

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE BIOMEDICHE**

Ciclo XXIX

**Settore Concorsuale di afferenza: 06/D3**

**Settore Scientifico disciplinare: MED/15**

**IL PROFILO TRASCRIZIONALE DEI SARCOMI A  
CELLULE FOLLICOLARI DENDRITICHE RIVELA NUOVE  
EVIDENZE SULL'ISTOGENESI E SUL MICROAMBIENTE  
IMMUNOLOGICO**

**Presentata da: GIOVANNA MOTTA**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Lucio I. Cocco**

**Relatore**

**D.ssa Lucia Catani**

**Correlatore**

**D.ssa Maria Antonella Laginestra**

**Esame finale anno 2017**

# INDICE

## ABSTRACT

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1 Il sarcoma a cellule follicolari dendritiche	2
1.2 Le cellule follicolari dendritiche	2
1.3 Caratteristiche cliniche ed eziologia del sarcoma FDC	4
1.4 Caratteristiche morfologiche ed immunofenotipiche del sarcoma FDC	5
1.5 Caratteristiche molecolari del sarcoma FDC	6
1.6 Terapia del sarcoma FDC	7
1.7 I sarcomi dei tessuti molli	8
1.7.1 Epidemiologia e aspetti clinici	8
1.7.2 Grado e stadiazione	9
1.7.3 Terapia	10
<b>2. OBIETTIVI DELLO STUDIO</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>13</b>
3.1 Selezione dei casi	14
3.2 Estrazione e quantificazione dell'RNA	14
3.3 <i>Gene Expression Profiling</i> (GEP)	15
3.4 Immunoistochimica	15
3.5 Analisi dati	17
<b>4. RISULTATI</b>	<b>20</b>
4.1 I sarcomi a cellule follicolari dendritiche presentano un distinto profilo trascrizionale, correlato a quello delle cellule follicolari dendritiche e diverso da quello degli altri tumori di origine mesenchimale	21
4.2 Il trascrittoma dei sarcomi a cellule follicolari dendritiche è caratterizzato dalla deregolazione di specifici <i>pathways</i> molecolari: trasduzione del segnale, ciclo cellulare, organizzazione della cromatina e della matrice extracellulare	25
4.3 L' <i>immuno landscape</i> dei sarcomi a cellule follicolari dendritiche è caratterizzato da un arricchimento di popolazioni TFH e Treg ed è rappresentato dall'espressione dell' <i>immuno-checkpoint</i> PD-1 – PD-L1/PD-L2	28
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>32</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>35</b>
<b>7. APPENDICE</b>	<b>40</b>



## *Abstract*

Follicular dendritic cell (FDC) sarcomas are rare mesenchymal tumors (MTs) with variable clinical, morphologic and phenotypic characteristics. Transcriptome analysis was performed on multiple FDC sarcomas and compared to other MTs, microdissected Castleman FDCs, and normal fibroblasts. Using unsupervised analysis, FDC sarcomas clustered with microdissected FDCs, distinct from other MTs and fibroblasts. The specific endowment of FDC-related gene expression programs in FDC sarcomas emerged by applying a gene signature of differentially expressed genes (n=1.289) between microdissected FDCs and fibroblasts. Supervised analysis comparing FDC sarcomas with microdissected FDCs and other MTs identified 370 and 2.927 differentially expressed transcripts, respectively, and based on pathway enrichment analysis ascribed to signal transduction, chromatin organization, and extracellular matrix organization programs. Since the transcriptome of FDC sarcomas retained similarity with FDCs, the immune landscape of FDC sarcoma was investigated by applying the CIBERSORT algorithm to FDC sarcomas and non-FDC MTs, and demonstrated that FDC sarcomas were enriched in T follicular helper (Tfh) and T regulatory (Treg) cell populations, as confirmed in situ by immunohistochemistry. The enrichment in specific T-cell subsets prompted investigating the mRNA expression of the inhibitory immune receptor PD-1 and its ligands PD-L1 and PD-L2, which were found to be significantly upregulated in FDC sarcomas as compared with other MTs, a finding also confirmed in situ. Here it is demonstrated for the first time the transcriptional relationship of FDC sarcomas with non-malignant FDCs and their distinction from other MTs



# **1. INTRODUZIONE**

## 1.1 Il sarcoma a cellule follicolari dendritiche

Il sarcoma a cellule follicolari dendritiche (sarcoma FDC) è una rara neoplasia caratterizzata da una presentazione clinica piuttosto variabile ed un elevato grado di eterogeneità morfologica ed immunofenotipica<sup>1,2</sup>. È stato descritto per la prima volta nel 1986 da Monda et al.<sup>3</sup> ed è stato incluso nella IV edizione della Classificazione dei tumori del sistema emolinfopoietico della *World Health Organization* (WHO) nel capitolo delle neoplasie degli istiociti e delle cellule dendritiche. Sebbene per questi sarcomi possa essere ipotizzata un'affinità istogenica con le cellule follicolari dendritiche (FDCs) dei follicoli linfonodali, sulla base di caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche<sup>4</sup>, finora non è stata ancora fornita alcuna evidenza molecolare che potrebbe sostenere la rappresentazione preferenziale di un *landscape* trascrizionale FDC-related rispetto ad altri tumori di origine mesenchimale, né sono mai stati descritti i programmi molecolari caratteristici dei sarcomi FDC.

## 1.2 Le cellule follicolari dendritiche

Le FDCs sono una popolazione di cellule dendritiche che risiedono nel centro germinativo (CG) dei follicoli degli organi linfoidei. La corretta funzione di queste cellule dipende dalla loro capacità di formare nei linfonodi densi reticoli tridimensionali che mantengono l'architettura linfonodale. L'organizzazione di una buona trama reticolare dipende, a sua volta, dalla presenza di un sano microambiente all'interno del centro germinale; infatti, come è stato visto in modelli murini, nessun reticolo di FDCs si sviluppa in caso di grave immunodeficienza<sup>5,6</sup>. La loro funzione è quella di legare e trattenere gli antigeni attraverso l'interazione con il complemento e i complessi immuni, per poi presentare questi antigeni ai linfociti B del CG che iniziano la risposta immunitaria secondaria. Le FDCs sono in grado di conservare l'antigene per molto tempo (da mesi ad anni) intrappolato all'interno dei loro processi dendritici che si intrecciano per formare il reticolo tridimensionale<sup>7</sup>. Essi presentano intatti i complessi antigene-anticorpo sulla loro superficie cellulare senza la necessità del complesso maggiore di istocompatibilità, come fanno di solito le altre cellule presentanti l'antigene<sup>6</sup>. Gli immunocomplessi sono tenuti sulla superficie cellulare da recettori Fc come il CD23 (recettore per le IgE a bassa affinità) e il CD32 o da recettori del complemento come CD21 (C3d) e CD35 (C3b)<sup>6,8</sup>. Così, CD21, CD23, CD35 sono tutti utili come marcatori immunohistochimici per le FDCs, in aggiunta ad altri marcatori recentemente rilevatisi

molto sensibili, ma non specifici per le FDCs, come la clusterina e la podoplanina<sup>9</sup>; il CD21, comunque, rappresenta il più affidabile e sensibile anticorpo per evidenziare le FDCs.

I linfociti B del centro germinativo, che hanno la più alta affinità nel legare gli immunocomplessi intrappolati dalle FDCs, sopravvivono alla morte cellulare programmata, processano l'antigene, proliferano e più tardi si differenziano in plasmacellule o in cellule B di memoria. Tale evidenza induce a pensare a un ruolo determinante delle FDCs nell'inibizione dell'apoptosi dei linfociti B e nella loro conseguente maturazione. Per di più, l'inizio dell'attività proliferativa che porta alla ipermutazione somatica (il segno distintivo delle cellule del centro germinale) può anche essere dipendente dall'antigene catturato dalle FDCs<sup>10</sup>.

La genesi delle FDCs è stato oggetto di accesi dibattiti e ancora oggi rimane poco chiara. L'individuazione di un precursore cellulare per le FDCs si è rivelato estremamente difficile. Esperimenti effettuati su roditori hanno mostrato come precursori delle FDCs risultassero dal differenziamento cellulare mesenchimale, seguito dall'acquisizione di lunghe fibre disposte a formare una rete capace di legare immunocomplessi durante le reazioni che si verificano nel centro germinativo<sup>11,12</sup>. In effetti, l'ultrastruttura, la citologia e l'immunofenotipo delle FDCs non supportano una origine emopoietica ma favoriscono una origine mesenchimale e sollevano la questione di una possibile derivazione da un'ulteriore differenziazione di una cellula reticolare fibroblastica locale<sup>13-15</sup> o da una cellula mesenchimale migratoria, probabilmente dal midollo osseo<sup>16,17</sup>. La maggior parte degli studi ultrastrutturali indicano una origine fibroblastica per le FDCs nelle loro forme meno differenziate; è stata infatti documentata anche sulla superficie delle FDCs l'espressione di marcatori di superficie tipici dei fibroblasti, quali ICAM1, VCAM - 1, 1B10 e 3C8<sup>6,18,19</sup>. Tuttavia, le FDCs mature differiscono dai fibroblasti in quanto danno luogo a una rete complessa di lunghe ramificazioni dendritiche e hanno giunzioni desmosomiali e aderenti<sup>11</sup>.

Il gruppo di Muñoz-Fernández ha rilevato l'espressione di alcuni antigeni correlati ai progenitori stromali del midollo osseo in una sotto-popolazione di linee cellulari coltivate *FDCs-like* provenienti da cellule di tonsille umane che, insieme all'individuazione di una certa attività contrattile e l'espressione della proteina  $\alpha$ -actina del muscolo liscio (anche espressa nelle cellule stromali, adipociti e osteoblasti del midollo osseo), ha indotto a concludere per le FDCs una possibile origine da una migrazione di cellule mesenchimali del midollo osseo<sup>20</sup> ed escludere, dunque, un'origine emopoietica.



### 1.3 Caratteristiche cliniche ed eziologia del sarcoma FDC

Il sarcoma FDC colpisce prevalentemente soggetti giovani o adulti, con età media di insorgenza intorno a 50 anni e l'incidenza nei due sessi è pressoché uguale. Molti casi descritti sono provenienti dall'Asia dell'Est, per cui non si esclude che alcune etnie o alcune zone geografiche siano più interessate di altre<sup>21</sup>.

L'eziologia e la patogenesi di tale trasformazione neoplastica sono ancora sconosciute. Solitamente essa si verifica ex novo; tuttavia, in un 10-20% dei casi, si verifica in associazione con la Malattia di Castleman (per lo più nella sua forma ialino-vascolare e raramente nella variante plasmacellulare), simultaneamente o come evento successivo<sup>1</sup>. La malattia di Castleman è un disordine linfoproliferativo benigno, caratterizzato da un'iperplasia di FDCs, la cui eziopatogenesi è incerta e la cui presentazione può essere variabile. La forma ialino-vascolare di questa malattia si presenta con centri germinativi "regressivi" che contengono un numero notevole di FDCs. È stata descritta, inoltre, una variante di malattia di Castleman ialino-vascolare ricca di stroma, in cui le FDCs possono essere notevolmente aumentate di numero<sup>22</sup> e atipiche (con nuclei estesi e irregolari), che vengono considerate displastiche e che potrebbero rappresentare i precursori del sarcoma FDC<sup>23,24</sup>. Il sarcoma, dunque, potrebbe insorgere in situazioni in cui vi è una iperplasia e/o ipertrofismo di cellule follicolari dendritiche<sup>1</sup>.

Inoltre, poiché una buona percentuale di casi di sarcoma FDC del fegato e della milza si associa ad infezione da virus di Epstein Barr, si potrebbe supporre un ruolo del virus nella patogenesi, sebbene non ci siano studi che ne stabiliscano una definitiva associazione<sup>1,25,26</sup>.

Il sarcoma FDC si presenta come una malattia ad interessamento linfonodale nel 31% dei casi, extranodale nel 58% dei casi e ad entrambi gli interessamenti nel 10% dei casi<sup>21</sup>. Nella presentazione nodale sono più spesso i linfonodi cervicali ad essere colpiti, ma spesso sono interessati anche i linfonodi ascellari, mediastinici, mesenterici, retroperitoneali e sovraclavicolari. Una grande varietà di siti extranodali può essere coinvolta, più comunemente tonsille, cavità orale, tratto gastrointestinale, tessuti molli intra-addominali, pelle e polmoni<sup>27,28</sup>.

Il decorso clinico è generalmente indolente, simile a un sarcoma dei tessuti molli di grado basso o intermedio, ma sono stati riportati casi che presentano un decorso particolarmente aggressivo<sup>23</sup>. Inoltre, le recidive locali sono frequenti (40-50% dei casi) e nel 25% dei casi il sarcoma tende a metastatizzare: tali eventi possono verificarsi anche molti anni dopo la diagnosi iniziale<sup>1,25</sup>.

La maggior parte dei pazienti di solito mostra una linfadenopatia (localizzata o meno) con una massa indolore a lento accrescimento e senza sintomi sistemici. La presentazione intra-addominale, le dimensioni della massa superiore a 6 cm, l'alto indice proliferativo, le marcate atipie citologiche,

la presenza di una necrosi diffusa e la mancanza di una terapia adiuvante sono indicatori di una prognosi sfavorevole<sup>29</sup>. Approssimativamente il 20-30% dei pazienti muore di questa malattia, spesso anche dopo un lungo periodo di tempo.

#### **1.4 Caratteristiche morfologiche ed immunofenotipiche del sarcoma FDC**

I sarcomi FDC sono caratterizzati dalla proliferazione di cellule fusiformi o ovali, con margini spesso indistinti, che di solito crescono aggregate in fascicoli, matrici storiformi, spiralfornati, trabecolari, lamine diffuse o noduli indistinti e possono ricordare il modello di crescita dei meningiomi<sup>30</sup>. La caratteristica ultrastrutturale più distintiva delle cellule neoplastiche del sarcoma FDC è costituita dai lunghi e sottili processi citoplasmatici connessi attraverso numerose giunzioni cellulari e desmosomi maturi. Le cellule neoplastiche presentano una moderata quantità di citoplasma eosinofilo e alquanto fibrillare e mostrano una lieve atipia nucleare, che può anche comprendere elementi epitelioidi e/o multinucleati<sup>25</sup>. I nuclei ovali o allungati hanno una delicata membrana nucleare, una cromatina finemente dispersa e uno o più piccoli distinti nucleoli. Un certo grado di atipia citologica può essere riscontrato solo in una piccola minoranza di casi e può associarsi ad un più alto tasso mitotico e ad una maggiore presenza di figure mitotiche atipiche. Una notevole variabilità si osserva, inoltre, nella densità e nella tipologia di elementi del sistema immune che accompagnano la proliferazione maligna, con cellule linfoidi reattive intersperse e talvolta aggregate intorno ai vasi sanguigni, ma nessuno studio è stato finora effettuato nel tentativo di caratterizzare il microambiente immunitario associato al sarcoma FDC<sup>1</sup>.

Oltre ad esprimere i marcatori delle cellule mesenchimali, le cellule neoplastiche conservano l'immunofenotipo delle FDCs normali, risultando positive per uno o più dei marcatori come CD21 (recettore del complemento C3b), CD23, CD35 (recettore del complemento C3d), KiM4p, CNA.42 e R4/23 (un marker specifico di FDCs che tendono a non *clusterizzare*). La clusterina, una glicoproteina associata a molte funzioni cellulari, incluso l'apoptosi, è fortemente positiva nei sarcomi FDC ed, essendo frequentemente negativa o solo debolmente positiva in altri tumori a cellule dendritiche, è un marker potenzialmente discriminante, specifico e sensibile del sarcoma FDC<sup>31</sup>. La podoplanina (D2-40), con una forte colorazione di membrana, è anch'essa un marcatore sensibile per i sarcomi FDC<sup>9</sup>. La  $\gamma$ -sinucleina, un marker relativamente recente che caratterizza la rete di FDCs, può essere considerato di aiuto nell'identificazione dei sarcomi FDC<sup>32</sup>. Le FDCs normali e neoplastiche sono positive per vimentina, fascina, desmoplachina, recettore per il fattore

di crescita endoteliale (EGFR) e HLA-DR. Anche la molecola CXCL13 viene mantenuta durante la trasformazione neoplastica, risultando fortemente e diffusamente espressa<sup>33</sup>.

Le cellule tumorali sono inoltre variabilmente o debolmente positive per CD68 e l'antigene di membrana epiteliale S100. CD45/45RB e CD20, invece, sono per lo più negativi, ma la positività delle cellule linfoidi adiacenti potrebbe portare a un'apparente colorazione positiva. La colorazione per CD1a, lisozima, mieloperossidasi, CD34, CD3, CD79A, CD30, HMB45, desmina e citocheratine ad alto peso molecolare risulta negativa<sup>1,34</sup>. Il Ki67 varia dall'1 al 25%.

Pur essendo imprescindibile la caratterizzazione immunoistochimica per diagnosticare correttamente un sarcoma FDC, la diagnosi differenziale con altri sarcomi potrebbe risultare problematica<sup>35</sup>.

### 1.5 Caratteristiche molecolari del sarcoma FDC

Il sarcoma a cellule follicolari dendritiche non ha i riarrangiamenti genici tipici delle cellule B o T e sono stati segnalati solo casi isolati con anomalie citogenetiche complesse<sup>2</sup>. Inoltre, ad oggi sono pochi gli studi molecolari sulla malattia; recentemente, uno studio multicentrico ha esaminato il *pathway* di BRAF e il suo contributo alla patogenesi di neoplasie di cellule dendritiche e istiocitiche, tra cui il sarcoma FDC. Attraverso il sequenziamento diretto Sanger e la validazione mediante PCR quantitativa *Peptide Nucleic Acid Clamp* (PNAcqPCR), gli autori hanno trovato la presenza della mutazione *BRAF*<sup>V600E</sup> nel 18,5% dei casi di sarcoma FDC (5 su 27)<sup>36</sup>. La mutazione *BRAF*<sup>V600E</sup>, riscontrata prevalentemente nei sarcomi istiocitici e nei sarcomi a cellule dendritiche che originano da cellule staminali di linea mieloide e mesenchimale, potrebbe essere associata alla loro patogenesi, oltre a costituire un potenziale target terapeutico in questi pazienti<sup>2</sup>.

Una prima esplorazione del *landscape* genomico del sarcoma FDC è stata effettuata solo di recente dal gruppo americano di Griffin che, mediante sequenziamento target di 309 geni associati al cancro su una casistica costituita da 13 casi di sarcoma FDC, ha individuato ricorrenti alterazioni *loss of function* in geni *tumor suppressor* coinvolti nel *pathway* regolatorio di NF-kB (38%) e nella progressione del ciclo cellulare (31%), oltre ad un'acquisizione di *copy number* nella regione cromosomica 9p24 che include i geni *CD274* (PD-L1) e *PDCD1LG2* (PD-L2) coinvolti in meccanismi di *immune escape* (23%). In particolare, per alcuni casi, sono state identificate mutazioni *frameshift* o delezioni nel gene *NFKBIA*, una proteina coinvolta nel sequestro citoplasmatico del complesso NF-kB, la perdita di entrambi gli alleli del gene *CYLD* e una mutazione missenso nel gene *TNFAIP3*; questi ultimi due geni sono entrambi regolatori

dell'attivazione di NF-kB attraverso la de-ubiquitinazione dei mediatori a monte del *signaling*. Tra le alterazioni in geni regolatori del ciclo cellulare, troviamo mutazioni o variazioni nel numero di copie di geni quali *CDKN2A*, *RBI* e *TP53*<sup>37</sup>.

Uno studio recente ha valutato il profilo di espressione dei micro RNA di 31 casi di sarcoma FDC, identificando la presenza di 2 sottogruppi, uno con livelli di espressione di miRNA generalmente alti, l'altro con livelli di espressione più bassi; differenze che, però, non si riflettono in una diversa morfologia. Il pattern di espressione dei micro RNA del primo gruppo è simile a quello osservato in fibroblasti e in casi di miopericitomi, mentre invece similarità di espressione si osservano tra i sarcomi FDC del secondo gruppo e le FDCs derivate da malattia di Castleman. Ciò ha indotto a pensare che alcuni sarcomi si sviluppino da FDCs mature e perciò più somiglianti alle FDCs di Castleman, altri potrebbero, invece, derivare da precursori cellulari (cellule perivascolari o cellule reticolari marginali) che sono più strettamente correlati ai fibroblasti<sup>38</sup>.

## **1.6 Terapia del sarcoma FDC**

Il trattamento di elezione, per le forme localizzate, è la completa escissione chirurgica della massa neoplastica, seguita da radio o chemioterapia adiuvante. Nei casi avanzati si utilizzano regimi di polichemioterapia dei linfomi aggressivi in associazione o meno a radioterapia. Per i sarcomi con mutazione di BRAF<sup>V600E</sup>, l'utilizzo del vemurafenib, inibitore dell'enzima BRAF, potrebbe essere utilizzato come potenziale terapia biologica, dal momento che ha mostrato effetti efficienti in altre neoplasie dendritiche e istiocitiche come la malattia di Erdheim-Chester e l'istiocitosi a cellule di Langherans<sup>39</sup>. Un'altra potenziale classe di agenti terapeutici è costituita dagli inibitori di EGFR, particolarmente in casi che mostrano moderata o forte espressione di EGFR<sup>40</sup>.

I risultati, in ogni caso, sono variabili e a tutt'oggi nessun trattamento è stato dimostrato essere consistentemente efficace, né alcuna terapia standard è stata finora identificata<sup>41</sup>.

## 1.7 I sarcomi dei tessuti molli

### 1.7.1 Epidemiologia e aspetti clinici

I sarcomi dei tessuti molli sono tumori di origine mesenchimale, perciò indicati come tumori mesenchimali (MTs), che insorgono nei muscoli, tendini, tessuto adiposo e tessuti connettivi in genere.

Questi tumori rappresentano l'1% di tutti i tumori maligni negli adulti ed il 7-10% dei tumori infantili. Sotto il termine di sarcomi dei tessuti molli sono raggruppati più di 50 tipi istologici che mostrano una elevata variabilità per quanto riguarda la presentazione clinica, la morfologia, la genetica ed il comportamento<sup>42</sup>.

Data l'elevata eterogeneità istologica, la classificazione dei MTs è molto complessa; essa si basa su aspetti istologici, immunofenotipici e genetici<sup>43</sup>.

Sulla base delle rilevazioni dell'Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTum), l'incidenza annuale in Italia è di circa 3/100.000 persone. Nonostante le tecniche chirurgiche e le terapie siano migliorate, la mortalità per questi tumori resta elevata e la sopravvivenza globale a 5 anni non supera il 55%. Il motivo principale è da attribuire a una diagnosi tardiva per una sottostima delle neoformazioni dei tessuti molli e all'avanzamento della malattia al momento della presentazione.

Nei casi di tumore resecabile, la sopravvivenza a lungo termine è correlata al grado istologico, alla sede e alle dimensioni della neoplasia. Il picco d'incidenza è intorno ai 50 anni, anche se sono stati riportati casi di tutte le età, sia maschi che femmine, con un leggero sbilanciamento per il genere maschile<sup>44,45</sup>. I MTs possono insorgere in qualsiasi distretto anatomico, ma più frequentemente sono localizzati a livello degli arti (60%) e del retroperitoneo (15%). Più rari sono quelli del tronco superficiale (10%) e del distretto testa/collo (5%). I sarcomi viscerali (esofago, stomaco, intestino, utero, ecc.) rappresentano il restante 10%; tra questi troviamo anche il sottogruppo dei tumori stromali gastro-intestinali (GIST). Circa il 10% dei pazienti presenta metastasi rilevabili al momento della diagnosi del tumore primitivo; i polmoni rappresentano l'organo più comunemente interessato dalle metastasi<sup>44</sup>.

