



Медицински Университет София

Медицински факултет

Катедра по медицинска химия и биохимия

Десислава Димитрова Игнатова

**Нови маркери за диагностика и таргетна терапия на
кожен Т клетъчен лимфом**

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен "Доктор" в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки и докторска програма Биохимия

**Научен Ръководител: Акад. Проф. Д-р Ваньо Митев,
ДМ, ДБН**

Консултант: Доц. Емануела Генова, ДМ, ДБН

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	6-11 стр.
I. Увод	12-13 стр.
II. Литературен обзор	14 стр.
1. Кожни Т-клетъчни лимфоми: класификация	14-16 стр.
2. Биология на кожния Т клетъчен лимфом	16 стр.
2.1. Молекулярни и геномни изследвания в областта	17-18 стр.
2.1.1. Генни мутации	18 стр.
2.1.2. CCL21, CCR10, CCR4, CCR7 и CLA	18 стр.
2.1.3. NKp46, CD158k/KIR3DL2, GD3, SD-4, T-plastin, CD164 и FCRL3	18-19 стр.
2.1.4. Микро РНК (miRNA)	19-20 стр.
2.1.5. Хиперметиране в областта на промоторите на някои тумор супресорни гени	20 стр.
2.1.6. Ролята на хистондеацетилазите (HDACs)	20-21 стр.
2.2. Имунологични изследвания	21 стр.
2.2.1. Доминанция на Th2 цитокините при пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом	21-22 стр.
2.2.2. Тумор-свързани галектини	22 стр.
2.2.3. Намалена продукция на антимикробни пептиди в кожата при пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом	22-23 стр.
2.2.4. Роля на някои новооткрити цитокини в патогенезата на Микозис фунгоидес и Сезари синдром	23-24 стр.
3. Критерии за поставяне на диагноза кожен Т клетъчен лимфом	24 стр.
3.1. Микозис фунгоидес	24-27 стр.
3.2 Сезари синдром	27-30 стр.
4. Терапевтични подходи при лечение на кожен Т клетъчен лимфом	30 стр.
4.1. Кожно насочени терапии	30 стр.
4.1.1. Ексимерен лазер	30 стр.
4.1.2.Брахитерапия	31 стр.

4.2. Системна терапия	31 стр.
4.2.1.Воринонат и ромидеписин	31-32 стр.
4.2.2. Таргетна терапия	32 стр.
4.2.2.1. Алемтуцумаб	32 стр.
4.2.2.2. Брентуксимаб	32-33 стр.
4.2.2.3. Могамулицумаб	34 стр.
4.2.3.Пралатрексат	34-35 стр.
4.2.4. Топични агенти	35 стр.
5. Секвениране на ниво единична клетка: нови възможности за откриване на прогностични, диагностични маркери и антигени за таргетна терапия	35 стр.
5.1. Възможни приложения на техниката за секвениране на единични клетки в процеса на изучаване на туморогенезата	35-36 стр.
5.1.1. Секвениране на ниво единична клетка: принцип на техниката, преимущества и недостатъци	36-40 стр.
5.1.2. Първи стъпки в изследванията на различни видове рак с помощта на методиката секвениране на единични клетки	40-41 стр.
II. Цел и задачи	42-43 стр.
III. Материали и методи	44 стр.
1. Скрининг за диференциално експресирани гени в клонални и неклонални кожни Т-лимфоцити от пациент с кожен Т-клетъчен лимфом	44 стр.
1.1. Култивиране на кожни експланти от пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом и последващо изолиране на Т-лимфоцити	45 стр.
1.2. Флоуцитометрично сортиране на CD3+CD45+ Т-лимфоцити	45-46 стр.
1.3. Предварителна обработка на C1 Single-Cell Auto Prep IFC (Fluidigm, 5-10 μ m, #100-5762) чипа за сепариране на единични клетки и обратна транскрипция на изолираните иРНКи.	46-47 стр.
1.4. Подготовка на клетъчна суспензия от сортираните CD4+CD45+ Т-лимфоцити за натоварване на чипа	47 стр.
1.5. Натоварване на IFC чипа с клетки	48 стр.
1.6. Заснемане на натоварените върху чипа CD4+CD45+ Т-лимфоцити	49 стр.

1.7. Лизис, обратна транскрипция и амплификация	49-50 стр.
1.8. Събиране на амплифицираните кДНКи	50-51 стр.
1.9. Секвениране на кДНКите от единични клетки (Функционален Геномен Център Цюрих)	51 стр.
1.9.1. Подготовка на библиотеки за секвениране (Nextera XT DNA Library Preparation Kit, Illumina, FC-131-11096)	51-52 стр.
1.9.2. Секвениране на информационните РНКи от всяка изолирана клетка (Illumina, HiSeq 4000 система за секвениране, SY-401-4001).	53-54 стр.
2. Анализ на антитяло-зависимата цитотоксичност (основен молекулен механизъм на действие на таргетните терапии) при пациенти с КТКЛ и при здрави индивиди (aCella™ - TOX: Bioluminescence Non Radioactive Cytotoxicity Assay GAPDH, Cell Technology).	54 стр.
2.1. aCella™ - TOX: биолуминесцентна нерадиоактивна методика за оценяване на цитотоксичност на базата на глицеалдехид фосфат дехидрогеназа.	54-56 стр.
2.2. Блокада на HLA-ABC антигените, експресирани върху повърхността на туморните клетки	56 стр.
3. Флоуцитометричен анализ на мононуклеарни клетки от периферна кръв на пациенти с левкемичен Т клетъчен лимфом. Оценяване на експресията на новооткритите потенциални туморни маркери на постраслагационно ниво	56 стр.
3.1. Изолиране на мононуклеарни клетки от периферна кръв	56-57 стр.
3.2. Оцветяване на периферни мононуклеарни клетки с флуоресцентно белязани моноклонални антитела и флоуцитометричен анализ на количеството на съответните антигени по повърхността на Т- лимфоцитите	57 стр.
4. Използван софтуеър при анализа на данните	57-58 стр.
IV. Резултати	59 стр.
1. Скрининг за гени, диференциално експресирани между клоналните и неклонални популации кожни Т-лимфоцити от пациент с кожен Т-клетъчен лимфом	59-63 стр.
2. Флоуцитометричен анализ на експресията на CD164 и TIGIT върху Т-лимфоцити от периферна кръв на пациенти с левкемичен Т клетъчен лимфом	62-72 стр.
3. Анализ на ефективността на евентуална таргетна терапия при пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом. Оценяване на нивата на антитяло-зависимата цитотоксичност (основен молекулен механизъм на таргетните терапии като цяло) при пациенти и	72-75 стр.

зdravi индивиди

V. Дискусия	75-87 стр.
VI. Приноси	88 стр.
VII. Публикации	89 стр.
VIII. Участие в международни конференции	90-92стр.
IX. Награди	93 стр.
X. Използвана литература	94-107 стр.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Adult T-cell leukemia/lymphoma, ATLL	Т-клетъчна левкемия / лимфом при възрастни, ATLL
Anaplastic large cell lymphoma, ALCL	Анапластичен едроклетъчен лимфом, ALCL
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC	Антитяло-зависима клетъчно-медирана цитотоксичност, ADCC
C-C chemokine receptor type 10, CCR10	С-С хемокинов рецептор тип 10, CCR10
C-C chemokine receptor type 4, CCR4	С-С хемокинов рецептор тип 4, CCR4
C-C chemokine receptor type 7, CCR7	С-С хемокинов рецептор тип 7, CCR7
Chemokine (C-C motif) ligand 21, CCL21	Хемокинов (С-С мотив) лиганд 21, CCL21
Circulating tumor cells, CTC	Циркулиращи туморни клетки, ЦТК
Cluster of differentiation 56, CD56	Клъстер на диференциация 56, CD56
Cluster of differentiation 158, CD158	Клъстер на диференциация 158, CD158
Cluster of differentiation 164, CD164	Клъстер на диференциация 164, CD164
Cluster of differentiation 26, CD26	Клъстер на диференциация 26, CD26
Cluster of differentiation 27, CD27	Клъстер на диференциация 27, CD27
Cluster of differentiation 3, CD3	Клъстер на диференциация 3, CD3

Cluster of differentiation 30, CD30	Клъстер на диференциация 30, CD30
Cluster of differentiation 4, CD4	Клъстер на диференциация 4, CD4
Cluster of differentiation 45, CD45	Клъстер на диференциация 45, CD45
Cluster of differentiation 52, CD52	Клъстер на диференциация 52, CD52
Cluster of differentiation 7, CD7	Клъстер на диференциация 7, CD7
Copy DNA, cDNA	Копи дезоксирибонуклеинова киселина, cDNA
Copy number variaton, CNV	Брой копия вариации, CNV
Cutaneous lymphocyte antigen, CLA	Кожен лимфоцитен антиген, CLA
Cutaneous T-cell lymphoma, CTCL	Кожен Т-клетъчен лимфом, КТКЛ
Cytosine-phosphate-guanine, CpG	Цитозин-гуанин фосфат, CpG
Deoxyribonucleic acid, DNA	Дезоксирибонуклеиновата киселина, ДНК
Dynamin-3, DNM3	Динамин-3, DNM3
Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA	Етилендиаминтетраоцетна киселина, EDTA
European Organisation for Research and Treatment of Cancer, EORTC	Европейска организация за изследвания и лечение на рак,

	EORTC, ЕОИЛР
Fc receptor-like protein 3, FCRL3	Fc рецептор-подобен протеин 3, FCRL3
Food and Drug Administration Organization, USA, FDA	Организация за контрол на храните и лекарствата, САЩ, ОКХЛ
Ganglioside 3, GD3	Ганглиозид 3, GD3
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH	Глицералдеhid 3-фосфат дехидрогеназа, GAPDH
Histone deacetylases, HDACs	Хистон деацетилази, HDACs
Human leukocyte antigens class I, HLA-ABC	Човешки левкоцитни антигени клас I, HLA-ABC
Interferon gamma, IFN γ	Интерферон гама, IFN γ
Interleukin 13, IL-13	Интерлевкин 13, IL-13
Interleukin 4, IL-4	Интерлевкин 4, IL-4
Interleukin-10, IL-10	Интерлевкин-10, IL-10
Interleukin-21, IL-21	Интерлевкин-21, IL-21
International Society for Cutaneous Lymphoma, ISCL	Международно общество за кожен лимфом, ISCL

Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL2, CD158k/KIR3DL2	Имуноглобулин-подобен рецептор на клетките убийци 3DL2, CD158k / KIR3DL2
Mean Fluorescence Intensity, MFI	Среден интензитет на флуоресценция, MFI
Messenger RNA, mRNA	Информационни РНКи, иРНКи
Micro ribonucleic acid, miRNA	Микро рибонуклеинова киселина, miRNA
Monoclonal B-cell lymphocytosis, MBL	Моноклонална В-клетъчна лимфоцитоза, MBL
Monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS	Моноклонална гамопатия с неопределено значение, MGUS
Multiple displacement amplification, MDA	Амплификация с множествоно изместване, MDA
Mycosis fungoides, MF	Фунгоидна микоза, MF, МФ
Naive/memory marker CD45RO, CD45RO	Наивен / памет маркер CD45RO, CD45RO
Natural cytotoxicity receptors group member p46, NKp46	Естествен рецептор на цитотоксичността P46, NKp46

