. (3 dosi, intervallo di 2 giorni)	[62]
ROMIDEPSINA	4.4 mg/kg e.v. una volta a settimana per 3 settimane (giorni 7, 14 e 21)	[109]
BORTEZOMIB	1.0 mg/kg i.p. 2 volte a settimana per 2-4 settimane	[110]
5-AZACYTIDINA	5 mg/kg i.p. (5 dosi, intervalli di 2 giorni)	[111]

Tabella 4: schema trattamento topi. Abbreviazioni=i.p.: intraperitoneale; e.v.: endovena; p.o.: per via orale

4.RISULTATI

4.1 Il sequenziamento genico ad alta risoluzione rivela nel BPDCN la presenza di mutazioni in 1174 geni “cancer-related”

Negli ultimi anni il nostro gruppo di ricerca ha raccolto un prezioso *dataset* di 16 casi di BPDCN da analizzare con il sequenziamento genico ad alta risoluzione. I 16 campioni sono stati selezionati sulla base di criteri di eleggibilità preanalitica sia quantitativi (componente neoplastica >80% del materiale in esame) che qualitativi (buona preservazione degli acidi nucleici) come riportato in tabella 7 in Appendice. Questi pazienti mostravano: un'età media di 57 anni (range tra 9 e 89 anni), una predominanza di soggetti di sesso maschile (rapporto maschio:femmina di 12:4) e caratteristiche lesioni della pelle. A causa della mancanza di un approccio terapeutico standardizzato, per i vari pazienti sono state seguite strategie differenti: chemioterapia convenzionale o chemioterapia combinata a trattamenti molto aggressivi, sfortunatamente con risultati poco favorevoli. Più del 50% dei pazienti (10/16) sono morti o persi *al follow up* (tabella 3). Ciascun paziente ha seguito un regime terapeutico diverso e nessuno di questi ha portato ad una remissione completa senza recidiva, da qui la necessità di trovare una terapia specifica ed ottimale per questo tipo di neoplasia.

Per la prima volta il nostro gruppo ha effettuato un sequenziamento dell'intero genoma codificante di un gran numero di pazienti di BPDCN (10 appaiati con DNA *germline* e 5 non appaiati) e della linea di cellule CAL-1.

Mediante il sequenziamento dell'intero esoma sono stati prodotti in media 69 milioni di *reads paired ends* per campione, con un *coverage* medio di 48x; circa il 71% dell'esoma è stato sequenziato con un *coverage* di 20x. Tutte le *libraries* hanno passato il controllo di qualità.

Per identificare solo le mutazioni collegate alla neoplasia e che quindi siano state acquisite durante la trasformazione neoplastica, abbiamo seguito un approccio di filtraggio molto stringente, soffermandoci solo sulle mutazioni non sinonime, escludendo SNV con una frequenza tumorale più bassa del 10%, SNV presenti nel DNA delle salive (specifiche dell'eterogeneità dell'individuo), SNV riportati in dbSNP e 1000genomi e quindi descritti come polimorfismi. Abbiamo selezionato un totale di 1318 SNV distribuite con una media di 21,5 SNV nei 10 campioni appaiati con la saliva, una media di 153,2 SNV nei 5 campioni senza controllo normale e un totale di 343 SNV nella linea cellulare CAL1. Questi SNV insistono su un totale di 1179 geni e tutti tranne 5 sono associati al cancro e inclusi nel Cosmic database (*Cosmic_v66_Gene*).

Le mutazioni non silenti candidate sono state soggette a validazione mediante *Sanger sequencing* dei prodotti di PCR ottenuti sia dal campione tumorale che dalla rispettiva saliva utilizzando *primers* specifici per ciascuna regione che contiene la variante. Un esempio di validazione è rappresentato da due mutazioni nonsense nei geni *SUZ12* e *ASXL1* coinvolti nel rimodellamento cromatinico e nel silenziamento genico e fondamentali per il corretto funzionamento del PRC2.

Un paziente presentava sia una sostituzione T/A nell'esone 13 di *ASXL1* (predittiva di un codone di stop in posizione aminoacidica L775*), che una sostituzione C/T nell'esone 16 di *SUZ12* (anche essa predittiva di un codone di stop, in posizione aminoacidica R654*): la presenza di un codone di stop porta alla formazione di un prodotto proteico troncato, potenzialmente difettivo da un punto di vista funzionale (figura 6).

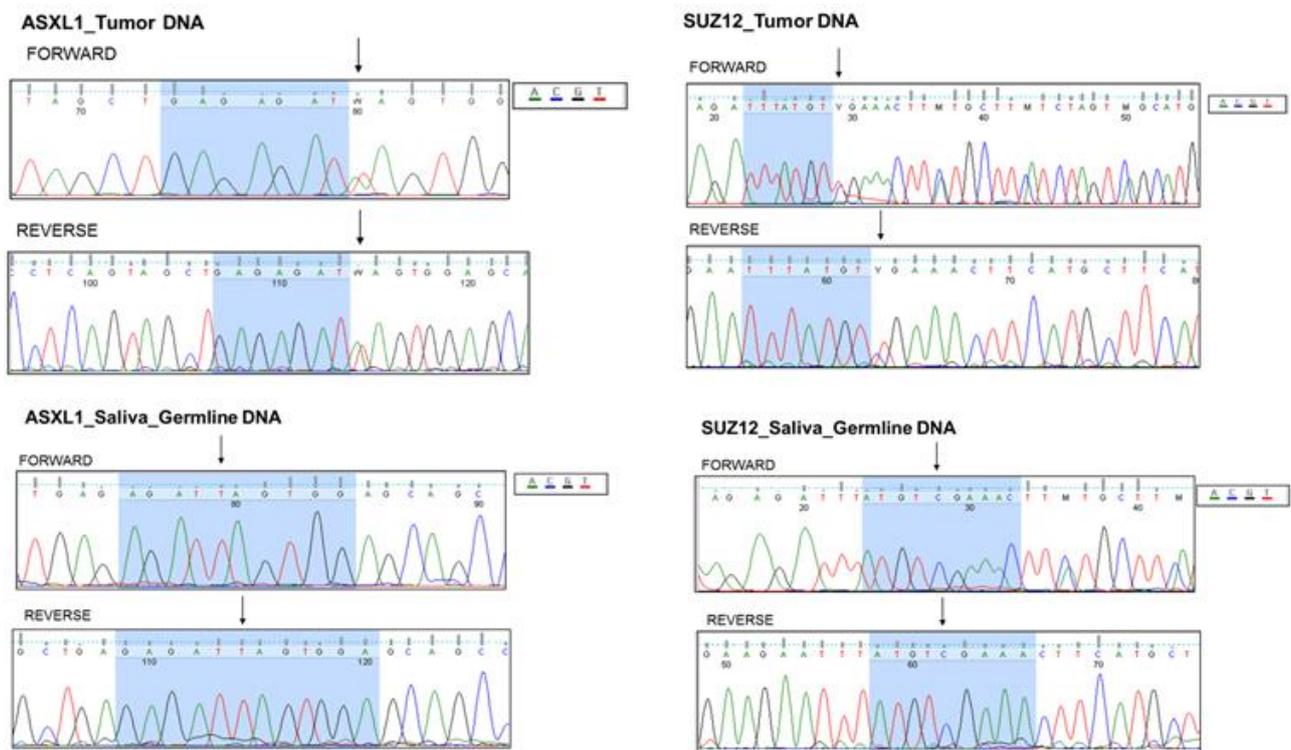


Figura 6.: Validazione con Sanger Sequencing delle SNV in *ASXL1* e *SUZ12* identificate con il WES. Si osserva una sostituzione T/A nell'esone 13 di *ASXL1* (mutazione in eterozigosi W indicata dalla freccia nei due *strand* del campione tumorale ed assente nella saliva). Lo stesso campione possiede una sostituzione C/T nell'esone 16 di *SUZ12* (anche essa mutazione in eterozigosi Y indicata dalla freccia nei due *strand* del campione tumorale ed assente nella saliva).

Dopo la validazione tecnica tramite il sequenziamento Sanger, siamo andati a validare, con un metodo di sequenziamento NGS con alto *coverage* (piattaforma Miseq) le mutazioni più interessanti identificate con il WES e abbiamo investigato anche ulteriori geni o regioni hotspot già riportate nel BPDCN o nelle neoplasie mielodisplastiche.

Complessivamente, il sequenziamento con piattaforma Miseq è stato effettuato in 24 casi: 16 campioni tumorali (15 criopreservati già sequenziati con il WES e un campione FFPE aggiuntivo), 7 campioni normali (salive di 7 pazienti) e la linea cellulare CAL-1.

Mediante il sequenziamento su piattaforma MiSeq è stato raggiunto un *coverage* medio di 1586X (tra 80X e 3500X) e circa il 65% delle regioni target è stato sequenziato con un *coverage* di almeno 10x. Dopo i vari filtraggi abbiamo ottenuto un totale di 833 SNV nei 36 geni selezionati con una media

per paziente di circa 49 SNV. A differenza dell'analisi WES con il *target sequencing* quasi tutti i geni sono mutati più volte e in più campioni:

Un totale di 22/23 SNV in 9 geni (95.6%) trovate in WES e interrogate nel *target sequencing*, sono state confermate; 15 di queste SNV sono in geni legati al *pathway* del rimodellamento cromatinico (*ASXL1*, *TET2*, *SUZ12*, *IDH2*). E' stato interessante notare che molte di esse (50%) fossero delle mutazioni *nonsense* e quindi con acquisizione di un codone di stop (tabella5).