Negli ultimi anni, la conoscenza di queste neoplasie è aumentata in modo significativo, sia da un punto di vista istopatologico che genetico, che ha quindi portato a un significativo aumento della *disease-free survival* (sopravvivenza libera da malattia) per tumori che in precedenza erano incurabili<sup>43</sup>.

L'eziologia della maggior parte di tali neoplasie è sconosciuta. In rari casi, fattori genetici e ambientali, radiazioni, infezioni virali e stati di immunodeficienza sono associati con lo

sviluppo di tumori maligni dei tessuti molli. Ci sono anche casi isolati di sarcomi dei tessuti molli che si verificano in presenza di tessuto cicatriziale, di siti di frattura e vicino a impianti chirurgici. Tuttavia, la grande maggioranza dei sarcomi dei tessuti molli sembrano insorgere *de novo*, senza un fattore causale apparente<sup>46</sup>.

Nonostante la maggior parte dei casi sia sporadica, è ben nota l'associazione di questi tumori con particolari sindromi familiari, come la Neurofibromatosi di tipo I (malattia di von Recklinghausen), con specifici tumori maligni delle guaine nervose periferiche e con la sindrome di Li-Fraumeni, una patologia caratterizzata da mutazioni nella linea germinale del gene oncosoppressore *TP53*. Tra le sostanze chimiche che sembrano essere associate a un aumento del rischio di sviluppare MTs vi sono il cloruro di vinile (angiosarcomi) e i pesticidi (sarcomi muscolari). Inoltre, è stato descritto il rischio di sarcomi radioindotti (angiosarcomi) o associati a immunodeficienze (leiomiomasarcomi)<sup>47</sup>.

Si ritiene che i sarcomi si sviluppino in seguito a mutazioni che si verificano nelle cellule mesenchimali staminali, ma l'esatta origine cellulare di questi tumori resta ancora sconosciuta<sup>42</sup>.

### **1.7.2 Grado e stadiazione**

Attualmente, il sistema di classificazione del grado di malignità maggiormente utilizzato per i sarcomi dei tessuti molli nell'adulto è quello che fa riferimento alla Federazione Francese dei Centri per la Lotta Contro il Cancro (FNCLCC), che prevede una classificazione in tre gradi dei tumori (grado 1: basso grado, grado 2: grado intermedio; grado 3: alto grado). Nel 2002 la WHO ha raccomandato lo schema FNCLCC; tale indicazione è stata mantenuta nella versione del 2013<sup>44,48</sup>.

La stadiazione, combinando i dati di *imaging* radiologico e della diagnosi istopatologica, valuta la crescita e la diffusione del tumore nell'organismo ed è quindi un significativo indicatore prognostico; è inoltre utile e necessaria per la scelta del trattamento terapeutico opportuno<sup>49</sup>.

Vi sono più sistemi di stadiazione, ma quello generalmente adottato nei MTs è il sistema TNM dell'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) che incorpora il grado istologico, la dimensione e la profondità del tumore, il coinvolgimento linfonodale e la disseminazione metastatica<sup>50-52</sup>.

### **1.7.3 Terapia**

La chirurgia rappresenta il trattamento standard nei MTs dell'adulto associata a radioterapia in caso di lesioni profonde e di dimensioni maggiori di 5 cm. La radioterapia ha come finalità il controllo locale della malattia; l'impiego ulteriore di cicli di chemioterapia dipende dal tipo istologico, dalla localizzazione del sarcoma e dal rischio di metastatizzazione.

La chemioterapia può avvalersi di pochi farmaci moderatamente attivi, anche se, negli ultimi anni, sono stati identificati nuove molecole dotate di attività su specifici istotipi<sup>53-55</sup>.

Questi tumori mesenchimali tendono a dare luogo a metastasi. Spesso la prima diffusione a distanza della malattia avviene a livello polmonare, dove si interviene con la chirurgia e/o con la chemioterapia; le metastasi in altre sedi (come lo scheletro, il fegato o tessuti molli multipli a distanza) vengono in genere trattate con la chemioterapia.

## **2. OBIETTIVI DELLO STUDIO**



Il sarcoma a cellule follicolari dendritiche, considerato una malattia rara, ad oggi non è stato ancora caratterizzato da un punto di vista trascrizionale, né ci sono evidenze molecolari che lo correlino alle cellule follicolari dendritiche e agli altri tumori di origine mesenchimale.

L'obiettivo di questo studio è stato la caratterizzazione del profilo di espressione genica di sarcomi FDC, di FDCs e di MTs al fine di:

- evidenziare differenti meccanismi molecolari alla base della patogenesi dei sarcomi FDC rispetto alle FDCs e agli altri tumori di derivazione mesenchimale;
- identificare *pathways* deregolati nei sarcomi FDC;
- investigare il possibile ruolo del microambiente nella patogenesi dei sarcomi FDC;
- individuare potenziali target molecolari predittivi di una terapia efficace.

### **3. MATERIALI E METODI**

### 3.1 Selezione dei casi

Dagli archivi delle Unità di Anatomia Patologica di Francoforte, Bologna, Brescia, Bombay, Barcellona, Lisbona e Vienna sono stati selezionati campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE). La casistica consta di 29 campioni di sarcomi FDC asportati chirurgicamente e 32 casi di MTs. Tra i tumori dei tessuti molli, sono stati selezionati solo istotipi con differenziazione fibroblastica/miofibroblastica data la loro possibilità di mostrare *overlaps* trascrizionali e/o fenotipici con il sarcoma FDC, mentre sono stati esclusi casi con differenziazione miogenica, adipocitica, condro-ossea o neuronale. In particolare sono stati reclutati: 3 casi di Fibromatosi Desmoide, 8 casi di Dermatofibrosarcoma Protuberans, 3 casi di Sarcoma Fibromixoide a basso grado, 6 casi di Tumore Miofibroblastico Infiammatorio (4 ALK +, 2 ALK-) e 12 casi di Tumore Fibroso Solitario che includono 3 casi di Emangiopericitoma. Come controllo sono stati utilizzati 5 campioni di FDCs ottenuti mediante microdissezione laser da centri germinali regressivi di malattia di Castleman di tipo ialino-vascolare HIV-negativi (CD-FDCs). Inoltre, 3 campioni di fibroblasti, ottenuti da circoncisioni di routine e, successivamente, fissati in formalina e inclusi in paraffina, sono stati inseriti nell'analisi del profilo di espressione genica.

Per di più, un data set in silico di profili di espressione genica di cellule staminali mesenchimali (MSC) GSE28205 (GSM698427, GSM698433, GSM698437, GSM698439)<sup>56</sup> è stato utilizzato in uno step di analisi comparativa.

Tutti i casi di sarcoma FDC sono stati valutati per i marcatori delle FDCs CD21, CD23, CD35, clusterina e CXCL13 e le diagnosi sono state confermate da patologi esperti in accordo con i criteri presenti nella IV Edizione della *Classificazione dei tumori del sistema emolinfopoietico* dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO). Le principali caratteristiche dei campioni di sarcoma FDC sono riassunte in Appendice, Tabella 1.

### 3.2 Estrazione e quantificazione dell'RNA

Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato il *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) che permette di estrarre gli acidi nucleici da tessuti FFPE. Per ciascun campione sono state tagliate 3-5 sezioni, con uno spessore di 10-15 µm; le sezioni sono state trattate con *HistoClear* per sparaffinare il tessuto e con etanolo al 100% per reidratarlo. I campioni così deparaffinati ed essiccati sono stati quindi incubati con *Digestion Buffer* e Proteasi K e successivamente trasferiti su apposite colonnine in borosilicato. In seguito a trattamento con DNAsi e a lavaggi con *wash buffers*, l'RNA è stato

eluito in uno specifico *elution buffer*.

L'RNA estratto da ciascun campione è stato quantificato mediante l'utilizzo dello Spettrofotometro *Thermo Scientific NanoDrop™ 1000* (NanoDrop Technologies Inc.) e la concentrazione espressa in ng/ul. Sono stati contemporaneamente valutati i due rapporti 260/280 e 260/230 per verificare la purezza dell'acido nucleico estratto.

### 3.3 Gene Expression Profiling (GEP)

Per superare i limiti relativi alla parziale degradazione dell'RNA e alla sua scarsa concentrazione dovuti alla fissazione in formalina, il profilo di espressione genica dei 62 campioni in studio è stato ottenuto mediante piattaforma Illumina *Whole-Genome DASL HT Assay (cDNA-mediated Annealing, Selection, extension and Ligation)*. Questa tecnica permette di ottenere il profilo di espressione genica di oltre 47.000 trascritti, a partire da campioni con quantità basse di RNA totale (50-100 ng), anche parzialmente degradato, assicurando comunque risultati altamente riproducibili. Il processo inizia con la conversione dell'RNA totale in cDNA, utilizzando oligo (dT) biotinilati e *primers* nanomerici random. Il cDNA biotinilato viene fatto appaiare a gruppi di sonde DAP (Pool Assay DASL), oligonucleotidi progettati appositamente per individuare ogni sequenza bersaglio nei trascritti. Queste sonde permettono il riconoscimento di frammenti di circa 50bp e sono ancorate a microsfere mobili, rendendo possibile l'analisi del profilo dell'RNA anche quando è parzialmente degradato. Ogni sonda consiste di un oligo a monte, contenente una sequenza gene-specifica e una sequenza di *primer* universali (P1) all'estremità 5', e di un oligo a valle contenente una sequenza gene specifica e *primer* universali (P2) all'estremità 3'. L'oligo a monte ibridizza con il cDNA target e quindi si estende e lega il suo oligo a valle corrispondente per creare un template di PCR, etichettato durante la reazione di amplificazione grazie all'aggiunta di *primers* fluorescenti, che può essere amplificato con i *primers* universali (P1 e P2). I prodotti di PCR ottenuti sono ibridizzati con *HumanHT-8 v4 Expression BeadChip* e analizzati utilizzando il *BeadArray Reader* o l'*iScan System* per determinare la presenza o l'assenza di specifici geni<sup>57-60</sup>.

### 3.4 Immunoistochimica

L'immunoistochimica (IIC) ha permesso la valutazione dell'immunofenotipo tissutale. La tecnica si basa sulla reazione antigene-anticorpo ed evidenzia se la proteina che si sta ricercando è presente

nel campione in esame e dov'è localizzata (membrana cellulare, citoplasma, nucleo, tessuti extracellulari).

Sezioni di tessuto di 4 µm di spessore hanno subito il processo di smascheramento antigenico, un pretrattamento effettuato per migliorare l'esposizione degli epitopi che vengono alterati dal processo di fissazione dei tessuti e che altrimenti potrebbero non reagire con l'anticorpo specifico. Il sistema utilizzato di *antigen retrieval* prevede l'immersione dei vetrini in soluzione *Epitope Retrieval Solution* (Novocastra) a 98°C, pH6, pH9, pH8 e per 30 minuti. L'intero ciclo di trattamento è stato effettuato in modo automatico mediante strumentazione PT link Dako.

In seguito, è stata inibita la perossidasi endogena mediante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% per 10 minuti e bloccato il frammento Fc per 8 minuti per poi procedere alla marcatura con l'anticorpo primario attraverso un'incubazione a 4°C *overnight*. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi:

- *Monoclonal anti-human PD-1* (Clone NAT105; Abcam)
- *Polyclonal anti-human CD274/PDL-1* (Acris Anticorpi)
- *Polyclonal anti-human CD273/PDL-2* (Acris Anticorpi)
- *Monoclonal anti-human Foxp3* (Clone 236A / E7; Abcam)
- *Monoclonal anti-human BCL6* (Clone LN22; Leica)
- *Polyclonal anti-human CD3* (Abcam)

La reazione di rivelazione è stata effettuata con un kit commerciale (Novolink Polymer Detection System Novocastra) che prevede l'utilizzo del cromogeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

Le sezioni sottoposte a doppia marcatura BCL6/CD3 hanno subito una prima colorazione per l'antigene BCL6 nella maniera sopradescritta e poi una seconda marcatura per CD3 in cui la reazione di rivelazione è avvenuta tramite l'utilizzo di un altro kit commerciale streptavidina-biotina (Dako LSAB + sistema-AP), utilizzando il cromogeno Ferangi Blu (Biocare Medical).

Tutti i vetrini sono stati contrastati con ematossilina di Harris (Novocastra) ed in seguito valutati al microscopio ottico Zeiss AXIO Scope A1 (Zeiss Oberkochen Germania).

Le fotografie sono state eseguite con Zeiss AxioCam 503 Colour (Zeiss).

Per l'analisi comparativa dell'espressione di PD-L1 tra i diversi casi di sarcoma FDC e MTs sono stati utilizzati *Tissue Microarrays* (TMA). I TMA consistono in tante piccolissime sezioni di tessuti normali o patologici disposti in modo ordinato su un supporto solido che ne consente il processamento e l'analisi simultanea. Per la costruzione dei TMA sono stati assemblati dei *cores*, carotaggi del blocchetto donatore nelle zone con maggior densità di cellule tumorali particolarmente rappresentative, ottenuti da inclusioni in paraffina relative a 22 sarcomi FDC e 27 MTs; come controllo negativo sono stati invece utilizzati campioni di fibrosarcoma e leiomiomasarcoma. Le

sezioni di TMA sono state valutate in cieco da patologi esperti attribuendo a ciascun campione un preciso *score* che combina la percentuale di cellule tumorali positive e l'intensità della colorazione.

### 3.5 Analisi dati

I dati di espressione genica sono stati analizzati con BRB-Array Tools (versione 4.4.1), un software integrato per la visualizzazione e l'analisi statistica dei dati di *gene expression* sviluppato da Richard Simon e Amy Peng Lam<sup>61</sup>. Inizialmente i dati sono stati trasformati in  $\log_2$  per ridurre la varianza tra i diversi campioni e poi sono stati normalizzati con una *Robust Spline Normalization*. Sono state seguite analisi non supervisionate e supervisionate. Un'analisi non supervisionata valuta la somiglianza tra campioni, basandosi esclusivamente sull'analisi del profilo genico: è quindi un'analisi a priori, dove le conoscenze biologiche acquisite mediante altri approcci non vengono tenute in considerazione. Questo tipo di analisi può, ad esempio, essere utile nell'identificazione di sottogruppi non precedentemente rilevati<sup>62</sup>. Un'analisi supervisionata, al contrario, si basa sull'impiego di informazioni clinico/biologiche già precedentemente acquisite (presenza di alterazioni molecolari note, stadio differenziativo della cellula, decorso clinico, ecc.) e consente di individuare geni, o gruppi di geni, che sono correlati con tali caratteristiche, selezionando quindi i trascritti che discriminano meglio due gruppi a confronto<sup>63</sup>.

Le analisi non supervisionate sono state eseguite con il software MeV v 4.7.4 utilizzando algoritmi di *Hierarchical Clustering* (HC), Analisi delle Componenti Principali (PCA) e *Non Negative Matrix Factorization* (NMF)<sup>64</sup>. In particolare, per generare Hierarchical Clustering è stato utilizzato il metodo di average-linkage e la correlazione di Pearson. Nell'approccio non supervisionato, per ridurre il numero di geni ed eliminare quelli poco differenzialmente espressi, sono stati selezionati set di geni con deviazione standard  $SD > 1.5$ . La PCA è stata utilizzata per ridurre il numero di variabili che caratterizzano i campioni, permettendo di discriminarli sulla base di solo poche variabili principali<sup>65</sup>. L'algoritmo NMF è stato applicato per valutare la stabilità dello HC, permettendo una riduzione della dimensionalità dei dati. Esso rappresenta i valori di espressione genica come una matrice Y, le cui righe contengono i livelli di espressione del singolo gene nei campioni e le cui colonne rappresentano il livello di espressione di tutti i geni in un campione. Tutte le voci nella matrice genica sono positive e l'algoritmo viene eseguito secondo i seguenti parametri: numero di cluster = range 2-8; numero di interazioni = 2000; *stop convergence* = 40; *stop frequency* = 10<sup>66,67</sup>.

Nell'analisi non supervisionata dei dati di espressione genica dei sarcomi FDC e dei dati dei profili trascrizionali delle cellule mesenchimali derivati in silico, per correggere gli effetti della serie sui valori di espressione e per ridurre la variabilità tra diversi *microarrays* è stato utilizzato il metodo *Combat*<sup>68</sup>.

Le analisi supervisionate sono state eseguite mediante il software BRB Array Tools, utilizzando l'algoritmo *Significant Analysis of Microarrays* (SAM)<sup>69</sup>.

Il metodo SAM rappresenta una variante del t-test, che consente di minimizzare l'effetto della sottostima della varianza e si basa sull'assunzione che le osservazioni sui diversi gruppi sono indipendenti dai campioni. Il test permette di selezionare i geni differenzialmente espressi senza fare alcuna ipotesi a priori sulla distribuzione dei dati, che viene stimata a partire dai dati stessi mediante permutazioni dei campioni. Il livello di significatività del test, trattandosi di test multipli, viene stimato tramite *false discovery rate* (FDR), per controllare il numero di falsi positivi tra i geni che verrebbero selezionati come differenzialmente espressi.

La valutazione dell'arricchimento di un set di geni in uno o più campioni è stata fatta con l'uso del software *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA)<sup>70</sup>. Questo metodo computazionale nasce dalla necessità di identificare gruppi funzionali di geni caratterizzati da una coerente espressione differenziale e determina se un set di geni, definito a priori, risulta essere statisticamente significativo confrontandone le differenze di espressione tra due stati biologici.

Per definire *pathways* e categorie funzionali per una lista di geni annotata è stato utilizzato il database *Consensus PathDB-human interaction* (<http://www.consensuspathdb.org>)<sup>71</sup>. Il software *Expression Analysis Systematic Explorer* (EASE), un'implementazione del *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID), è stato applicato per stabilire le specifiche funzioni cellulari e i processi biologici significativamente rappresentati, definiti in base alla *gene ontology*, nell'analisi dei geni condivisi tra gruppi diversi di campioni<sup>72-75</sup>.

Per studiare il *landscape* di cellule immunitarie infiltranti i sarcomi FDC e confrontarlo con quello di altri MTs è stato applicato, ai dati di espressione genica, il metodo computazionale CIBERSORT che permette di identificare diversi infiltrati immunitari all'interno di popolazioni miste. I valori grezzi di intensità dei campioni (definito come "file mixture") sono stati confrontati con i valori presenti nel file di *signature* genica LM22, fornito dal tool CIBERSORT, costituito da 547 geni che distinguono 22 popolazioni ematopoietiche umane mature (*subsets* di cellule T, cellule B naive e della memoria, plasmacellule, cellule NK e sottoinsiemi di cellule mieloidi). Per l'analisi sono state adottate le seguenti metriche: normalizzazione quantile, permutazioni = 1000, *p-value*  $\leq 0.05$ <sup>76</sup>.

Per valutare la diversa espressione dei livelli di mRNA di PD-1, PD-L1 e PD-L2 nei sarcomi FDC e negli altri MTs è stato utilizzato il t-test di Student su valori di intensità normalizzati e trasformati in  $\log_2$ .

I dati di *microarray* dei campioni analizzati sono stati depositati in *Omnibus Gene Expression* di NCBI e sono accessibili attraverso GEO, numero di serie GSE90592 <sup>77</sup>.



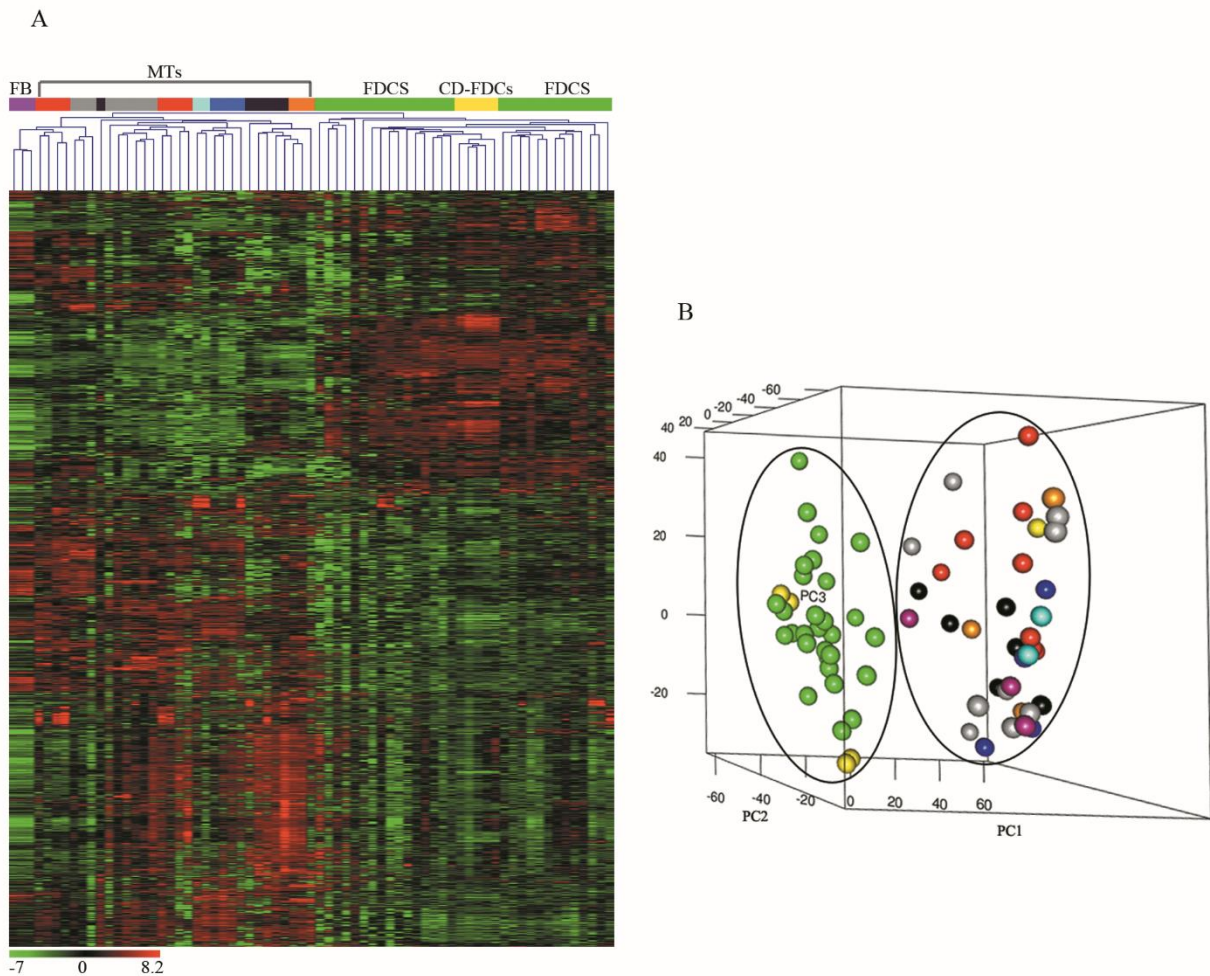
## **4. RISULTATI**

#### **4.1 I sarcomi a cellule follicolari dendritiche presentano un distinto profilo trascrizionale, correlato a quello delle cellule follicolari dendritiche e diverso da quello degli altri tumori di origine mesenchimale**

Per determinare se il profilo trascrizionale di 29 sarcomi FDC presentasse significative somiglianze o differenze rispetto a quello di 32 tumori di origine mesenchimale (Fibromatosi Desmoide, Dermatofibrosarcoma Protuberans, Sarcoma Fibromixioide, Tumore Miofibroblastico Infiammatorio, Tumore Fibroso Solitario), di FDCs microdisseccate da 5 casi di malattia di Castleman e di 3 campioni di fibroblasti, è stata effettuata un'analisi non supervisionata, sia mediante HC che mediante PCA. L'analisi non supervisionata ha evidenziato la presenza di due *clusters* principali: 1) i campioni di sarcoma FDC insieme alle FDCs; 2) i MTs insieme alle cellule normali fibroblastiche (Fig. 1 A-B).