Natural killer cells, NK cells	Клетки естествени убийци, NK клетки
Phospholipase C, gamma 1, PLCG1	Фосфолипаза C, гама 1, PLCG1
Plastin-3, PLS3	Пластин-3, PLS3
Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, QRT-PCR	Количествена обратно транскрипторна полимеразна верижна реакция, QRT- PCR
Ribonucleic acid, RNA	Рибонуклеинова киселина, РНК
Sezary syndrome, SS	Сезари синдром, СС
Signal transducer and activator of transcription, Stat3	Сигнал трансдюсер и активатор на транскрипция, Stat3
Silent information regulator type-1, SIRT1	тип-1 тих регулатор на информацията, SIRT1
Single-cell sequencing, SCS	Секвениране на единични клетки
Sirtuin, Sir2	Сиртуин, Sir2
Syndecan-4, SD-4	Синдекан-4, SD-4
T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains, TIGIT	Т-клетъчен имунорецептор с Ig и ITIM домени, TIGIT
T helper cells type 1, Th1 cells	Т-клетки помощници тип 1, Th1 клетки

T helper cells type 2, Th2 cells	Т-клетки помощници тип 2, Th2 клетки
T-cell receptor, TCR	Т-клетъчен рецептор, ТКР
Toll-like receptor 7, TLR 7	Toll-подобен рецептор 7, TLR 7
Toll-like receptor 8, TLR 8	Toll-подобен рецептор 8, TLR 8
Toll-like receptor 9, TLR 9	Toll-подобен рецептор 9, TLR 9
Twist Family BHLH Transcription Factor 1, TWIST1	Twist семейство BHLH транскрипционен фактор 1, TWIST1
World Health Organisation, WHO	Световната здравна организация, СЗО

I. Увод

Кожните Т-клетъчни лимфоми (КТКЛ) са втората най-често срещана група на екстранодални Неходжкинови лимфоми и представляват приблизително 75% от всички първични кожни лимфоми. Средно 53% от случаите на кожни Т-клетъчни лимфоми се диагностицират като Микозис фунгоидес или Сезари синдром. По правило протичането на КТКЛ е агресивно, когато се наблюдава пролиферация на малигнени Т клетъчни клонове в кръвта. Прогнозата за левкемичен тип пациенти е лоша: средна продължителност на живота след откриване на болестта е около пет години. Клиничната проява се изразява в генерализирана, сърбяща еритродерма, периферна лимфаденопатия и наличие на туморни клетки в кръвообръщение. Ето защо точното и бързо откриване на раковите клетки в кръвта на пациенти с кожен Т клетъчен лимфом е от водещо значение за правилната диагностика и прогностика. В наши дни, изчезването на клетъчни маркери като CD26, CD27 и CD7 от повърхността на малигнените Т-лимфоцити се счита за една от основните характеристики на левкемичен КТКЛ и се използва в рутинната диагностика. За съжаление лабораторните резултати трябва да бъдат интерпретирани внимателно поради незадоволителната специфичност и чувствителност на използваните методики. Единствен и специфичен маркер за откриване на туморните клетки в кръвта все още не е открит.

Поради неизяснената етиология на кожен Т клетъчен лимфом, в последните години се полагат неимоверни усилия да се подобри представата за заболяването. Според скорошни литературни данни епигенетичните промени са интегрална част от развитието на заболяването. Също така бе доказана ролята на някои туморни имунологични фактори в подтискането на пролиферацията и секрецията на цитокини от немалигнените Т лимфоцити. Ето защо откриването на нови участници в молекулните механизми, участващи в подтискането на имунните отговори, насочени срещу раковите Т-клетки, би дало нови възможности за лечение на КТКЛ. Таргетните терапии срещу свръхекспресирани върху туморните клетки антигени като например

лечение с анти-CD30 моноклонални антитела при някои подтипове КТКЛ са все по-често предпочитани от лекуващите лекари, тъй като позволяват индивидуализиран подход в зависимост от фенотипните характеристики на съответния тумор. Скринингът за и откриването на нови прицелни молекули, които са специфични предимно за малигнените клетки и които биха могли да се използват за разработване на таргетна терапия, както и на нови ключови регулатори на имунния отговор срещу раковите клетки е от значение за подобряване на диагностиката на КТКЛ, за лечение и проследяване на ефекта от назначената терапия.

II. Литературен обзор

1. Кожни Т-клетъчни лимфоми: класификация

Кожните Т клетъчни лимфоми са хатерогенна група от неоплазии на Т клетките с изявен тропизъм към кожата. Представяват приблизително 75% от всички първични кожни лимфоми. Средно 53% от КТКЛ се диагностицират като Микозис фунгоидес и Сезари синдром (Sarah I. Jawed 2014). Следващият по честота на срещане тип КТКЛ включва кожните CD30+ лимфопрролиферативни нарушения: приблизително 30% от случаите. Към тази група спадат кожен анапластичен голямклетъчен лимфом и лимфатоид папулозис (Hoetzenecker, Guenova et al. 2009, Kempf, Kazakov et al. 2014). Около 3% от КТКЛ се диагностицират като редки подтипове. Субкутанен паникулитис-подобен Т клетъчен лимфом се характеризира с алфа/бета (α/β) фенотип на Т лимфоцитите (Guenova, Schanz et al. 2014), докато лезии с гама/делта Т клетъчен фенотип се субкатегоризират като първичен кожен $\gamma\delta$ Т-клетъчен лимфом (PCGD-TCL) (Takahashi, Takata et al. 2014). Първичен кожен CD4+ малко/средно голям плеоморфен Т-клетъчен лимфом (James, Sokhn et al. 2014), екстранодален NK/Т-клетъчен лимфом (Takata, Hong et al. 2014), агресивен епидермотропичен кожен CD8+ лимфом (Robson, Assaf et al. 2014), ангиоимунобластен Т клетъчен лимфом (Pircher, Verdorfer et al. 2014), хидроаваксинаформе-подобен кожен Т клетъчен лимфом (Plaza and Sanguenza 2014) и периферен Т клетъчен лимфом, неклассифициран по друг начин, са също редки субтипове на КТКЛ (Quintanilla-Martinez, Jansen et al. 2013). Клиничната картина и прогнозата в случай на диагностициран кожен Т клетъчен лимфом силно варира в зависимост от субтипа и стадия на развитие на тумора (Таблица 1). Най-често срещаният вариант, Микозис фунгоидес, по правило е неагресивен тип лимфом с протрахиран клиничен ход. Повечето МФ пациенти (70%) са в начален стадий на заболяването при поставяне на диагнозата (стадий IA-IIA). Средно 88% от пациентите с диагноза Микозис фунгоидес са с преживяемост повече от 5 години. В редки случаи заболяването прогресира, развиват се тумори и се наблюдава екстранодална

дисеминация на малигнени Т клетки (Talpur R 2012). За разлика от МФ, Синдром на Сезари е агресивен и левкемичен вариант на КТКЛ, при който в едва 24% от случаите преживяемостта е повече от 5 години.

Изборът на терапия се базира на площта на лезиите и на частите на тялото, които са засегнати. Топичните медикаменти и фототерапията са подходящи при лечение в случаите, когато е засегнат неголям кожен участък. Системните агенти се прилагат в случай на пролиферация на малигнени клетки в кръвта и лимфните възли. Съвременните методи на лечение, когато са ефективни, просто контролират болестта. За момента единствената възможност за напълно излекуване остава трансплантацията на стволови клетки.

Таблица 1. Класификация на кожен Т-клетъчен лимфом в зависимост от клиничния ход (адаптирана от класификацията на СЗО/ЕОИЛР). *Честота: % на случаите на съответния тип КТКЛ от общия брой случаи, преживяемост: процент на пациентите с преживяемост повече от 5 години спрямо общия брой на болните със същата диагноза.

<i>Първични кожни Т-клетъчни лимфومي с бавен клиничен ход</i>	<i>Честота (%)</i>	<i>5 години преживяемост (%)</i>
Микозис фунгоидес (МФ)	44	88
Варианти на МФ		
Фоликулотропен МФ	4	80
Пагетоид Ретикулозис / Pagetoid Reticulosis	<1	100
Грануломатозна отпусната кожа / Granulomatous Slack Skin	<1	100
Първични кожни CD30+ лимфопролиферативни нарушения		
Първичен кожен анапластичен голямо клетъчен лимфом	8	95
Лимфоматоид Папулозис / Lymphomatoid Papulosis	12	100
Субкутанен паникулитис - подобен Т-клетъчен лимфом	1	82
Периферен Т -клетъчен лимфом (некласифициран по друг начин)		
Първичен кожен CD4+ малко/средно голям плеоморфен Т-клетъчен лимфом	2	72
<i>Агресивни първични кожни Т-клетъчни лимфومي</i>	<i>Честота (%)</i>	<i>5 години преживяемост (%)</i>
Синдром на Сезари	3	24
Екстранодален НК/Т-клетъчен лимфом, назален тип	<1	0
Периферен Т-клетъчен лимфом (некласифициран другаде)		
Агресивен епидермотропичен кожен CD8+ лимфом	<1	18
Първичен кожен гама/делта Т-клетъчен лимфом	<1	0

2. Биология на кожния Т клетъчен лимфом

Етиологията на Т клетъчен лимфом все още не е изцяло разбрана. Приема се, че характерна за напреднал стадий на КТКЛ е наличие на малигнени клетки в периферното кръвообръщение и имунната супресия (Kim, Hess et al. 2005). Също така все повече литературни данни сочат, че епигенетични изменения играят роля в патофизиологията на заболяването (Wong 2013).

2.1. Молекулярни и геномни изследвания в областта

2.1.1. Генни мутации

Генни мутации, свързани с клиничната проява на кожен Т клетъчен лимфом, все още не са открити. Скорешни проучвания сочат множество изменения в генната експресия, които обаче в повечето случаи не са свързани с аберации в нуклеотидната последователност на гените. Различният профил на експресия се дължи на промени в транскрипцията на определени гени, водещи до епигенетични изменения и отключване на КТКЛ. Все повече научни разработки доказват изменена експресия на някои гени, микро РНК дисрегулация, повишена активност на хистон деацетилазите и метилиране в областта на промоторите.

Соматични мутации в гена, кодиращ фосфолипаза С, гама 1 (PLCG1: Phospholipase C, gamma 1) са доказани от Vaqué и сътрудници в 19% от кожни биопсии, взети от 42 пациента с диагноза Микозис фунгоидес. При наличие на

тази мутация се наблюдава активиране на сигналния път надолу от ядрен фактор на активирани Т клетки (NFAT, nuclear factor of activated T cells). Инхибиране на същия сигнален път води до подтискане на пролиферацията на малигнени клетки. Според авторите именно PLCG1 мутацията е причина за експанзия на Т клетъчни клонове в случаите на КТКЛ (Vaque, Gomez-Lopez et al. 2014).