Caso	Posizione	ref/var	Gene	CCDS	AA	Tipo mutazione	Validatione MiSeq S/N
BPDCN_38	chr20:31022643	G/T	ASXL1	CCDS13201.1	G710*	Nonsense	S
BPDCN_48	chr20:31022643	G/T	ASXL1	CCDS13201.1	G710*	Nonsense	S
BPDCN_39	chr20:31022839	T/A	ASXL1	CCDS13201.1	L775*	Nonsense	S
BPDCN_49	chr20:31023408	C/T	ASXL1	CCDS13201.1	R965*	Nonsense	S
BPDCN_42	chr4:106157407	C/T	TET2	CCDS47120.1	Q770*	Nonsense	S
BPDCN_38	chr4:106158108	G/A	TET2	CCDS47120.1	W1003*	Nonsense	S
BPDCN_48	chr4:106158108	G/A	TET2	CCDS47120.1	W1003*	Nonsense	S
BPDCN_42	chr4:106193934	C/T	TET2	CCDS47120.1	Q1466*	Nonsense	S
BPDCN_37	chr4:106196213	C/T	TET2	CCDS47120.1	R1516*	Nonsense	S
BPDCN_39	chr17:30325762	C/T	SUZ12	CCDS11270.1	R654*	Nonsense	S
BPDCN_25	chrX:15841035	C/G	ZRSR2	CCDS14172.1	Y373*	Nonsense	S
BPDCN_47	chr20:31023472	A/G	ASXL1	CCDS13201.1	N986S	Missense	S
BPDCN_42	chr12:25398262	C/G	KRAS	CCDS8702.1	L19F	Missense	S
CAL1	chr12:25398284	C/G	KRAS	CCDS8702.1	G12A	Missense	S
BPDCN_43	chr1:115258747	C/G	NRAS	CCDS877.1	G12A	Missense	S
BPDCN_41	chr1:115258748	C/T	NRAS	CCDS877.1	G12S	Missense	S
BPDCN_23	chr7:140481402	C/G	BRAF	CCDS5863.1	G469A	Missense	S
BPDCN_46	chr7:140481417	C/A	BRAF	CCDS5863.1	G464V	Missense	N
BPDCN_50	chr17:16852132	C/T	TNFRSF13B	CCDS11181.1	R122Q	Missense	S
BPDCN_25	chr15:90631934	C/T	IDH2	CCDS10359.1	R140Q	Missense	S
BPDCN_25	chr20:31022441	-/G	ASXL1	CCDS13201.1	G642+	Frameshift	S
BPDCN_41	chr4:106157069	-/A	TET2	CCDS47120.1	S657+	Frameshift	S
BPDCN_43	chr4:106158349	-/A	TET2	CCDS47120.1	Q1084+	Frameshift	S

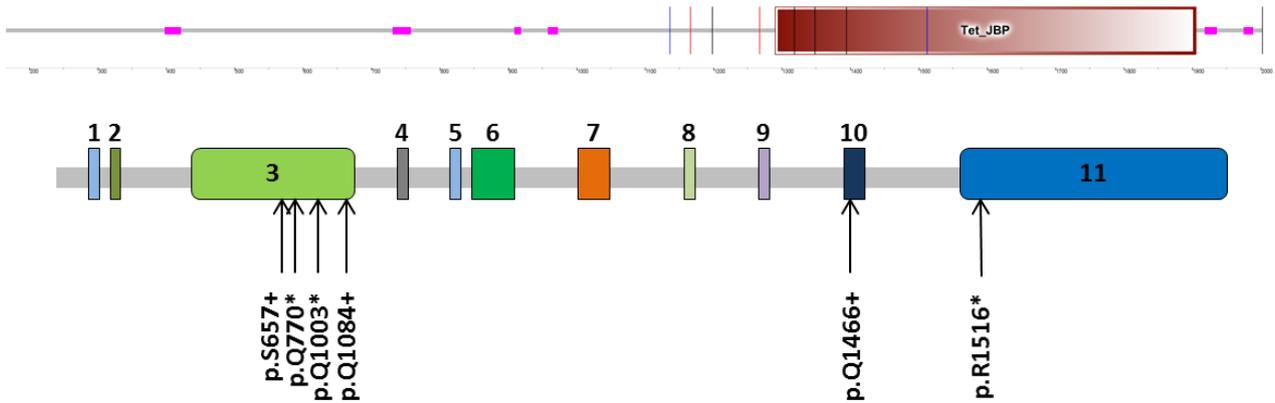
Tabella5.: SNV identificate con WES e confermate in Miseq. 15 SNV sono in geni legati al *pathway* del rimodellamento cromatinico (*ASXL1*, *TET2*, *SUZ12*, *IDH2*) inoltre molte di esse (50%) sono delle mutazioni *nonsense* e quindi con acquisizione di un codone di stop (riquadro in rosso).

4.2 Quasi tutti i campioni di BPDCN analizzati presentano una o più lesioni del pathway epigenetico

Analizzando i dati del WES, abbiamo poi concentrato la nostra attenzione sui geni mutati in più di un campione e abbiamo identificato *ASXL1* e *TET2* come i geni più ricorrentemente mutati nei campioni: *ASXL1* è mutato in 6/15 pazienti con un totale di 5 SNV, delle quali 3 sono mutazioni *nonsense* (una stessa SNV è presente in due pazienti), una è non sinonima ed una è una mutazione *frameshift*. Tutte queste mutazioni cadono nel dominio attivo della proteina e quindi questa potrebbe aver subito dei danni funzionali. *TET2* è mutato in 6/15 pazienti con un totale di 6 SNV, 4 *nonsense* e 2 *frameshift*, anche in questo caso vanno a danneggiare l'attività della proteina (Figura 7). Tra i geni con minore ricorrenza abbiamo identificato *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *SUZ12*, etc.

A partire dai nostri risultati, che vedono come geni più mutati due regolatori epigenetici coinvolti nel rimodellamento cromatinico (*ASXL1* e *TET2*), e dai suggerimenti della letteratura che documenta la presenza nel BPDCN di mutazioni in regolatori epigenetici [55, 58], abbiamo deciso di esplorare questo pathway in modo più approfondito. Grazie ai dati di sequenziamento dell'esoma abbiamo potuto approfondire la nostra indagine su diverse classi di regolatori del rimodellamento cromatinico (metiltransferasi, demethyltransferase, acetiltrasferasi proteine che legano la cromatina, proteine con legami ai bromodomini, etc...) ed effettivamente abbiamo visto che quasi tutti i pazienti, compresa la linea cellulare CAL1, avevano mutazioni puntiformi in almeno un gene appartenente a questo pathway (Figura 8). Inoltre, ogni singola SNV identificata, cade all'interno di domini funzionali o prima di essi, portando quindi ad un possibile danno funzionale della proteina e all'alterazione del pathway. (Tabella 8 in appendice).

TET2



ASXL1

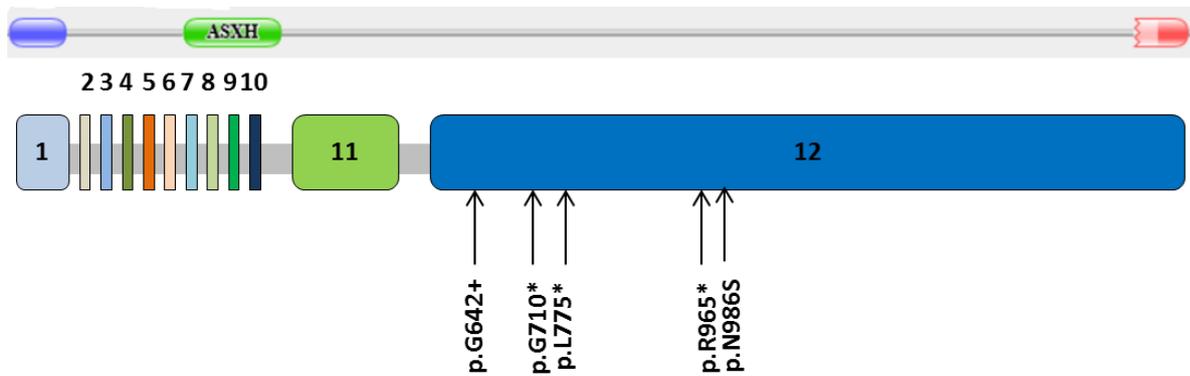


Figura 7.: Rappresentazione delle SNv identificate in *TET2* e *ASXL1*. *TET2* riporta 6SNV (3 mutazioni nonsense e 3 frameshift) tutte prima del dominio di interazione con il DNA e di legame con il substrato; *ASXL1* riporta 5 SNV (3SNV nonsense e 1SNV frameshift e 1SNV missense) tutte prima del dominio di riconoscimento del sito target (RARA).

soli e in combinazione. I due inibitori della DNA Metil-transferasi Azacitidina e Decitabina, in passato hanno mostrato significativa attività in tutte le fasi delle varie MDS [95, 113]. Inoltre, basandoci su studi pregressi abbiamo deciso di trattare i topi anche con il Bortezomib [56].

Sono state fatte 2 batterie di esperimenti con 5 topi con BPDCN per ciascun tipo di trattamento.

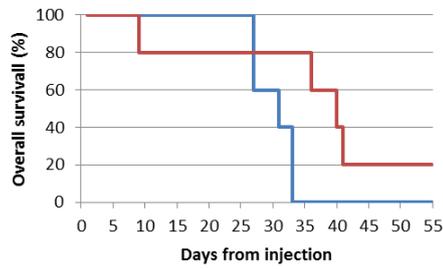
Nella prima batteria di esperimenti, i topi sono stati trattati con i farmaci sopra indicati, sia in singolo che in combinazione sinergica. I topi non trattati utilizzati come controllo, intorno al ventisettesimo giorno dall'inizio dell'esperimento, iniziavano a morire a causa della neoplasia e, al trentatreesimo giorno, il numero dei topi sopravvissuti era pari a zero. Per quanto riguarda i topi trattati, invece, il risultato più significativo a livello statistico è stato dato dal trattamento con Azacitidina (t test, $p < 0.01$), ma la sopravvivenza al 47 giorno è comunque arrivata a zero. Nel trattamento con Decitabina, invece, il 20% dei topi sono sopravvissuti, ma l'esperimento non è stato statisticamente significativo, mentre i topi trattati con Bortezomib e Romidepsina non hanno mostrato miglioramenti a livello di *overall survival* (figura 9a). Nella combinazione di Romidepsina + Decitabina il 20% dei topi trattati è sopravvissuta sino al sacrificio, con una significatività di $p < 0.05$, mentre le altre combinazioni non hanno portato ad una differenza significativa in termini di sopravvivenza rispetto ad i controlli (figura 9b).