Per valutare la robustezza dell'analisi, in termini di stabilità dell'algoritmo utilizzato nello HC, è stato eseguito l'algoritmo NMF, valutando diversi numeri di *clusters* (range 2-8). Il numero ottimale di *clusters* è stato determinato per  $k=2$  e coefficiente di correlazione cofenetica=0.991, confermando la reale presenza dei due gruppi ottenuti mediante HC, uno comprendente i sarcomi FDC e le FDCs, l'altro che include i tumori mesenchimali e i fibroblasti (Fig. 1, Appendice).

Questi risultati suggeriscono che il profilo trascrizionale dei sarcomi FDC è diverso da quello degli altri MTs e risulta correlato a quello delle FDCs.



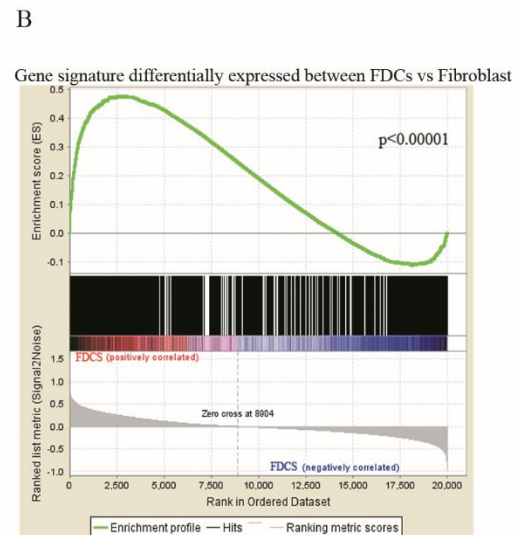
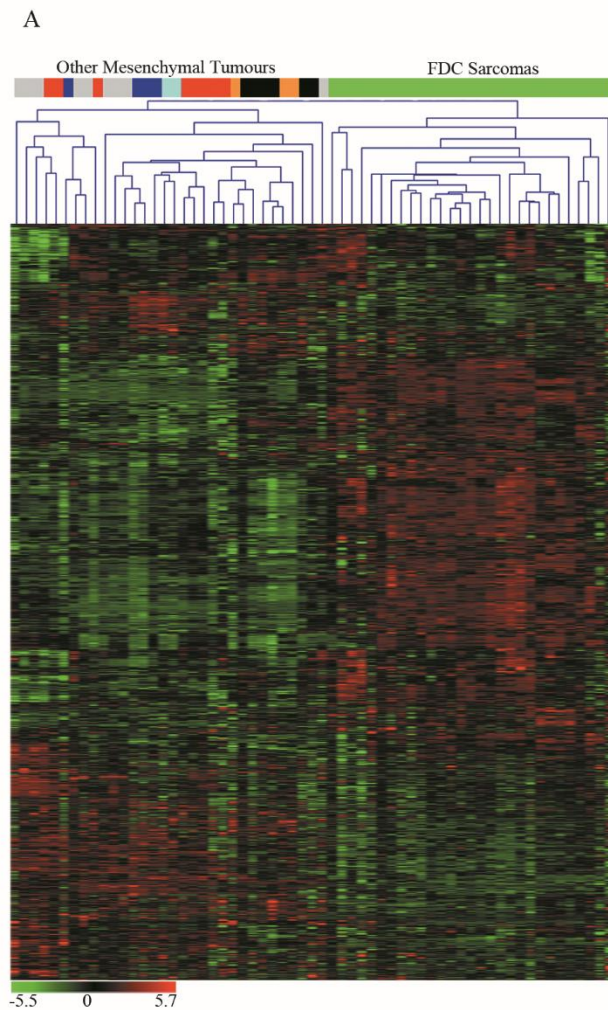
**Figura 1:** Analisi non supervisionata (1,683 geni). **A)** Lo *Hierarchical Clustering* confronta sarcomi a cellule follicolari dendritiche (FDCS), cellule follicolari dendritiche microdissecate (CD-FDCs), altri sarcomi mesenchimali (MTs) e fibroblasti (FB). Nella matrice, ciascuna riga rappresenta un gene e ciascuna colonna rappresenta un campione. La scala di colori illustra il livello di espressione relativo a ciascun gene in tutti i campioni: il rosso rappresenta un livello di espressione sopra la media mentre il verde rappresenta un valore di espressione inferiore alla media. **B)** L'Analisi delle Componenti Principali (PCA) indica in che misura i diversi campioni biologici si raggruppano insieme. I colori dei pallini indicano l'appartenenza ai diversi sottotipi. Verde: Sarcoma a cellule follicolari dendritiche (FDCS); blu: Fibromatosi Desmoide (DF); rosso: Dermatofibrosarcoma Protuberans (DFSP); azzurro: Sarcoma Fibromixoide (FMS); nero: Tumore Miofibroblastico Infiammatorio; grigio: Tumore Fibroso Solitario (SF); arancio: Emangiopericitoma (HP); viola: fibroblasto; giallo: cellule follicolari dendritiche microdissecate da Castleman (CD-FDCs)

Inoltre, per verificare che le divergenze nel profilo di espressione genica dei sarcomi FDC rispetto ai MTs fossero effettivamente dovute al contributo di programmi trascrizionali relativi alle FDCs piuttosto che imputabili ad altri fattori quali l'eterogeneità tissutale della localizzazione tumorale e del microambiente, sono stati confrontati, attraverso un'analisi supervisionata ( $FDR \leq 0.001$ ,  $FC \geq 2$ ), i profili di espressione genica delle CD-FDCs e dei fibroblasti, individuando 1.289 geni differenzialmente espressi (777 geni *up*-regolati e 512 geni *down*-regolati nelle CD-FDCs) (Fig. 2 e Tab. 2, Appendice). Quando tale *signature* trascrizionale, propria delle FDCs, è stata applicata ai sarcomi FDC e ai MTs attraverso un approccio non supervisionato (HC), ancora una volta i profili di espressione delle due classi tumorali si sono mantenuti ben distinti (Fig. 2A).

Coerentemente, l'analisi di *Gene Set Enrichment* (GSEA) ha rivelato nel profilo trascrizionale dei sarcomi FDC un significativo arricchimento nei geni che erano risultati differenzialmente modulati tra le CD-FDCs e i fibroblasti ( $p < 0.00001$ , Fig. 2B).

Per di più, poiché, in generale, i sarcomi derivano da precursori staminali, è stata effettuata un'analisi non supervisionata HC includendo anche i profili di espressione genica di cellule staminali mesenchimali (MSCs) derivati in silico<sup>56</sup>. È stato osservato che le cellule staminali mesenchimali formano un gruppo a sé stante rispetto alle CD-FDCs e ai sarcomi FDC e condividono, invece, caratteristiche trascrizionali comuni con i fibroblasti e gli altri tumori mesenchimali (Fig. 3, Appendice).

Questi risultati supportano l'idea che il profilo di espressione genica dei sarcomi FDC differisce da quello degli altri tumori di origine mesenchimale e delle cellule normali mesenchimali ed è simile al profilo trascrizionale relativo alle FDCs.



**Figura 2:** **A)** L'analisi non supervisionata mediante *Hierarchical Clustering* dei sarcomi FDC (FDC Sarcomas) e di altri tumori mesenchimali (Other Mesenchymal Tumours), utilizzando una *signature* di 1289 geni differenzialmente espressi tra FDCs e fibroblasti, mostra il gruppo dei sarcomi a cellule follicolari dendritiche distinto dagli altri tumori mesenchimali. **B)** L'analisi di *Gene Set Enrichment* (GSEA) ha rivelato un significativo arricchimento nel sarcoma FDC della *signature* di geni *up* e *down*-regolati nelle FDCs rispetto ai fibroblasti. L'*enrichment score* è stato calcolato dal software GSEA. L'asse X mostra i geni dal più *up*-regolato al più *down*-regolato tra le FDCs e i fibroblasti. Le linee nere verticali indicano la posizione dei geni arricchiti compresi nel *gene set*.

## 4.2 Il trascrittoma dei sarcomi a cellule follicolari dendritiche è caratterizzato dalla deregolazione di specifici *pathways* molecolari: trasduzione del segnale, ciclo cellulare, organizzazione della cromatina e della matrice extracellulare

Per individuare i programmi trascrizionali deregolati alla base della trasformazione neoplastica di sarcomi FDC, ci si è focalizzati sull'analisi dei *pathways* differenzialmente rappresentati in questi sarcomi sia rispetto alle CD-FDCs, sia rispetto alle altre neoplasie mesenchimali.

Attraverso un'analisi supervisionata (FDR <0.1, FC $\geq$ 2) sono stati identificati 370 geni differenzialmente espressi tra i sarcomi FDC e le CD-FDCs (Fig. 4A, Appendice). Di questi geni, 64 sono significativamente *up*-regolati nei sarcomi, mentre i restanti 306 sono *down*-regolati (Tab. 3, Appendice). È bene sottolineare come tra questi geni risultati significativamente *down*-regolati nei sarcomi FDC ci siano geni riportati come target di mutazioni *loss-of-function* in studi di sequenziamento, coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e correlati al *signaling* di NF- $\kappa$ B<sup>37</sup>.

Per valutare i *pathways* in cui sono coinvolti i geni differenzialmente modulati tra sarcomi FDC e CD-FDCs, è stata effettuata un'analisi di *Pathway Enrichment*, tramite *Consensus PathDB* (*Reactome Pathway data sets*, *p-value cut-off* = 0.0001). Trasduzione del segnale, ciclo cellulare, organizzazione della cromatina, metabolismo e sistema immunitario sono fra i primi programmi risultati significativamente più rappresentati (Tab. 4, Appendice).

Per determinare se i differenti programmi trascrizionali fossero caratterizzati da geni con alto grado di *overlap* nei *pathways* o se per ciascun programma fosse possibile individuare gruppi di geni unici, è stato utilizzato un *Venn Diagram*. Dei 370 geni differenzialmente espressi tra i sarcomi FDC e le CD-FDCs, 85 sono risultati selettivamente coinvolti in un unico *pathway* dimostrando che la deregolazione trascrizionale è piuttosto specifica e non è imputabile a geni con elevata ridondanza tra *pathways* diversi. (Fig. 3A).

Lo stesso approccio analitico è stato adottato nel confronto tra i sarcomi FDC e i MTs. L'analisi supervisionata (FDR <0.0001, FC $\geq$ 2) ha identificato 2.927 trascritti differenzialmente espressi, 2.041 *up*-regolati e 886 *down*-regolati nei sarcomi FDC (Fig. 4B e Tab. 5, Appendice). I *pathways* statisticamente più significativi in cui sono coinvolti i geni differenzialmente espressi (*Reactome Pathway data sets*, *p-value cut-off* = 0.0001) sono: vie di trasduzione del segnale, ciclo cellulare, metabolismo, organizzazione della matrice extracellulare e sistema immunitario (Tab. 6, Appendice). Valutando il grado di unicità dei geni nei *pathways*, sono risultati 156 i geni differenzialmente espressi selettivamente coinvolti in un unico programma cellulare, avvalorando l'idea della presenza di specifici *pathways* deregolati nel sarcoma FDC (Fig. 3B).

I *pathways* differenzialmente modulati tra il sarcoma FDC e le CD-FDCs sono sostanzialmente gli stessi di quelli che emergono dal confronto tra i sarcomi FDC e gli altri tumori mesenchimali, ad

eccezione del processo di rimodellamento della cromatina e dell'organizzazione della matrice extracellulare. Coerentemente, 116 geni sono risultati condivisi dalle *signature* trascrizionali che differenziano i sarcomi FDC dalle CD-FDCs e dai MTs.

Per evidenziare specifici processi biologici in cui sono coinvolti i 116 geni comuni tra le due *signature*, è stata applicata un'analisi di *gene ontology*, attraverso l'utilizzo del *software* EASE. La maggior parte di questi geni risultano coinvolti in meccanismi di assemblaggio della cromatina, di crescita, conservazione e proliferazione cellulare, di *signaling* intracellulare, di attività chinasiche (Tab. 7, Appendice).

In generale questi risultati dimostrano la presenza di specifici set di geni e relativi *pathways* molecolari in grado di discriminare il sarcoma FDC dagli altri MTs, fornendo nuove evidenze riguardo la pato-biologia dei sarcomi FDC.

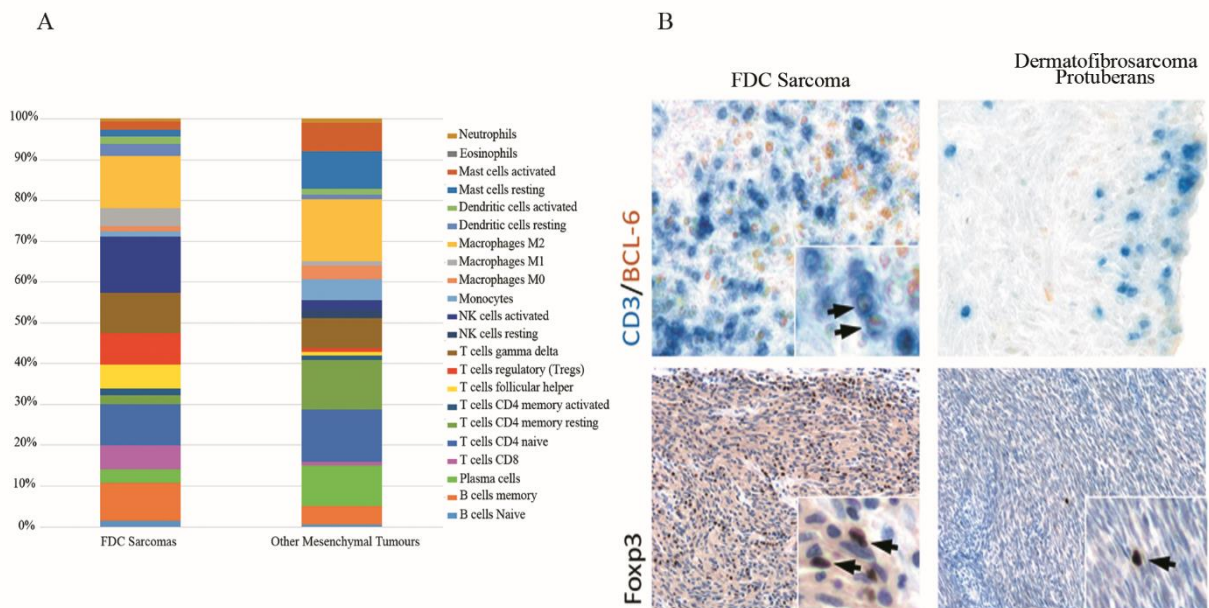




### **4.3 L'immuno landscape dei sarcomi a cellule follicolari dendritiche è caratterizzato da un arricchimento di popolazioni TFH e Treg ed è rappresentato dall'espressione dell'immuno-checkpoint PD-1 – PD-L1/PD-L2**

Le cellule follicolari dendritiche hanno un ruolo di primaria importanza nell'organizzazione mesenchimale del centro germinativo, che rappresenta un microambiente altamente dinamico, dove specializzati *subsets* di cellule immunitarie, tra cui cellule B, cellule T *helper* follicolari (TFH), cellule T regolatorie (Treg), macrofagi e cellule dendritiche mieloidi interagiscono tra di loro concorrendo alla maturazione dell'affinità anticorpale <sup>78</sup>.

Dopo aver dimostrato che il profilo trascrizionale dei sarcomi FDC è simile al profilo di espressione genica delle FDCs ed è nettamente diverso da quello di fibroblasti e di altri MTs, è stato studiato l'immuno *landscape* dei sarcomi FDC confrontandolo con quello che contraddistingue gli altri MTs, nel tentativo di individuare specifiche popolazioni cellulari che caratterizzano il microambiente del tumore. A tal fine, per “misurare” il contributo delle diverse popolazioni cellulari, è stato applicato l'algoritmo CIBERSORT al profilo di espressione genica dei sarcomi FDC e degli altri MTs, evidenziando un *landscape* immunitario differente nelle due tipologie di sarcomi (Fig. 4A). In particolare, i sarcomi FDC risultano significativamente arricchiti in cellule T *helper* follicolari e cellule T regolatorie, due popolazioni funzionalmente associate al microambiente del GC. Questo risultato è stato confermato anche con l'analisi immunohistochimica per BCL6 / CD3 e Foxp3 (marcatori rispettivamente di cellule TFH e Treg) in casi random di sarcoma FDC e di MTs (Fig. 4B). Inoltre, l'analisi CIBERSORT ha evidenziato anche differenze significative in termini di cellule T citotossiche e di cellule NK che sono particolarmente numerose nei campioni di sarcoma FDC rispetto ai MTs che risultano arricchiti in plasmacellule.



**Figura 4:** *Landscape* immune dei sarcomi FDC comparato a quello di altri tumori mesenchimali. **A)** L'analisi CIBERSORT, sulla base dei profili di espressione, ha valutato il contributo di diversi sottotipi di cellule immunitarie. È emersa una rappresentazione diversa di cellule del sistema immunitario nei due gruppi, con un significativo arricchimento di cellule T helper follicolari (TFH), cellule T regolatorie (Treg), cellule T citotossiche (cellule T CD8) e cellule NK attivate nei sarcomi FDC e di plasmacellule negli altri isotipi tumorali mesenchimali. **B)** Colorazioni immunoistochimiche rappresentative mostrano la diversa frequenza di cellule TFH che esprimono CD3 (pannelli superiori, segnale blu) e BCL-6 (pannelli superiori, segnale marrone) in un sarcoma FDC e in un caso di Dermatofibrosarcoma Protuberans. Una differenza analoga è riscontrabile per la densità di cellule Treg che esprimono Foxp3 (pannelli inferiori) nei due casi.

La presenza di specifici sottogruppi di cellule T ha suscitato l'interesse verso la valutazione del livello di espressione delle molecole dell'*immuno-checkpoint* PD-1, PD-L1 e PD-L2, che risultano coinvolti nella regolazione dell'immunità antitumorale all'interno del microambiente tumorale<sup>79</sup>.

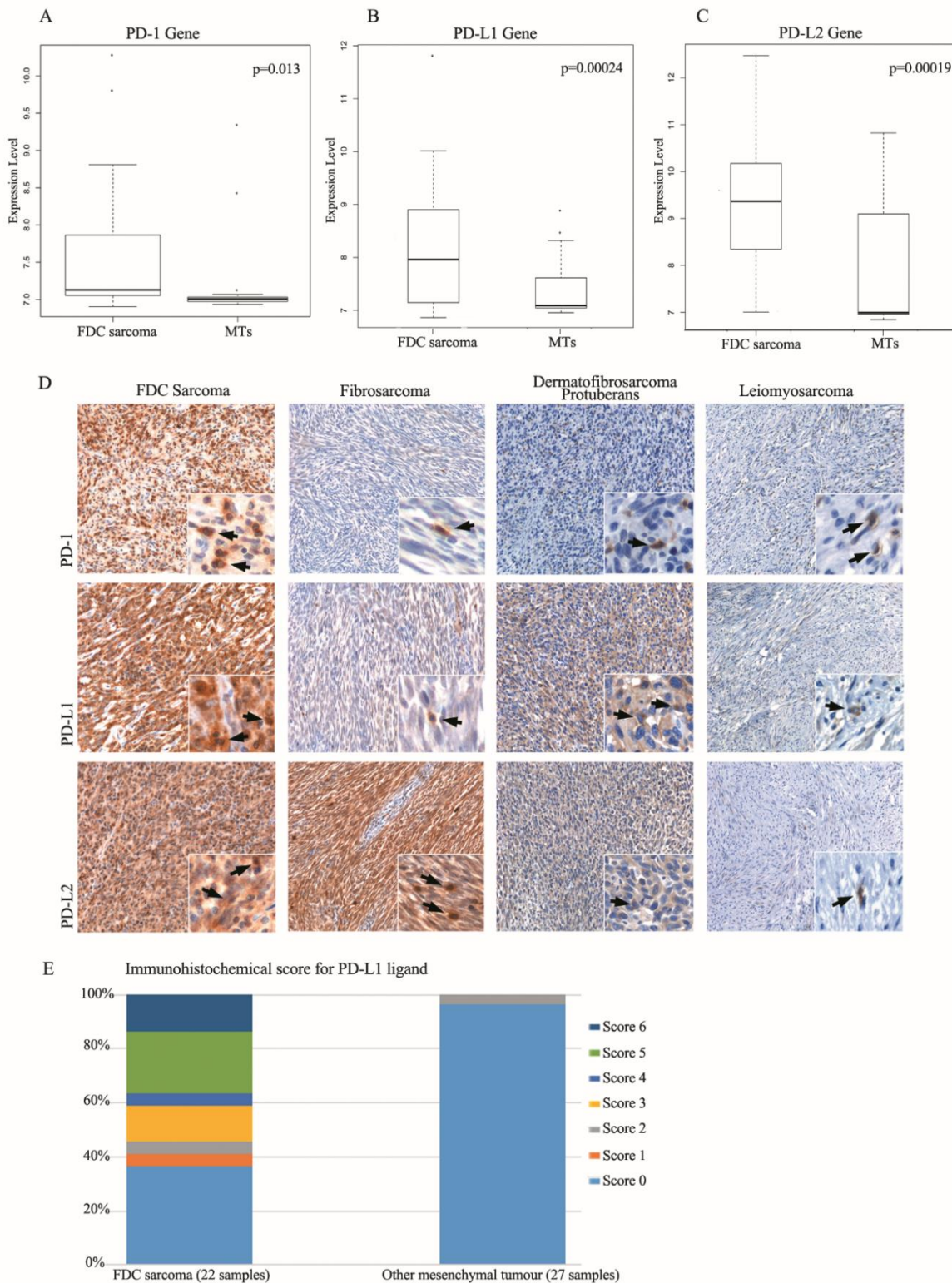
PD-1 è espresso sulla superficie delle cellule T effettrici attivate e delle cellule NK, come marcatore fenotipico delle cellule Treg e TFH correlate con loro stato di attivazione; questa molecola, mediante un feedback regolatorio, limita l'autoimmunità di tali cellule inducendone il loro esaurimento funzionale.

La presenza di linfociti TFH, Treg e di elementi citotossici riscontrata nei sarcomi FDC con l'analisi CIBERSORT, è coerente con il livello di espressione dell'mRNA di PD-1 negli stessi tumori, risultando questa molecola significativamente più espressa nel sarcoma FDC rispetto agli altri MTs ( $p\text{-value} = 0.013$ ) (Fig. 5A). Lo stesso andamento è stato osservato per i ligandi PD-L1 e PD-L2 ( $p\text{-value} = 0.00024$ ,  $p\text{-value} = 0.00019$ ) (Fig. 5B e 5C).

Questi dati sono stati confermati mediante immunohistochimica, evidenziando sia la presenza di PD-1 nei linfociti infiltranti i sarcomi FDC, sia la presenza di PD-L1 e PD-L2 sulla superficie delle cellule tumorali e delle cellule immunitarie infiltranti (Fig. 5D).