2.1.2. CCL21, CCR10, CCR4, CCR7 и CLA

Интригуваща е също скорошна публикация от Хашикава и колектив (Hashikawa et al), чиято цел е проучване на механизмите на епидермотропизъм при пациенти с диагноза Микозис фунгоидес и Т клетъчна левкемия/лимфома при възрастни (adultT-cellleukemia/lymphoma, ATLL, ТКЛЛВ). МФ и ТКЛЛВ могат лесно да бъдат отдиференцирани с помощта на микрочип кДНК анализи на епидермис и дерма. За МФ е типична засилената секреция на скин-хоуминг хемокини и хемокинови рецептори, също така повишена експресия на лимфотоксин бета, CCL21 и CCR10. Докато показателни за ТКЛЛВ са повишени нива на CCR4 и CLA (Hashikawa, Yasumoto et al. 2014). В последните години са публикувани и много научни разработки, имащи за цел фенотипизиране на малигнените Т лимфоцити при пациенти с диагноза Сезари синдром. Туморните Сезари клетки се субкатегоризират като част от централната имунна памет и експресираният от тях фенотип е CD4+CD26-CD45RO+. Способността на малигнените Т лимфоцити да се локализируют в кожата се определя от наличието на CLA и CCR4, докато експресията на CCR7 улеснява навлизането им в лимфните възли (Vander Lugt, Tubo et al. 2013), (Ferenczi, Fuhlbrigge et al. 2002), (Sokolowska-Wojdylo, Wenzel et al. 2005), (Wenzel, Henze et al. 2005).

2.1.3. NKp46, CD158k/KIR3DL2, GD3, SD-4, T-plastin, CD164 и FCRL3

Напредването на заболяването корелира с намаляване разнообразието на Т клетъчните рецептори (ТКР), което води до експресията на един преобладаващ ТКР V β върху клетъчната повърхност на малигнените CD4 Т лимфоцити (Yawalkar, Ferenczi et al. 2003). Също така за молекули като НКр46 and CD158k/KIR3DL2, първоначално открити върху НК клетките, ганглиозид GD3 (CD60) и синдекан 4 (SD-4), характерни за активираните нормални Т лимфоцити, са доказани повишени нива на експресия при пациенти с напреднал стадий Сезари синдром (Caudron, Marie-Cardine et al. 2012), (Chung, Shiue et al. 2011), (Poszepczynska-Guigne, Schiavon et al. 2004), (Scala, Abeni et al. 2010). Т-пластин (Т-plastin) би могъл да бъде използван като специфичен маркер за малигнени циркулиращи CD4 Т клетки, но вътреклетъчната експресия и липсата на флоуцитометрични антитела го правят трудно приложим като диагностичен маркер (Kari, Loboda et al. 2003). След скрининг, базиран на микрочип анализи и количествена обратнотранскриптна полимеразна верижна реакция (QRT-PCR), Висоцка и сътрудници установяват повишени нива на CD164 и FCRL3 информационна РНК в CD4 Т лимфоцити от Сезари синдром пациенти. Успяват да докажат също така корелация между клинично подобрене и намаляване процента на CD4+CD26-CD164+FCRL3+ циркулиращите Т клетки.

2.1.4. Микро РНК (miRNA)

Микро РНК (miRNA) са малки некодиращи РНК молекули, които регулират пост-транскрипционната генна експресия. Изследвания на микро РНК профила доказват променена експресия на микро РНКи при кожен Т клетъчен лимфом. При пациенти с диагностициран Сезари синдром са отчетени изменения в микроРНКите вследствие на промени в област DNМ3 от хроматина (Booken, Gratchev et al. 2008, Qin, Vuermans et al. 2012). Повишени нива на miR-155, miR-92a, и miR-93 са измерени в кожни лезии от пациент в стадий тумор Микозис фунгоидес (van Kester MS 2011). Мишра и сътрудници

(Mishra et al.) доказват, че mi-R150 е със силно подтисната експресия в напреднал стадий КТКЛ и че пониженото и ниво е тясно свързано с инвазивността и метастазирането на тумора (Mishra A 2014). В скорошно проучване на Макгирт и колектив (McGirt et al) се описват понижени нива на miR-223 в кръв от пациенти късен стадий МФ/КТКЛ. При проследяване на ефекта от назначената терапия се установява възстановяване/увеличение на miR-223, а също така и повишаване нивото на miR191 и miR-342 3 месеца след приключване на екстракорпорална фотофореза. Този факт подсказва, че нивото на специфични микро РНКи би могло да се ползва като показател за клиничен отговор по време на лечение (McGirt LY 2014).

2.1.5. Хиперметиране в областта на промоторите на някои тумор супресорни гени

Характерно за малигнените Т лимфоцити в случай на кожен Т клетъчен лимфом е хиперметирането в областта на промоторите, което е причина за инактивиране на някои тумор супресорни гени (van Doorn R 2005). CD158 (KIR3DL2), DNMT3, PLS3 and TWIST1 са силно експресирани при МФ/СС и са показателни за КТКЛ (Wong 2013). Интересно е, че всички тези гени съдържат в структурата си дълги CpG острови и загубата на метилиране е възможен механизъм за тяхното активиране. В подкрепа на по-горе изложеното е доказаното хипометиране на CpG островите при КТКЛ пациенти (Jones CL 2012). В скорошно проучване Ферара и сътрудници оценяват тенденцията на метилиране при 41 първи стадий Микозис фунгоидес пациенти, които са били проследявани в продължение на повече от 12 години. Целта е да бъдат открити специфични особености на метилирането, които могат да послужат като маркер за повишен риск от прогресиране на болестта. При пациенти с прогресиращо и напреднал стадий заболяване са открити различни нива на метилиране в 4 локуса - LINE-1, PPARG, SOCS1 and NEUROG1. Данните съвпадат с профила на метилиране, наблюдаван при Сезари клетъчната линия HUT78 (Ferrara G 2014).

2.1.6. Роля на хистондеацетилазите (HDACs)

Ролята на хистон деацетилазите (HDACs) в патофизиологията на КТКЛ все още не е добре проучена. В един от малкото литературни източници по този въпрос се описва тих регулатор на информацията тип 1 (silent information regulator type-1, SIRT1) - най-известният представител на Сиртуин (Sirtuin, Sir2) семейството, състоящо се от никотинамид динуклеотид (nicotinamide dinucleotide, NAD) - зависими клас III хистондеацетилази (HDACs). SIRT1 е силно експресиран в кръв и кожни лезии при пациенти с диагностициран кожен Т клетъчен лимфом (Nihal M 2014).

Нарастващите литературни данни, доказващи че епигенетичните аберации са неразделна част от отключването и прогресията на КТКЛ, подсказват, че терапията трябва да регулира множеството епигенетични промени, което от своя страна е постижимо с помощта на комбиниран режим на приемане на лекарствените препарати.

2.2. Имунологични изследвания

2.2.1. Доминанция на Th2 цитокините при пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом

Кожният Т клетъчен лимфом представлява малигнена пролиферация на скин-хоуминг Т лимфоцити и една от основните характеристики на болестта в напреднал стадий е супресия на имунната система. Задълбочени анализи на цитокиновия профил на Т клетки от левкемични КТКЛ пациенти установяват,

че и туморните, и здравите Т лимфоцити секретират предимно Th2 цитокини. Продуцираните от малигнените клонални клетки Th2 цитокини се предполага, че директно подтискат Th1 имунните отговори у КТКЛ пациенти. Важно е да се отбележи, че инхибиране на Th2 цитокините води до възстановяване на протективните Th1 имунни отговори (Guenova, Watanabe et al. 2013). Генова и екип установяват в 12 от общо 12 пациента с левкемичен кожен Т клетъчен лимфом свръхпродукция на Th2 цитокини. Включително и здравите Т клетки са с Th2 цитокинов профил. Разделянето на здрави Т лимфоцити от малигнени клонални клетки и самостоятелното им култивиране води до намаляване на Th2 и възстановяване на Th1 цитокиновата продукция. При монокултура от малигнени Т-лимфоцити не се наблюдава подобна промяна в типа на секретираните цитокини. В ко-култури от здрави Т клетки и туморни лимфоцити от левкемични пациенти с КТКЛ са измерени понижени нива на интерферон гама (IFN γ). След добавяне на неутрализиращи антитела срещу интерлевкин 4 (IL-4) и интерлевкин 13 (IL-13) в клетъчната ко-култура, количеството на Th1 цитокините се увеличава. Цитираното проучване предоставя възможно обяснение на факта, че при пациенти, преминали през курс на лечение, довел до намаляване количеството на малигнени клетки, се подобрява Th1 имунитетът.

2.2.2. Тумор-свързани галектини

Наред с Th2 цитокините, тумор-свързаните галектини (galectins) също подтискат пролиферацията и продукцията на Th1 цитокини от немалигнените Т клетки (Cedeno-Laurent, Watanabe et al. 2012). В проучване на Тод и сътрудници се съобщават изменения в епидермиса като хиперпролиферация и загуба на бариерна функция при КТКЛ, които се дължат на тумор-свързаните галектини (Thode, Woetmann et al. 2014).

2.2.3. Намалена продукция на антимикробни пептиди в кожата при пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом

Кожни лезии ранен стадий кожен Т клетъчен лимфом, най-вече Микозис фунгоидес, често са клинично наподобяват такива при атопичен дерматит - друго Th2-медирано хронично заболяване на кожата (Guenova, Volz et al. 2008). При атопичен дерматит намалената продукция на антимикробни пептиди в кожата се счита за основна причина за чести инфекции и нарушен кожен имунен отговор. От значение по темата са две научни публикации от Суга и сътр. и Уолк и колектив (Suga, Sugaya et al. 2014, Wolk, Mitsui et al. 2014), които детектират понижена експресия на антимикробни пептиди в кожни лезии от КТКЛ пациенти. Освен тумор-свързаните галектини, също така и ниските нива на антимикробни пептиди корелират с нарушена бариерна функция и чести инфекции на кожата (Suga, Sugaya et al. 2014, Wolk, Mitsui et al. 2014). *Staphylococcus aureus* е често срещан патоген в лезионна кожа от КТКЛ пациенти. В статия, публикувана от Крейсгард и сътрудници (Willerslev-Olsen, Krejsgaard et al. 2016) се описва, че стафилококовият ентеротоксин допълнително подтиска защитните имунни отговори при КТКЛ пациенти. Авторите установяват, че той индуцира взаимодействие между малигниетите и "здравите" Т лимфоцити, което води до активиране на сигнал преносител и активатор на транскрипцията 3 (signal transducer and activator of transcription, Stat3) и последваща продукция от туморните клетки на имуносупресорния интерлевкин-10 (interleukin-10, IL-10) (Krejsgaard, Willerslev-Olsen et al. 2014). Типично за Сезари клетките е, че STAT3 е конститутивно фосфорилиран и допълнително може да бъде активиран от интерлевкин-21 (van der Fits, Out-Luiting et al. 2012). Ето защо STAT3 и интерлевкин-21 (IL-21) са потенциални прицелни молекули за лечение на Сезари синдром (van der Fits, Out-Luiting et al. 2014).

2.2.4. Роля на някои новооткрити цитокини в патогенезата на Микозис фунгоидес и Сезари синдром

Наскоро бе установена ролята на още два цитокина в патогенезата на Микозис фунгоидес и Сезари синдром. В публикация от Оматсу и колектив (Ohmatsu et al.) са описани високи нива на експресия на интерлевкин-32 мРНК при пациенти с диагноза Микозис фунгоидес. Авторите предполагат, че интерлевкин-32 допринася за прогресията на болестта (Ohmatsu, Humme et al. 2014). Според проучване на Сингер и сътрудници (Singer et al.) при 14 СС пациента със силен сърбеж от общо 26 са открити повишени серумни нива на интерлевкин-31. При 3 от 3 изследвани пациента с откриваем малигнен Т клетъчен клон, туморните клетки са основният източник на интерлеквкин-31. Също така е установено, че клиничното подобрене на прурита е правопрпорционално на намаляването на нивото на интерлевкин-31 в кръвообръщението (Singer, Shin et al. 2013).