In base ai risultati dei primi esperimenti, si è deciso di eliminare il trattamento con Bortezomib che non ha portato ad alcun miglioramento nei topi rispetto al controllo. Abbiamo così ripetuto gli esperimenti somministrando solo Azacitidina Decitabina e Romidepsina (singolarmente e in combinazione doppia o tripla). I topi utilizzati come controllo, avevano una curva molto simile a quella dei controlli del primo esperimento e, al trentasettesimo giorno, il numero dei topi sopravvissuti era pari a zero. Inoltre abbiamo osservato delle curve di sopravvivenza significativamente differenti nei topi trattati con Decitabina, Azacitidina e Romidepsina in singolo rispetto ai controlli non trattati ($p < 0.01$) (figura 9c). Nella combinazione di Romidepsina + Azacitidina il 40% dei topi trattati è sopravvissuta sino al sacrificio, ma senza valore statistico significativo, mentre la combinazione di Decitabina + Azacitidina ha portato ad una sopravvivenza del 60% dei topi alla fine dell'esperimento con una significatività di $p < 0.01$. Le combinazioni Romidepsina+ decitabina e Romidepsina+ Azacitidina+ Decitabina pur avendo un *p-value* significativo ($p < 0.01$), non portano a maggiore sopravvivenza dell'animale rispetto al controllo (figura 9d).

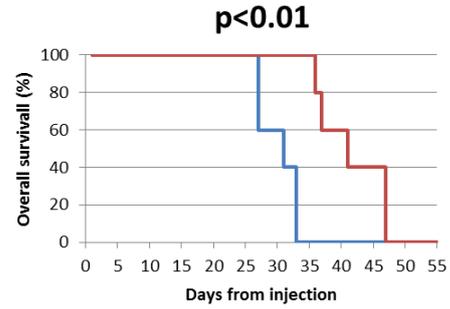
I grafici I+ IIexp, in figura 9e, rappresentano la somma dei dati di sopravvivenza dei due esperimenti appena descritti; se si guardano questi 4 grafici i farmaci più efficaci sembrano essere la Decitabina e l'Azacitidina in singolo mentre la combinazione più efficace, tra quelle eseguite durante gli esperimenti, è stata sicuramente quella con Decitabina + Azacitidina.

I EXP: 5.000 CAL-1 i.v. (5 topi/gruppo)

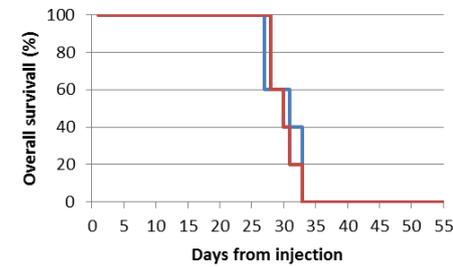
a)



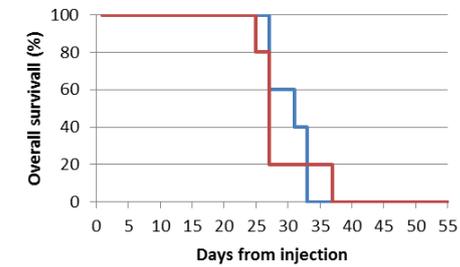
— CTRL
— DECITABINE



— CTRL
— 5-AZACITIDINE

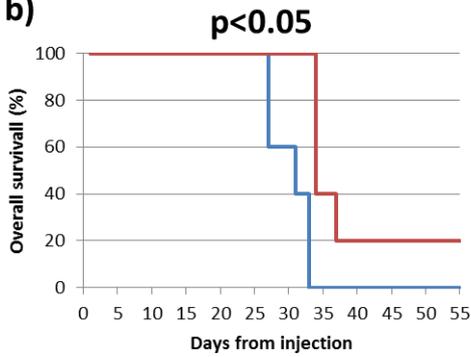


— CTRL
— BORTEZOMIB

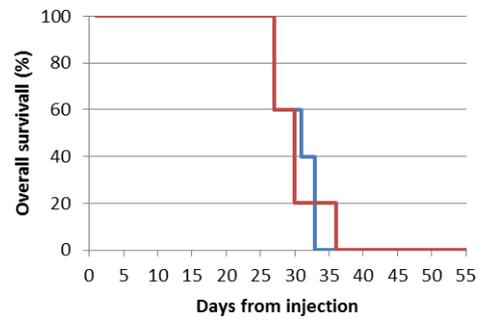


— CTRL
— ROMIDEPSIN

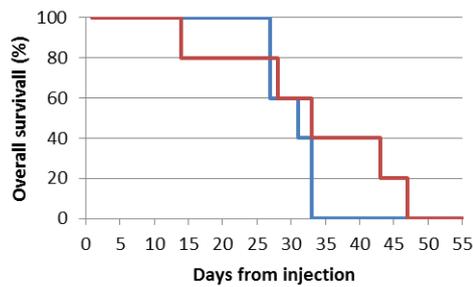
b)



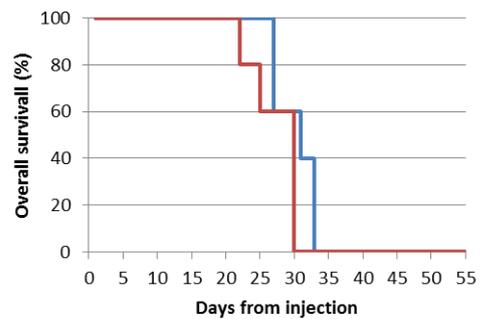
— CTRL — ROMIDEPSIN + DECITABINE



— CTRL — DECITABINE + BORTEZOMIB



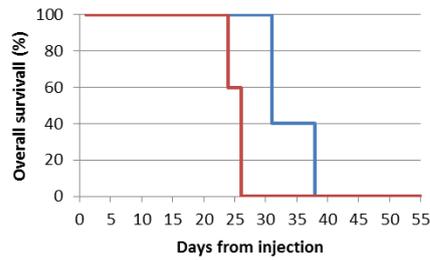
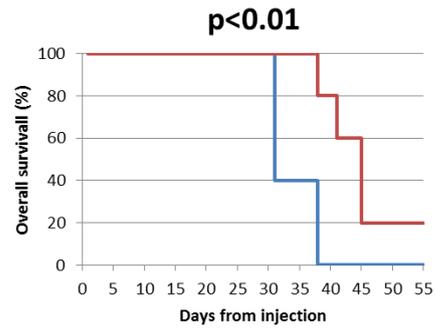
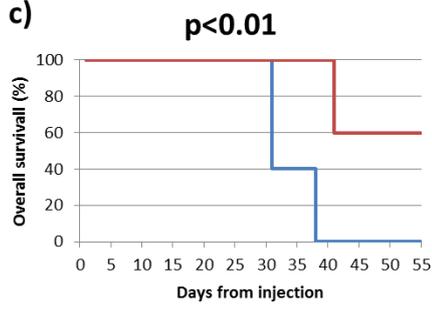
— CTRL
— BORTEZOMIB + ROMIDEPSIN + DECITABINE



— CTRL — ROMIDEPSIN + BORTEZOMIB

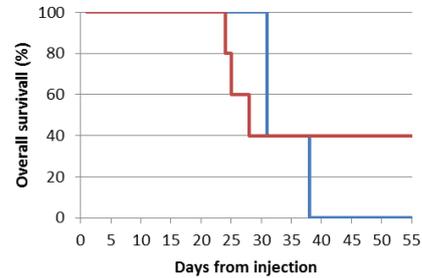
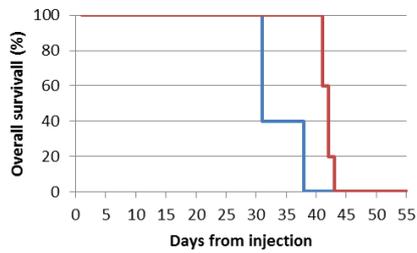
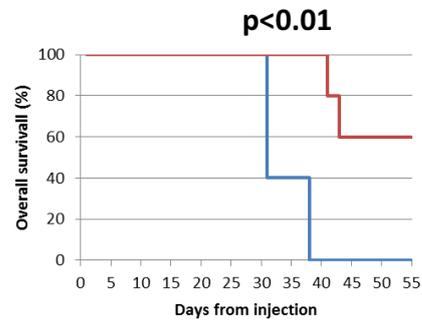
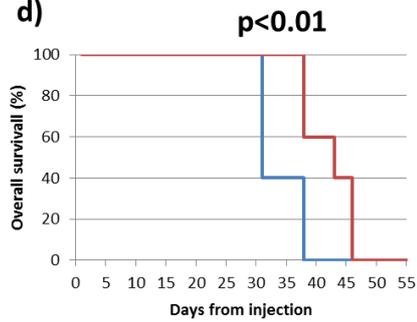
II EXP: 5.000 CAL-1 i.v. (5 topi/gruppo)

c)



p<0.01

d)



p<0.01

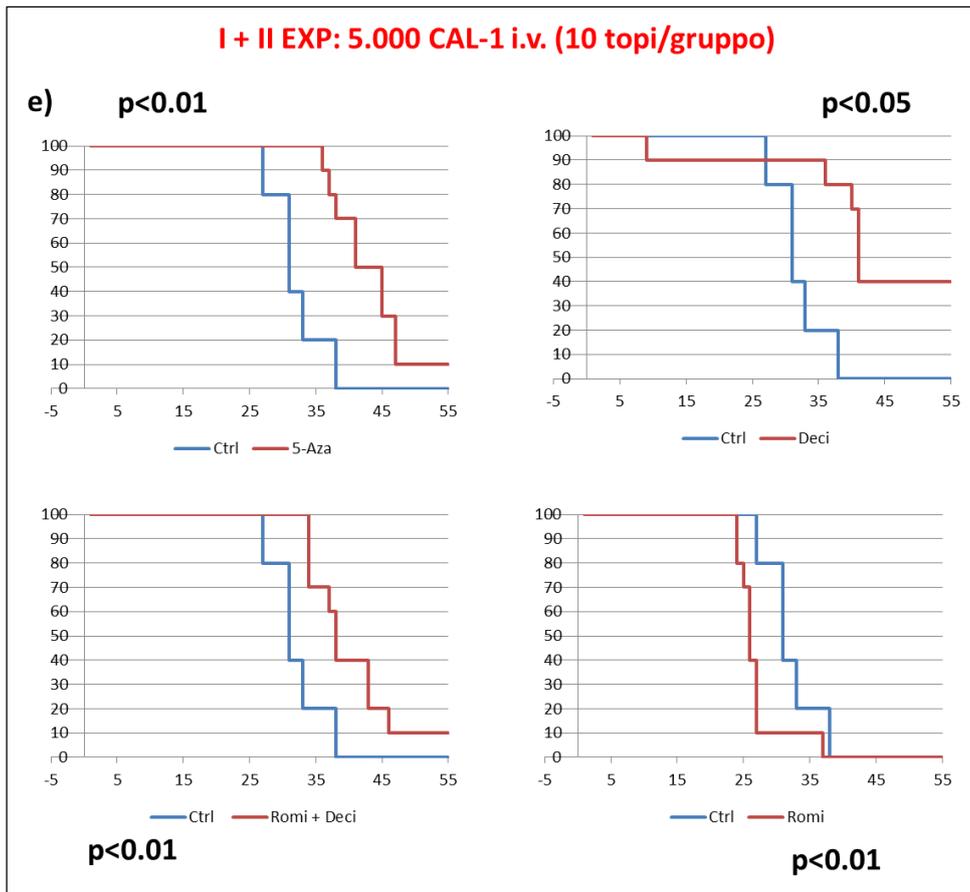


Figura 9: Curve di sopravvivenza dei gruppi di topi trattati e non trattati (Ctrl) con i singoli farmaci e con combinazioni sinergiche dei vari farmaci. Esperimento I con farmaci somministrati in singolo (a) ed in combinazione (b); Esperimento II dopo esclusione di Bortezomib, sempre con farmaci somministrati in singolo (c) ed in combinazione (d); somma dei trattamenti ripetuti negli esperimenti I e II (e).