Inoltre, la costante espressione di PD-L1 nei diversi casi di sarcoma FDC è stata evidenziata mediante la costruzione di *Tissue Microarrays* su 22 casi di sarcoma FDC e 27 campioni di MTs. Nelle regioni ricche di cellule tumorali dei sarcomi FDC è stata rilevata una cospicua reattività per PD-L1 in oltre il 60% dei casi, mentre per gli altri sarcomi mesenchimali PD-L1 è rilevabile in solo il 4% dei casi (Fig. 5E; Tab. 8, Appendice). All'interno del gruppo dei sarcomi FDC è stata, inoltre, valutata la correlazione tra l'espressione di PD-1 e la frequenza di cellule T citotossiche, TFH, Treg e cellule NK per valutare se uno o più di questi sottotipi cellulari potesse essere il maggiore determinante dei livelli di espressione di PD-1, ma non è stata identificata nessuna correlazione significativa: tutte le popolazioni di linfociti infiltranti, dunque, contribuiscono all'espressione di PD-1 nel microambiente del sarcoma FDC.

Questi risultati dimostrano che i sarcomi FDC presentano un peculiare microambiente immunologico, caratterizzato da popolazioni di cellule T infiltranti funzionalmente specializzate come TFH e Treg, sotto l'influenza del *checkpoint* inibitorio di PD-1 - PD-L1/PD-L2.



**Figura 5:** Correlazione tra i livelli di espressione dell'mRNA di PD-1, PD-L1 e PD-L2 nei sarcomi FDC vs. altri tumori mesenchimali. Box Plot della significativa differenza dei livelli di espressione dell' mRNA di **A)** PD-1, **B)** PD-L1, **C)** PD-L2. **D)** Colorazioni immunoistochimiche rappresentative mostrano cellule immunitarie infiltranti che esprimono PD-1 (pannelli superiori) e la cospicua espressione dei ligandi PD-L1 (pannelli centrali) e PD-L2 (pannelli inferiori) in un caso di sarcoma FDC, comparati a campioni di controllo di Dermatofibrosarcoma protuberans, fibrosarcoma e leiomiosarcoma. **E)** Score di immunoistochimica combinato per PD-L1 nei TMA fatti su 22 sarcomi FDC (FDC Sarcoma) e 27 campioni tumorali mesenchimali.

## **5. DISCUSSIONE**

Il sarcoma a cellule follicolari dendritiche è una rara neoplasia caratterizzata da una presentazione clinica piuttosto variabile ed un elevato grado di eterogeneità morfologica ed immunofenotipica <sup>1</sup>. Viene classificato nella IV Edizione della Classificazione dei tumori del sistema emolinfopoietico della WHO nel capitolo delle neoplasie degli istiociti e delle cellule dendritiche. Sebbene per questi sarcomi può essere ipotizzata un'affinità istogenica con le cellule follicolari dendritiche dei follicoli linfonodali, sulla base di caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche, <sup>4</sup> finora non è stata ancora fornita alcuna evidenza molecolare che potrebbe sostenere la rappresentazione preferenziale di un *landscape* trascrizionale relativo alle FDCs rispetto ad altri tumori mesenchimali, né sono mai stati descritti i programmi molecolari caratteristici dei sarcomi FDC.

Le cellule follicolari dendritiche sono presunte cellule mesenchimali altamente specializzate che si differenziano da precursori mesenchimali peri-vascolari sotto la stimolazione di cellule induttrici del tessuto linfoide, linfotossine e altre citochine <sup>80</sup>. L'acquisizione del fenotipo FDC si caratterizza per l'espressione di molecole coinvolte nell'organizzazione della matrice cellulare del centro germinativo, come collagene di tipo I, SPARC, ICAM-1, VCAM-1 e MAdCAM-1 e presenta aspetti caratteristici di elementi mesenchimali che si trovano in microambienti specializzati come la nicchia ematopoietica del midollo osseo <sup>81</sup>. Inoltre, il fenotipico FDC prevede l'espressione di mediatori funzionali di chemo-attrazione di cellule B (CXCL-13), tropismo (BAFF, IL-6), co-stimolazione (C4bBP, iC3b / C3dg) e *trapping* degli immunocomplessi (CD21, CD35, CD23). Nei sarcomi a cellule follicolari dendritiche alcune caratteristiche del fenotipo FDC possono essere mantenute, altre no <sup>35</sup>.

In questo studio è stata eseguita per la prima volta un'analisi completa del profilo trascrizionale di campioni di sarcoma FDC, evidenziando come la trasformazione sarcomatosa sia caratterizzata dal mantenimento di programmi trascrizionali propri delle cellule follicolari dendritiche. Infatti attraverso un'analisi non supervisionata è emerso come i sarcomi FDC clusterizzano insieme con la loro "controparte naturale" costituita dalle cellule follicolari dendritiche e mantengono un profilo di espressione ben distinto rispetto agli altri tumori di origine mesenchimale che clusterizzano insieme ai fibroblasti e alle cellule staminali.

Inoltre, l'analisi supervisionata nel confronto tra i profili di espressione genica dei sarcomi FDC, delle FDCs e dei MTs ha evidenziato la presenza di differenti *pathways* deregolati nei sarcomi FDC, in particolare è stata riscontrata una generale *down*-modulazione di *network* coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, nell'organizzazione della cromatina e nella trasduzione del segnale. Il fatto che i profili di espressione genica dei sarcomi FDC e degli altri MTs differiscano per meccanismi coinvolti nell'organizzazione della matrice extracellulare e nel sistema immunitario, è coerente con il diverso stato funzionale e di differenziazione dei due gruppi cellulari.

L'applicazione del metodo CIBERSORT, per la valutazione dei sottotipi cellulari infiltranti, ha rivelato un arricchimento di popolazioni TFH e Treg nei sarcomi FDC rispetto ai tumori di origine mesenchimale; risultato confermato anche da analisi immunoistochimica. Le cellule TFH sono un sottoinsieme specializzato di cellule T che forniscono supporto alla crescita e al differenziamento delle cellule B del centro germinativo per l'avviamento delle risposte immuni anticorpo-mediate <sup>82</sup>. Controllate dall'attività sinergica dei linfociti T *helper* e di specifici fattori di trascrizione, i linfociti TFH sono essenziali per i *network* cellulari del CG <sup>83</sup> e un'alterata funzione porta a una difettiva immunità umorale sistemica <sup>84</sup>. Aver individuato un arricchimento significativo di questi linfociti T specifici nei campioni di sarcoma FDC, piuttosto che in altri tumori mesenchimali, avvalorava l'ipotesi del ruolo del microambiente nella patogenesi dei sarcomi FDC.

Tra i segnali over-rappresentati nel *network* immunitario dei centri geminativi vi è l'asse immuno regolatorio PD-1 – PD-L1/2, che controlla la funzione di un sottogruppo di cellule T che esprimono il recettore PD-1 e la sopravvivenza e la differenziazione delle cellule B che esprimono PD-L2 <sup>85</sup>. In accordo con la presenza di popolazioni di cellule T connesse al centro germinativo nei sarcomi FDC, anche l'espressione di PD-1 e dei suoi ligandi PD-L1 e PD-L2, sia a livello di mRNA che di proteina, sono risultati significativamente più elevati nei sarcomi FDC rispetto agli altri istotipi tumorali mesenchimali. È interessante notare che i geni *CD274* (PD-L1) e *PDCD1LG2* (PD-L2) sono codificati in una regione 9p24 che è stata riportata essere soggetta ad un *copy number gain* in casi di sarcoma FDC <sup>37</sup>.

In generale, sebbene i risultati riguardanti il microambiente nel sarcoma FDC siano stati dedotti dal solo profilo molecolare, possono essere considerati interessanti anche per la valutazione di immunoterapie specifiche. Infatti, anticorpi monoclonali anti-PD-1 ed anti-PD-L1 rappresentano una delle strategie più efficaci nel restituire la funzione ai linfociti T divenuti anergici e si sono dimostrati efficaci in numerose neoplasie.

In conclusione, in questo studio è stato caratterizzato per la prima volta il profilo di espressione genica dei sarcomi FDC, chiarendo la reale relazione con le cellule follicolari dendritiche e con gli altri tumori di origine mesenchimale. Sono stati identificati i programmi molecolari deregolati nei sarcomi FDC quali trasduzione del segnale, ciclo cellulare, organizzazione della cromatina e della matrice extracellulare. Infine l'analisi delle popolazioni infiltranti i sarcomi, attraverso l'applicazione dell'algoritmo cibersort, ha evidenziato la presenza di un particolare microambiente immunologico associato alla proliferazione sarcomatosa delle FDCs e l'importanza dell'asse PD-1 - PDL1/2 nella regolazione del contesto immunitario di questa rara neoplasia.

## **6. BIBLIOGRAFIA**



1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, V. J. *WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. (IARC, 2008).
2. Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375 LP-2390 (2016).
3. Monda, L., Warnke, R. & Rosai, J. A primary lymph node malignancy with features suggestive of dendritic reticulum cell differentiation. A report of 4 cases. *Am. J. Pathol.* **122**, 562–572 (1986).
4. Lorenzi, L. *et al.* Folliculocentric B-cell–rich follicular dendritic cells sarcoma: a hitherto unreported morphological variant mimicking lymphoproliferative disorders. *Hum. Pathol.* **43**, 209–215 (2012).
5. Yoshida, K., Kaji, M., Takahashi, T., van den Berg, T. K. & Dijkstra, C. D. Host origin of follicular dendritic cells induced in the spleen of SCID mice after transfer of allogeneic lymphocytes. *Immunology* **84**, 117–126 (1995).
6. Park, C.-S. & Choi, Y. S. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology* **114**, 2–10 (2005).
7. Grouard, G., Durand, I., Filgueira, L., Banchereau, J. & Liu, Y.-J. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature* **384**, 364–367 (1996).
8. Tew, J. G., Mandel, T. E. & Burgess, A. W. Retention of intact HSA for prolonged periods in the popliteal lymph nodes of specifically immunized mice. *Cell. Immunol.* **45**, 207–212 (1979).
9. Yu, H., Gibson, J. A., Pinkus, G. S. & Hornick, J. L. Podoplanin (D2-40) Is a Novel Marker for Follicular Dendritic Cell Tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* **128**, 776 LP-782 (2007).
10. Aydar, Y., Balogh, P., Tew, J. G. & Szakal, A. K. Follicular dendritic cells in aging, a ‘bottle-neck’ in the humoral immune response. *Ageing Res. Rev.* **3**, 15–29 (2004).
11. Heinen, E. & Bosseloir, A. Follicular dendritic cells: whose children? *Immunol. Today* **15**, 201–204 (1994).
12. Namikawa, R. *et al.* Ontogenic development of T and B cells and non-lymphoid cells in the white pulp of human spleen. *Immunology* **57**, 61–69 (1986).
13. Humphrey, J. H., Grennan, D. & Sundaram, V. The origin of follicular dendritic cells in the mouse and the mechanism of trapping of immune complexes on them. *Eur. J. Immunol.* **14**, 859–864 (1984).
14. Bofill, M., Akbar, A. N. & Amlot, P. L. Follicular dendritic cells share a membrane-bound protein with fibroblasts. *J. Pathol.* **191**, 217–226 (2000).
15. Allen, C. D. C. & Cyster, J. G. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: Phenotype and function. *Semin. Immunol.* **20**, 14–25 (2008).
16. Kapasi, Z. F. *et al.* Follicular Dendritic Cell (FDC) Precursors in Primary Lymphoid Tissues. *J. Immunol.* **160**, 1078 LP-1084 (1998).
17. Igyártó, B.-Z., Magyar, A. & Oláh, I. Origin of follicular dendritic cell in the chicken spleen. *Cell Tissue Res.* **327**, 83–92 (2007).
18. Lindhout, E. *et al.* Fibroblast-Like Synoviocytes from Rheumatoid Arthritis Patients Have Intrinsic Properties of Follicular Dendritic Cells. *J. Immunol.* **162**, 5949 LP-5956 (1999).
19. Lee, I. Y. & Choe, J. Human follicular dendritic cells and fibroblasts share the 3C8 antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 701–707 (2003).
20. Muñoz-Fernández, R. *et al.* Follicular Dendritic Cells Are Related to Bone Marrow Stromal Cell Progenitors and to Myofibroblasts. *J. Immunol.* **177**, 280 LP-289 (2006).
21. Saygin, C., Uzunaslán, D., Ozguroglu, M., Senocak, M. & Tuzuner, N. Dendritic cell sarcoma: A pooled analysis including 462 cases with presentation of our case series. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **88**, 253–271 (2013).
22. Weiss, L. M. in *eLS* (John Wiley & Sons, Ltd, 2008). doi:10.1038/npg.els.0000525
23. Chan, J. K., Fletcher, C. D., Nayler, S. J. & Cooper, K. Follicular dendritic cell sarcoma.

- Clinicopathologic analysis of 17 cases suggesting a malignant potential higher than currently recognized. *Cancer* **79**, 294–313 (1997).
24. Chan, A. C. L. *et al.* Development of follicular dendritic cell sarcoma in hyaline-vascular Castleman's disease of the nasopharynx: tracing its evolution by sequential biopsies. *Histopathology* **38**, 510–518 (2001).
  25. Perez-Ordenez, B. & Rosai, J. Follicular dendritic cell tumor: review of the entity. *Semin. Diagn. Pathol.* **15**, 144–154 (1998).
  26. Cheuk, W. *et al.* Inflammatory Pseudotumor-Like Follicular Dendritic Cell Tumor: A Distinctive Low-Grade Malignant Intra-abdominal Neoplasm With Consistent Epstein–Barr Virus Association. *Am. J. Surg. Pathol.* **25**, (2001).
  27. Hollowood, K., Stamp, G., Zouvani, L. & Fletcher, C. D. M. Extranodal Follicular Dendritic Cell Sarcoma of the Gastrointestinal Tract: Morphologic, Immunohistochemical and Ultrastructural Analysis of Two Cases. *Am. J. Clin. Pathol.* **103**, 90 LP-97 (1995).
  28. Duan, G. *et al.* Extranodal Follicular Dendritic Cell Sarcoma of the Pharyngeal Region. *Am. J. Clin. Pathol.* **133**, 49 LP-58 (2010).
  29. Perez-Ordenez, B., Erlandson, R. A. & Rosai, J. Follicular Dendritic Cell Tumor: Report of 13 Additional Cases of a Distinctive Entity. *Am. J. Surg. Pathol.* **20**, (1996).
  30. Wu, A. & Pullarkat, S. Follicular Dendritic Cell Sarcoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **140**, 186–190 (2016).
  31. Grogg, K. L., Lae, M. E., Kurtin, P. J. & Macon, W. R. Clusterin Expression Distinguishes Follicular Dendritic Cell Tumors From Other Dendritic Cell Neoplasms: Report of a Novel Follicular Dendritic Cell Marker and Clinicopathologic Data on 12 Additional Follicular Dendritic Cell Tumors and 6 Additional Inter. *Am. J. Surg. Pathol.* **28**, (2004).
  32. Zhang, H. *et al.*  $\gamma$ -Synuclein Is a Promising New Marker for Staining Reactive Follicular Dendritic Cells, Follicular Dendritic Cell Sarcoma, Kaposi Sarcoma, and Benign and Malignant Vascular Tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* **35**, (2011).
  33. Vermi, W. *et al.* Identification of CXCL13 as a new marker for follicular dendritic cell sarcoma. *J. Pathol.* **216**, 356–64 (2008).
  34. ES Jaffe, NL Harris, JW Vardiman, E Campo, D. A. *Hematopathology*. (Elsevier, 2011).
  35. Facchetti, F. & Lorenzi, L. Follicular dendritic cells and related sarcoma. *Semin. Diagn. Pathol.* **33**, 262–276 (2016).
  36. Go, H. *et al.* Frequent detection of BRAF(V600E) mutations in histiocytic and dendritic cell neoplasms. *Histopathology* **65**, 261–272 (2014).
  37. Griffin, G. K., Sholl, L. M., Lindeman, N. I., Fletcher, C. D. M. & Hornick, J. L. Targeted genomic sequencing of follicular dendritic cell sarcoma reveals recurrent alterations in NF- $\kappa$ B regulatory genes. *Mod Pathol* **29**, 67–74 (2016).
  38. Hartmann, S. *et al.* miRNA expression profiling divides follicular dendritic cell sarcomas into two groups, related to fibroblasts and myopericytomas or Castleman's disease. *Eur. J. Cancer* **64**, 159–166 (2016).
  39. Haroche, J. *et al.* Dramatic efficacy of vemurafenib in both multisystemic and refractory Erdheim-Chester disease and Langerhans cell histiocytosis harboring the BRAF V600E mutation. *Blood* **121**, 1495 LP-1500 (2013).
  40. Sun, X. *et al.* Epidermal growth factor receptor expression in follicular dendritic cells: a shared feature of follicular dendritic cell sarcoma and Castleman's disease. *Hum. Pathol.* **34**, 835–840 (2003).
  41. Soriano, A. O. *et al.* Follicular dendritic cell sarcoma: a report of 14 cases and a review of the literature. *Am. J. Hematol.* **82**, 725–8 (2007).
  42. Guillou L1, A. A. Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles. *Virchows Arch.* **456**, 201–17 (2010).
  43. Singer S, Demetri GD, Baldini EH, F. C. Management of soft tissue sarcomas: an overview

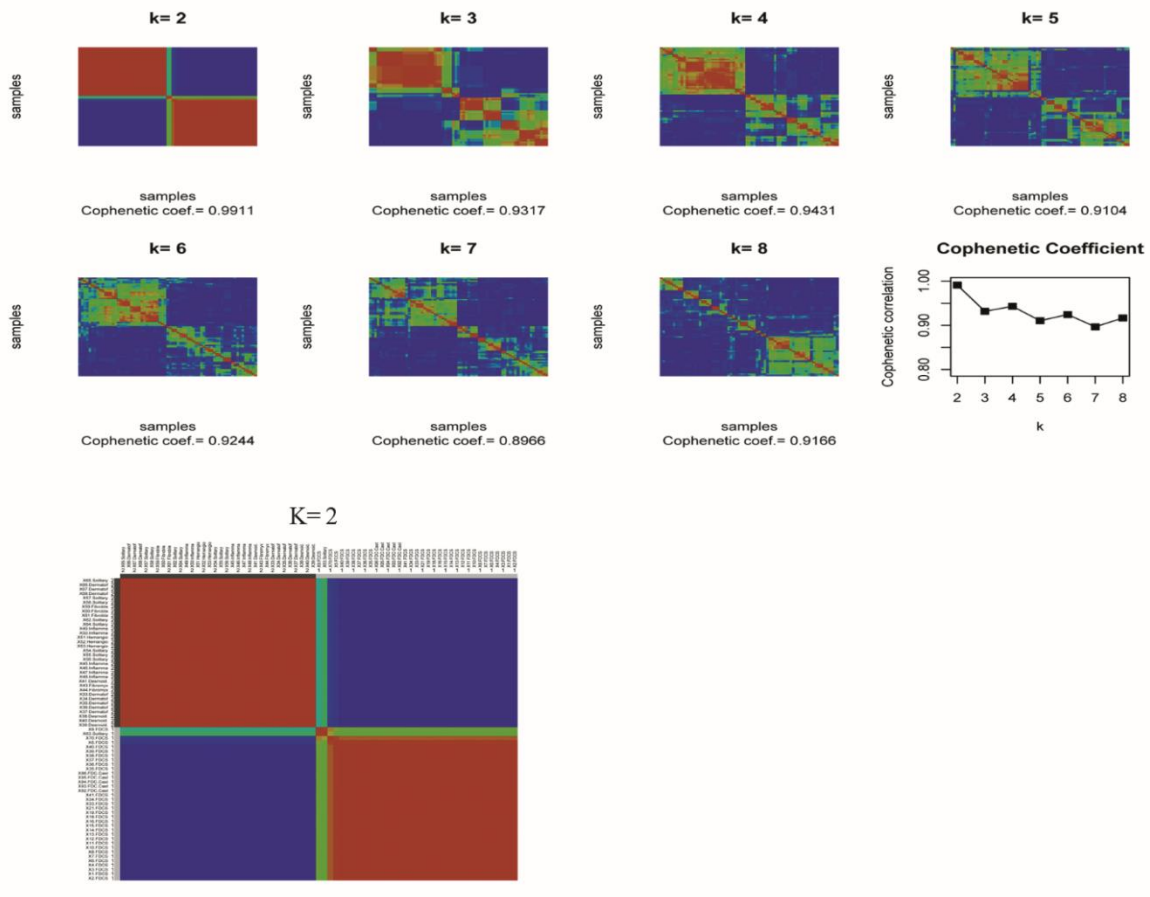
- and update. *Lancet Oncol.* **1**, 75–85 (2000).
44. Jo, V. Y. & Fletcher, C. D. M. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology* **46**, 95–104 (2014).
  45. Gustafson P. Soft tissue sarcoma. Epidemiology and prognosis in 508 patients. *Acta Orthop Scand Suppl.* **259**, 1–31 (1994).
  46. Kirkpatrick, C. J. *et al.* Biomaterial-Induced Sarcoma: A Novel Model to Study Preneoplastic Change. *Am. J. Pathol.* **156**, 1455–1467 (2000).
  47. Wibmer, C., Leithner, A., Zielonke, N., Sperl, M. & Windhager, R. Increasing incidence rates of soft tissue sarcomas? A population-based epidemiologic study and literature review. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **21**, 1106–1111 (2010).
  48. Deyrup, A. T. & Weiss, S. W. Grading of soft tissue sarcomas: the challenge of providing precise information in an imprecise world. *Histopathology* **48**, 42–50 (2006).
  49. Russell, W. O. *et al.* A clinical and pathological staging system for soft tissue sarcomas. *Cancer* **40**, 1562–1570 (1977).
  50. Gustafson P1, Dreinhöfer KE, R. A. Soft tissue sarcoma should be treated at a tumor center. A comparison of quality of surgery in 375 patients. *Acta Orthop Scand.* **55**, 47–50 (1994).
  51. Rydholm A. Management of patients with soft-tissue tumors. Strategy developed at a regional oncology center. *Acta Orthop Scand Suppl.* **203**, 13–77 (1983).
  52. Bauer HC1, Trovik CS, Alvegård TA, Berlin O, Erlanson M, Gustafson P, Klepp R, Möller TR, Rydholm A, Saeter G, Wahlström O, W. T. Monitoring referral and treatment in soft tissue sarcoma: study based on 1,851 patients from the Scandinavian Sarcoma Group Register. *Acta Orthop Scand.* **72**, 150–9
  53. Stacchiotti, S. *et al.* Tumor response assessment by modified Choi criteria in localized high-risk soft tissue sarcoma treated with chemotherapy. *Cancer* **118**, 5857–5866 (2012).
  54. Nakamura, T., Matsumine, A. & Sudo, A. The value of trabectedin in the treatment of soft tissue sarcoma. *Ther. Clin. Risk Manag.* **12**, 73–79 (2016).
  55. Canter, R. J. *et al.* Why do patients with low-grade soft tissue sarcoma die? *Ann. Surg. Oncol.* **15**, 3550–3560 (2008).
  56. Dani N, Olivero M, Mareschi K, vanDuist M, Miretti S, Cuvertino S, Patané S, Calogero RA, Ferracini R, Scotlandi K, Fagioli F, D. M. Transcriptional profiles of MET transformed osteoblast clones (MET-HOB) and mesenchymal stem cells (MSC) where osteoblast differentiation was induced. *GEO, NCBI*
  57. Laginestra, M. A. *et al.* Pathogenetic and diagnostic significance of microRNA deregulation in peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified. *Blood Cancer J.* **4**, 259 (2014).
  58. Waddell, N. *et al.* Gene expression profiling of formalin-fixed, paraffin-embedded familial breast tumours using the whole genome-DASL assay. *J. Pathol.* **221**, 452–461 (2010).
  59. April, C. *et al.* Whole-Genome Gene Expression Profiling of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Samples. *PLoS One* **4**, e8162 (2009).
  60. April, C. S. & Fan, J.-B. in (ed. O’Driscoll, L.) 77–98 (Humana Press, 2011). doi:10.1007/978-1-61779-289-2\_6
  61. Simon, R. *et al.* Analysis of Gene Expression Data Using BRB-Array Tools. *Cancer Inform.* **3**, 11–17 (2007).
  62. Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. & Botstein, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 14863–14868 (1998).
  63. Slonim, D. K. From patterns to pathways: gene expression data analysis comes of age. *Nat Genet*
  64. Saeed, A. I. *et al.* TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**, 374–378 (2003).
  65. Jolliffe, I. T. *ANALYSIS, PRINCIPAL COMPONENT.* (University of Aberdeen, Aberdeen, UK, 2002). doi:10.1007/b98835
  66. Brunet, J.-P., Tamayo, P., Golub, T. R. & Mesirov, J. P. Metagenes and molecular pattern

- discovery using matrix factorization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 4164–4169 (2004).
67. Lee, D. D. & Seung, H. S. Learning the parts of objects by non-negative matrix factorization. *Nature* **401**, 788–791 (1999).
  68. Johnson, W. E., Li, C. & Rabinovic, A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* **8**, 118–127 (2007).
  69. Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 5116–5121 (2001).
  70. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 15545–15550 (2005).
  71. Kamburov, A., Stelzl, U., Lehrach, H. & Herwig, R. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res.* **41**, D793–800 (2013).
  72. Jenssen, T.-K., Laegreid, A., Komorowski, J. & Hovig, E. A literature network of human genes for high-throughput analysis of gene expression. *Nat Genet* **28**, 21–28 (2001).
  73. Hosack, D. A., Dennis, G., Sherman, B. T., Lane, H. C. & Lempicki, R. A. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol.* **4**, R70–R70 (2003).
  74. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2008).
  75. Dennis, G. J. *et al.* DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* **4**, P3 (2003).
  76. Newman, A. M. *et al.* Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Meth* **12**, 453–457 (2015).
  77. Edgar, R., Domrachev, M. & Lash, A. E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* **30**, 207–210 (2002).
  78. Victora GD; Nussenzweig MC. Germinal Centers. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 429–457 (2012).
  79. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **12**, 252–264
  80. Krautler, N. J. *et al.* Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors. *Cell* **150**, 194–206 (2012).
  81. Sangaletti, S. *et al.* Stromal niche communalities underscore the contribution of the matricellular protein SPARC to B-cell development and lymphoid malignancies. *Oncoimmunology* **3**, e28989 (2014).
  82. Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 621–663 (2011).
  83. Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L. J. & McHeyzer-Williams, M. G. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* **30**, 324–335 (2009).
  84. Tangye, S. G., Ma, C. S., Brink, R. & Deenick, E. K. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 412–426 (2013).
  85. Good-Jacobson, K. L. *et al.* PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat. Immunol.* **11**, 535–542 (2010).