3. Критерии за поставяне на диагноза кожен Т клетъчен лимфом

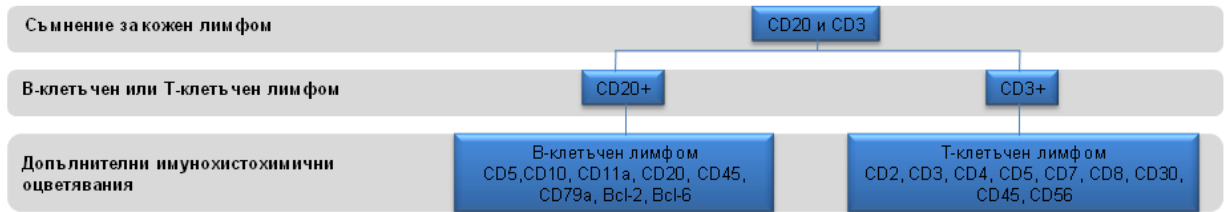
3.1. Микозис фунгоидес

Поставянето на диагноза Микозис фунгоидес, особено в начален стадий на заболяването с проява на петна или плаки, е труден процес поради липсата на специфични клинични и патологични маркери. При много пациенти предшестващата диагноза е екзема или парасориазис и са необходими години, за да се диагностицират окончателно като МФ. Обикновено в ретроспективен план между първата проява на симптоми и поставянето на окончателна диагноза Микозис фунгоидес има отстояние 3-4 години, в редки случаи са необходими дори десетилетия (Zhao, Abdul-Fattah et al. 2016);

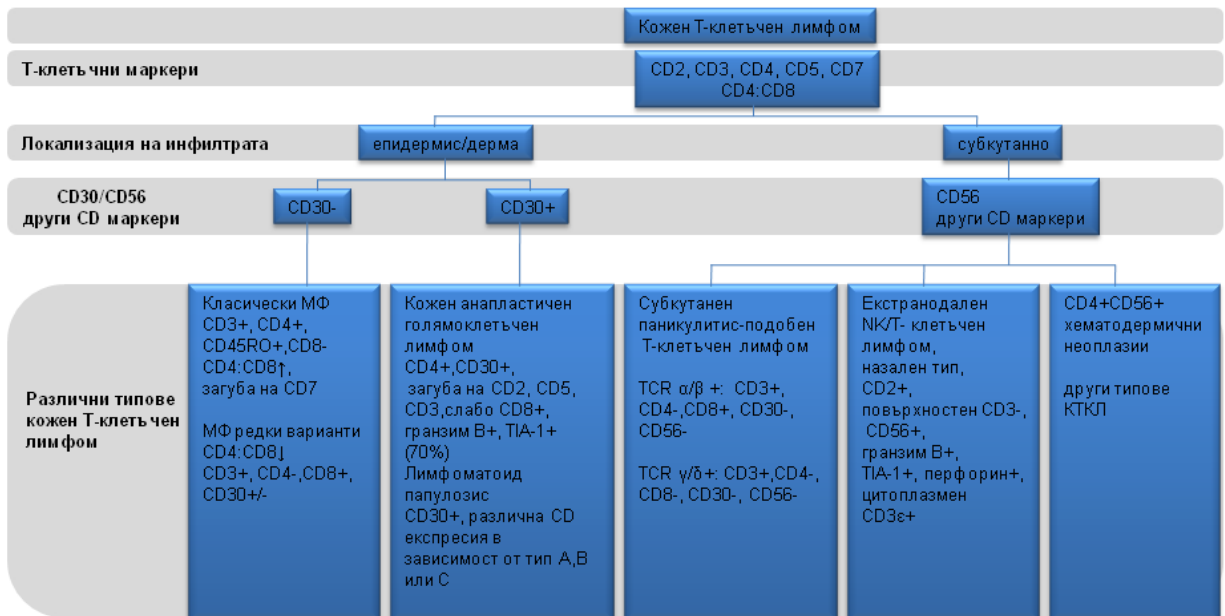
(Ehsani, Azizpour et al. 2016); (Patrawala, Broussard et al. 2016). Диагнозата се базира на клиничните и хистопатологичните данни, също така от значение е определянето на Т клетъчния клоналитет и скрининга за понижена експресия на Т клетъчни антигени като CD26, CD2, CD3, CD5, CD7 с помощта на имунохистохимични оцветявания (таблица 2). Техниките на полимеразна верижна реакция дават възможност да се детектират клонални пренареждания на Т клетъчния рецептор (T-cell receptor, TCR) дори в биопсии, фиксирани във формалин или включени в парафин (O'Shea, Hollowood et al. 1996);(Hodges, Williams et al. 2005). Методиките, използващи ПБР, въпреки че са чувствителни, трябва да бъдат интерпретирани внимателно, тъй като клонални пренареждания на ТКР се срещат при здрави възрастни индивиди и пациенти с доброкачествени дерматози например (Furukawa, Tokura et al. 1996), (Wedderburn, O'Hehir et al. 1993, Bohle, Schwihla et al. 1998). Въпреки това откриването на идентични клонове в биопсии от различни части на тялото на пациента е показателно за Микозис фунгоидес (Mancebo, Cordova et al. 2016). Дали МФ и СС са предшествани от пре-малигнено състояние, подобно на моноклонална В-клетъчна лимфоцитоза (monoclonal B-cell lymphocytosis, MBL) или моноклонална гамопатия с неизяснено значение (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS) е все още под въпрос (Barrio, Shanafelt et al. 2016),(Palladino, Bruno et al. 2014). Туморните лимфоцити при МФ/СС са обикновено CD3+CD4+CD8-, но често експресията и на други Т-клетъчни маркери е намалена. Наблюдават се значителни популации от клетки без CD2, CD5, и/или CD7 (таблица 2), локализирани в лезиите или по целия епидермис, което е специфично за Микозис фунгоидес (>90%) (Kelemen, White et al. 2010).

Таблица 2. Имунохистохимична диагностика на кожен Т-клетъчен лимфом (адаптирана от Кампбел и сътрудници, Immunophenotypic Diagnosis of Primary Cutaneous Lymphomas, Clin Aesthet Dermatol. 2010;3(10):21–25).

А. Алгоритъм за имунохистофенотипизиране при съмнение за първичен кожен Т- или В-клетъчен лимфом



Б. Алгоритъм за имунохистофенотипизиране на първичен кожен Т-клетъчен лимфом в зависимост от локализацията



В повечето случаи МФ стадий петна/плаки клинично се характеризира с персистиращи и прогресиращи лезии с локализация, наречена "бански костюм", които силно варират по размер, форма и/или цвят (фигура 1). Тези лезии при "класически" Микозис фунгоидес по правило са големи (>5 cm), сърбящи и мултифокални. Освен "класическия" тип МФ са описани и много други варианти, при които се наблюдават различия в тропизма (например фоликуларен МФ), локализацията на лезиите (напр. палмоплантарен МФ), пигментацията (хипо- и хиперпигментиран вариант) и броя на лезиите (еднолезионен МФ). Някои от тези варианти са официално признати и включени в класификацията на Световната Здравна Организация и

Европейската Организация за Изследване и Лечение на Рак (WHO-EORTC) (Khamaysi, Ben-Arieh et al. 2008, Kempf and Sander 2010). Впредвид многото варианти и нуждата от унифицирани диагностични критерии Международната Общност за Кожен Лимфом (International Society for Cutaneous Lymphoma, ISCL) наскоро предложи диагностичен алгоритъм, който обединява клиничните и хистопатологичните данни с тези от имунофенотипизирането и определянето на Т-клетъчния клоналитет (Vandergriff, Nezafati et al. 2015).



Фигура 1. Клиника при кожен Т-клетъчен лимфом: а. класически тип Микозис фунгоидес; б. Сезари синдром (личен архив Доц. Генова, ДМ, ДБН).

3.2 Сезари синдром

По правило Сезари синдром се определя като левкемична форма на кожен Т-клетъчен лимфом, свързана с генерализирана, сърбяща еритродерма (фигура1).

В множество литературни източници от средата на 20ти век се описва популация от големи лимфоцити с огънато, лобуларно ядро, циркулиращи в периферното кръвообръщение на пациенти с МФ и СС. Наречени са Сезари клетки - на името на изследователя, който ги е описал за пръв път през 1938 (френският дерматолог Алберт Сезари) (Volgert 1957). Подобно на други лимфопролиферативни нарушения, диференциалното броене на Сезари клетки се представя като абсолютни стойности. Например ≈ 1000 клетки/мл, което е показателно за В2 стадий заболяване според класификацията, одобрена от Международната организация за Кожен Лимфом и Европейската Организация за Изследване и Лечение на Рак (ISCL/EORTC). Морфологичното откриване на Сезари клетки в периферното кръвообръщение не е специфично само за КТКЛ, тъй като същият тип клетки се среща и при здрави индивиди, както и незлокачествени болестни процеси. Хистологичните находки от кожа на пациенти със Сезари синдром често се припокриват с тези при Микозис фунгоидес. Обикновено епидермотропизмът е по-слабо изразен в случай на СС. В напреднал стадий левкемичен кожен Т-клетъчен лимфом се засягат и лимфните възли, чиято архитектура се разрушава изцяло от натрупаните в тях Сезари клетки (Sausville, Worsham et al. 1985, Scheffer, Meijer et al. 1986). При СС подобно на МФ клоналните Т клетки в повечето случаи са CD3+CD4+CD8-, когато биват изследвани с многоцветна флуоцитометрия. Също така често се наблюдава загуба на Т-клетъчни антигени като CD2, CD3, CD4, CD5 и CD7 (таблица 2) (Boonk, Zoutman et al. 2016), (Steinhoff, Schopp et al. 2009). От изброените доминираща е намалената експресия на CD7: среща се в две трети от случаите на Сезари синдром (Kim and Horpe 1999). Изчезването на CD26 би могло също да се използва за идентифициране на Сезари клетки и се открива при голяма част от СС пациентите (Horna, Deaver et al. 2014, Novelli, Fava et al. 2015). Друг потенциален маркер за туморни клетки е CD158к, главен комплекс на тъканната съвместимост клас I свързващ имуноглобулин-подобен рецептор убиец (MHC class I-binding, killer immunoglobulin-like receptor, KIR). При здрави индивиди е експресиран върху клетките естествени убийци, докато при голяма част от СС пациентите се детектира и на повърхността на Т-лимфоцитите (Poszepczynska-Guigne, Schiavon et al. 2004, Bahler, Hartung et al. 2008). В рутинната практика за

определяне на Т-клетъчния клоналитет се използват полимеразна верижна реакция или многоцветна флоуцитометрия, комбинирана с с панел от антитела срещу вариабилните части на бета веригите, участващи в изграждането на ТКР. По този начин може да се детектират клонална популация от Т-лимфоцити, когато е значително повече от фоновата честота на срещане на поликлоналните Т-клетки със същата бета верига (Beck, Stahl et al. 2003). Кларк и колектив установяват, че част от лимфоцитите, изолирани от периферна кръв или кожни лезии на СС пациенти и впоследствие анализирани с флоуцитометрия, формират популация с висок FSC и SSC (forward scatter и side scatter). Същата популация не се наблюдава при здрави индивиди. След детайлно имунофенотипизиране и анализ на експресията на клоналния Т-клетъчен рецептор, постулират, че именно клоналните малигнени Т-лимфоцити са тази популация с висок FSC и SSC. Дали описаната популация от Кларк и колектив би могла да се използва в рутинната диагностика като метод за детектиране на туморни клетки и за проследяване на клиничния отговор по време на лечение предстои да се установи.