5. CONCLUIONI

La neoplasia blastica di derivazione dagli elementi dendritici plasmacitoidi è una rara ma aggressiva neoplasia ematologica con una prognosi sfavorevole; la sua incidenza globale è estremamente bassa, pari al 0,44% di tutte le neoplasie ematologiche e lo 0,7% dei linfomi cutanei. Questa neoplasia, inoltre, rappresenta meno del 1% delle leucemie acute e, a causa di tale rarità, la definizione della malattia è stata estremamente difficoltosa. Solo dopo molti anni dalla prima descrizione della neoplasia, la sua istogenesi è stata attribuita ad elementi di origine mieloide, le pDC [1, 56].

PubMed cita poco più di 200 articoli specifici su questa malattia e la maggior parte di essi sono dei *case-report*. Ancora oggi, sono presenti pochi studi relativi alla caratterizzazione molecolare della neoplasia e le nozioni circa le alterazioni genomiche che ne influenzano il destino sono limitate.

I pochi studi che hanno esplorato la genetica del BPDCN hanno mostrato un cariotipo complesso e alterazioni genetiche sporadiche, ma questi contributi sono stati di solito basati su piccole coorti, e non sono stati associati a studi funzionali.

Il gruppo di Lucioni, per esempio, ha identificato alterazioni al livello del cariotipo nei cromosomi 9, 12 e 13 con associata la ridotta espressione di oncosoppressori quali RB1 e LATS2 e un'aumentata espressione degli oncogeni HES6, RUNX2 e FLT3 [50, 52]. Weisner, nel 2010, ha confermato che le delezioni cromosomiche più frequenti nel BPDCN sono quelle che colpiscono i cromosomi 9, 12, 13 e 15. Ulteriori studi hanno identificato delezioni ricorrenti di geni codificanti proteine coinvolte nel controllo della transizione G1/S del ciclo cellulare, quali *RB1* e *LATS2*, *CDKN1B*, *CDKN2A* e *TP53* [53, 54].

Dal 2013 ad oggi sono stati pubblicati solo 3 articoli sul sequenziamento massivo del BPDCN: il primo, un lavoro sul sequenziamento dell'esoma in 3 pazienti con BPDCN, riporta mutazioni in 15 geni mutati già coinvolti in neoplasie mieloidi e con funzioni di particolare interesse, quali: controllo epigenetico (*IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *ATRX*, *EZH2*, *TET1/2*), RAS signaling (*NRAS*, *KRAS*) e splicing (*U2AF1*). Altri due gruppi invece hanno pubblicato dati di target sequencing, riportando ricorrenti mutazioni in geni già identificati in sindromi mielodisplastiche, AML e ALL come *TET2*, *KRAS*, *NRAS*, *IDH2*, *TP53*, *CDKN2A*, *CDKN2B* [57, 58].

Sempre a causa della rarità di questa neoplasia e dai limitati dati di follow-up, non esiste un regime terapeutico standard di prima linea stabilito per i pazienti con BPDCN.

Da uno studio di Pagano emerge che il BPDCN è molto sensibile alla chemioterapia iniziale, con tassi di risposta completa che vanno dal 53% al 89%. Tuttavia, la prognosi resta infausta, anche per i pazienti che raggiungono una remissione completa, a causa dell'alto potere recidivante della malattia. La sopravvivenza mediana va dai 12 ai 27 mesi, con una più alta sopravvivenza nei casi pediatrici o nei pazienti con malattia esclusivamente cutanea. Generalmente i pazienti trattati con un regime *ALL/lymphoma-like* hanno avuto risultati migliori rispetto a quelli che hanno ricevuto il trattamento

AML-like con un tasso di remissione completa pari al 79%, ma la recidiva resta molto frequente con una successiva evoluzione che porta a morte [114]. I risultati più durevoli in termini di sopravvivenza (adattati per età) sono stati ottenuti con regimi ALL-like seguiti da allo-SCT, in caso il trapianto sia stato effettuato in prima remissione completa (CR1). Tuttavia, resta aperta la diatriba circa la terapia di scelta nella popolazione non eleggibile al trapianto (spesso in percentuale non trascurabile, essendo maggiormente colpita la popolazione anziana). Da qui emerge l'esigenza di arrivare a nuove soluzioni terapeutiche [59].

Nonostante la rarità della malattia, dal 2011 al 2015, il nostro gruppo di ricerca è riuscito a collezionare, grazie alla collaborazione internazionale di vari Centri Ematologici, un set di 16 campioni tumorali di BPDCN di pazienti di cui sono note le caratteristiche cliniche.

Come si vede dalla tabella 3 nei Materiali e Metodi, sono stati seguiti diversi approcci terapeutici per i pazienti presi in esame, ma nessuno di questi approcci è stato identificato come il più efficace: tutti i pazienti sono morti per malattia.

Abbiamo così investigato, tramite il sequenziamento massivo, lo stato mutazionale dell'intero esoma di 15 campioni di BPDCN alla diagnosi (10 dei quali avevano anche il campione sano) e della linea cellulare Cal-1. Il nostro è il primo lavoro che esplora l'intero esoma in un numero così ampio di campioni, dove per altro viene messo a confronto il DNA tumorale con quello germinale.

Quasi tutte le SNV identificate cadono su geni che sono riportati nel COSMIC database e che sono coinvolti in importanti processi cellulari e di tumorigenesi.

Tra questi ad esempio abbiamo identificato mutazioni mutualmente esclusive dei geni KRAS e NRAS, entrambi appartenenti al RAS signaling. L'alterazione di questi geni è una caratteristica comune del 25% dei tumori umani ed è molto significativa soprattutto nella patogenesi molecolare delle neoplasie ematologiche. Sono stati fatti sforzi enormi al fine di inibire clinicamente le alterazioni del RAS signaling, ma a causa delle loro proprietà strutturali e biochimiche, le proteine Ras sono dei target estremamente complessi, e quindi l'identificazione di una terapia efficace è ancora una prospettiva lontana [115]. Un altro tra i geni mutati nei campioni di BPDCN è BRAF, anch'esso ricorrentemente alterato nella maggior parte dei tumori (in circa l'8% di tutti i tumori e nel 100% dei casi di hairy-cell leukemia *HCL*). BRAF ha un ruolo fondamentale nella regolazione della proliferazione cellulare e della sopravvivenza [113, 116].

Non è stato trovato un unico gene mutato in tutti i pazienti, ma abbiamo identificato un *pathway* comune che potrebbe concorrere alla patogenesi della neoplasia tramite la combinazione delle varie alterazioni genomiche. Tra i geni più mutati nei campioni sono stati identificati *TET2* e *ASXL1*: due modificatori epigenetici rilevanti, spesso riportati deregolati nelle neoplasie mieloidi e associati alla predisposizione al cancro[117]. La funzione principale di TET2 è quella di portare ad una

demetilazione del DNA catalizzando la produzione di 5-idrossimetil-citosina (5-hmC) a partire da 5-metil-citosina (5-mC). TET2, inoltre, contribuisce al controllo epigenetico dell'espressione genica attraverso il reclutamento dei membri dei *Polycomb repressive complexes* (PRC1 e PRC2): complessi proteici atti a regolare l'espressione genica attraverso specifiche modificazioni post-traduzionali della struttura istonica attraverso la metilazione di H3K27me3 (PRC2) o l'ubiquitinazione dell'istone H2A e il reclutamento del metiltrasferasi (PRC1). Nel corso dell'ultimo decennio alterazioni nelle subunità PRC sono state descritte in un'ampia gamma di neoplasie dal momento che, sia l'incremento che la diminuzione di tale attività, sembrano essere potenzialmente oncogenici [87]. *ASXL1* è un altro gene implicato indirettamente nel *pathway* di PRC2 e risulta alterato in maniera ricorrente in diversi disordini mieloidi (6-30% in AML e 43% in CML); le mutazioni inattivanti del gene compromettono l'attività dell'istone metil-trasferasi con riduzione del livello globale di H3K27me3 e conseguente perdita della repressione di geni specifici [55, 92]. Gli interruttori epigenetici sono suddivisi in diverse classi e lavorano a molti livelli: a livello di modificazione degli istoni, rimodellamento della cromatina, metilazione del DNA, tempi di replicazione e localizzazione nucleare [73]. Avendo quindi a disposizione dati dell'intero esoma e avendo trovato mutazioni in 1179 geni abbiamo deciso di andare ad indagare lo stato mutazionale delle diverse classi di regolatori epigenetici e abbiamo scoperto che quasi tutti i pazienti, compresa la linea cellulare CAL-1, hanno mutazioni in almeno un gene coinvolto nel rimodellamento cromatinico (metiltransferasi, demethyltransferase, acetiltransferasi proteine che legano la cromatina, proteine con legami ai bromodomini, etc..) (Figura 8).