## **7. APPENDICE**

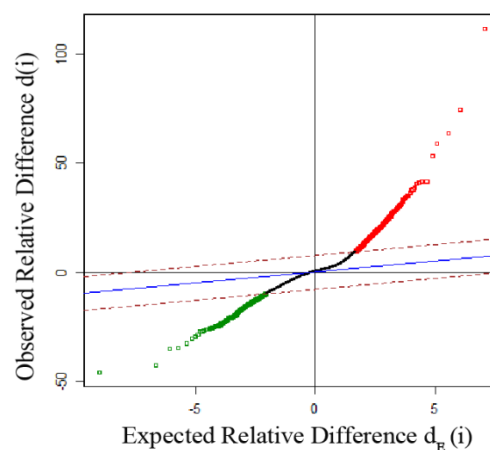
## FIGURE

**Figura 1:** Per valutare la stabilità dello HC, è stata eseguita una *Non Negative Matrix Factorization* (NMF) mediante l'uso di un diverso numero di cluster (*range* 2-8). Il numero ottimale di cluster è stato determinato per  $k = 2$  e Coefficiente di Correlazione Cofenetica = 0.991: uno comprendente i sarcomi FDC e le FDCs microdissectate da malattia di Castleman, l'altro che include gli altri tumori mesenchimali e i fibroblasti.

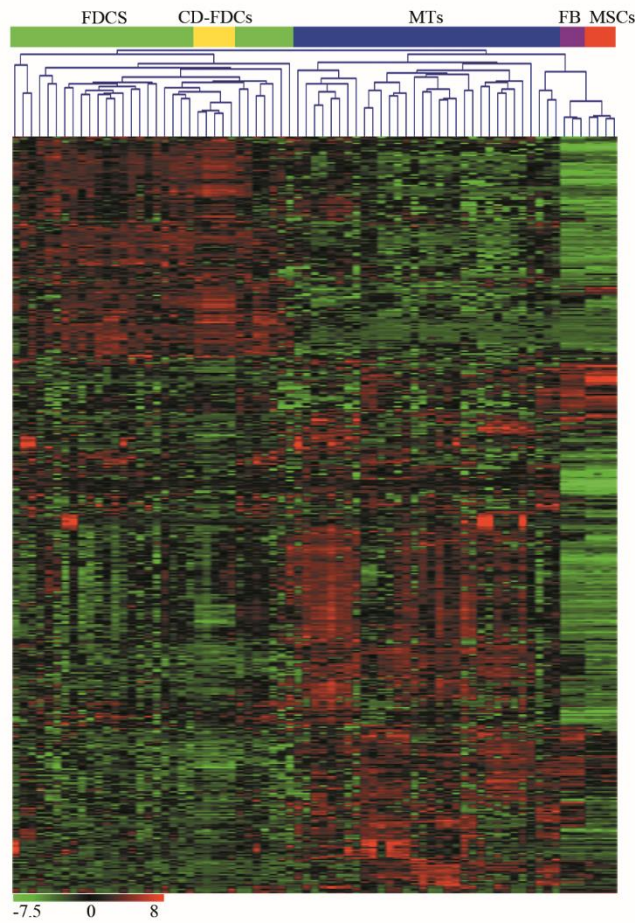


**Figura 2:** L'analisi supervisionata (SAM) identifica 1.289 geni differenzialmente espressi tra CD-FDCs e Fibroblasti ( $FDR \leq 0.001$ ,  $FC \geq 2$ )

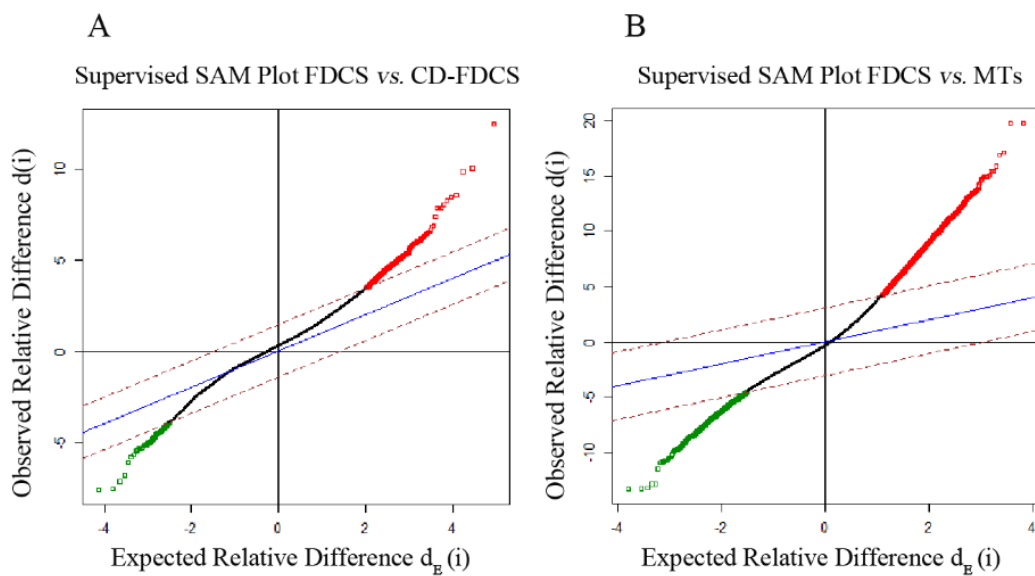
Supervised SAM Plot CD-FDCs vs. Fibroblasts



**Figura 3:** Analisi non supervisionata HC (503 geni) di sarcomi FDC (FDCS) (verde), CD-FDCs (giallo), tumori mesenchimali (MTs) (blu), fibroblasti (FB) (viola) e cellule staminali mesenchimali (MSCs) (arancio).



**Figura 4:** L'analisi supervisionata SAM identifica: **A)** 370 geni differenzialmente espressi tra sarcomi FDC (FDCS) e CD-FDCs (FDR<0.1, FC≥2); **B)** 2.927 geni differenzialmente espressi tra sarcomi FDC e altri tumori mesenchimali (MTs) (FDR<0.0001, FC≥2)



## TABELLE

**Tabella 1:** Caratteristiche dei pazienti con sarcoma FDC (FDCS). NA= non disponibile, 1=positivo, 0=negativo

GEP_ID	Età	Sesso	Localizzazione della biopsia	Presentazione clinica	CD2 1	CD2 3	CD3 5	CXCL1 3	Clusterin a	Claudina 4	PDP N	EBE R	Ciclina D1	BCL2	Cellule T >=10% (1)	Cellule B >=10% (1)
FDCS_5	55	F	milza	unifocale	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0
FDCS_9	68	F	LN cervicale	unifocale	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
FDCS_13	68	F	LN cervicale	Unifocale con coinvolgimento ipsilaterale linfonodale	1	0	1	1	NA	NA	1	NA	0	0	1	1
FDCS_21	36	M	epifaringe	unifocale	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
FDCS_70	62	F	tiroide	unifocale	1	0	0	1	NA	NA	0	0	0	1	1	1
FDCS_1	69	M	LN	unifocale	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
FDCS_2	76	M	tessuto molle	NA	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
FDCS_6	56	F	LN cervicale	unifocale, con ricorrenze multiple locali	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
FDCS_7	48	F	Addome (mesocolon)	unifocale	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1
FDCS_11	53	F	fegato	unifocale	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0
FDCS_12	84	F	ghiandola parotide	LN metastasi at presentation	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
FDCS_14	56	M	LN	unifocale	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
FDCS_16	67	M	mediastino	NA	1	1	0	1	1		0	0	1	0	1	0
FDCS_33	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FDCS_38	73	F	retroperitoneo (LN multipli retrop.)	unifocale (nodi multipli)	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1
FDCS_39	60	M	milza	unifocale	1	1	0	1	1	NA	0	1	0	0	1	0
FDCS_3	53	F	LN (ghiandola surrenale)	unifocale	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
FDCS_4	73	M	LN	associato con DLBCL	0	1	0	1	1	NA	NA	0	NA	NA	1	0
FDCS_8	70	M	LN cervicale	unifocale	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1
FDCS_10	74	M	mediastino	sistemico (polmone, fegato, ossa, linfonodi, colon, omento, peritoneo)	1	1	1	1	1	NA	NA	0	NA	NA	0	0
FDCS_15	44	F	LN peripancreatico	NA	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
FDCS_18	50	F	retroperitoneo	unifocale	1	1	1	1	NA	NA	1	0	1	0	0	0



FDCS_19	36	M	retroperitoneo	unifocale	1	1	1	1	NA	NA	1	0	1	1	0	0
FDCS_20	35	M	retroperitoneo	NA	0	1	0	1	NA	NA	0	0	1	0	0	0
FDCS_35	70	F	LN sovraclaveare	unifocale	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
FDCS_37	78	M	LN cervicale	unifocale	1	1	1	1	1		1	0	1	0	0	0
FDCS_40	50	F	LN cervicale	unifocale	1	1	1	1	NA	NA	1	0	1	0	1	1
FDCS_41	75	M	mediastino/polmone	multifocale (LN toracici e addominali, diaframma)	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
FDCS_69	17	F	addome	recidiva dopo masse addominali multiple	1	1	1	1	NA	NA	1	0	0	0	0	0

**Tabella 2:** I top 500 geni, in ordine di *fold change*, differenzialmente espressi tra CD-FDCs e fibroblasti. Lo stimato FDR (false discovery rate) tra i geni significativi è 0.00091.

<i>Geni up-regolati nelle CD-FDCs secondo fold change</i>		
Gene	Log <sub>2</sub> Fold Change	Descrizione
FDCSP	375.03	follicular dendritic cell secreted protein
CCL19	169.03	chemokine (C-C motif) ligand 19
CCL21	163.74	chemokine (C-C motif) ligand 21
LYZ	154.96	lysozyme
LTB	148.2	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
CXCR4	133.53	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
LCP1	131.73	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
CR2	125.42	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2
PARVG	122.59	parvin, gamma
CD74	109.9	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
POU2AF1	107.03	POU class 2 associating factor 1
CORO1A	98.45	coronin, actin binding protein, 1A
CXCL13	94.58	chemokine (C-X-C motif) ligand 13
PLEK	93.59	pleckstrin
HLA-DMB	86.44	major histocompatibility complex, class II, DM beta
UBD	81.22	ubiquitin D
NCKAP1L	76.4	NCK-associated protein 1-like
HLA-DPA1	76.16	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1
PTPRC	72.97	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
IKZF1	70.83	IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros)
NAPSB	69.12	napsin B aspartic peptidase, pseudogene
PLVAP	68.98	plasmalemma vesicle associated protein
CD53	67.61	CD53 molecule
SERPINA3	65.52	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3
CD48	65.14	CD48 molecule
CD79B	65	CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta
LRMP	61.38	lymphoid-restricted membrane protein
CSF2RB	60.17	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
FCER2	59.75	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)
SELL	59.13	selectin L
SCIMP	58.54	SLP adaptor and CSK interacting membrane protein
MMP9	57.16	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
C1QC	52.28	complement component 1, q subcomponent, C chain
EXOC3L4	50.99	exocyst complex component 3-like 4
CETP	48.84	cholesteryl ester transfer protein, plasma
ITGAL	48.66	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)

SNX10	48.51	sorting nexin 10
CPNE5	48.42	copine V
HLA-DRA	45.72	major histocompatibility complex, class II, DR alpha
CD79A	45.64	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha
LSP1	44.95	lymphocyte-specific protein 1
BIK	44.93	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
SERPINB9	43.86	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9
ITGB2	43.82	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)
PTPN6	43.55	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6
SPOCK2	43.02	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 2
SRGN	42.81	serglycin
ALOX5AP	42.1	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein
PTPRCAP	41.86	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C-associated protein
HCK	41.79	HCK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase
MAP4K1	41.74	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1
SNORA20	41.63	small nucleolar RNA, H/ACA box 20
KCNK12	41.4	potassium channel, subfamily K, member 12
CD19	41.32	CD19 molecule
TMEM163	40.37	transmembrane protein 163
TNFRSF9	40.2	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
CD22	39.66	CD22 molecule
CXCR5	39.36	chemokine (C-X-C motif) receptor 5
CD200	39.24	CD200 molecule
GIMAP4	37.76	GTPase, IMAP family member 4
CXorf21	37.42	chromosome X open reading frame 21
GAPT	37.3	GRB2-binding adaptor protein, transmembrane
HLA-DRB6	36.71	major histocompatibility complex, class II, DR beta 6 (pseudogene)
SASH3	36.65	SAM and SH3 domain containing 3
SNORD90	35.98	small nucleolar RNA, C/D box 90
CYTH4	35.3	cytohesin 4
SNORA54	35.05	small nucleolar RNA, H/ACA box 54
CD180	34.94	CD180 molecule
CD300LF	33.95	CD300 molecule-like family member f
GJA4	33.78	gap junction protein, alpha 4, 37kDa
F11R	33.47	F11 receptor
P2RY8	33.14	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8
ARHGAP30	33.06	Rho GTPase activating protein 30
SNORA36B	33.05	small nucleolar RNA, H/ACA box 36B
CD84	32.92	CD84 molecule
CR1	32.59	complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)

STAP1	32.22	signal transducing adaptor family member 1
PLCG2	32.19	phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)
RGS13	31.89	regulator of G-protein signaling 13
ADAMDEC1	31.31	ADAM-like, decysin 1
SLAMF6	31.24	SLAM family member 6
PRKCB	31.14	protein kinase C, beta
FCRL1	30.92	Fc receptor-like 1
MS4A6A	30.83	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A
PIK3CG	30.73	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit gamma
GPR114	30.7	G protein-coupled receptor 114
CLEC4G	30.68	C-type lectin domain family 4, member G
SP140	30.48	SP140 nuclear body protein
HLA-DRB1	30.43	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1
RCSD1	30.43	RCSD domain containing 1
DACT2	30.16	dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 2
CSTA	30.03	cystatin A (stefin A)
HIST1H2AJ	29.79	histone cluster 1, H2aj
GIMAP7	29.77	GTPase, IMAP family member 7
HIST1H2AH	29.5	histone cluster 1, H2ah
SLC40A1	29.41	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1
TNFRSF4	29.32	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
SLCO2B1	28.61	solute carrier organic anion transporter family, member 2B1
HIST1H2BE	28.33	histone cluster 1, H2be
LOC606724	28.21	coronin, actin binding protein, 1A pseudogene
HIST1H2BO	28.2	histone cluster 1, H2bo
VCAM1	28.17	vascular cell adhesion molecule 1
KLHL6	28.04	kelch-like family member 6
FGD2	27.99	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 2
PARM1	27.75	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1
ITK	27.68	IL2-inducible T-cell kinase
TLR10	27.66	toll-like receptor 10
CD37	27.09	CD37 molecule
DOCK8	27.06	dedicator of cytokinesis 8
IL2RG	27.01	interleukin 2 receptor, gamma
SERPINA9	26.84	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 9
NCF4	26.34	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa
WAS	26.31	Wiskott-Aldrich syndrome
GMFG	26.24	glia maturation factor, gamma
IGJ	26.2	immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides
IL10RA	25.79	interleukin 10 receptor, alpha
IRF8	25.62	interferon regulatory factor 8

SNORA72	25.62	small nucleolar RNA, H/ACA box 72
HLA-DOA	25.55	major histocompatibility complex, class II, DO alpha
SNORD45A	25.38	small nucleolar RNA, C/D box 45A
LY86	25.14	lymphocyte antigen 86
CIITA	25.11	class II, major histocompatibility complex, transactivator
HCLS1	24.85	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1
SPI1	24.83	Spi-1 proto-oncogene
HIST1H3C	24.8	histone cluster 1, H3c
CD1C	24.51	CD1c molecule
PTGDS	24.3	prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)
SCARNA8	24.26	small Cajal body-specific RNA 8
TMEM176B	23.81	transmembrane protein 176B
NPHS1	23.54	nephrosis 1, congenital, Finnish type (nephrin)
DENND1C	23.38	DENN/MADD domain containing 1C
SNORA21	23.27	small nucleolar RNA, H/ACA box 21
LTA	23.25	lymphotoxin alpha
FGD3	22.97	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 3
C7	22.69	complement component 7
SNORA9	22.62	small nucleolar RNA, H/ACA box 9
HIST1H2BM	22.58	histone cluster 1, H2bm
REM1	22.49	RAS (RAD and GEM)-like GTP-binding 1
LGALS9	22.42	lectin, galactoside-binding, soluble, 9
SNORA76A	22.13	small nucleolar RNA, H/ACA box 76A
HIST1H2AI	22.02	histone cluster 1, H2ai
TSPAN33	21.86	tetraspanin 33
SNORD2	21.7	small nucleolar RNA, C/D box 2
VTRNA1-1	21.67	vault RNA 1-1
CCR6	21.57	chemokine (C-C motif) receptor 6
HIST1H4L	21.52	histone cluster 1, H4l
MFNG	21.33	MFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase
HLA-DOB	21.25	major histocompatibility complex, class II, DO beta
CTSS	21.1	cathepsin S
HIST1H4A	20.37	histone cluster 1, H4a
KCNC3	20.32	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 3
SNORA26	20.1	small nucleolar RNA, H/ACA box 26
SNORA27	20.06	small nucleolar RNA, H/ACA box 27
SNORA74A	19.94	small nucleolar RNA, H/ACA box 74A
MYH11	19.92	myosin, heavy chain 11, smooth muscle
CD14	19.84	CD14 molecule
VANGL2	19.78	VANGL planar cell polarity protein 2
HIST2H3D	19.72	histone cluster 2, H3d
SNORD27	19.65	small nucleolar RNA, C/D box 27
SNORD21	19.44	small nucleolar RNA, C/D box 21
SNORA28	19.13	small nucleolar RNA, H/ACA box 28

TBC1D10C	19.12	TBC1 domain family, member 10C
IL21R	19.02	interleukin 21 receptor
SNORD68	19.02	small nucleolar RNA, C/D box 68
RNU11	18.97	RNA, U11 small nuclear
ITGAX	18.9	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
NCF1C	18.9	neutrophil cytosolic factor 1C pseudogene
HIST1H4F	18.85	histone cluster 1, H4f
OAS2	18.7	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa
SCARNA5	18.65	small Cajal body-specific RNA 5
CD38	18.53	CD38 molecule
RAC2	18.32	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)
GRAP	18.22	GRB2-related adaptor protein
PDLIM3	18.19	PDZ and LIM domain 3
SNORD57	18.16	small nucleolar RNA, C/D box 57
SYK	18.09	spleen tyrosine kinase
HIST2H2AC	18.02	histone cluster 2, H2ac
HIST1H3F	17.82	histone cluster 1, H3f
SNORD35B	17.79	small nucleolar RNA, C/D box 35B
SNORA31	17.74	small nucleolar RNA, H/ACA box 31
TAGAP	17.69	T-cell activation RhoGTPase activating protein
SIGLEC14	17.55	sialic acid binding Ig-like lectin 14
CD247	17.41	CD247 molecule
LCP2	17.28	lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)
SOX8	17.19	SRY (sex determining region Y)-box 8
PLA2G7	16.98	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)
SNORD110	16.95	small nucleolar RNA, C/D box 110
STK17B	16.94	serine/threonine kinase 17b
LCK	16.56	LCK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase
SNORD30	16.41	small nucleolar RNA, C/D box 30
TNFRSF13C	16.37	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13C
SNORA1	16.37	small nucleolar RNA, H/ACA box 1
FYB	16.23	FYN binding protein
SNORD8	16.19	small nucleolar RNA, C/D box 8
HIST1H2BD	16.11	histone cluster 1, H2bd
SNORD78	16.1	small nucleolar RNA, C/D box 78
ITM2A	15.95	integral membrane protein 2A
SPIB	15.94	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)
HIST1H2BH	15.86	histone cluster 1, H2bh
SNORD25	15.82	small nucleolar RNA, C/D box 25
SNORA49	15.73	small nucleolar RNA, H/ACA box 49
ELMO1	15.72	engulfment and cell motility 1
C3	15.51	complement component 3