Актуалният алгоритъм, който се ползва от клиницистите за поставяне на диагноза Сезари синдром и който е одобрен от Международната Организация за Кожен Лимфом, включва комбинация от хистологични оцветявания, имунофенотипизиране и молекулярни изследвания. Критериите са диференциално броене на Сезари клетки $\geq 1,000$ /микрол, съотношение CD4/CD8 ≥ 10 (дължи се на клонална експанзия на CD4 клетки), променена експресия на типични за Т-лимфоцитите маркери, откриване на доминиращ Т клетъчен клон с помощта на Саутърн блот (Southern blot) или полимеразна верижна реакция, цитогенетично доказване на същия клон (Edsall and Patterson 2010). Към по-горе описаните изисквания за поставяне на диагноза Сезари синдром Световната Здравна Организация добавя и еритродерма, генерализирана лимфаденопатия, клонални Т лимфоцити (Сезари клетки) в кожата, периферното кръвообръщение и лимфните възли. В редки случаи, Сезари синдром може да бъде предшестван от класически Микозис фунгоидес, което трябва да бъде отбелязано в досието на пациента. При левкемичен вариант на Микозис фунгоидес не се наблюдава еритродерма, но

кръвните показатели съвпадат с тези за Сезари синдром (Klemke, Booken et al. 2015). За останалите субтипове КТКЛ също има публикувани диагностични критерии (Willemze 2003)

4. Терапевтични подходи при лечение на кожен Т клетъчен лимфом

Все още не е приет унифициран международен алгоритъм за лечение на КТКЛ. В клиничната практика се налагат няколко терапевтични подхода като все повече се обръща внимание на разработването на таргетни терапии (Dummer, Rozati et al. 2013, Guenova, Hoetzenecker et al. 2014).

4.1. Кожно насочени терапии

4.1.1. Ексимерен лазер

Тъй като клиничната проява на Микозис фунгоидес, най-често срещаната форма на кожен Т клетъчен лимфом във всички възрастови групи, се изразява в кожни петна и плаки, първа линия на борба със заболяването са кожно насочените терапии. Неотдавна при малка група от 6 пациента със засягане на <10% телесна повърхност и слабо повлияване от топична терапия бе проучено приложението на 308-nm ексимерен лазер (excimer laser) за лечение на ранен стадий (IA-IIA). Пълен отговор е документиран при 50% от пациентите (Deaver, Cauthen et al.). Тази модалност би могла да бъде полезна

при лечението на анатомично трудните интертригинозни области и за намаляване на фототоксичността (Deaver, Cauthen et al.).

4.1.2.Брахитерапия

Брахитерапията е друг безопасен и ефективен терапевтичен подход за лечение на деликатни области на тялото като например кожата на лицето. Наскоро Генова и сътрудници проведоха клинично изпитване, чиято цел бе да проследи терапевтичния отговор към ниска и висока доза брахитерапия при пациенти с диагноза Микозис фунгоидес. При общо 10 пациента и 23 лицеви лезии, лекувани с брахитерапия, пълен отговор бе наблюдаван при 6 пациента (13 лезии), а частичен такъв бе отчетен при 4 пациента (10 лезии) (DeSimone, Guenova et al. 2013).

4.2. Системна терапия

При персистираща клиника и напреднал стадий на КТКЛ се налага системна терапия. Такъв тип лечение включва ново поколение медикаменти, с помощта на които все по-ефективно се контролира прогресирането на тумора.

4.2.1.Воринолат и ромидепсин

Воринолат и ромидепсин (vorinostat and romidepsin) са инхибитори на хистон деацетилазите, които са вече одобрени за лечение на КТКЛ от

американската организация за контрол на приема на храни и медикаменти (FDA, Food and Drug Administration Organization, USA). Според проучвания, насочени към изследване на механизма на действие на хистон деацетилазните инхибитори, същите индуцират спиране на клетъчния цикъл и апоптоза. В ин витро условия обаче е установена резистентност към хистон деацетилазни инхибитори при подтискане на про-апоптичните протеини (Chakraborty, Robey et al.). Двата препарата са ефективни при около 33-34% от пациентите и в най-добрите случаи продължителността на клинично подобрене е 12-15 месеца (Kim, Thompson et al. , Kogge, Volteau et al. 2014). Често срещани странични ефекти са загуба на тегло, отпадналост, хематологични аномалии като анемия и тромбоцитопения, гадене/повръщане и податливост към инфекции (Coiffier, Pro et al.), (Kogge, Volteau et al.).

4.2.2. Таргетна терапия

4.2.2.1. Алемтуцумаб

Алемтуцумаб (Alemtuzumab) - анти-CD52 моноклонално IgG антитяло, е медикамент, одобрен от американската организация за контрол на приема на храни и медикаменти (FDA, Food and Drug Administration Organization, USA) за лечение на упорит и повтарящ се кожен лимфом. Препаратът е ефикасен при лечение на напреднал стадий Микозис фунгоидес и Синдром на Сезари, но в литературата се срещат данни за връзка между приема на Алемтуцумаб и голямклетъчна трансформация (de Masson, Guitera et al.). От значение е фактът, че приблизително 70% от пациентите със Сезари синдром се повлияват добре при лечение с медикамента, докато при пациентите с

Микозис фунгоидес процентът е значително по-нисък - около 25%. Следователно, системната терапия е по-подходяща в случаите на КТКЛ с циркулиращи в кръвта малигнени Т лимфоцити и по-слабо ефективна, когато туморът се състои от кожни Т клетки на имунната памет (de Masson, Guitera et al. , Watanabe, Teague et al. 2014). Лимитиращ фактор в употребата на Алемтуцумаб са страничните ефекти, състоящи се в остра лимфопения, водеща до увеличен риск от системни инфекции, исхемичен колит и синдром на капилярната пропускливост (de Masson, Guitera et al.).

4.2.2.2. Brentuximab

В момента тежат клинични изпитвания и се събират данни за токсичността и ефикасността на брентуксимаб (brentuximab), който представлява конюгат между анти-CD30 моноклонално антитяло и монометилауристатин с про-апоптичен и анти-тубулинов ефект. Прилага се при CD30 положителни Микозис фунгоидес пациенти, първичен кожен анапластичен голямклетъчен лимфом (anaplastic large cell lymphoma, ALCL) и други редки CD30 положителни кожни туморни образувания (Duvic, Tetzlaff et al. 2013, Corey, Cook et al. 2014, Mehra, Ikenberg et al. 2014). След като резултатите от фаза II клинично изпитване на брентуксимаб, включващо 27 CD30+ Микозис фунгоидес пациенти, показват клиничен отговор при 44 % от участниците и средна продължителност на отговора 12 седмици, препаратът бе одобрен за фаза III клинично изпитване (Международна среща на изследователите в областта на дерматологията, Единбург, Шотландия, 2013). Важно е да се отбележи, че е наблюдавана летална прогресивна мултифокална левкоенцефалопатия (ПМЛ, multifocal leukoencephalopathy, PML) като страничен ефект при лечение с брентуксимаб на пациенти с лимфом на Ходжкин (3 пациента), първичен кожен анапластичен голямклетъчен лимфом (1 пациент) и с CD30+ Микозис фунгоидес (1 пациент). Пациентите с лимфом

на Ходжкин и Микозис фунгоидес развиват неврологична дегенерация и умират скоро след проявата на ПМЛ (Carson, Newsome et al. 2014).

4.2.2.3. Могамулицумаб

Хемокинов рецептор 4 (chemokine receptor 4, CCR4) е експресиран върху клетъчната повърхност на Т лимфоцитите и е важен за тяхното отклоняване към кожата (Tuzova, Richmond et al. 2014). Могамулицумаб (Mogamulizumab) е моноклонално антитяло срещу CCR4, което е разработено за лечение на различни хематологични неоплазии и астма (Subramaniam, Whiteside et al. 2012). Вече са публикувани резултатите от фаза II клинично изпитване за същия препарат. В него са включени 37 пациента с релапсиращ периферен Т клетъчен лимфом и кожен Т клетъчен лимфом. При 35% от участниците се наблюдава клиничен отговор, средната продължителност на периода без прогрес на заболяването е 3 месеца (Ogura, Ishida et al. 2014).

4.2.3. Пралатрексат

Пралатрексатът (Pralatrexate) е нов инхибитор на дихидрофолат редуктазата с по-добър анти-туморен ефект от метотрексат (methotrexate), дължащ се на повишена интернализация в раковите клетки (Coiffier, Pro et al.). Според данните, публикувани в проучване, оценяващо ефекта на различни дози пралатрексат при лечение на напреднал стадий Микозис фунгоидес и Синдром на Сезари, преживяемостта при ниска доза е средно 41% от пациентите, докато при висока доза средната преживяемост се покачва до 51% (Coiffier, Pro et al.). Също така 46% от пациентите с прогрес на болестта по време на лечение с метотрексат, клинично се подобряват след смяна на

терапията от метотрексат на пралатрексат, което говори за различен механизъм на действие на метотрексат и пралатрексат (Coiffier, Pro et al.). Мукозит, отпадналост, гадене, температура, анорексия, едем, анемия са често срещани странични реакции по време на лечение с пралатрексат. За оптимална доза се приема 15 mg/m² (Coiffier, Pro et al.).

4.2.4. Топични агенти

Упребата на топични агенти, които активират вродената имунна система, наскоро бе преоценена и възобновена при лечение на Микозис фунгоидес (Huen and Rook 2014). Клиничните изпитвания на топични медикаменти, провеждани в момента, са фокусирани главно върху резикимод (resiquimod) – TLR 7/TLR 8 агонист и цитозин-фосфат-гуанин (cytosine-phosphate-guanine, CpG) – TLR9 агонист. Фаза I клиничните изпитвания с таргетна група индивиди с кожен Т клетъчен показват обнадеждаващи резултати по отношение на ефикасността (Kim, Girardi et al. 2010).

5. Секвениране на ниво единична клетка: нови възможности за откриване на прогностични, диагностични маркери и антигени за таргетна терапия

Научните изследвания, базирани на данни от секвениране на ниво една клетка, дават възможност за класифициране на единични клетки част от хетерогенната туморна маса. В последните години са разработени различни техники на ДНК и РНК количествено определяне в рамките на една клетка. За пръв път учените имат възможността да изследват комплексните генетични,

епигенетични и транскрипционни промени в самата клетка, както и клетъчните взаимодействия в рамките на тумора. Детайлната информация за участващите в тези процеси фенотипове клетки, значително ще улесни разработването на нови противоракови терапии, ще даде и по-пълна представа за механизмите на резистентност към определени медикаменти. При анализа на данните от подобен тип експерименти биха могли да бъдат открити и потенциални диагностични и прогностични биомаркери, на базата на които да бъдат разработени индивидуализирани таргетни терапии.