Le modificazioni epigenetiche sono generalmente reversibili permettendo cambiamenti specifici nell'espressione genica durante il differenziamento, la divisione cellulare e la riparazione del DNA ed è proprio la plasticità intrinseca delle modificazioni epigenetiche che le rende suscettibili ad un intervento farmacologico. La scoperta di mutazioni ricorrenti in modificatori della cromatina in molte neoplasie ematopoietiche, ha fornito ulteriori conoscenze sulla patogenesi delle malattie, nonché lo sviluppo di nuove terapie epigenetiche potenti e dirette [94].

Partendo proprio da questo punto siamo andati ad elaborare un modello di interpretazione della neoplasia e abbiamo deciso di procedere con la creazione di modelli murini iniettando la linea cellulare CAL-1 in topi NOD-SCID IL2-R γ -null dove, grazie all'assenza di cellule NK, cellule T e cellule B, si può ottenere un miglior attecchimento delle cellule rispetto al classico modello NOD/SCID [99, 100].

Siamo riusciti ad elaborare questo modello con successo e abbiamo deciso di trattare i topi con farmaci epigenetici come 5-Azacitidina, Decitabina e Romidepsina già utilizzati con successo per altre neoplasie [94, 95]. L'Azacitidina e la Decitabina sono analoghi nucleosidici che causano

l'inibizione della DNA-metiltrasferasi con conseguente ipometilazione del DNA. Si pensa che questi farmaci agiscano ipometilando geni oncosoppressori andandoli ad attivare; la 5-Azacidina è utilizzata in prima linea in pazienti con MDS ad alto rischio e sono stati rilevati risultati incoraggianti al termine dei primi studi di fase 2 [94]. Le combinazioni di questi inibitori sono attualmente in corso di valutazione in studi clinici per AML e MDS [95]. Gli inibitori delle istone-deacetilasi (tra cui la Romidepsina) hanno dimostrato un modesto potenziale terapeutico nei primi studi clinici per il linfoma a cellule B, nel mieloma, nelle MDS e nelle AML[96].

Inoltre basandoci su studi pregressi abbiamo anche deciso di trattare i topi con il Bortezomib [56].

Queste sperimentazioni hanno portato a risultati incoraggianti, specialmente per il trattamento combinato dei topi con Decitabina e Azacidina: una combinazione vincente che ha portato alla riduzione della massa tumorale e ad una maggiore sopravvivenza dei topi trattati rispetto ad i controlli non trattati.

Questi risultati suggeriscono che la strada che stiamo percorrendo potrebbe diventare una valida alternativa agli approcci fin ora seguiti per prolungare la sopravvivenza dei pazienti e quindi che la somministrazione di farmaci demetilanti può offrire una opzione terapeutica di prima linea per i pazienti BPDCN.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Facchetti F, J.D., Petrella T et al., *Blastic plasmacytoid dendritic cells neoplasm*. 4 ed. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, ed 4. Vol. 4. 2008. 145-147.
2. Adachi, M., et al., *High expression of CD56 (N-CAM) in a patient with cutaneous CD4-positive lymphoma*. Am J Hematol, 1994. **47**(4): p. 278-82.
3. Brody, J.P., et al., *Acute agranular CD4-positive natural killer cell leukemia. Comprehensive clinicopathologic studies including virologic and in vitro culture with inducing agents*. Cancer, 1995. **75**(10): p. 2474-83.
4. Petrella, T., et al., '*Agranular CD4+ CD56+ Hematodermic Neoplasm*' (*Blastic NK-Cell Lymphoma*) *Originates From a Population of CD56+ Precursor Cells Related to Plasmacytoid Monocytes*. The American Journal of Surgical Pathology, 2002. **26**(7): p. 852-862.
5. DiGiuseppe, J.A., et al., *Blastic Natural Killer Cell Leukemia/Lymphoma: A Clinicopathologic Study*. The American Journal of Surgical Pathology, 1997. **21**(10): p. 1223-1230.
6. Jacob, M., et al., *CD4+ CD56+ lineage negative malignancies: a new entity developed from malignant early plasmacytoid dendritic cells*. Haematologica, 2003. **88**(8): p. 941-955.
7. Reichard, K.K., et al., *CD4(+) CD56(+) Lineage-Negative Malignancies Are Rare Tumors of Plasmacytoid Dendritic Cells*. The American Journal of Surgical Pathology, 2005. **29**(10): p. 1274-1283.
8. Chaperot, L., et al., *Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3210-3217.
9. Bueno, C., et al., *Incidence and characteristics of CD4(+)/HLA DRhi dendritic cell malignancies*. Haematologica, 2004. **89**(1): p. 58-69.
10. Petrella, T., et al., *Blastic NK-Cell Lymphomas (Agranular CD4+CD56+ Hematodermic Neoplasms): A Review*. American Journal of Clinical Pathology, 2005. **123**(5): p. 662-675.
11. Assaf, C., et al., *CD56-positive haematological neoplasms of the skin: a multicentre study of the Cutaneous Lymphoma Project Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer*. Journal of Clinical Pathology, 2007. **60**(9): p. 981-989.
12. Julia, F., et al., *Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasms: Clinico-immunohistochemical Correlations in a Series of 91 Patients*. The American Journal of Surgical Pathology, 2014. **38**(5): p. 673-680.
13. Weaver, J. and E.D. Hsi, *CD4+/CD56+ hematodermic neoplasm (blastic NK-cell lymphoma)*. Journal of Cutaneous Pathology, 2008. **35**(10): p. 975-977.
14. Bendriss-Vermare, N., et al., *In situ leukemic plasmacytoid dendritic cells pattern of chemokine receptors expression and in vitro migratory response*. Leukemia, 2004. **18**(9): p. 1491-1498.
15. Petrella, T., et al., *CD4+ CD56+ Cutaneous Neoplasms: A Distinct Hematological Entity?* The American Journal of Surgical Pathology, 1999. **23**(2): p. 137-146.
16. Feuillard, J., et al., *Clinical and biologic features of CD4+CD56+ malignancies*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1556-1563.
17. Ascani, S., et al., *CD4-negative variant of CD4+/CD56+ hematodermic neoplasm: description of three cases*. Journal of Cutaneous Pathology, 2008. **35**(10): p. 911-915.
18. Kawai, K., *CD56-negative blastic natural killer-cell lymphoma (agranular CD4+/CD56+ haematodermic neoplasm)?* British Journal of Dermatology, 2005. **152**(2): p. 369-370.
19. Petrella, T., et al., *A CD56-negative case of blastic natural killer-cell lymphoma (agranular CD4+/CD56+ haematodermic neoplasm)*. British Journal of Dermatology, 2004. **150**(1): p. 174-176.
20. Hauswirth, A.W., et al., *Expression of the target receptor CD33 in CD34+/CD38-/CD123+*

- AML stem cells*. European Journal of Clinical Investigation, 2007. **37**(1): p. 73-82.
21. Du, X., M. Ho, and I. Pastan, *New Immunotoxins Targeting CD123, a Stem Cell Antigen on Acute Myeloid Leukemia Cells*. Journal of Immunotherapy, 2007. **30**(6): p. 607-613.
 22. Sumida, K., et al., *Leukemic transformation of Langerhans cell sarcoma*. International Journal of Hematology, 2008. **87**(5): p. 527-531.
 23. Herling, M., et al., *TCL1 expression in plasmacytoid dendritic cells (DC2s) and the related CD4+ CD56+ blastic tumors of skin*. Blood, 2003. **101**(12): p. 5007-5009.
 24. Jähn, P.S., et al., *BDCA-2 signaling inhibits TLR-9-agonist-induced plasmacytoid dendritic cell activation and antigen presentation*. Cellular Immunology, 2010. **265**(1): p. 15-22.
 25. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, a Novel Plasmacytoid Dendritic Cell-specific Type II C-type Lectin, Mediates Antigen Capture and Is a Potent Inhibitor of Interferon α/β Induction*. The Journal of Experimental Medicine, 2001. **194**(12): p. 1823-1834.
 26. Montes-Moreno, S., et al., *SPIB, a novel immunohistochemical marker for human blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms: characterization of its expression in major hematolymphoid neoplasms*. Blood, 2013. **121**(4): p. 643-647.
 27. Lee, E.M., et al., *Efficacy of an Fc-modified anti-CD123 antibody (CSL362) combined with chemotherapy in xenograft models of acute myelogenous leukemia in immunodeficient mice*. Haematologica, 2015. **100**(7): p. 914-926.
 28. Liu, Y.-J., *IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors*. Annual Review of Immunology, 2005. **23**(1): p. 275-306.
 29. Lennert K, Kaiserling E, and M.-H. HK, *T-associated plasma cells*. The Lancet, 1975. **306**(7943): p. 1031-1032.
 30. Facchetti, F., et al., *Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin*. The American Journal of Pathology, 1988. **133**(1): p. 15-21.
 31. Grouard, G., et al., *The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic Cells with Interleukin (IL)-3 and CD40-Ligand*. The Journal of Experimental Medicine, 1997. **185**(6): p. 1101-1112.
 32. Liu, K., et al., *In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis*. Science (New York, N.Y.), 2009. **324**(5925): p. 392-397.
 33. Naik, S.H., et al., *Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo*. Nat Immunol, 2007. **8**(11): p. 1217-1226.
 34. Blom, B., et al., *Generation of Interferon α -Producing Predendritic Cell (Pre-Dc)2 from Human Cd34(+) Hematopoietic Stem Cells*. The Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(12): p. 1785-1796.
 35. Schotte, R., et al., *The ETS Transcription Factor Spi-B Is Required for Human Plasmacytoid Dendritic Cell Development*. The Journal of Experimental Medicine, 2004. **200**(11): p. 1503-1509.
 36. Schotte, R., et al., *The transcription factor Spi-B is expressed in plasmacytoid DC precursors and inhibits T-, B-, and NK-cell development*. Blood, 2003. **101**(3): p. 1015-1023.
 37. Anderson, M.K., et al., *Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage*. Development, 1999. **126**(14): p. 3131-3148.
 38. Kadowaki, N., et al., *Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens*. The Journal of Experimental Medicine, 2001. **194**(6): p. 863-870.
 39. FP, S., K. N, and S.M.e. al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. Science: p. 1835-1837.
 40. Ito, T., et al., *Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2423-2431.
 41. Swiecki, M. and M. Colonna, *Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance*. Immunological reviews, 2010. **234**(1): p. 142-