CHD7	15.36	chromodomain helicase DNA binding protein 7
SNORA14B	15.27	small nucleolar RNA, H/ACA box 14B
FERMT3	15.25	fermitin family member 3
ST8SIA4	15.24	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4
CD1A	15.2	CD1a molecule
SNORD97	15.2	small nucleolar RNA, C/D box 97
SNORD58A	15.1	small nucleolar RNA, C/D box 58A
RASSF5	15.02	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5
SNORD36A	14.93	small nucleolar RNA, C/D box 36A
SNORD117	14.93	small nucleolar RNA, C/D box 117
LAPTM5	14.92	lysosomal protein transmembrane 5
CD86	14.86	CD86 molecule
ZC3H12D	14.83	zinc finger CCCH-type containing 12D
CHL1	14.74	cell adhesion molecule L1-like
LIMD2	14.7	LIM domain containing 2
SNORD41	14.7	small nucleolar RNA, C/D box 41
CXCL14	14.57	chemokine (C-X-C motif) ligand 14
PKP2	14.49	plakophilin 2
JAK3	14.47	Janus kinase 3
ATP8A1	14.47	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), class I, type 8A, member 1
SNORD36C	14.46	small nucleolar RNA, C/D box 36C
SAMSN1	14.43	SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals 1
SNORD10	14.43	small nucleolar RNA, C/D box 10
PTPN7	14.42	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7
SNORA67	14.37	small nucleolar RNA, H/ACA box 67
SNORD62B	14.27	small nucleolar RNA, C/D box 62B
MS4A4A	14.26	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A
YWHAZ	14.11	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta
PCDHAC1	13.97	protocadherin alpha subfamily C, 1
SNORD15A	13.91	small nucleolar RNA, C/D box 15A
HDAC9	13.85	histone deacetylase 9
APOC1	13.84	apolipoprotein C-I
PAPLN	13.72	papilin, proteoglycan-like sulfated glycoprotein
SNORD54	13.7	small nucleolar RNA, C/D box 54
ZNF273	13.67	zinc finger protein 273
SNORD28	13.64	small nucleolar RNA, C/D box 28
SKAP2	13.53	src kinase associated phosphoprotein 2
ST8SIA1	13.48	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1
CD83	13.48	CD83 molecule
HIST1H1D	13.44	histone cluster 1, H1d
GPR183	13.38	G protein-coupled receptor 183

CCND2	13.37	cyclin D2
KIAA0226L	13.35	KIAA0226-like
IL18	13.31	interleukin 18
ARHGAP9	13.28	Rho GTPase activating protein 9
PLEKHG1	13.23	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 1
SNORA11	13.19	small nucleolar RNA, H/ACA box 11
<b><i>Geni down-regolati nelle CD-FDCs ordinati secondo fold change</i></b>		
<b>Gene</b>	<b>Log<sub>2</sub> Fold Change</b>	<b>Descrizione</b>
FBLN1	-228.47	fibulin 1
COL8A1	-138.39	collagen, type VIII, alpha 1
FST	-102.75	follistatin
SEMA3B	-72.86	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B
FLNC	-58.92	filamin C, gamma
LOX	-48.56	lysyl oxidase
LOXL4	-45.84	lysyl oxidase-like 4
MGARP	-45.64	mitochondria-localized glutamic acid-rich protein
LRRN4CL	-39.88	LRRN4 C-terminal like
FRMD6	-39.41	FERM domain containing 6
THBS1	-38.09	thrombospondin 1
DCLK2	-37.29	doublecortin-like kinase 2
TNFRSF11B	-36.77	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
CSDC2	-36.26	cold shock domain containing C2, RNA binding
F10	-35.39	coagulation factor X
C3HC4	-35.27	membrane-associated ring finger (C3HC4) 4, E3 ubiquitin protein ligase
TFAP2A	-35.01	transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha)
APCDD1L	-34.34	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1-like
SLIT2	-32.89	slit homolog 2 (Drosophila)
MAP1A	-31.67	microtubule-associated protein 1A
IGFBP6	-31.02	insulin-like growth factor binding protein 6
ITGB5	-30.97	integrin, beta 5
SOCS5	-29.86	suppressor of cytokine signaling 5
FSTL1	-29.46	follistatin-like 1
SVEP1	-28.73	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1
FBLN2	-28.14	fibulin 2
PSG4	-28.13	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4
CTDSPL	-28.07	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like
MEGF6	-27.93	multiple EGF-like-domains 6
STC2	-27.91	stanniocalcin 2
BMP4	-27.68	bone morphogenetic protein 4
RECK	-27.56	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs



MMP2	-27.08	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
PTK7	-26.79	protein tyrosine kinase 7
RPL32P18	-26.75	ribosomal protein L32 pseudogene 18
HOTAIR	-26.7	HOX transcript antisense RNA
ASS1	-25.39	argininosuccinate synthase 1
DIO2	-24.95	deiodinase, iodothyronine, type II
FKBP9P1	-24.8	FK506 binding protein 9 pseudogene 1
SPOCD1	-24.58	SPOC domain containing 1
DCN	-24.42	decorin
KCNK2	-23.87	potassium channel, subfamily K, member 2
MMP3	-23.76	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
IGF2BP2	-23.64	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2
CEMIP	-22.95	cell migration inducing protein, hyaluronan binding
SH2D4A	-22.6	SH2 domain containing 4A
HOXA11	-21.62	homeobox A11
SULF1	-20.84	sulfatase 1
MGST1	-20.55	microsomal glutathione S-transferase 1
OAF	-20.49	OAF homolog (Drosophila)
COL12A1	-20.21	collagen, type XII, alpha 1
EFEMP1	-19.43	EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
SLC6A9	-19.1	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9
CDH13	-18.92	cadherin 13
NLGN1	-18.4	neuroligin 1
HOXA13	-18.05	homeobox A13
TEX2	-18.01	testis expressed 2
PACSIN3	-17.75	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3
RAB7B	-17.7	RAB7B, member RAS oncogene family
SLIT3	-17.61	slit homolog 3 (Drosophila)
ELFN2	-17.21	extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type III domain containing 2
PSG7	-16.89	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 7 (gene/pseudogene)
TFAP2C	-16.82	transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)
GREM1	-16.49	gremlin 1, DAN family BMP antagonist
OXTR	-15.86	oxytocin receptor
OSR2	-15.63	odd-skipped related transcription factor 2
AKAP12	-15.6	A kinase (PRKA) anchor protein 12
PTPLA	-15.38	protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member A
FGD1	-15.18	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1
TNFRSF12A	-15.15	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A
PITX1	-15.06	paired-like homeodomain 1
BEND6	-14.71	BEN domain containing 6

GRIK2	-14.65	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2
GSTO2	-14.62	glutathione S-transferase omega 2
CMBL	-14.52	carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas)
CPZ	-14.31	carboxypeptidase Z
KRT19	-14.27	keratin 19
ARHGAP10	-14.22	Rho GTPase activating protein 10
OSBPL5	-14.07	oxysterol binding protein-like 5
MIR125B1	-13.98	microRNA 125b-1
SRPX	-13.92	sushi-repeat containing protein, X-linked
WDR19	-13.88	WD repeat domain 19
EXT1	-13.8	exostosin glycosyltransferase 1
ERRFI1	-13.79	ERBB receptor feedback inhibitor 1
OSR1	-13.78	odd-skipped related transcription factor 1
AMY1A	-13.58	amylase, alpha 1A (salivary)
SHOX	-13.52	short stature homeobox
GTF2IRD1	-13.35	GTF2I repeat domain containing 1
SERTAD4-AS1	-13.26	SERTAD4 antisense RNA 1
CAMK2N1	-13.05	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
ANTXR1	-12.69	anthrax toxin receptor 1
PRSS3	-12.53	protease, serine, 3
SLC2A12	-12.42	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 12
PRR5	-12.34	proline rich 5 (renal)
ADM	-12.3	adrenomedullin
PCK2	-11.89	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)
ZBTB47	-11.81	zinc finger and BTB domain containing 47
DPCD	-11.76	deleted in primary ciliary dyskinesia homolog (mouse)
RIN1	-11.76	Ras and Rab interactor 1
TYRO3	-11.51	TYRO3 protein tyrosine kinase
PODN	-11.46	podocan
BICC1	-11.39	BicC family RNA binding protein 1
F2RL2	-11.38	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2
POLR2L	-11.35	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L, 7.6kDa
PLEKHG4	-11.29	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 4
NPR3	-11.22	natriuretic peptide receptor 3
SLC7A11	-11.07	solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11
LRRC8E	-11	leucine rich repeat containing 8 family, member E
PSG5	-10.96	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5
DHX30	-10.86	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box helicase 30
TMEM54	-10.53	transmembrane protein 54
COL16A1	-10.41	collagen, type XVI, alpha 1
PFKP	-10.4	phosphofructokinase, platelet

SGCD	-10.31	sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)
EPN2	-10.22	epsin 2
SPATA18	-10.07	spermatogenesis associated 18
C7orf69	-10.04	chromosome 7 open reading frame 69
SHC3	-9.89	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 3
PTX3	-9.77	pentraxin 3, long
FZD2	-9.55	frizzled class receptor 2
DHRS3	-9.51	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3
PMP22	-9.48	peripheral myelin protein 22
CTNNA1	-9.44	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa
SLC16A2	-9.34	solute carrier family 16, member 2 (thyroid hormone transporter)
MIR612	-9.33	microRNA 612
FHL1	-9.28	four and a half LIM domains 1
HSPB3	-9.18	heat shock 27kDa protein 3
MAFG-AS1	-9.05	MAFG antisense RNA 1 (head to head)
APPL2	-9.01	adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 2
DOCK1	-8.99	dedicator of cytokinesis 1
MKX	-8.98	mohawk homeobox
AXIN2	-8.96	axin 2
SPON2	-8.91	spondin 2, extracellular matrix protein
NUDT11	-8.9	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 11
AMPH	-8.87	amphiphysin
EXTL1	-8.84	exostosin-like glycosyltransferase 1
PSPH	-8.7	phosphoserine phosphatase
C4orf48	-8.66	chromosome 4 open reading frame 48
ADCY6	-8.6	adenylate cyclase 6
HYAL3	-8.59	hyaluronoglucosaminidase 3
STAC	-8.45	SH3 and cysteine rich domain
POMT2	-8.41	protein-O-mannosyltransferase 2
AHNAK2	-8.32	AHNAK nucleoprotein 2
CD27-AS1	-8.26	CD27 antisense RNA 1
DKK1	-8.21	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1
SERP2	-8.08	stress-associated endoplasmic reticulum protein family member 2
UCN2	-8.02	urocortin 2
TRHDE	-8	thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme
HSPB2	-7.98	heat shock 27kDa protein 2
CTTN	-7.96	cortactin
OSBPL1A	-7.96	oxysterol binding protein-like 1A
IFT46	-7.95	intraflagellar transport 46
MTHFD1L	-7.95	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+

		dependent) 1-like
MOK	-7.91	MOK protein kinase
LEPREL4	-7.87	leprecan-like 4
DPP4	-7.84	dipeptidyl-peptidase 4
DSTN	-7.79	destrin (actin depolymerizing factor)
LPPR2	-7.77	lipid phosphate phosphatase-related protein type 2
CORO2B	-7.76	coronin, actin binding protein, 2B
GLI2	-7.74	GLI family zinc finger 2
SERTAD4	-7.68	SERTA domain containing 4
TMCO4	-7.68	transmembrane and coiled-coil domains 4
FLT3LG	-7.65	fms-related tyrosine kinase 3 ligand
PLA2R1	-7.65	phospholipase A2 receptor 1, 180kDa
TRIP6	-7.64	thyroid hormone receptor interactor 6
CD99L2	-7.62	CD99 molecule-like 2
ST3GAL4	-7.56	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4
MT1E	-7.49	metallothionein 1E
GULP1	-7.42	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1
CTNNBIP1	-7.29	catenin, beta interacting protein 1
IRS1	-7.24	insulin receptor substrate 1
NTM	-7.24	neurotrimin
ACAN	-7.23	aggrecan
TGM2	-7.22	transglutaminase 2
GAA	-7.19	glucosidase, alpha; acid
MYH3	-7.09	myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic
ZFYVE21	-7.09	zinc finger, FYVE domain containing 21
GAMT	-7.04	guanidinoacetate N-methyltransferase
EFS	-7.04	embryonal Fyn-associated substrate
GREM2	-7.01	gremlin 2, DAN family BMP antagonist
CYTH2	-6.98	cytohesin 2
ATOH8	-6.9	atonal homolog 8 (Drosophila)
ALX4	-6.86	ALX homeobox 4
LEPREL2	-6.86	leprecan-like 2
TMED10P1	-6.81	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast) pseudogene 1
CDC42BPA	-6.78	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)
MRGPRF	-6.72	MAS-related GPR, member F
ZNF692	-6.7	zinc finger protein 692
MPPE1	-6.65	metallophosphoesterase 1
C22orf29	-6.56	chromosome 22 open reading frame 29
KCNIP3	-6.54	Kv channel interacting protein 3, calsenilin
NEK11	-6.5	NIMA-related kinase 11
GRAMD3	-6.49	GRAM domain containing 3
LRRC42	-6.47	leucine rich repeat containing 42
PKD1	-6.47	polycystic kidney disease 1 (autosomal dominant)
PSG1	-6.47	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1

FGF5	-6.46	fibroblast growth factor 5
CHAC1	-6.33	ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli)
PLOD3	-6.26	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3
MAP2K5	-6.22	mitogen-activated protein kinase kinase 5
NTF3	-6.15	neurotrophin 3
SCN9A	-6.08	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit
SPARC	-6.03	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
DAGLA	-6.03	diacylglycerol lipase, alpha
RP9P	-6.03	retinitis pigmentosa 9 pseudogene
CEP164	-5.98	centrosomal protein 164kDa
C5orf30	-5.95	chromosome 5 open reading frame 30
EXT2	-5.95	exostosin glycosyltransferase 2
ITFG3	-5.94	integrin alpha FG-GAP repeat containing 3
SNX21	-5.94	sorting nexin family member 21
HOMER3	-5.91	homer homolog 3 (Drosophila)
ZHX3	-5.91	zinc fingers and homeoboxes 3
ANO4	-5.88	anoctamin 4
RBFA	-5.87	ribosome binding factor A (putative)
TTC25	-5.86	tetratricopeptide repeat domain 25
GDE1	-5.84	glycerophosphodiester phosphodiesterase 1
EHBP1	-5.83	EH domain binding protein 1
SYNE1	-5.83	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1
AHCTF1	-5.82	AT hook containing transcription factor 1
C1orf216	-5.79	chromosome 1 open reading frame 216
ARHGEF5	-5.76	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5
LAMA1	-5.76	laminin, alpha 1
COPZ2	-5.73	coatamer protein complex, subunit zeta 2
TMEM120A	-5.73	transmembrane protein 120A
TBX5	-5.66	T-box 5
PHGDH	-5.66	phosphoglycerate dehydrogenase
ARMC9	-5.55	armadillo repeat containing 9
NAGPA	-5.51	N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase
CAP2	-5.48	CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)
TARSL2	-5.35	threonyl-tRNA synthetase-like 2
ARHGAP28	-5.31	Rho GTPase activating protein 28
DOCK7	-5.29	dedicator of cytokinesis 7
GRIA1	-5.27	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1
CTSF	-5.25	cathepsin F
EPB41L4A-AS1	-5.24	EPB41L4A antisense RNA 1
SNORD114-4	-5.2	small nucleolar RNA, C/D box 114-4
SEMA3C	-5.18	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C
HRCT1	-5.17	histidine rich carboxyl terminus 1
ZNF219	-5.15	zinc finger protein 219
LAYN	-5.13	layilin

TBX3	-5.11	T-box 3
COQ6	-5.1	coenzyme Q6 monooxygenase
SLC22A18	-5.1	solute carrier family 22, member 18
SDC4	-5.05	syndecan 4
RAB34	-4.96	RAB34, member RAS oncogene family
PLAU	-4.93	plasminogen activator, urokinase
REXO2	-4.93	RNA exonuclease 2
SNORD114	-4.93	small nucleolar RNA, C/D box 114-30
ATG9A	-4.91	autophagy related 9A
ABCF3	-4.89	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 3

**Tabella 3:** Geni differenzialmente espressi tra sarcomi FDC (FDCS) e cellule follicolari dendritiche microdisseccate da malattia di Castleman. Il False Discovery Rate stimato tra i geni significativi è 0.09444.

<i>Geni up-regolati nei FDCS ordinati secondo fold change</i>		
Gene	Log <sub>2</sub> Fold Change	Descrizione
COL8A1	15.47	collagen, type VIII, alpha 1
LAD1	13.60	ladinin 1
LRRC26	11.89	leucine rich repeat containing 26
C1orf110	11.52	chromosome 1 open reading frame 110
FLNC	11.30	filamin C, gamma
CTSG	10.71	cathepsin G
IRX3	9.57	iroquois homeobox 3
THBS2	8.99	thrombospondin 2
GRM3	8.08	glutamate receptor, metabotropic 3
LOXL4	7.54	lysyl oxidase-like 4
KLRF1	7.31	killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1
CXCL2	6.77	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
CDS1	6.38	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 1
ACKR2	6.31	atypical chemokine receptor 2
ELOVL4	6.22	ELOVL fatty acid elongase 4
PTPRO	5.89	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O
GZMA	5.73	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)
TNFRSF11B	5.72	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
CYR61	5.71	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
PLD6	5.63	phospholipase D family, member 6
LYVE1	5.31	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1
DLC1	5.22	DLC1 Rho GTPase activating protein
CCDC151	5.22	coiled-coil domain containing 151

TFF3	4.79	trefoil factor 3 (intestinal)
DSEL	4.76	dermatan sulfate epimerase-like
IL18R1	4.61	interleukin 18 receptor 1
OPLAH	4.51	5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing)
AVPI1	4.48	arginine vasopressin-induced 1
CCL5	4.46	chemokine (C-C motif) ligand 5
GOLIM4	4.33	golgi integral membrane protein 4
STOX2	4.09	storkhead box 2
KIF21A	3.97	kinesin family member 21A
SLIT2	3.93	slit homolog 2 (Drosophila)
PDE3B	3.91	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited
PODN	3.83	Podocan
GPC6	3.77	glypican 6
TSKU	3.74	tsukushi, small leucine rich proteoglycan
ARHGAP39	3.74	Rho GTPase activating protein 39
SCNN1D	3.51	sodium channel, non-voltage-gated 1, delta subunit
ACSS2	3.43	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2
AUTS2	3.34	autism susceptibility candidate 2
LEPREL1	3.34	leprecan-like 1
ADAP1	3.32	ArfGAP with dual PH domains 1
ACRC	3.14	acidic repeat containing
CAAP1	3.11	caspase activity and apoptosis inhibitor 1
BGN	3.08	Biglycan
LRIG2	3.00	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 2
CFD	2.97	complement factor D (adipsin)
PUS3	2.90	pseudouridylate synthase 3
GPX3	2.74	glutathione peroxidase 3 (plasma)
CTGF	2.62	connective tissue growth factor
NDFIP1	2.52	Nedd4 family interacting protein 1
FAM50A	2.37	family with sequence similarity 50, member A
EMC9	2.33	ER membrane protein complex subunit 9
PIGM	2.25	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class M
PARP10	2.25	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10
RPAP2	2.21	RNA polymerase II associated protein 2
VPS37C	2.19	vacuolar protein sorting 37 homolog C (S. cerevisiae)
VWF	2.18	von Willebrand factor
SCARNA4	2.16	small Cajal body-specific RNA 4
PI4K2A	2.06	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 alpha
ZNF17	1.99	zinc finger protein 17
RPP40	1.95	ribonuclease P/MRP 40kDa subunit
PRDM4	1.92	PR domain containing 4
<b><i>Geni down-regolati nei FDCS ordinati secondo fold change</i></b>		
Gene	Log <sub>2</sub> Fold	Descrizione

	Change	
SERPINA3	-31.08	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3
SERPINA9	-17.69	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 9
RGS13	-15.17	regulator of G-protein signaling 13
HIST1H2BE	-14.59	histone cluster 1, H2be
HIST1H1B	-13.95	histone cluster 1, H1b
CPNE5	-12.66	copine V
BIK	-12.1	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
VPREB3	-11.9	pre-B lymphocyte 3
LRMP	-11.53	lymphoid-restricted membrane protein
MYBL1	-11.44	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1
SH2B2	-11.17	SH2B adaptor protein 2
HIST1H2BH	-11.06	histone cluster 1, H2bh
HIST1H2AI	-10.26	histone cluster 1, H2ai
MEF2BNB-MEF2B	-10.12	MEF2BNB-MEF2B readthrough
HMCES	-9.24	5-hydroxymethylcytosine (hmC) binding, ES cell-specific
BACH2	9.07	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2
HIST1H1E	-8.48	histone cluster 1, H1e
CD22	-8.33	CD22 molecule
MYH11	-8.25	myosin, heavy chain 11, smooth muscle
HIST1H2BF	-8.09	histone cluster 1, H2bf
HIST1H3C	-8.03	histone cluster 1, H3c
CD79B	-7.88	CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta
CD79A	-7.69	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha
HIST1H2AJ	-7.68	histone cluster 1, H2aj
SUGCT	-7.63	succinyl-CoA:glutarate-CoA transferase
RASGRP3	-7.59	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)
SERPINB9	-7.57	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9
HTR3A	-7.47	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A, ionotropic
FCRL1	-6.92	Fc receptor-like 1
HIST1H4F	-6.81	histone cluster 1, H4f
TUBB3	-6.65	tubulin, beta 3 class III
DACT2	-6.54	dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 2
HIST1H4L	-6.48	histone cluster 1, H4l
HIST1H2AH	-6.39	histone cluster 1, H2ah
RAC2	-6.34	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)
POU2AF1	-6.2	POU class 2 associating factor 1
HIST1H2BO	-6.12	histone cluster 1, H2bo
TCL1A	-6.08	T-cell leukemia/lymphoma 1A
ACY3	-6.06	aspartoacylase (aminocyclase) 3
ASB13	-6.05	ankyrin repeat and SOCS box containing 13



GJA4	-6.04	gap junction protein, alpha 4, 37kDa
HIST1H2BM	-5.95	histone cluster 1, H2bm
AURKB	-5.91	aurora kinase B
CENPM	-5.87	centromere protein M
HIST1H3F	-5.78	histone cluster 1, H3f
DCAF12	-5.72	DDB1 and CUL4 associated factor 12
TNFRSF13C	-5.63	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13C
TACC3	-5.3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3
FLJ40453	-5.28	uncharacterized LOC100288254
EBF1	-5.27	early B-cell factor 1
LPAR1	-5.27	lysophosphatidic acid receptor 1
SAMD1	-5.26	histone cluster 1, H2ak
HIST1H2AK	-5.26	sterile alpha motif domain containing 1
NCF1	-5.25	neutrophil cytosolic factor 1
SNORD45A	-5.22	small nucleolar RNA, C/D box 45A
LILRA5	-5.19	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 5
ADA	-5.18	adenosine deaminase
GMDS	-5.13	GDP-mannose 4,6-dehydratase
HIST1H3A	-5.08	histone cluster 1, H3a
HIST2H2AC	-5.06	histone cluster 2, H2ac
CDK5R1	-5.04	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)
TERF2	-5.03	telomeric repeat binding factor 2
KPNA2	-4.99	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)
GSR	-4.86	glutathione reductase
CDKN2D	-4.85	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)
KIFC1	-4.77	kinesin family member C1
PTPRC	-4.75	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
HIP1R	-4.73	huntingtin interacting protein 1 related
ATP2A3	-4.66	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, ubiquitous
HMGN1	-4.59	high mobility group nucleosome binding domain 1
ZNF595	-4.58	zinc finger protein 595
KLHL6	-4.57	kelch-like family member 6
IFNLR1	-4.5	interferon, lambda receptor 1
POLR2J2	-4.39	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J2
ELL3	-4.36	elongation factor RNA polymerase II-like 3
PTPN18	-4.36	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 18 (brain-derived)
KDR	-4.35	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
TLR9	-4.32	toll-like receptor 9
LIMD2	-4.31	LIM domain containing 2
SPINK2	-4.3	serine peptidase inhibitor, Kazal type 2 (acrosin-trypsin inhibitor)
HOPX	-4.29	HOP homeobox
HMGA1	-4.24	histone cluster 1, H2ad