5.1. Възможни приложения на техниката за секвениране на единични клетки в процеса на изучаване на туморогенезата

5.1.1. Секвениране на ниво единична клетка: принцип на техниката, преимущества и недостатъци

Секвенирането на ниво единична клетка (CEK, single-cell sequencing, SCS) е нова и даваща много възможности методика, която позволява проучването на генетичните вариации в самата клетка, както и сравняването им с тези в останалите клетки от популацията или тумора (Saliba, Westermann et al. 2014). До момента все още не е ясно как точно промените в количеството на определени РНКи играят роля в канцерогенезата, определят различни клетъчни фенотипове и подпомагат клетъчната хетерогенност в рамките на тумора. Възможността за анализ на транскриптома на ниво клетка е от значение за определяне на генетичните разлики между раковите клетки в самия пациент (Lovett 2013), също така позволява субкатегоризирането на туморните клетки в подгрупи и дава възможност за свързването на

определени субтипове клетки с агресивен или индолентен ход на заболяването.

Първите опити за изолиране на единични клетки и анализите на амплификация на цял геном започват преди 15-20 години. Впоследствие е разработена и техниката за оценяване на транскриптома на ниво клетка, която се отличава със значително по-добра резолюция в сравнение с анализа на амплификация на цял геном (Macaulay and Voet 2014). СЕК методиката не само позволява определяне на генетичната вариабилност между отделните ракови клетките, но и предоставя възможност за проследяване на туморната еволюция (Casasent, Edgerton et al. 2016, Tirosh, Venteicher et al. 2016). Поради новата концепция на този експериментален подход, вече може да бъде отчетено натрупването на генетични аберации по време на туморогенезата, също така улеснява разбирането на процесите, свързани с геномната стабилност и развитието на рак. С помощта на транскриптомиката на ниво клетка могат да бъдат класифицирани смесени популации клетки и да бъдат фенотипизирани редки типове клетки като циркулиращи туморни клетки например (circulating tumor cells, CTCs) (Gkountela, Szczerba et al. 2016). Скорошни нововъведения в областта на секвенирането на единични клетки дават възможност за оценяване на разликите в генната експресия между привидно идентични клетки (Shalek, Satija et al. 2014). Използвайки именно такъв подход бе доказано наличието на различия в количеството РНК на определени гени в популация от циркулиращи меланомни клетки. Протеините, кодирани от тези РНК, от своя страна представляват кандидат биомаркери за диагностика и таргетна терапия (Ramskold, Luo et al. 2012). Секвенирането на единични клетки е приложимо и при солидни тумори. В случая може да бъде обхваната хетерогенната популация от клетки, изграждаща тумора, да се определят молекулярните характеристики на всяка клетка и да се установи кои клетъчни типове са с натрупване на генетични мутации (Navin and Hicks 2011). Откриването на общи за определени субгрупи клетки мутации и изясняването на основните онкогенни процеси са от първостепенно значение за разработването на по-точни терапевтични подходи (Yu, Yu et al. 2014).

За момента по-бързо се усъвършенстват методиките за РНК секвениране на ниво една клетка в сравнение с тези за ДНК секвениране. Това се дължи основно на факта, че всяка клетка съдържа само две идентични копия ДНК молекули, докато копията РНК са хиляди (Wang and Navin 2015). Също така РНК секвенирането на ниво клетка позволява идентифицирането на субпопулации от клетки в рамките на хетерогенна популация, което на ниво ДНК е невъзможно (Kolodziejczyk, Kim et al. 2015).

Платформи за изолиране на единични клетки и последващо секвениране са вече разработени: CellSearch system, Fluidigm, Magsweeper на Illumina и DEP-Array system на Silicon Biosciences например. Все още детектирането на редки клетъчни типове остава техническо предизвикателство (Wang and Navin 2015). Често изолирането на информационни РНКи от една клетка се съчетава със SmartSeq2 секвениране, което осигурява пълно покритие на транскриптите, водещо до висока чувствителност на метода и ниска вариабилност на резултатите (Picelli, Bjorklund et al. 2013). Липсата на селективност относно ДНК веригите и невъзможността да се детектират не-полиаденилирани РНКи са едни от основните недостатъци на по-горе описаната методика (Picelli, Bjorklund et al. 2013). Технически проблеми като прекомерна амплификация, променяща количественото съотношение между отделните видове РНКи, високите цени и продължителността на експеримента са частично преодолені с разработването на микрофлуидни системи за изолиране на единични клетки. Благодарение на тях транскриптомът на една клетка се амплифицира в нанолитров обем (Rotem, Ram et al. 2015). Две групи наскоро публикуваха микрофлуидна капкова техника за РНК секвениране на единични клетки (Klein, Mazutis et al. 2015, Macosko, Basu et al. 2015). И при двата научни подхода единична клетка се включва в капка, която се слива с друга капка, съдържаща в себе си милиони копия ДНК баркодове и допълнителни реагенти. Същата идея лежи в основата на "High-throughput Single-Cell Labelling" метода. Rotem и сътрудници (Rotem et al.) тестват микрофлуидната техника като секвенират и измерват РНК нивата в единични клетки от две различни популации (миши ембрионални стволови клетки и миши ембрионални фибробласти). Те

успешно детектират и разграничават популациите, което доказва че техниката е подходяща за изследване на единични клетки (Rotem, Ram et al. 2015). В приложение е вече още едно подобрене на микрофлуидната методика, което позволява комбинирането на изолиране на единични клетки и обратна транскрипция на РНКите в един апарат. По този начин се увеличава ефективността и чувствителността, също така се намалява времетраенето на анализа на генната експресия (Sun, Olsen et al. 2015).

През 2014 Хан и колеги (Han, Zi et al. 2014) за пръв път разработват и оптимизират лизис буфер, позволяващ разделянето на цитоплазмените компартменти от ядрото в една клетка. След сепариране геномната ДНК и информационните РНКи се амплифицират поотделно. Преимуществото на тази методика е контролираното разделяне на ядрената от цитоплазмената фракция и възможността да се комбинират с вече оптимизираните протоколи за секвениране на цял геном и на цял транскриптом. Като резултат се получава информация за генома и транскриптома на всяка клетка, включена в изследването, което от своя страна позволява откриване на зависимости между мутации в структурата на ДНК (или метилиране, или модификации на хроматина) и транскрипцията. Наскоро подобен метод, базиран на механично разделяне на клетъчните фракции, наречен геном и транскриптом секвениране, е публикуван от друга група изследователи (Macaulay, Haerty et al. 2015). След лизис на клетката се използват биотинилирани олиго-дТ праймери, с помощта на които полиаденилираните РНКи се отделят от геномната ДНК. Поли А (polyA) РНКите се амплифицират по методиката Smart-Seq2, докато за геномната ДНК обикновено се ползват техники за размножаване като MDA (multiple displacement amplification) или PicoPlex преди секвениране на нуклеотидната последователност (Macaulay, Haerty et al. 2015). През 2015 Дей и сътрудници (Deu, Kester et al. 2015) разработват почти линеарен метод за амплификация, наречен гДНК-иРНК секвениране (gDNA-mRNA sequencing, DR-Seq).

DR-Seq позволява количествено определяне на транскриптите в клетката без механично разделяне на цитоплазмената от ядрената фракция

преди започване на амплификацията. Също така всички реакции се извършват в една епруветка, което намалява загубите на информационни РНК и геномна ДНК (Dey, Kester et al. 2015). Все още не е изцяло изяснено дали секвенираната по този начин геномна ДНК може да бъде използвана за проучване на профила на метилиране. Към същата DR-seq технология е разработена компютърна програма за изчисляване на вариациите в броя на копията (CNV, copy number variaton) и за елиминиране на интерференцията между иРНК рийдовете (mRNA reads). Без съмнение разработването на техники за едновременен анализ на геномиката и/или епигеномиката (CpG) и транскриптомиката е голяма стъпка към изясняване на молекулните механизми на туморогенезата.

5.1.2. Първи стъпки в изследванията на различни видове рак с помощта на методиката секвениране на единични клетки

В литературата вече са публикувани първите резултати от проучвания на често срещани видове рак, базирани на СЕК. Срещат се данни за рак на гърдата (Nguyen, Cox et al. 2014, Wang, Waters et al. 2014), рак на дебелото черво (Yu, Yu et al. 2014), инвазиращ мускулите рак на пикочния мехур (Li, Xu et al. 2012), рак на тънките черва (Grun, Lyubimova et al. 2015), аденокарцинома на белия дроб (Kim, Lee et al. 2015), рак на бъбреците (Xu, Hou et al. 2012) и остра миелоидна левкемия (Hughes, Magrini et al. 2014, Paquirigan, Smith et al. 2015). Секвенирането на единични клетки дава нов поглед върху канцерогенезата, туморната прогресия, метастазирането и резистентността към определени медикаменти. Интересно е да се отбележи, че посредством СЕК се откриват гени с много натрупани мутации в някои единични клетки, но с ниска честота на срещане на същите в рамките на целия тумор (Wang, Waters et al. 2014, Yu, Yu et al. 2014). Други гени пък са с различни изоформи на екзоните в резултат на алтернативен сплайсинг, когато

се сравнят транскриптомите на отделните клетки (Ramskold, Luo et al. 2012). Алел-специфична експресия е характерна за някои типове рак (Mayba, Gilbert et al. 2014), но до момента не е детектирана с помощта СЕК, което говори, че методиката най-вероятно не е приложима за подобен тип анализ. Концепцията на техниката за секвениране на единични клетки дава нови възможности за проучване на редки субтипове ракови клетки, за проследяване на настъпващите фенотипни промени в туморните клетки и механизмите на метастазирание. Наскоро е публикуван подробен обзор на постигнатото до момента в областта на изследванията на циркулиращи туморни клетки, включително и данни от секвениране на единични клетки (Alix-Panabieres and Pantel 2014). При напреднал стадий рак на простата е установено, че циркулиращите туморни клетки (ЦТМ) експресират хетерогенни сигнални пътища, отговорни за различни молекулни механизми на резистентност към лекарствени препарати (Miyamoto, Zheng et al. 2015). Такъв тип резултати биха могли значително да подобрят ефикасността на противораковите терапии. Също така изследванията на циркулиращи туморни клетки биха могли да заменят инвазивните методи на взимане на хистологичен материал, тъй като данните получени с помощта на СЕК на ЦТМ са достатъчни за определяне на стадия на заболяването, назначаване на подходяща терапия и проследяване на ефекта и'. Динамичните туморни клетки (ДТК) са друг важен за канцерогенезата клетъчен тип. Посредством СЕК техниките са открити генетични изменения в генома на ДТК в сравнение с клетки от първичен тумор или здрава тъкан (Moller, Kumar et al. 2013). Споменатите генетични аберации включват анеуплоидия, хромозомни пренареждания и точкови мутации, подпомагащи еволюцията на тумора (Wang, Waters et al. 2014). Благодарение на СЕК вече са публикувани и и научни разработки, охарактеризиращи и валидиращи хетерогенната природа на тумора. За някои видове рак е доказан биклонален произход (Yu, Yu et al. 2014), за други моноклонален/биклонален произход (инвазиращ мускулатурата рак на пикочния мехур), а за терти се приема, че произлизат от клонална пролиферация на една клетка (Xu, Hou et al. 2012).