- 162.
42. Penna, G., et al., *Cutting Edge: Differential Chemokine Production by Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells*. The Journal of Immunology, 2002. **169**(12): p. 6673-6676.
 43. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.-J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells in immunity*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1219-1226.
 44. Hoeffel, G., et al., *Antigen Crosspresentation by Human Plasmacytoid Dendritic Cells*. Immunity, 2007. **27**(3): p. 481-492.
 45. Villadangos, J.A. and L. Young, *Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 352-361.
 46. Farkas, L., et al., *Plasmacytoid Dendritic Cells (Natural Interferon- α/β -Producing Cells) Accumulate in Cutaneous Lupus Erythematosus Lesions*. The American Journal of Pathology, 2001. **159**(1): p. 237-243.
 47. Lande, R., et al., *Characterization and Recruitment of Plasmacytoid Dendritic Cells in Synovial Fluid and Tissue of Patients with Chronic Inflammatory Arthritis*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(4): p. 2815-2824.
 48. Maeda, T., et al., *A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma*. Int J Hematol, 2005. **81**(2): p. 148-54.
 49. Leroux, D., et al., *CD4+, CD56+ DC2 acute leukemia is characterized by recurrent clonal chromosomal changes affecting 6 major targets: a study of 21 cases by the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4154-4159.
 50. Lucioni, M., et al., *Twenty-one cases of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: focus on biallelic locus 9p21.3 deletion*. Blood, 2011. **118**(17): p. 4591-4594.
 51. Riaz, W., et al., *Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: update on molecular biology, diagnosis, and therapy*. Cancer Control, 2014. **21**(4): p. 279-89.
 52. Dijkman, R., et al., *Gene-expression profiling and array-based CGH classify CD4+CD56+ hematodermic neoplasm and cutaneous myelomonocytic leukemia as distinct disease entities*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1720-1727.
 53. Wiesner, T., et al., *Alterations of the Cell-Cycle Inhibitors p27KIP1 and p16INK4a Are Frequent in Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasms*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(4): p. 1152-1157.
 54. Tokuda, K., et al., *CLTC-ALK fusion as a primary event in congenital blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm*. Genes, Chromosomes and Cancer, 2014. **53**(1): p. 78-89.
 55. Menezes, J., et al., *Exome sequencing reveals novel and recurrent mutations with clinical impact in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm*. Leukemia, 2014. **28**(4): p. 823-9.
 56. Sapienza, M.R., et al., *Molecular profiling of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm reveals a unique pattern and suggests selective sensitivity to NF- κ B pathway inhibition*. 2014. **28**(8): p. 1606-16.
 57. Alayed, K., et al., *TET2 mutations, myelodysplastic features, and a distinct immunoprofile characterize blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in the bone marrow*. American Journal of Hematology, 2013. **88**(12): p. 1055-1061.
 58. Stenzinger, A., et al., *Targeted ultra-deep sequencing reveals recurrent and mutually exclusive mutations of cancer genes in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm*. Oncotarget, 2014. **5**(15): p. 6404-13.
 59. Jegalian, A.G., et al., *Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in children: diagnostic features and clinical implications*. Haematologica, 2010. **95**(11): p. 1873-1879.
 60. Bekkenk, M.W., et al., *CD56+ hematological neoplasms presenting in the skin: a retrospective analysis of 23 new cases and 130 cases from the literature*. Annals of Oncology, 2004. **15**(7): p. 1097-1108.
 61. Suzuki, R., et al., *Blastic natural killer cell lymphoma/leukemia (CD56-positive blastic tumor): prognostication and categorization according to anatomic sites of involvement*. Cancer, 2005. **104**(5): p. 1022-31.

62. Agliano, A., et al., *Therapeutic effect of lenalidomide in a novel xenograft mouse model of human blastic NK cell lymphoma/blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(19): p. 6163-73.
63. Laribi, K., et al., *Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: the first report of two cases treated by 5-azacytidine*. Eur J Haematol, 2014. **93**(1): p. 81-5.
64. Angelot-Delettre, F., et al., *In vivo and in vitro sensitivity of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm to SL-401, an interleukin-3 receptor targeted biologic agent*. Haematologica, 2015. **100**(2): p. 223-30.
65. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
66. Swerdlow, H., et al., *Capillary gel electrophoresis for DNA sequencing. Laser-induced fluorescence detection with the sheath flow cuvette*. J Chromatogr, 1990. **516**(1): p. 61-7.
67. Hunkapiller, T., et al., *Large-scale and automated DNA sequence determination*. Science, 1991. **254**(5028): p. 59-67.
68. Wheeler, D.A., et al., *The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing*. Nature, 2008. **452**(7189): p. 872-876.
69. Schloss, J.A., *How to get genomes at one ten-thousandth the cost*. Nat Biotech, 2008. **26**(10): p. 1113-1115.
70. Hodges, E., et al., *Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing*. Nat Genet, 2007. **39**(12): p. 1522-1527.
71. Hoeijmakers, W.M., R. Bártfai, and H. Stunnenberg, *Transcriptome Analysis Using RNA-Seq*, in *Malaria*, R. Ménard, Editor. 2013, Humana Press. p. 221-239.
72. Rehm, H.L., *Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic*. Nat Rev Genet, 2013. **14**(4): p. 295-300.
73. Cedar, H. and Y. Bergman, *Epigenetics of haematopoietic cell development*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(7): p. 478-88.
74. Ji, H., et al., *Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors*. Nature, 2010. **467**(7313): p. 338-342.
75. Broske, A.M., et al., *DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction*. Nat Genet, 2009. **41**(11): p. 1207-15.
76. Shih, A.H., et al., *The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(9): p. 599-612.
77. Aumann, S. and O. Abdel-Wahab, *Somatic alterations and dysregulation of epigenetic modifiers in cancers*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **455**(1-2): p. 24-34.
78. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1*. Science (New York, N.Y.), 2009. **324**(5929): p. 930-935.
79. Delhommeau, F., et al., *Mutation in TET2 in Myeloid Cancers*. New England Journal of Medicine, 2009. **360**(22): p. 2289-2301.
80. Yamazaki, J., et al., *Effects of TET2 mutations on DNA methylation in chronic myelomonocytic leukemia*. Epigenetics, 2012. **7**(2): p. 201-7.
81. Moran-Crusio, K., et al., *Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation*. Cancer Cell, 2011. **20**(1): p. 11-24.
82. Figueroa, M.E., et al., *Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation*. Cancer Cell, 2010. **18**(6): p. 553-67.
83. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8[thinsp]Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-260.
84. Berger, S.L., *The complex language of chromatin regulation during transcription*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 407-412.
85. Imhof, A., *Epigenetic regulators and histone modification*. Briefings in Functional Genomics

- & Proteomics, 2006. **5**(3): p. 222-227.
86. Agger, K., et al., *UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development*. Nature, 2007. **449**(7163): p. 731-4.
 87. Margueron, R. and D. Reinberg, *The Polycomb complex PRC2 and its mark in life*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 343-349.
 88. Varambally, S., et al., *The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer*. Nature, 2002. **419**(6907): p. 624-629.
 89. Score, J., et al., *Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms*. Blood, 2012. **119**(5): p. 1208-13.
 90. Brecqueville, M., et al., *Mutations and deletions of the SUZ12 polycomb gene in myeloproliferative neoplasms*. Blood Cancer Journal, 2011. **1**(8): p. e33.
 91. Schnittger, S., et al., *ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome*. Leukemia, 2013. **27**(1): p. 82-91.
 92. Abdel-Wahab, O., et al., *ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression*. Cancer Cell, 2012. **22**(2): p. 180-93.
 93. Branco, M.R., G. Ficz, and W. Reik, *Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(1): p. 7-13.
 94. Greenblatt, S.M. and S.D. Nimer, *Chromatin modifiers and the promise of epigenetic therapy in acute leukemia*. Leukemia, 2014. **28**(7): p. 1396-1406.
 95. Garcia-Manero, G., et al., *Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3271-3279.
 96. Garcia-Manero, G., *Myelodysplastic syndromes: 2015 Update on diagnosis, risk-stratification and management*. American Journal of Hematology, 2015. **90**(9): p. 831-841.
 97. Yu, C., et al., *The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to STI571*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3765-74.
 98. Agliano, A., et al., *Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains*. Int J Cancer, 2008. **123**(9): p. 2222-7.
 99. McCormack, E., O. Bruserud, and B.T. Gjertsen, *Animal models of acute myelogenous leukaemia - development, application and future perspectives*. Leukemia, 2005. **19**(5): p. 687-706.
 100. Siegler, U., et al., *Activated natural killer cells from patients with acute myeloid leukemia are cytotoxic against autologous leukemic blasts in NOD/SCID mice*. Leukemia, 2005. **19**(12): p. 2215-22.
 101. Blunt, T., et al., *Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation*. Cell. **80**(5): p. 813-823.
 102. Shultz, L.D., et al., *Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice*. J Immunol, 1995. **154**(1): p. 180-91.
 103. Greiner, D.L., R.A. Hesselton, and L.D. Shultz, *SCID mouse models of human stem cell engraftment*. Stem Cells, 1998. **16**(3): p. 166-77.
 104. Pession, A., et al., *Results of the AIEOP AML 2002/01 multicenter prospective trial for the treatment of children with acute myeloid leukemia*. Blood, 2013. **122**(2): p. 170-178.
 105. Intermesoli, T., et al., *High cure rates in Burkitt lymphoma and leukemia: a Northern Italy Leukemia Group study of the German short intensive rituximab-chemotherapy program*. Haematologica, 2013. **98**(11): p. 1718-1725.
 106. Li, H. and R. Durbin, *Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform*. Bioinformatics, 2009. **25**(14): p. 1754-1760.