HIST1H2AD	-4.24	high mobility group AT-hook 1
RAB30	-4.23	RAB30, member RAS oncogene family
TERF1	-4.21	telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1
AMFR	-4.16	autocrine motility factor receptor, E3 ubiquitin protein ligase
IKZF1	-4.13	IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros)
RAMP2-AS1	-4.1	Holliday junction recognition protein
SHCBP1	-4.1	RAMP2 antisense RNA 1
HJURP	-4.1	SHC SH2-domain binding protein 1
RPL12P1	-4.08	ribosomal protein L12 pseudogene 1
HIST1H3D	-4.07	histone cluster 1, H3d
DAAM1	-4.06	dishevelled associated activator of morphogenesis 1
SLC30A4	-4.04	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 4
POTEF	-4	POTE ankyrin domain family, member F
IGJ	-3.99	immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides
TMPO	-3.97	Thymopoietin
PRDM15	-3.96	PR domain containing 15
ZNF273	-3.93	histone cluster 1, H2bg
HIST1H2BG	-3.93	poly(rC) binding protein 1
PCBP1	-3.93	zinc finger protein 273
PHACTR1	-3.91	phosphatase and actin regulator 1
H3F3A	-3.9	H3 histone, family 3A
LTA4H	-3.88	leukotriene A4 hydrolase
GP1BA	-3.85	glycoprotein Ib (platelet), alpha polypeptide
CDK2AP1	-3.84	cyclin-dependent kinase 2 associated protein 1
PTK2B	-3.84	ferritin, heavy polypeptide 1 pseudogene 3
FTH1P3	-3.84	protein tyrosine kinase 2 beta
ZNF318	-3.82	differentially expressed in FDCP 8 homolog (mouse)
DEF8	-3.82	zinc finger protein 318
HIST1H4E	-3.79	histone cluster 1, H4e
CDCA7	-3.78	cell division cycle associated 7
TFDP1	-3.77	transcription factor Dp-1
NLRP4	-3.75	NLR family, pyrin domain containing 4
HIST1H3J	-3.72	histone cluster 1, H3j
SNORD78	-3.72	small nucleolar RNA, C/D box 78
HIST1H1D	-3.71	histone cluster 1, H1d
CKS2	-3.68	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2
EAF2	-3.63	ELL associated factor 2
BCL2L11	-3.62	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
CDKN3	-3.61	cyclin-dependent kinase inhibitor 3
HMGB2	-3.61	high mobility group box 2
PTTG1	-3.6	cyclin A2
CCNA2	-3.6	pituitary tumor-transforming 1
UCHL1	-3.59	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)
LGALS9B	-3.58	lectin, galactoside-binding, soluble, 9B

MTMR12	-3.57	myotubularin related protein 12
CORO1A	-3.56	coronin, actin binding protein, 1A
MND1	-3.56	meiotic nuclear divisions 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
PSMD10	-3.55	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10
CITED2	-3.54	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2
RAB5C	-3.54	RAB5C, member RAS oncogene family
RNPS1	-3.54	RNA binding protein S1, serine-rich domain
HIST2H3D	-3.53	histone cluster 2, H3d
HIST1H3I	-3.52	histone cluster 1, H3i
CD74	-3.5	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
HIST1H4B	-3.5	histone cluster 1, H4b
SLC29A1	-3.48	solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 1
BPNT1	-3.46	3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1
HNRNPA1P10	-3.46	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene 10
SPC25	-3.44	SPC25, NDC80 kinetochore complex component
TAB1	-3.44	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1
YDJC	-3.43	phosphofurin acidic cluster sorting protein 1
PACS1	-3.43	YdjC homolog (bacterial)
NPIPA1	-3.4	kinesin family member 18B
KIF18B	-3.4	nuclear pore complex interacting protein family, member A1
HIST1H2BN	-3.38	histone cluster 1, H2bn
SIAH2	-3.36	siah E3 ubiquitin protein ligase 2
ARHGAP27	-3.34	Rho GTPase activating protein 27
UGT8	-3.33	UDP glycosyltransferase 8
AFF2	-3.31	AF4/FMR2 family, member 2
HIST1H2BJ	-3.25	histone cluster 1, H2bj
TMED8	-3.23	son of sevenless homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )
SOS1	-3.23	transmembrane emp24 protein transport domain containing 8
S100A10	-3.21	Kruppel-like factor 4 (gut)
KLF4	-3.21	S100 calcium binding protein A10
NDC1	-3.2	NDC1 transmembrane nucleoporin
PLK1	-3.2	polo-like kinase 1
TCF4	-3.2	transcription factor 4
SLC7A10	-3.19	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4
DDX4	-3.19	solute carrier family 7 (neutral amino acid transporter light chain, asc system), member 10
SNORD57	-3.17	small nucleolar RNA, C/D box 57
TMEM106A	-3.17	transmembrane protein 106A
RPS27L	-3.15	ribosomal protein S27-like
PRRC2A	-3.13	proline-rich coiled-coil 2A
POLR2J3	-3.12	KIAA0922

KIAA0922	-3.12	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 2
PLEKHF2	-3.12	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J3
SMARCB1	-3.11	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1
HIST1H2BC	-3.1	histone cluster 1, H2bc
TRIM16L	-3.1	myosin IE
MYO1E	-3.1	tripartite motif containing 16-like
ECEL1	-3.09	endothelin converting enzyme-like 1
STK17B	-3.07	serine/threonine kinase 17b
HIST1H1C	-3.06	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 5
DDX5	-3.06	histone cluster 1, H1c
MCM8	-3.05	minichromosome maintenance complex component 8
H6PD	-3.04	extra spindle pole bodies homolog 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )
ESPL1	-3.04	hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)
LCP1	-3.02	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
KMT2E-AS1	-3.01	KMT2E antisense RNA 1 (head to head)
LYN	-2.98	LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase
RPS3A	-2.97	ribosomal protein S3A
MAOB	-2.96	dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) N-acetylglucosaminophosphotransferase 1 (GlcNAc-1-P transferase)
MAP1LC3B	-2.96	monoamine oxidase B
DPAGT1	-2.96	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
SNHG5	-2.96	small nucleolar RNA host gene 5 (non-protein coding)
PLCG2	-2.94	histone cluster 1, H2bb
HIST1H2BB	-2.94	phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)
RRAS2	-2.93	histone cluster 1, H2bl
HIST1H2BL	-2.93	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2
ARHGDI1A	-2.9	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha
ZNF765	-2.89	CDKN2A interacting protein N-terminal like
CDKN2AIPN L	-2.89	zinc finger protein 765
ATP5F1	-2.87	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial Fo complex, subunit B1
HIST1H2BD	-2.83	B-cell CLL/lymphoma 3
BCL3	-2.83	ER membrane protein complex subunit 10
EMC10	-2.83	histone cluster 1, H2bd
SF3B6	-2.83	splicing factor 3b, subunit 6, 14kDa
GGA3	-2.82	golgi-associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 3
CD53	-2.81	CD53 molecule
BFSP2	-2.79	beaded filament structural protein 2, phakinin
USPL1	-2.79	ubiquitin specific peptidase like 1
UQCC2	-2.77	actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20kDa
TCF7L1	-2.77	phosphodiesterase 6D, cGMP-specific, rod, delta

PDE6D	-2.77	transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box)
ARPC4	-2.77	ubiquinol-cytochrome c reductase complex assembly factor 2
KANK1	-2.75	family with sequence similarity 214, member A
FAM214A	-2.75	KN motif and ankyrin repeat domains 1
DDX6	-2.73	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 6
HINT1	-2.73	histidine triad nucleotide binding protein 1
CAPRIN1	-2.71	cell cycle associated protein 1
SNORD76	-2.71	small nucleolar RNA, C/D box 76
ODC1	-2.7	ornithine decarboxylase 1
YWHAZ	-2.68	interleukin 21
IL21	-2.68	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta
SLC7A7	-2.66	B-cell linker
SNX3	-2.66	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, y+L system), member 7
BLNK	-2.66	sorting nexin 3
DDX24	-2.65	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 24
TCL1B	-2.65	T-cell leukemia/lymphoma 1B
UBE2H	-2.65	ubiquitin-conjugating enzyme E2H
NPPC	-2.64	natriuretic peptide C
VPS53	-2.63	vacuolar protein sorting 53 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
NBPF15	-2.61	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1
EIF1	-2.61	apolipoprotein M
EXOC3L2	-2.61	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2
ATP6V0D2	-2.61	eukaryotic translation initiation factor 1
APEX1	-2.61	exocyst complex component 3-like 2
APOM	-2.61	neuroblastoma breakpoint family, member 15
PODXL	-2.6	bromodomain PHD finger transcription factor
BPTF	-2.6	podocalyxin-like
TCEA1	-2.6	transcription elongation factor A (SII), 1
KIF2C	-2.57	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 51
DDX51	-2.57	kinesin family member 2C
RBBP7	-2.56	retinoblastoma binding protein 7
B4GALNT4	-2.54	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 4
GPS2	-2.54	G protein pathway suppressor 2
NDUFA4	-2.54	NDUFA4, mitochondrial complex associated
RPS27	-2.52	ribosomal protein S27
HNRNPA1L2	-2.51	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2
NLRP8	-2.5	anaphase promoting complex subunit 15
ANAPC15	-2.5	NLR family, pyrin domain containing 8
WASH2P	-2.48	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
TAF10	-2.48	TAF10 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 30kDa
NFKB1	-2.48	WAS protein family homolog 2 pseudogene

USP33	-2.46	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed
FAU	-2.46	mediator complex subunit 12-like
MED12L	-2.46	ubiquitin specific peptidase 33
RPL36AL	-2.43	ribosomal protein L36a-like
SNORD102	-2.42	small nucleolar RNA, C/D box 102
SNORD80	-2.41	small nucleolar RNA, C/D box 80
TUBA1A	-2.41	tubulin, alpha 1°
HNRNPC	-2.39	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)
PDCD7	-2.38	programmed cell death 7
EMR1	-2.37	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1
RPS15A	-2.34	ribosomal protein S15a
SNORD17	-2.33	GDP dissociation inhibitor 2
SIK3	-2.33	SIK family kinase 3
GDI2	-2.33	small nucleolar RNA, C/D box 17
RPS13	-2.32	ribosomal protein S13
SWAP70	-2.32	SWAP switching B-cell complex 70kDa subunit
FOXN3	-2.31	forkhead box N3
RNU2-1	-2.3	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 10
OR2T10	-2.3	RNA, U2 small nuclear 1
CHEK1	-2.29	checkpoint kinase 1
PAFAH1B2	-2.29	platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, catalytic subunit 2 (30kDa)
TMEM214	-2.28	ELK4, ETS-domain protein (SRF accessory protein 1)
ELK4	-2.28	ras homolog family member A
RHOA	-2.28	transmembrane protein 214
HDAC1	-2.27	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A
ANP32A	-2.27	histone deacetylase 1
NSA2	-2.27	NSA2 ribosome biogenesis homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
KHDC1	-2.26	KH homology domain containing 1
DNASE1	-2.25	deoxyribonuclease I
SETD2	-2.24	harakiri, BCL2 interacting protein
HRK	-2.24	SET domain containing 2
SNHG3	-2.24	small nucleolar RNA host gene 3 (non-protein coding)
FBXO5	-2.23	F-box protein 5
LATS1	-2.22	major histocompatibility complex, class II, DP beta 2 (pseudogene)
HLA-DPB2	-2.22	large tumor suppressor kinase 1
PXK	-2.21	actin-related protein 2 pseudogene
LOC284441	-2.21	PX domain containing serine/threonine kinase
SGPP1	-2.2	sphingosine-1-phosphate phosphatase 1
C12orf77	-2.19	chromosome 12 open reading frame 77
RBM15B	-2.19	RNA binding motif protein 15B
HNRNPM	-2.18	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M

EIF2B2	-2.17	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 2 beta, 39kDa
GNL3L	-2.17	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)-like
PKN2	-2.16	protein kinase N2
ELF1	-2.15	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)
AICDA	-2.14	activation-induced cytidine deaminase
LMO2	-2.14	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)
NFYB	-2.12	nuclear transcription factor Y, beta
SNIP1	-2.1	PML-RARA regulated adaptor molecule 1
PRAM1	-2.1	Smad nuclear interacting protein 1
RBCK1	-2.08	RanBP-type and C3HC4-type zinc finger containing 1
NONO	-2.07	non-POU domain containing, octamer-binding
DYNLL1	-2.05	dynein, light chain, LC8-type 1
NAT1	-2.04	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)
TRAF7	-2.03	TNF receptor-associated factor 7, E3 ubiquitin protein ligase
PIK3AP1	-2.02	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1
CLIC1	-2.01	chloride intracellular channel 1
ERGIC1	-2	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment (ERGIC) 1
PSMD6	-2	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 6
TLE3	-2	transducin-like enhancer of split 3

**Tabella 4:** Analisi di *Pathway enrichment* dei geni differenzialmente espressi tra sarcomi FDC e CD-FDCs. Principali 5 *pathways* secondo il *Reactome pathway data set*.

<i>Pathway</i>	<i>Numero di geni nel pathway</i>	<i>p-value</i>
Trasduzione del segnale	76	3.68E-14
Organizzazione della cromatina	35	5.82E-11
Ciclo cellulare	52	1.49E-09
Sistema immune	28	7.45E-09
Metabolismo	23	0.000000238

**Tabella 5:** I top 500 geni, ordinati secondo fold change, differenzialmente espressi tra sarcomi FDC (FDCS) e altri tumori mesenchimali. Il False Discovery Rate stimato tra i geni significativi è 9e-05.

***Geni up-regolati nei FDCS ordinati per fold change***

<b>Gene</b>	<b>Log<sub>2</sub> Fold Change</b>	<b>Descrizione</b>
FDCSP	138.68	follicular dendritic cell secreted protein
UBD	40.28	ubiquitin D
CR2	21.77	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2
LTB	20.6	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
CXCL13	20.18	chemokine (C-X-C motif) ligand 13

ADAMDEC1	17.77	ADAM-like, decysin 1
IL2RG	16.66	interleukin 2 receptor, gamma
CCL19	16.62	chemokine (C-C motif) ligand 19
SPIB	14.35	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)
TNFRSF9	13.42	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
STK17B	13.27	serine/threonine kinase 17b
SNAP91	13.24	synaptosomal-associated protein, 91kDa
CD48	13.21	CD48 molecule
B2M	13.12	beta-2-microglobulin
BIRC3	11.64	baculoviral IAP repeat containing 3
SAMSN1	10.98	SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals 1
SPOCK2	10.78	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 2
LYZ	10.57	Lysozyme
CSF2RB	10.53	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
IGJ	10.24	immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides
SRGN	10.03	Serglycin
CD247	9.8	CD247 molecule
MAP4K1	9.79	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1
MYBPC2	9.72	myosin binding protein C, fast type
ALPK2	9.68	alpha-kinase 2
TMSB4X	9.49	thymosin beta 4, X-linked
CD19	8.66	CD19 molecule
PLEK	8.47	Pleckstrin
MAL	8.35	mal, T-cell differentiation protein
FYB	8.3	FYN binding protein
IL21R	8.25	interleukin 21 receptor
ANKRD29	8.15	ankyrin repeat domain 29
CCND2	8.1	cyclin D2
NKG7	8.07	natural killer cell granule protein 7
ERICH1	8.06	glutamate-rich 1
PKP2	7.89	plakophilin 2
TBC1D10C	7.78	TBC1 domain family, member 10C
CD3D	7.75	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)
PTMA	7.74	prothymosin, alpha
IL32	7.67	interleukin 32
SKAP1	7.63	src kinase associated phosphoprotein 1
CDC42SE2	7.56	CDC42 small effector 2
VCAM1	7.51	vascular cell adhesion molecule 1
EXOC3L4	7.5	exocyst complex component 3-like 4
SNX10	7.43	sorting nexin 10
CD53	7.4	CD53 molecule
KIAA1551	7.38	KIAA1551



SH3BGRL	7.38	SH3 domain binding glutamate-rich protein like
CXCL10	7.34	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
SOX8	7.34	SRY (sex determining region Y)-box 8
DENND2D	7.3	DENN/MADD domain containing 2D
FCRLA	7.25	Fc receptor-like A
NCEH1	7.18	neutral cholesterol ester hydrolase 1
P2RX2	7.1	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 2
ARRDC4	7.05	arrestin domain containing 4
GZMK	7.04	granzyme K (granzyme 3; tryptase II)
LCP1	6.98	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
CARD16	6.92	caspase recruitment domain family, member 16
CCR7	6.9	chemokine (C-C motif) receptor 7
ACTR3	6.85	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)
EPST11	6.8	epithelial stromal interaction 1 (breast)
DLGAP5	6.7	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5
NEDD1	6.7	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1
RGS1	6.64	regulator of G-protein signaling 1
C7	6.56	complement component 7
H2AFZ	6.54	H2A histone family, member Z
HSPA8	6.54	heat shock 70kDa protein 8
CD86	6.53	CD86 molecule
DOCK8	6.52	dedicator of cytokinesis 8
RAB8B	6.5	RAB8B, member RAS oncogene family
SCARA3	6.44	scavenger receptor class A, member 3
CYTIP	6.4	cytohesin 1 interacting protein
GZMA	6.37	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)
ALOX5AP	6.36	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein
LITAF	6.36	lipopolysaccharide-induced TNF factor
MAD2L1	6.35	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)
ABCE1	6.32	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1
CD46	6.3	CD46 molecule, complement regulatory protein
SPCS2P4	6.3	signal peptidase complex subunit 2 homolog (S. cerevisiae) pseudogene 4
CTSH	6.29	cathepsin H
ANO9	6.21	anoctamin 9
ST8SIA1	6.19	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1
septin 2	6.18	septin 2
APOBEC3A	6.18	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A
ITK	6.18	IL2-inducible T-cell kinase
SHFM1	6.18	split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1
CXorf21	6.15	chromosome X open reading frame 21
HSP90AA1	6.14	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1
ABCA3	6.11	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3
HNRNPR	6.1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R

NUSAP1	6.09	nucleolar and spindle associated protein 1
GIMAP7	6.08	GTPase, IMAP family member 7
MARCKS	6.07	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
SLC39A8	6.06	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8
FCER2	6.04	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)
FPR3	6.03	formyl peptide receptor 3
RAC2	6.03	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)
KLRF1	6.02	killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1
HMGN3	6.01	high mobility group nucleosomal binding domain 3
BEX5	6	brain expressed, X-linked 5
PARP15	6	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 15
TNFAIP3	5.97	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
TMPO	5.96	Thymopoietin
ARGLU1	5.92	arginine and glutamate rich 1
HIST1H2AJ	5.88	histone cluster 1, H2aj
GZMB	5.87	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)
NACA	5.86	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit
PSD4	5.84	pleckstrin and Sec7 domain containing 4
HMGB2	5.83	high mobility group box 2
ATP11C	5.8	ATPase, class VI, type 11C
CR1	5.79	complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)
CXCR4	5.79	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
RPS3A	5.79	ribosomal protein S3A
TLR4	5.77	toll-like receptor 4
CCR6	5.76	chemokine (C-C motif) receptor 6
DPM1	5.76	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit
MMP9	5.73	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
GPR183	5.71	G protein-coupled receptor 183
HNRNPA2B1	5.71	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
HNRNPH1	5.71	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)
H3F3AP4	5.68	H3 histone, family 3A, pseudogene 4
XBP1	5.68	X-box binding protein 1
RASSF5	5.67	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5
HECA	5.66	headcase homolog (Drosophila)
RNAS22	5.65	ribonuclease T2
PTPN6	5.63	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6
F11R	5.61	F11 receptor
KDM2B	5.6	lysine (K)-specific demethylase 2B
CD3G	5.57	CD3g molecule, gamma (CD3-TCR complex)
FAM151A	5.53	family with sequence similarity 151, member A
MEFV	5.46	Mediterranean fever

CCL5	5.45	chemokine (C-C motif) ligand 5
CD83	5.44	CD83 molecule
PPP1CC	5.41	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isozyme
E2F2	5.4	E2F transcription factor 2
GPSM3	5.4	G-protein signaling modulator 3
NXPE3	5.4	neurexophilin and PC-esterase domain family, member 3
COL4A4	5.37	collagen, type IV, alpha 4
CSTA	5.37	cystatin A (stefin A)
HIST1H2AH	5.37	histone cluster 1, H2ah
ETS1	5.36	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
SARAF	5.36	store-operated calcium entry-associated regulatory factor
MS4A4A	5.34	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A
PFDN5	5.34	prefoldin subunit 5
ALDH2	5.33	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)
SLAMF6	5.33	SLAM family member 6
RP2	5.32	retinitis pigmentosa 2 (X-linked recessive)
PSIP1	5.31	PC4 and SFRS1 interacting protein 1
SOD2	5.27	superoxide dismutase 2, mitochondrial
CHMP5	5.26	charged multivesicular body protein 5
HERC5	5.26	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5
ISG20	5.26	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa
SCOC	5.26	short coiled-coil protein
HELLS	5.24	helicase, lymphoid-specific
PSME1	5.24	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)
RBL2	5.24	retinoblastoma-like 2
RPS27	5.24	ribosomal protein S27
BMP2K	5.2	BMP2 inducible kinase
TMX1	5.2	thioredoxin-related transmembrane protein 1
STAP1	5.16	signal transducing adaptor family member 1
ADI1	5.14	acireductone dioxygenase 1
IRF2	5.14	interferon regulatory factor 2
JAK2	5.11	Janus kinase 2
CD8A	5.1	CD8a molecule
SP140	5.09	SP140 nuclear body protein
ZNF92	5.09	zinc finger protein 92
ATP5O	5.07	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit
GZMH	5.07	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)
CD69	5.06	CD69 molecule
FAIM3	5.06	Fas apoptotic inhibitory molecule 3
RELB	5.05	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
CNBP	5.02	CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein
FAM96A	5.02	family with sequence similarity 96, member A
IKZF3	5.02	IKAROS family zinc finger 3 (Aiolos)
CMPK1	5.01	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1, cytosolic