II. Цел и задачи

Дисертационният труд има за цел откриване на нови туморни маркери при пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом, приложими в рутинната диагностика и даващи възможност за разработване на специфични таргетни терапии за лечение на заболяването. Бяха поставени следните задачи:

1. Валидиране на техниката секвениране на информационни РНКи на ниво единична клетка като метод за откриване на нови потенциални маркери за диагностика.
2. След провеждане на скрининг за диференциално експресирани гени между клоналната и неклоналната популация от Т-лимфоцити, доказване на същите различия и на протеиново ниво.
3. Анализ на приложимостта на новооткритите маркери в диагностиката и таргетното лечение на КТКЛ.

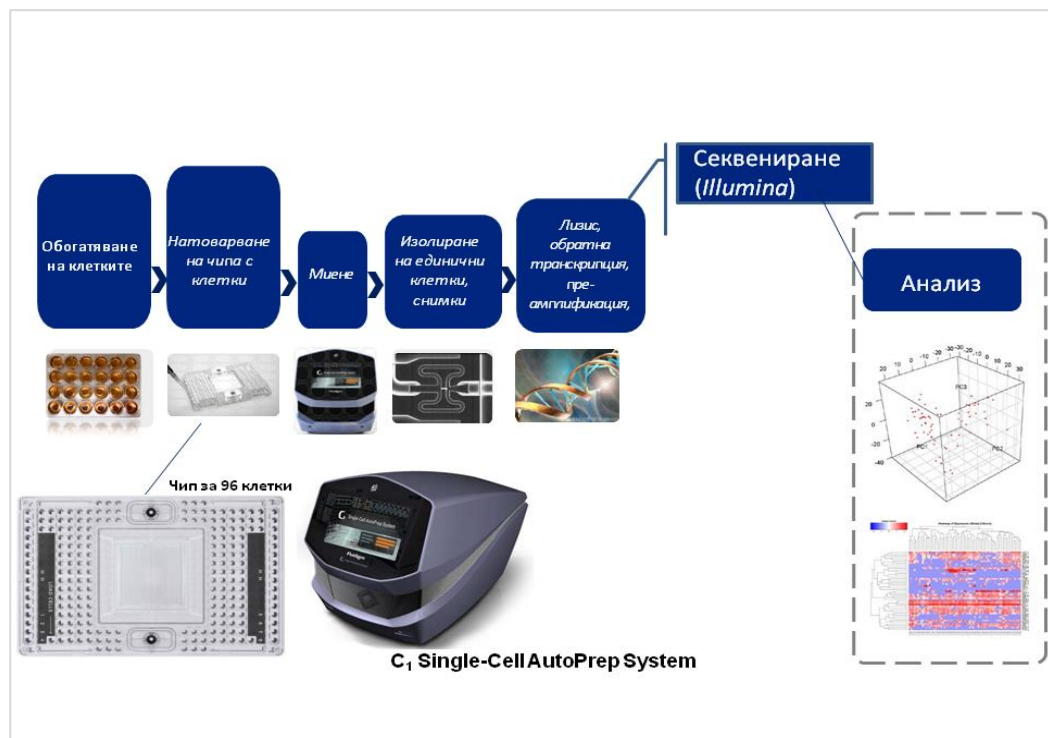
4. Оценяване на нивата на антияло-зависимата клетъчна цитотоксичност (основен молекулен механизъм на действие на таргетните терапии) при пациенти с КТКЛ и здрави хора.

III. Материали и методи

1. Скрининг за диференциално експресирани гени в клонални и неклонални кожни Т-лимфоцити от пациент с кожен Т-клетъчен лимфом

В методиките, свързани с C1 Single-Cell AutoPrep системата на Fluidigm, са използвани реактиви, които са част от Smart-Seq v4 Ultra Low Input RNA kit for the Fluidigm C1 System (Clontech Laboratories, # 635025) и ArrayControl RNA spikes (Ambion, #AM1780). На фигура 2 е представено схематично описание на стъпките в процеса на анализ на генната експресия в единични кожни Т-лимфоцити, изолирани от пациент с кожен Т клетъчен лимфом .

Фигура 2. Ход на експеримента.



1.1. Култивиране на кожни експланти от пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом и последващо изолиране на Т-лимфоцити

Получената ексцизионна кожна биопсия се съхранява най-дълго за 3 часа във физиологичен разтвор (0,9% NaCl) на 4°C в хладилник. Тъканта се надробява до консистенция "бебешко пюре" с помощта на операционна ножица, след което се поставя върху предварително обработени с 250 µl колаген тип I (опашка от плъх, 3mg/ml, Gibco, Life technologies, # 10483) на 1 ml PBS триизмерни матрици (#CY-903, Cytomatrix Pty Ltd). Работи се при стерилни условия, в ламинарен бокс. Преди употреба триизмерните матрици за култивиране на клетки се автоклавираат (121°C, 15 минути) и охлаждаат до стайна температура. Триизмерните матрици, наточени с хомогенизирана кожна тъкан, се поставят в 24 ямкови плаки (Falcon, # 353047) - фигура 3. Култивират се в селективна за Т-лимфоцити среда: 400ml Iscove's medium (Life technologies, #12440-053), 100 ml инактивиран фетален телешки серум (Gibco, #10500064), 5 ml L-глутамин (Biochrom, # K0282), 5 ml Anti-Anti (Gibco, # 115240-096), 100 IU/ml рекомбинантен човешки интерлевкин-2 (PreproTech, # 200-02), 10 ng/ml рекомбинантен човешки интерлевкин-15 (PreproTech, # 200-15). Плаките се инкубират на 37°C, 5% CO₂. Изолираните по тази методика кожни Т-клетки периодично се замразяват в течен азот за по-нататъшни анализи.

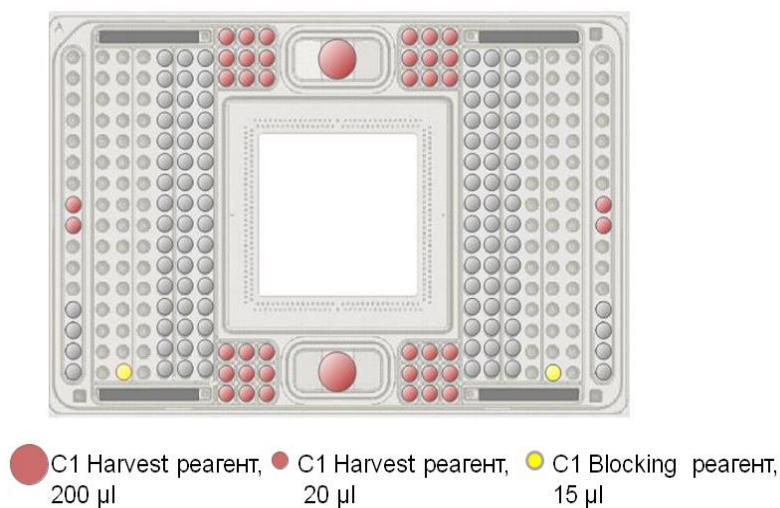


Фигура 3. Култури от кожни експланти за изолиране Т-клетки

1.2. Флоуцитометрично сортиране на CD3+CD45+ Т-лимфоцити

За целта е използван BD FACS Aria III сортер, оборудван с пет лазера, 375 nm, 407 nm, 488 nm, 561 nm и 633 nm. Сортирането е извършено с дюза 85 μ m. Култивираните с помощта на триизмерни матрици кожни Т лимфоцити са инкубирани с анти- човешко CD3 PerCP антитяло (Miltenyi Biotec, #130-098-154) и анти- човешко CD45 APC-Vio770 антитяло (Miltenyi Biotec, #130-098-151) за половин час на лед. Непосредствено след оцветяването са сортирани CD3+CD45+ кожни Т-клетки, които впоследствие са анализирани с помощта на техника за секвениране на информационни РНКи от единични клетки.

1.3. Предварителна обработка на C1 Single-Cell Auto Prep IFC (Fluidigm, 5-10 μ m, #100-5762) чипа за сепариране на единични клетки и обратна транскрипция на изолираните иРНКи.



Фигура 4. Схема на пипетиране за стъпка прайминг на C1 IFC чипа

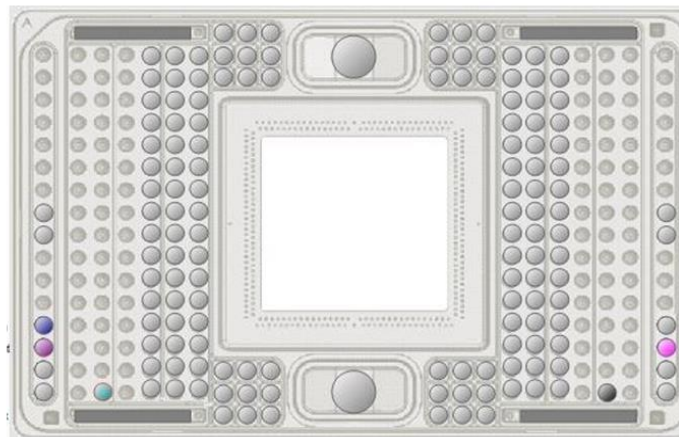
Пипетират се 200 μ l от C1 Harvest реагента във всяка от ямките, маркирани с голяма червена точка (фигура 4). Пръстеновидният отвор се натиска с върха на пипетата, за да стане възможно инжектирането на реагента в ямката. Следва накапване на 20 μ l от C1 Harvest реагента в позициите, отбелязани с малки червени точки. Последната стъпка от този етап на процедурата е поставянето на 15 μ l Blocking реагент във входната и изходната ямка на чипа (оцветени в жълто). За прайминг се използва скрипт Smart-Seq v4: Prime (1861x/1862x/1863x), който е специално разработен за целта и е съвместим с C1 Single-Cell AutoPrep системата на Fluidigm.

1.4. Подготовка на клетъчна суспензия от сортираните CD4+CD45+ Т-лимфоцити за натоварване на чипа

Според протоколите за работа на фирмата производител на чипа съотношението между обема клетъчна суспензия към обема Suspension реагент трябва да бъде 3:2. Концентрацията, размерът и виталността на клетките се определят с Countess II FL Automated Cell Counter, Invitrogen. Първоначално се подготвят 0.5 ml клетъчна суспензия с подходяща концентрация. Оптималната концентрация е в тясна зависимост от размера на клетките. Ако се работи със среден размер клетки (10-17 μ m диаметър) или голям размер (17-25 μ m диаметър), концентрацията на клетъчната суспензия трябва да е в диапазон от 166 000-250 000 клетки/ml. При анализ на малки клетки (5-10 μ m диаметър), клетъчната концентрация е по висока ~400 000-800 000 клетки/ml. Следващата стъпка е разреждане на клетките със Suspension реагент в съотношение 3:2 (12 μ l клетъчна суспензия + 8 μ l Suspension реагент). По този начин се гарантира, че в крайния обем от 20 μ l, който се накапва на IFC чипа, ще има около 1 200- 1 400 CD4+CD45+ кожни Т-лимфоцити.

1.5. Натоварване на IFC чипа с клетки

С пипета се отстранява Blocking реагента от ямка C1, оцветена в светло синьо, и ямка C2 с тъмно сив цвят (фигура 5).