107. Trifonov, V., et al., *SAVI: a statistical algorithm for variant frequency identification*. BMC Systems Biology, 2013. **7**(2): p. 1-11.
108. Dong, C., et al., *Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies*. Human Molecular Genetics, 2014.
109. Al-Romaih, K., et al., *Decitabine-induced demethylation of 5' CpG island in GADD45A leads to apoptosis in osteosarcoma cells*. Neoplasia, 2008. **10**(5): p. 471-80.
110. Graham, C., et al., *Evaluation of the antitumor efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the histone deacetylase inhibitor depsipeptide in childhood cancer models in vivo*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(1): p. 223-34.
111. Tan, C. and T.A. Waldmann, *Proteasome inhibitor PS-341, a potential therapeutic agent for adult T-cell leukemia*. Cancer Res, 2002. **62**(4): p. 1083-6.
112. Sutherland, M.K., et al., *5-azacytidine enhances the anti-leukemic activity of lintuzumab (SGN-33) in preclinical models of acute myeloid leukemia*. MAbs, 2010. **2**(4): p. 440-8.
113. Tiacci, E., et al., *BRAF Mutations in Hairy-Cell Leukemia*. New England Journal of Medicine, 2011. **364**(24): p. 2305-2315.
114. Pagano, L., et al., *Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with leukemic presentation: an Italian multicenter study*. Haematologica, 2013. **98**(2): p. 239-246.
115. Ward, A.F., B.S. Braun, and K.M. Shannon, *Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies*. Blood, 2012. **120**(17): p. 3397-3406.
116. Abdel-Wahab, O. and C.Y. Park, *BRAF -mutant hematopoietic malignancies*. 2014. 2014.
117. Rocquain, J., et al., *Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias*. BMC Cancer, 2010. **10**(1): p. 401.

7. APPENDICE

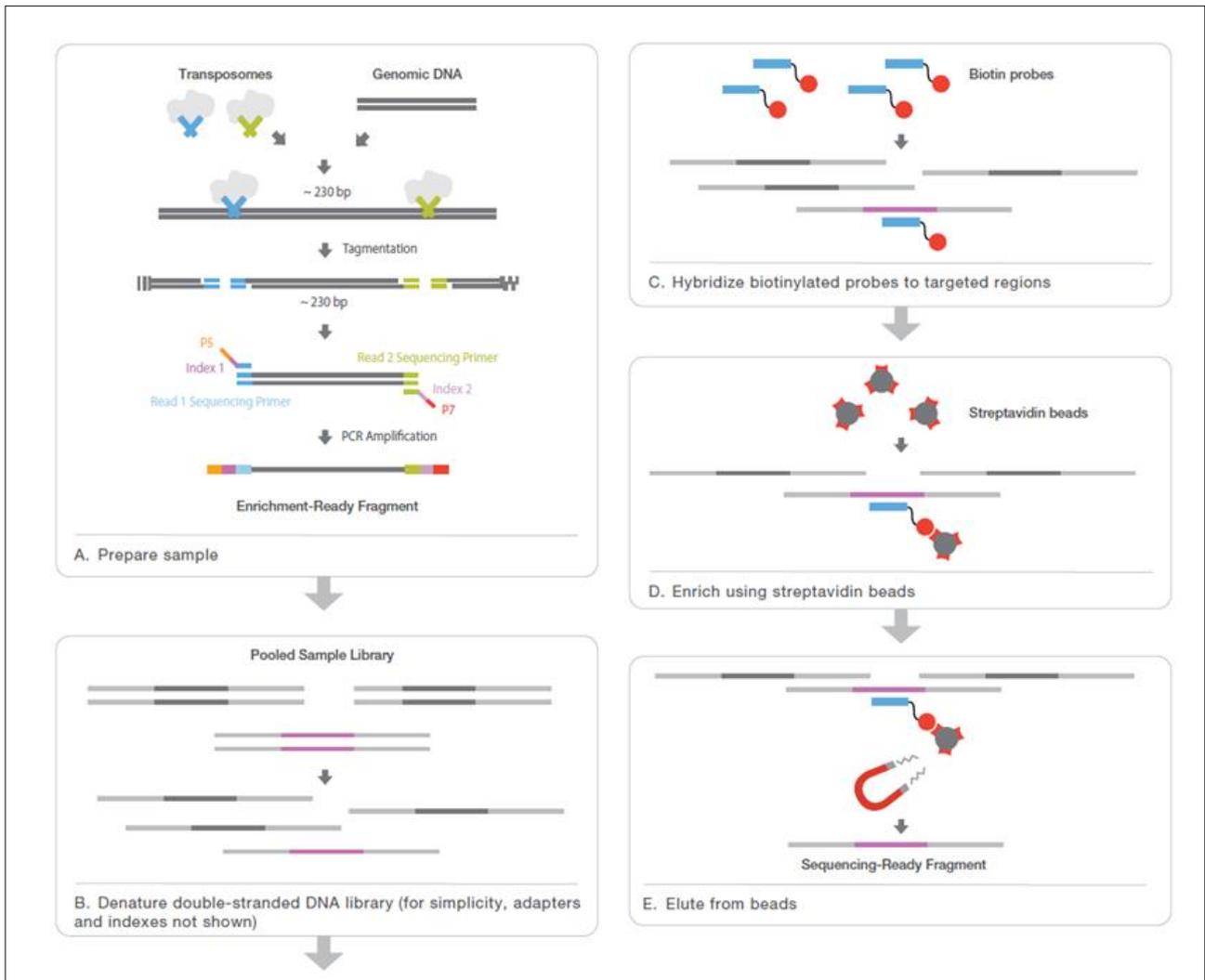


Figura 1: Nextera Rapid Capture workflow.

Fonte: http://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_nextera_rapid_capture_exome.pdf

Temperatura	Tempo	Cicli
72 °C	3 min	
98 °C	30 sec	
98 °C	10 sec	10
60 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	5 min	
10 °C	Hold	

Tabella 1.: Condizioni di temperatura e tempo della reazione di PCR (lid a 100° C) nel sequenziamento Nextera Rapid capture.

Temperatura	Tempo	Cicli	Auto delta
95 °C	10 min		
94 °C	1 min	18	(-2 °C per ogni ciclo)
58 °C	overnight (15 ore)		

Tabella2.: Condizione di tempo e temperature delle reazioni di Ibridazione nel sequenziamento Nextera Rapid capture.

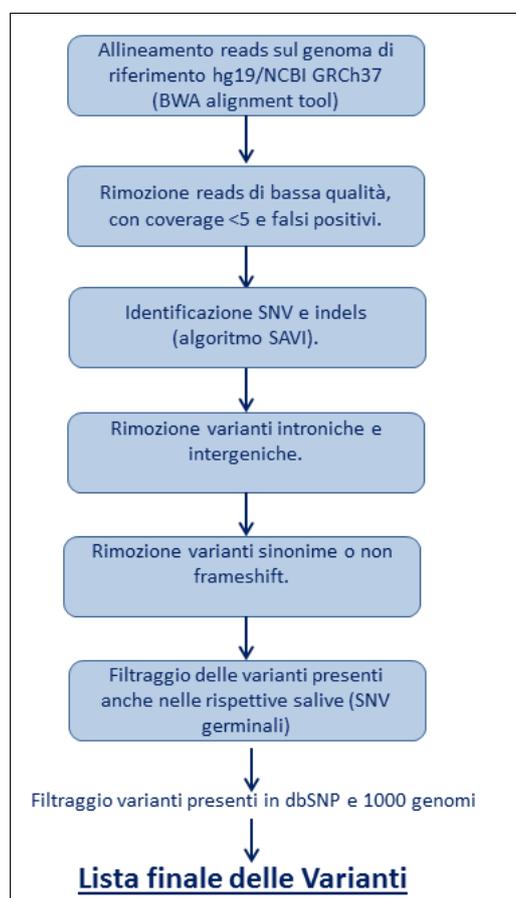


Figura 2.: Workflow analisi dati WES ed identificazione lista varianti mediante l'algoritmo SAVI.

Gene	Primers
ASXL1	Forward: GGACTCACAGATGGGCTAGG Reverse: AGAATGGGACCATTGTCTGC
SUZ12	Forward: TCATGCCTGTATGCTGTTTG Reverse: GAAGCAGATTCCCCCTTTTC

Tabella 3.: Primer per sequenziamento Sanger per validazione di SNV in ASXL1 e SUZ12.

Geni	Regioni selezionate per il Target Sequencing.
KDM6A	tutti gli esoni codificanti
TP53	tutti gli esoni codificanti
PRPF40B	tutti gli esoni codificanti
SF3A1	tutti gli esoni codificanti
EZH2	tutti gli esoni codificanti
SF3B1	Regioni Hot Spot (Esoni 12,13,14,15,16)
SRSF2	Regioni Hot Spot (Esone 1)
U2AF1	Regioni Hot Spot (Esoni 2, 6)
JAK2	Regioni Hot Spot (Esoni 12,14)
CBL	Regioni Hot Spot (Esoni 7, 8, 9)
IDH2	Regioni Hot Spot (Esone 4)
NPM1	Regioni Hot Spot (Esone 12)
IDH1	Regioni Hot Spot (Esone 4)
KRAS	Regioni Hot Spot (Esoni 2, 3)
BRAF	Regioni Hot Spot (Esoni 11, 15)
MPL	Regioni Hot Spot (Esoni 9, 10)
KIT	Regioni Hot Spot (Esoni 8, 10, 11, 17)
PTPN11	Regioni Hot Spot (Esoni 3, 4, 8, 13)
NOTCH1	Regioni Hot Spot (Esoni 26, 27, 34)
ZRSR2	tutti gli esoni codificanti
DNMT3A	tutti gli esoni codificanti
RUNX1	tutti gli esoni codificanti
CEBPA	tutti gli esoni codificanti
TET2	tutti gli esoni codificanti
BCOR	tutti gli esoni codificanti
BCORL1	tutti gli esoni codificanti
ETV6	tutti gli esoni codificanti
PHF6	tutti gli esoni codificanti
FLT3	tutti gli esoni codificanti
TNFRSF13B	tutti gli esoni codificanti

ASXL1	tutti gli esoni codificanti
SUZ12	tutti gli esoni codificanti
U2AF2	tutti gli esoni codificanti
SF1	Regioni Hot Spot (Esoni 1,2,3,4,5, 6,7,8)
NRAS	Regioni Hot Spot (Esone 2)
IKZF1	Regioni Hot Spot (Esoni 2 e3)

Tabella 4.: I 36 geni investigati tramite target sequencing con piattaforma MiSeq.

Temperatura	Tempo	Cicli	Auto delta
95 °C	1 min		
95 °C	2 min	22	(-2 °C per ogni ciclo)
53 °C	3 min	13	(-1 °C per ogni ciclo)
40 °C	Hold		

Tabella 5.: Condizioni di tempo e temperature della reazione di Ibridazione degli oligonucleotidi (CAT) nel sequenziamento Target.