TNFRSF13B	5.01	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B
BTLA	5	B and T lymphocyte associated
TMEM163	5	transmembrane protein 163
PPIB	4.98	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
FAM46C	4.97	family with sequence similarity 46, member C
LGALS9	4.97	lectin, galactoside-binding, soluble, 9
P2RY10	4.95	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 10
PTTG1	4.95	pituitary tumor-transforming 1
RSL24D1	4.95	ribosomal L24 domain containing 1
SUCO	4.94	SUN domain containing ossification factor
CD3E	4.93	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)
PTPRC	4.93	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
ECT2	4.92	epithelial cell transforming 2
ATP6V1A	4.91	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A
GNLY	4.91	Granulysin
KLHL5	4.91	kelch-like family member 5
CSF2RA	4.9	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)
FCAMR	4.89	Fc receptor, IgA, IgM, high affinity
GNA13	4.88	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13
IL6ST	4.88	interleukin 6 signal transducer
CLIC2	4.87	chloride intracellular channel 2
GPR65	4.87	G protein-coupled receptor 65
UBQLN2	4.87	ubiquilin 2
SSBP1	4.86	single-stranded DNA binding protein 1, mitochondrial
UHMK1	4.85	U2AF homology motif (UHM) kinase 1
GDI2	4.84	GDP dissociation inhibitor 2
HNRNPK	4.84	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
CXCL2	4.83	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
LAMP3	4.83	lysosomal-associated membrane protein 3
MALT1	4.83	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
PCDHAC1	4.83	protocadherin alpha subfamily C, 1
HNRNPH2	4.82	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (H')
SNORD28	4.82	small nucleolar RNA, C/D box 28
OTULIN	4.81	OTU deubiquitinase with linear linkage specificity
ACSL5	4.79	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5
HLA-DRA	4.79	major histocompatibility complex, class II, DR alpha
LTA	4.79	lymphotoxin alpha
SCML1	4.79	sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)
WTAP	4.79	Wilms tumor 1 associated protein
HIST1H3C	4.78	histone cluster 1, H3c
IFNGR1	4.78	interferon gamma receptor 1
MMP12	4.78	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)
POT1	4.78	protection of telomeres 1
SP110	4.78	SP110 nuclear body protein

RREB1	4.74	ras responsive element binding protein 1
SOCS1	4.73	suppressor of cytokine signaling 1
PTGES3	4.72	prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)
IFI30	4.71	interferon, gamma-inducible protein 30
CCL4L2	4.68	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2
MBD2	4.68	methyl-CpG binding domain protein 2
VAMP7	4.68	vesicle-associated membrane protein 7
TNFRSF11B	4.67	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
CD300LF	4.65	CD300 molecule-like family member f
MAT2B	4.65	methionine adenosyltransferase II, beta
MTPN	4.65	Myotrophin
NAPSB	4.64	napsin B aspartic peptidase, pseudogene
SLFN5	4.63	schlafen family member 5
UBQLN1	4.63	ubiquilin 1
ZNF460	4.63	zinc finger protein 460
CXCR5	4.6	chemokine (C-X-C motif) receptor 5
DAPP1	4.6	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides
DOCK2	4.6	dedicator of cytokinesis 2
SERINC3	4.6	serine incorporator 3
STK26	4.6	serine/threonine protein kinase 26
TANK	4.6	TRAF family member-associated NFkB activator
IL4R	4.58	interleukin 4 receptor
GTPBP4	4.57	GTP binding protein 4
MIR1206	4.57	microRNA 1206
NONO	4.57	non-POU domain containing, octamer-binding
CD79A	4.55	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha
TP53INP1	4.55	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1
LAMC2	4.53	laminin, gamma 2
TAP1	4.53	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
NPL	4.52	N-acetylneuraminase pyruvate lyase (dihydrodipicolinate synthase)
SMNDC1	4.52	survival motor neuron domain containing 1

***Geni down-regolati nei FDCS ordinati per fold change***

<b>Gene</b>	<b>Log2 Fold Change</b>	<b>Descrizione</b>
ADAM33	-16.64	ADAM metallopeptidase domain 33
SPON2	-14.48	spondin 2, extracellular matrix protein
EMILIN1	-13.65	elastin microfibril interfacer 1
FBLN1	-13.37	fibulin 1
MFAP2	-12.61	microfibrillar-associated protein 2
LPAR4	-11.26	lysophosphatidic acid receptor 4
GSN	-11.16	Gelsolin
OAF	-10.57	OAF homolog (Drosophila)
LAMC3	-10.03	laminin, gamma 3
F7	-9.37	coagulation factor VII (serum prothrombin conversion accelerator)

PTK7	-9.34	protein tyrosine kinase 7
BOC	-8.81	BOC cell adhesion associated, oncogene regulated
PDGFRL	-8.69	platelet-derived growth factor receptor-like
CRABP2	-8.64	cellular retinoic acid binding protein 2
MEG3	-8.25	maternally expressed 3 (non-protein coding)
HTR2A	-8.18	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A, G protein-coupled
NUDT4P1	-8.01	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4 pseudogene 1
LAMP5	-7.96	lysosomal-associated membrane protein family, member 5
HLA-DMA	-7.83	major histocompatibility complex, class II, DM alpha
PPFIA4	-7.72	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 4
B4GALT2	-7.72	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 2
RPL32P18	-7.60	ribosomal protein L32 pseudogene 18
ZNF750	-7.60	zinc finger protein 750
SYNGR1	-7.57	synaptogyrin 1
VAX2	-7.44	ventral anterior homeobox 2
TLE2	-7.44	transducin-like enhancer of split 2
LRFN5	-7.32	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 5
TMED10P1	-7.29	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast) pseudogene 1
PALM	-7.16	Paralemmin
DSCR8	-7.06	Down syndrome critical region gene 8
CAPN5	-7.03	calpain 5
IGFBP6	-6.99	insulin-like growth factor binding protein 6
MXRA8	-6.99	matrix-remodelling associated 8
MMP2	-6.85	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
MRC2	6.80	mannose receptor, C type 2
SLC36A2	-6.74	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 2
LRRC17	-6.64	leucine rich repeat containing 17
FHL2	-6.64	four and a half LIM domains 2
C9orf3	-6.62	chromosome 9 open reading frame 3
CREB3L1	-6.52	cAMP responsive element binding protein 3-like 1
SYT7	-6.51	synaptotagmin VII
EFNB1	-6.43	ephrin-B1
KRT27	6.38	keratin 27
RCN3	-6.32	reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain
SEMA6D	-6.29	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D
ADIPOQ	-6.28	adiponectin, C1Q and collagen domain containing
TIMP4	-6.26	TIMP metalloproteinase inhibitor 4
RUNX2	-6.25	runt-related transcription factor 2
METTL20	-6.24	methyltransferase like 20
BAIAP2	-6.21	BAI1-associated protein 2

SNORD114-1	-6.21	small nucleolar RNA, C/D box 114-1
38596	-6.18	septin 5
ALX4	-6.15	ALX homeobox 4
RERGL	-6.07	RERG/RAS-like
ADAMTS2	-6.04	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 2
MMP16	-5.96	matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)
PML	-5.90	promyelocytic leukemia
SCNN1A	-5.90	sodium channel, non-voltage-gated 1 alpha subunit
FSCN2	-5.82	fascin actin-bundling protein 2, retinal
KCNJ13	-5.81	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13
FAP	-5.72	fibroblast activation protein, alpha
PPAP2B	-5.71	phosphatidic acid phosphatase type 2B
PDE7B	-5.63	phosphodiesterase 7B
AGPAT1	-5.61	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1
RNASE7	-5.60	ribonuclease, RNase A family, 7
CRAT	-5.60	carnitine O-acetyltransferase
MIR99AHG	-5.59	mir-99a-let-7c cluster host gene (non-protein coding)
TNKS1BP1	-5.57	tankyrase 1 binding protein 1, 182kDa
MIR125B1	-5.53	microRNA 125b-1
TUB	-5.49	tubby bipartite transcription factor
CSDC2	-5.49	cold shock domain containing C2, RNA binding
RDH5	-5.48	retinol dehydrogenase 5 (11-cis/9-cis)
FAIM2	-5.48	Fas apoptotic inhibitory molecule 2
SLC30A4	-5.46	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 4
ARHGEF17	-5.45	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 17
PCDHGB6	-5.44	protocadherin gamma subfamily B, 6
HOXC8	-5.40	homeobox C8
SH3GL3	-5.37	SH3-domain GRB2-like 3
ASIP	-5.36	agouti signaling protein
CDH10	-5.35	cadherin 10, type 2 (T2-cadherin)
PHC2	-5.35	polyhomeotic homolog 2 (Drosophila)
KNDC1	-5.35	kinase non-catalytic C-lobe domain (KIND) containing 1
PCDHGA5	-5.33	protocadherin gamma subfamily A, 5
NFATC4	-5.32	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4
PGA5	-5.31	pepsinogen 5, group I (pepsinogen A)
SNORD114-3	-5.26	small nucleolar RNA, C/D box 114-3
LGALS7	-5.26	lectin, galactoside-binding, soluble, 7
FRMD6	-5.25	FERM domain containing 6
GLI2	-5.23	GLI family zinc finger 2
VSNL1	-5.23	visinin-like 1
NECAB3	-5.22	N-terminal EF-hand calcium binding protein 3
OGN	-5.21	Osteoglycin
EVA1B	-5.17	eva-1 homolog B (C. elegans)

SCARF2	-5.17	scavenger receptor class F, member 2
SNAI2	-5.16	snail family zinc finger 2
TMEM98	-5.16	transmembrane protein 98
PIANP	-5.14	PILR alpha associated neural protein
LRRN4CL	-5.13	LRRN4 C-terminal like
ATP6V1B1	-5.12	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B1
MYH14	-5.09	myosin, heavy chain 14, non-muscle
SSC5D	-5.09	scavenger receptor cysteine rich family, 5 domains
COL11A1	-5.08	collagen, type XI, alpha 1
WTIP	-5.06	Wilms tumor 1 interacting protein
GSTM5	-5.06	glutathione S-transferase mu 5
RGS11	-5.06	regulator of G-protein signaling 11
OSR1	-5.05	odd-skipped related transcription factor 1
SIX3	-5.03	SIX homeobox 3
ENKUR	-5.03	enkurin, TRPC channel interacting protein
LOXL2	-5.03	lysyl oxidase-like 2
SLC29A4	-5.02	solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 4
BCAP29	-5.01	B-cell receptor-associated protein 29
FIGN	-5.01	Fidgetin
P4HA2	-4.99	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II
DUOX1	-4.98	dual oxidase 1
C17orf77	-4.97	chromosome 17 open reading frame 77
KIAA0895L	-4.95	KIAA0895-like
RASL12	-4.91	RAS-like, family 12
VWA5B1	-4.90	von Willebrand factor A domain containing 5B1
GRIK2	-4.90	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2
ECM1	-4.89	extracellular matrix protein 1
HOTAIR	-4.89	HOX transcript antisense RNA
UPK1A	-4.87	uroplakin 1 <sup>o</sup>
APBB1	-4.87	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 (Fe65)
DACT1	-4.86	dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 1
IGF2	-4.83	insulin-like growth factor 2
C2orf66	-4.83	chromosome 2 open reading frame 66
AHDC1	-4.82	AT hook, DNA binding motif, containing 1
MXRA5	-4.82	matrix-remodelling associated 5
KLHL21	-4.78	kelch-like family member 21
HERC2P2	-4.77	hect domain and RLD 2 pseudogene 2
LTBP3	-4.77	latent transforming growth factor beta binding protein 3
ARL3	-4.76	ADP-ribosylation factor-like 3
PLCD4	-4.76	phospholipase C, delta 4
EFNB3	-4.75	ephrin-B3
FUT8-AS1	-4.74	FUT8 antisense RNA 1
VWA7	-4.74	von Willebrand factor A domain containing 7
LRP4	-4.73	low density lipoprotein receptor-related protein 4



TRO	-4.73	Trophinin
ITGA11	-4.72	integrin, alpha 11
GABBR1	-4.72	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1
PLXNB1	-4.72	plexin B1
ATOH8	-4.71	atonal homolog 8 (Drosophila)
MYOZ1	4.69	myozenin 1
CHST10	-4.69	carbohydrate sulfotransferase 10
PDLIM7	-4.68	PDZ and LIM domain 7 (enigma)
SEMA3B	-4.67	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B
COL6A2	-4.66	collagen, type VI, alpha 2
SOCS5	-4.65	suppressor of cytokine signaling 5
FAM20C	-4.65	family with sequence similarity 20, member C
FAM183B	-4.64	acyloxyacyl hydrolase (neutrophil)
KIRREL	-4.64	kin of IRRE like (Drosophila)
LRRC3B	-4.64	leucine rich repeat containing 3B
UBL4B	-4.63	ubiquitin-like 4B
ZNF503	-4.62	zinc finger protein 503
SMTN	-4.61	Smoothelin
HECTD2	-4.61	HECT domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2
NFIC	-4.61	nuclear factor I/C (CCAAT-binding transcription factor)
PARD6G	-4.60	par-6 family cell polarity regulator gamma
SLC27A1	-4.58	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1
LEPREL2	-4.56	leprecan-like 2
SPOCK1	-4.54	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1
CSAD	-4.52	cysteine sulfinic acid decarboxylase
CPZ	-4.52	carboxypeptidase Z
IGDCC3	-4.52	immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 3
FAM110B	-4.51	family with sequence similarity 110, member B
PIDD1	-4.50	p53-induced death domain protein 1
UNC93A	-4.50	unc-93 homolog A (C. elegans)
PLB1	-4.49	phospholipase B1
BICC1	-4.49	BicC family RNA binding protein 1
NEFL	-4.48	neurofilament, light polypeptide
FGD1	-4.48	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1
CFL2	-4.47	cofilin 2 (muscle)
PLAGL1	-4.47	pleiomorphic adenoma gene-like 1
RPL7L1	-4.46	ribosomal protein L7-like 1
SAR1B	-4.46	secretion associated, Ras related GTPase 1B
ATG9A	-4.46	autophagy related 9A
PPFIA2	-4.46	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 2
MAMSTR	-4.44	MEF2 activating motif and SAP domain containing transcriptional regulator
AXIN2	-4.41	axin 2

EFHD1	-4.41	EF-hand domain family, member D1
CCDC8	-4.40	coiled-coil domain containing 8
RHOD	-4.39	ras homolog family member D
OLFM2	-4.38	olfactomedin 2
GREB1L	-4.38	growth regulation by estrogen in breast cancer-like
CACNA2D4	-4.37	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 4
MIR758	-4.37	microRNA 758
THSD1	-4.35	thrombospondin, type I, domain containing 1
COL26A1	-4.34	collagen, type XXVI, alpha 1
UNC5D	-4.33	unc-5 homolog D (C. elegans)
SCUBE2	-4.32	signal peptide, CUB domain, EGF-like 2
PODXL2	-4.32	podocalyxin-like 2
MIR370	-4.30	microRNA 370
LRRC71	-4.30	leucine rich repeat containing 71
OR2B11	-4.28	olfactory receptor, family 2, subfamily B, member 11
GNB3	-4.28	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3
DLC1	-4.27	DLC1 Rho GTPase activating protein
DLX1	-4.27	distal-less homeobox 1
CYHR1	-4.27	cysteine/histidine-rich 1
TIMM44	-4.26	translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog (yeast)
SCRG1	4.26	stimulator of chondrogenesis 1
APOD	-4.26	apolipoprotein D
SHBG	4.25	sex hormone-binding globulin
HGF	-4.25	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)
RUFY3	-4.24	RUN and FYVE domain containing 3
TEAD3	-4.24	TEA domain family member 3
C9orf116	-4.23	chromosome 9 open reading frame 116
SYNPO2L	-4.23	synaptopodin 2-like
ZNF528	-4.23	zinc finger protein 528
CDC42EP1	-4.23	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1
RAMP2-AS1	-4.23	RAMP2 antisense RNA 1
MIR874	-4.22	microRNA 874
MAPK3	-4.22	mitogen-activated protein kinase 3
CHAD	-4.22	chondroadherin
LCA5L	-4.21	Leber congenital amaurosis 5-like
EFS	-4.21	embryonal Fyn-associated substrate
SEPN1	-4.19	selenoprotein N, 1
SLC4A2	-4.18	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 2
XKR3	-4.18	XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 3
ZNF287	-4.16	zinc finger protein 287
KEAP1	-4.16	kelch-like ECH-associated protein 1
IL17RC	-4.15	interleukin 17 receptor C
MAP2	-4.15	microtubule-associated protein 2
HEY2	-4.15	hes-related family bHLH transcription factor with YRPW motif 2
RND2	-4.15	Rho family GTPase 2

DBN1	-4.14	drebrin 1
ACCS	-4.13	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homolog (Arabidopsis)(non-functional)
PHLDB1	-4.13	pleckstrin homology-like domain, family B, member 1
CTF1	-4.13	cardiotrophin 1
SNORD113-5	-4.13	small nucleolar RNA, C/D box 113-5
ANPEP	-4.12	alanyl (membrane) aminopeptidase
MYOCD	-4.12	Myocardin
NBPF1	-4.12	neuroblastoma breakpoint family, member 1
SLC6A11	-4.12	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 11
ISLR	-4.11	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat
C1orf95	-4.10	chromosome 1 open reading frame 95
DKK2	-4.09	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2
ZFH3	-4.09	zinc finger homeobox 3
EXTL1	-4.09	exostosin-like glycosyltransferase 1
MGAT4B	-4.09	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme B
ATAD3C	-4.07	ATPase family, AAA domain containing 3C
WNT11	-4.06	wingless-type MMTV integration site family, member 11
MIOX	-4.06	myo-inositol oxygenase
MTMR11	-4.06	myotubularin related protein 11
TACC2	-4.05	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2
OR2A9P	-4.03	olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 9 pseudogene
TDRD12	-4.02	tudor domain containing 12
KIAA1217	-4.02	KIAA1217
LMO7	-4.02	LIM domain 7
F2RL2	-4.01	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2
PDE3A	-4.01	phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibited

**Tabella 6:** Analisi di *Pathway enrichment* dei geni differenzialmente espressi tra sarcomi FDC e gli altri Tumori Mesenchimali. Primi 5 *pathways* secondo il *Reactome pathway data set*.

<i>Pathway</i>	<i>Numero di geni nel pathway</i>	<i>p-value</i>
Trasduzione del segnale	89	2.58E-16
Sistema immunitario	76	3.67E-14
Metabolismo	36	1.74E-07
Organizzazione della matrice extracellulare	23	2.87E-05
Ciclo cellulare	23	2.88E-05

**Tabella 7:** 116 geni condivisi dalle *signature* che differenziano i sarcomi FDC dalle CD-FDCs e dagli altri tumori mesenchimali. Prime 10 categorie di geni ordinate in base al *p-value*. Categorie funzionali eseguite mediante il software EASE secondo la *Gene Ontology*. BP= Processi Biologici. *List Hits*: numero di geni compresi nella lista dei geni differenzialmente espressi in maniera significativa in quella categoria funzionale. *List total*: numero totale di geni differenzialmente espressi che sono stati classificati nella categoria funzionale. *Population Hits*: numero di geni, tra il totale dei geni testati, appartenenti a quella specifica categoria funzionale. *Population Total*: numero di geni totali che appartengono a ciascuna categoria all'interno del sistema.

<i>Sistema</i>	<i>Categoria funzionale</i>	<i>List Hits</i>	<i>List Total</i>	<i>Population Hits</i>	<i>Population Total</i>	<i>Fisher Exact Test</i>	<i>Benjamini</i>	<i>Geni</i>
GO_BP	Assemblaggio nucleosomi	11	77	58	8576	2.37E-12	5.93E-10	HIST1H1B; HIST1H1D; HIST1H2AD; HIST1H2AH; HIST1H2BD; HIST1H2BG; HIST1H2BM; HIST1H2BO; HIST1H3D; HIST2H2AC; LAD1
GO_BP	Assemblaggio/disassemblaggio cromatina	11	77	84	8576	1.61E-10	1.28E-08	HIST1H1B; HIST1H1D; HIST1H2AD; HIST1H2AH; HIST1H2BD; HIST1H2BG; HIST1H2BM; HIST1H2BO; HIST1H3D; HIST2H2AC; LAD1
GO_BP	Organizzazione cellulare e biogenesi	19	77	499	8576	5.22E-08	1.86E-06	DLC1; GP1BA; HDAC1; HIST1H1B; HIST1H1D; HIST1H2AD; HIST1H2AH; HIST1H2BD; HIST1H2BG; HIST1H2BM; HIST1H2BO; HIST1H3D; HIST2H2AC; HMGA1; KPNA2; LAD1; RPS3A; TERF2; ZNF318
GO_BP	Metabolismo del DNA	16	77	400	8576	0.000000371	1.16E-05	HDAC1; HIST1H1B; HIST1H1D; HIST1H2AD; HIST1H2AH; HIST1H2BD; HIST1H2BG; HIST1H2BM; HIST1H2BO; HIST1H3D; HIST2H2AC; HMGB2; KPNA2; LAD1; PTTG1; SMARCB1
GO_BP	Processi cellulari	58	77	4869	8576	0.000536	0.0149	ANP32A; ARPC4; ATP5F1; BCL3; CD22; CD53; CD79A; CD79B; CDKN3; CKS2; CORO1A; DDX5; DDX6; DLC1; GDI2; GP1BA; GRM3; HDAC1; HINT1; HIST1H1B; HIST1H1D; HIST1H2AD; HIST1H2AH; HIST1H2BD; HIST1H2BG; HIST1H2BM; HIST1H2BO; HIST1H3D; HIST2H2AC; HMGA1; KLRF1; KPNA2; LAD1; LYN; NCF1; NFKB1; PDE3B; PLCG2; PTPRC; PTTG1; RAB5C; RAC2; RBBP7; RPS27; RPS3A; S100A10; SIAH2; SLC29A1; SLC30A4; SLC7A7; SMARCB1; SNX3; STK17B;

								TAF10; TERF2; TNFRSF11B; YWHAZ; ZNF318
GO_BP	Crescita e/o mantenimento cellulare	38	77	2827	8576	0.00201	0.0504	ATP5F1; BCL3; CDKN3; CKS2; CORO1A; DDX5; DDX6; DLC1; GDI2; GP1BA; HDAC1; HIST1H1B; HIST1H1D; HIST1H2AD; HIST1H2AH; HIST1H2BD; HIST1H2BG; HIST1H2BM; HIST1H2BO; HIST1H3D; HIST2H2AC; HMGA1; KPNA2; LAD1; LYN; PTTG1; RAB5C; RBBP7; RPS27; RPS3A; SLC29A1; SLC30A4; SLC7A7; SMARCB1; SNX3; TAF10; TERF2; ZNF318
GO_BP	Cascata di <i>signaling</i> intracellulare	13	77	640	8576	0.00424	0.0896	ANP32A; BCL3; GDI2; GRM3; LYN; NCF1; PLCG2; RAB5C; RAC2; SIAH2; SNX3; STK17B; YWHAZ
GO_BP	Proliferazione cellulare	11	77	840	8576	0.0129	0.376	BCL3; CDKN3; CKS2; CORO1A; KPNA2; LYN; PTTG1; RBBP7; RPS27; SMARCB1; TERF2
GO_BP	Regolazione dell'attività CDK	2	77	36	8576	0.0412	0.306	CDKN3; CKS2
GO_BP	NF-kappaB	1	77	5	8576	0.0441	0.306	BCL3

**Tabella 8:** *Score* combinato per PD-L1 nei TMA (Tissue microarrays). Sarcomi FDC (FDCS), altri tumori mesenchimali (MTs).

		<b>Espressione nelle cellule neoplastiche</b>	<b>Expression score</b>	<b>Espressione nelle cellule infiltranti</b>
<b>FDCS</b>		80% ++	5	cellule molto rare
		100% +++	6	cellule molto rare
		0	0	5% +
		80% ++	5	50% +
		30% +	3	30% ++
		0%	0	0%
		5% ++	2	80% +++
		100% +++	6	cellule molto rare
		0%	0	0%
		0%	0	5% +
		60% ++	4	50% ++
		5% +	1	80% ++
		50% +	3	5% +
		80% ++	5	80% ++
		0%	0	5% ++
		80% +++	6	50% ++
		0%	0	0%
		20% ++	3	60% ++
		100% ++	5	cellule molto rare
		0%	0	0%
	0%	0	0%	
	80% ++	5	cellule molto rare	
<b>MTs</b>		0%	0	0%
		0%	0	0%