Temperatura	Tempo	Cicli
95 °C	3 min	
95 °C	30 sec	24
66 °C	30 sec	
72 °C	60 sec	
72 °C	5 min	
10 °C	Hold	

Tabella 6.: Condizione di temperatura e tempo della reazione di PCR nel sequenziamento Target .

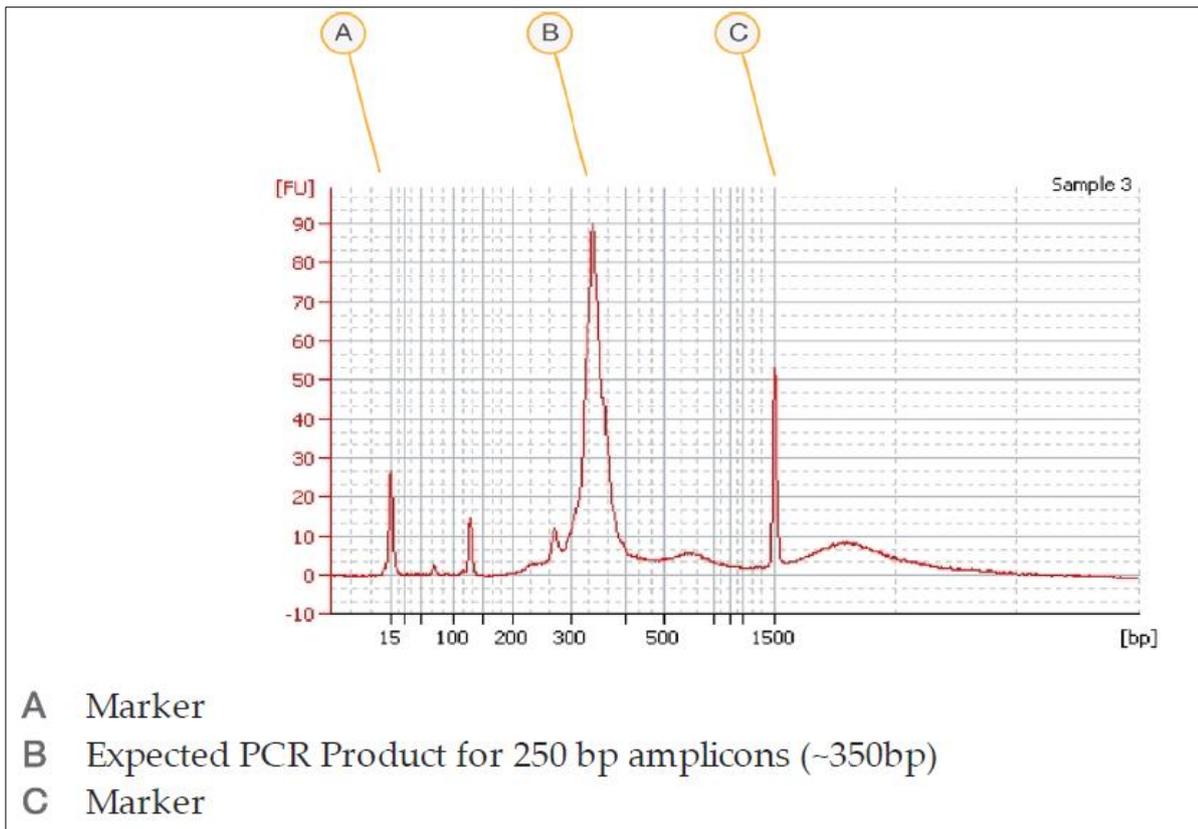


Figura 3.: Esempio di validazione dell'avvenuta amplificazione delle libraries mediante Bioanalyzer 7500 (il picco è a circa 300bp).

Campioni	Wes	Cellule tumorali %	Campioni	Target sequencing	Cellule tumorali %
BPDCN_37	Appaiato con saliva	≥90%	BPDCN_37	Appaiato con saliva	≥90%
BPDCN_38	Appaiato con saliva	≥90%	BPDCN_39	Appaiato con saliva	≥90%
BPDCN_39	Appaiato con saliva	≥90%	BPDCN_40	Appaiato con saliva	≥90%
BPDCN_40	Appaiato con saliva	≥90%	BPDCN_43	Appaiato con saliva	≥90%
BPDCN_43	Appaiato con saliva	≥90%	BPDCN_45	Appaiato con saliva	≥90%
BPDCN_45	Appaiato con saliva	≥90%	BPDCN_46	Appaiato con saliva	≥90%
BPDCN_46	Appaiato con saliva	≥90%	BPDCN_49	Appaiato con saliva	≥90%
BPDCN_47	Appaiato con saliva	≥90%	BPDCN_23	Non appaiato	≥90%
BPDCN_48	Appaiato con saliva	≥90%	BPDCN_25	Non appaiato	≥90%
BPDCN_49	Appaiato con saliva	≥90%	BPDCN_38	Non appaiato	≥90%
BPDCN_23	Non appaiato	≥90%	BPDCN_41	Non appaiato	≥90%
BPDCN_25	Non appaiato	≥90%	BPDCN_42	Non appaiato	≥90%
BPDCN_41	Non appaiato	≥90%	BPDCN_47	Non appaiato	≥90%
BPDCN_42	Non appaiato	≥90%	BPDCN_48	Non appaiato	≥90%
BPDCN_50	Non appaiato	≥90%	BPDCN_50	Non appaiato	≥90%
CAL-1 cell line	Non appaiato	100%	BPDCN_32	Non appaiato	≥80%
			CAL-1 cell line	Non appaiato	100%

Tabella7: campioni selezionati per WES e *Target sequencing*

Gene	chr	AA	tipo di SNV	dettagli	COSMIC
ARID1A					
BPDCN_45	chr1:27106539	W1833*	stop gained	dopo il dominio funzionale	
CHD8					
BPDCN_50	chr14:21854308	R2125W	non synonymous	dopo il dominio funzionale	
BPDCN_23	chr14:21861393	L1835F	non synonymous	dopo il dominio funzionale	
BPDCN_CAL1	chr14:21873903	G731R	non synonymous	dentro il dominio funzionale	
SMARCA5					
CAL1	chr4:144457820	L495*	stop gained	dentro il dominio funzionale	
SMARCAD1					
CAL1	chr4:95173830	N318T	non synonymous	prima del dominio di legame con ATP	
SMARCD1					
BPDCN_25	chr12:50492757	Q508*	stop gained	dentro il dominio funzionale	
TET2					
BPDCN_41	chr4:106157069	S657+	Frameshift	prima del dominio di interazione con DNA	
BPDCN_42	chr4:106157407	Q770*	stop gained	prima del dominio di interazione con DNA	
BPDCN_43	chr4:106158349	Q1084+	Frameshift	prima del dominio di interazione con DNA	
BPDCN_42	chr4:106193934	Q1466*	stop gained	prima del dominio di interazione con DNA	
BPDCN_38	chr4:106158108	W1003*	stop gained	prima del dominio di interazione con DNA	
BPDCN_48	chr4:106158108	W1003*	stop gained	prima del dominio di interazione con DNA	
BPDCN_37	chr4:106196213	R1516*	stop gained	prima del dominio di legame con 2-oxoglutarate	
IDH2					
BPDCN_25	chr15:90631934	R140Q	non synonymous	prima del dominio di legame con substrato	COSM41590
ASH1L					
BPDCN_23	chr1:155448058	R1535C	non synonymous	prima del dominio funzionale	
ASXL1					
BPDCN_25	chr20:31022441	G642+	Frameshift	dentro il dominio di interazione con NCOA1	COSM110710
BPDCN_38	chr20:31022643	G710*	stop gained	prima del dominio di interazione con RARA	
BPDCN_48	chr20:31022643	G710*	stop gained	prima del dominio di interazione con RARA	
BPDCN_39	chr20:31022839	L775*	stop gained	prima del dominio di interazione con RARA	COSM219136
BPDCN_49	chr20:31023408	R965*	stop gained	prima del dominio di interazione con RARA	COSM132978
BPDCN_47	chr20:31023472	N986S	non synonymous	prima del dominio di interazione con RARA	
ASXL3					
BPDCN_46	chr18:31323569	P1253S	non synonymous	prima del dominio funzionale	

MLL2					
BPDCN_47	chr12:49448165	W145C	non synonymous	prima del dominio funzionale	
MLL3					
BPDCN_41	chr7:151843784	V4644G	non synonymous	dentro il dominio C-terminale FYR	
MLL4					
CAL1	chr19:36216708	R1292W	non synonymous	prima del dominio funzionale	
SETMAR					
CAL1	chr3:4345101	E16G	non synonymous	prima del dominio funzionale	
SUZ12					
BPDCN_39	chr17:30325762	R654*	stop gained	dopo il dominio VEFS-box	
JMJD1C					
CAL1	chr10:64974759	D390+	Frameshift	prima del dominio JmjC	
KDM4D					
BPDCN_50	chr11:94731791	R419W	non synonymous	dopo il dominio JmjC	
PHF2					
BPDCN_46	chr9:96429387	S738L	non synonymous	dopo il dominio JmjC	
EP300					
BPDCN_41	chr22:41573648	G1978A	non synonymous	ex 31 hot spot e prima del dominio funzionale	
EP400					
CAL1	chr12:132445627	P155S	non synonymous	prima del dominio HSA	
CAL1	chr12:132471135	S668Y	non synonymous	prima del dominio HSA	
MYST3					
BPDCN_41	chr8:41789947	M1931V	non synonymous	nella regione di attivazione di RUNX1-2	
MYST4					
BPDCN_23	chr10:76784746	R1135C	non synonymous	prima della regione di attivazione di RUNX1-2	
PHC1					
CAL1	chr12:9085218	Q389*	stop gained	prima del dominio SAM	COSM1606741
PHC2					
CAL1	chr1:33836638	A131S	non synonymous	prima del dominio SAM	
EYA2					
BPDCN_46	chr20:45618703	D18E	non synonymous	prima del dominio funzionale	
BPDCN_42	chr20:45702876	P188L	non synonymous	prima del dominio funzionale	
SRCAP					
BPDCN_42	chr16:30732644	P1130S	non synonymous	prima del dominio di interazione con DNA	

Tabella8.: dettagli SNV identificate nel pathway epigenetico di metilazione del DNA e rimodellamento della cromatina.