Фигура 5. Схема на пипетиране за стъпка натоварване на IFC C1 чипа с клетки

- C1 Blocking реагентът се отстранява; на капват се 10 μ l клетъчна суспензия
- C1 Blocking реагентът се отстранява от ямката
- C1 Preloading реагент, 24 μ l
- Cell Wash буфер, 11 μ l
- Cell Wash буфер, 11 μ l

След това се поставят 10 μ l клетъчна суспензия в позиция C1. От голямо значение е да не се вкарват мехури в системата. 24 μ l C1 Preloading реагент се на капват в ямката, оцветена в лилаво, разположена вляво на чипа. 7 μ l от Cell Wash буфер се добавят в розовата и синята ямка. C1 IFC се връща в Single-Cell AutoPrep системата на Fluidigm и от менюто се избира скрипт SMART-Seq v4: Cell Load (1861x/1862x/1863x). След натоварване на чипа, клетките се оцветяват с анти-човешко антитяло, специфично за съответния преобладаващ $V\beta$ клон, характерен за пациента, за 15 минути на стайна температура (IOtest Beta Mark TCR $V\beta$ Repertoire kit, Beckman Coulter).

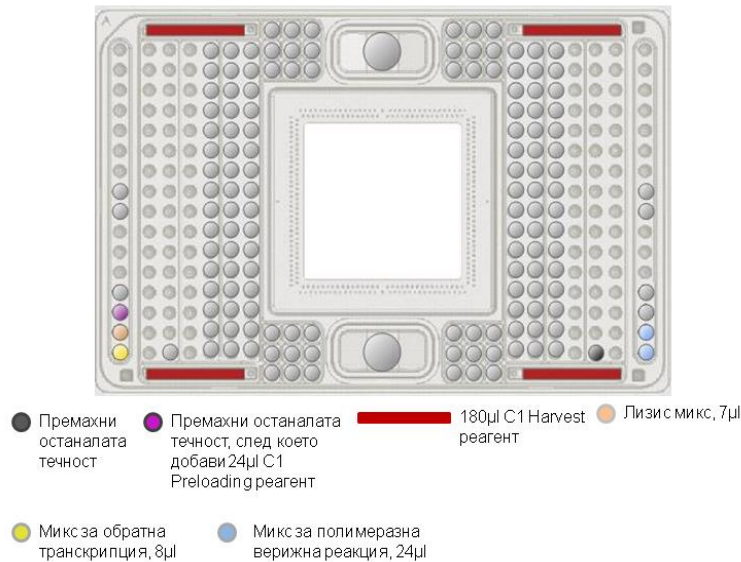
1.6. Заснемане на натоварените върху чипа CD4+CD45+ Т-лимфоцити

Всяка ямка за улавяне на единична клетка (96 общо върху един чип) се заснема и се оценява дали е изолирана една или повече клетки и дали клетката в нея е интактна. За всеки чип се съставя протокол с позициите на единичните, живи клетки, защото само те са обект на по-нататъшни анализи. За целта е използван микроскоп Leica DMI6000 B, а използваният за снимките обектив е с увеличение 10x.

1.7. Лизис, обратна транскрипция и амплификация

Тази стъпка е последната, за която се използва C1 Single-Cell AutoPrep системата на Fluidigm, и е подготвителна за секвениране. В последователен ред се извършва лизис на клетките, обратна транскрипция на информационните РНКи и амплификация на получените кДНКи. Преди накапване на C1 IFC чипа се приготвят микс от Spikes РНКи (служат за положителна контрола дали всички биохимични и температурни изисквания за правилно протичане на обратната транскрипция и полимеразната верижна реакция са спазени), лизис микс, микс за обратна транскрипция и микс за амплификация. За конкретната експериментална постановка са използвани РНК spikes #7 (1474bp), РНК spikes #4 (1000bp) и РНК spikes #1 (750bp). Приготвят се три епруветки А (13.5 µl RNA Storage разтвор+1.5 µl РНК spikes #7), В (12 µl RNA Storage разтвор+1.5 µl РНК spikes #4) и С (148.5 µl RNA Storage разтвор+1.5 µl РНК spikes #1). От епруетка А се пипетират 1.5µl в епруетка В. От епруетка В се прехвърлят 1.5µl в епруетка С, след което 1 µl от епруетка С се разрежда в 99µl Loading реагент. По този начин се получава готов за употреба микс от Spikes РНКи. Следващият микс, който се подготвя е

лизис микс. В епруветка се смесват 19µl Lysis буфер и 1µl РНАза инхибитор като по този начин се получава 10x Reaction буфер. Лизис микс се състои от 1µl Spikes РНКи микс+ 2.4µl 3' SMART-Seq CDS Primer II A (12µM)+ 14µl вода без нуклеази+2.6µl 10x Reaction буфер. Миксът за обратна транскрипция включва шест компонента (1.2µl 20x C1 Loading реагент + 11.2 µl 5x Ultra Low First-Strand буфер + 2.8µl SMART-Seq v4 олигонуклеотиди + 1.4µl 40 U/µl РНАза инхибитор + 9.8µl вода без нуклеази + 5.6µl 100 U/µl SMARTScribe обратна транскриптаза). Миксът за полимеразна верижна реакция включва 4.5µl 20x C1 Loading реагент, 4.4µl вода без нуклеази, 3µl PCR Primer II A (12µM), 75.2µl 2x SeqAmp PCR буфер и 2.9µl SeqAmp DNA полимераза (1.25 U/µl). И за тази стъпка чипа се накапва по схема (фигура 6). От ямките, оцветени в сиво и лилаво, се премахва течността. В големите резервоари в червен цвят се накапват 180µl C1 Harvest реагент. В оранжевата ямка се поставя 3µl лизис микс, а в жълтата - 8µl микс за обратна транскрипция. По 24µl от микса, съдържащ всички необходими компоненти за полимеразна верижна реакция, се пипетират в двете ямки, оцветени в синьо. Така подготвеният чип се поставя в C1 Single-Cell AutoPrep системата на програма SMART-Seq v4: Sample Prep (1861x/1862x/1863x). Скриптът съдържа следните цикли: лизис (72°C/4мин.; 4°C/10мин.; 25°C/1мин.), обратна транскрипция (42°C/90мин.; 70°C/10мин.) и полимеразна верижна реакция (1 цикъл 98°C/1мин.; 5 цикъла 98°C/20 сек., 59°C/4мин., 68°C/6мин.; 9 цикъла 95°C/20сек., 65°C/30сек., 68°C/6мин.; 7 цикъла 95°C/30сек., 65°C/30сек., 68°C/7мин.; 1 цикъл 72°C/10мин., 10°C/задържане).



Фигура 6. Схема за наcapване на чипа за стъпка лизис, обратна транскрипция и амплификация.

1.8. Събиране на амплифицираните кДНКи

За събиране на намножените кДНКи и за последващо генериране на кДНК библиотеки за иРНК секвениране се използва протокол, наречен "Using C1 to Generate Single-Cell cDNA Libraries for mRNA Sequencing" (<https://www.fluidigm.com/prod;uctsupport/c1-support-hub; Documents>Protocols>C1 System for mRNA Seq>). Съгласно същия протокол веднага след приключване на амплификацията кДНКите се прехвърлят в 96 ямкова плака (grenier bio-one, # 651 901), в която предварително са накапани по 10µl от C1 DNA Dilution реагент. Инструкциите за прехвърляне на кДНКите от чипа на 96 ямковата плака са стриктно спазени, за да може съответните клетки да бъдат проследявани в хода на експеримента. Пробите кДНК са съхранявани на -20°C за три седмици преди секвениране.

1.9. Секвениране на кДНКите от единични клетки (Функционален Геномен Център Цюрих)

1.9.1. Подготовка на библиотеки за секвениране (Nextera XT DNA Library Preparation Kit, Illumina, FC-131-11096)

Тази методика включва няколко стъпки: тагментиране на ДНКите, амплифициране на тагментираните ДНКи, почистване на амплифицираните ДНКи и нормализиране на библиотеките за секвениране. Предварително получените от всяка клетка кДНКи се оценяват количествено и качествено с помощта на NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Необходимото начално количество тотална ДНК за използвания кит е 1 ng. При нужда ДНК се разрежда с вода или 10 mM Tris HCl, pH 7.5-8.5. Във всяка ямка от ПВР плаката се накапват 10 µl TD и 5µl кДНКи от съответната клетка. Добавят се 5 µl ATM и се пипетира до хомогенизиране на сместа. Центрофугира се на 280g, 20°C, 1 мин. Апаратът за полимеразна верижна реакция се настройва на програма за тагментация (предварително нагриване на капака, 55°C за 5 мин, задържане на 10°C). След приключване на тагментацията, във всяка ямка от плаката се добавят 5 µl NT. Отново се центрофугира за 1 минута на 280g, 20°C. Следва инкубация на стайна температура за 5 минути. Тагментираните по този начин кДНКи с помощта на транспозон, специално разработен за целта от Nextera, се амплифицират на ПВР програма, включваща следните стъпки: предварително нагриване на капака; 72° C за 3 мин; 95° C за 30 сек; 12 цикъла (95° C за 10 сек, 55° C за 30 сек, 72° C за 30 сек; 72° C за 5 мин, задържане на 10° C. Непосредствено преди стъпката за размножаване на тагментираните кДНКи, във всяка ямка от плаката се накапват по 5 µl Index 1 (i7) и 5 Index2 (i5) адаптори. Към тях се добавят 15µl NPM. Следва центрофугиране (280g, 20° C, 1 мин), след което плаката се поставя в предварително програмирания ПВР апарат. Амплифицираните библиотеки се

почистват. В нова midi плака се прехвърлят по 50µl от продукта получен в предишната стъпка. Добавят се AMPure частици като съотношението ПВР продукт към частици е 3 към 2. В случая се накапват 30 µl AMPure частици във всяка ямка. Плаката се клати на 1800 оборота в продължителност на 2 мин, след което се инкубира за 5 мин на стайна температура. Плаката се поставя на магнит и се изчаква надлежащата течност да се избистри. Супернатантата във всяка ямка се изхвърля. За постигане на оптимално почистване се мие два пъти с прясно приготвен 80% етанол. След премахване на надлежащия алкохол, плаката се суши на магнит за 15 мин. Почистените библиотеки се освобождават от магнитните частици с помощта на RSB. Във всяка ямка се поставят по 52.5 µl от него и се инкубира първо на клатачка (1800 об. за мин), а след това за 2 мин без разклащане на стайна температура. Плаката е връща на магнитния стенд, изчаква се надлежащата течност да се избистри и супернатантите се прехвърлят в нова TCY плака като се внимава за последователността на библиотеките. Нормализирането на библиотеките е важна стъпка, която осигурява еднакво количество на библиотеките в сборната проба, която ще бъде секвенирана. 20µl от всяка ямка се прехвърлят в нова midi плака. 4.4 ml LNA1 се пипетират в 15 ml конична епруветка. След напълно ресуспендиране, 800 µl LNB1 се добавят към епруветката. По 45µl от сместа, съдържаща магнитни частици LNA1 и LNB1 , се накапват във всяка ямка. Библиотеките се инкубират за 30 мин на клатачка (1800 об. за мин). Плаката се поставя на магнитен стенд и след избистряне на надлежащата течност супернатантата се изхвърля. Следва двукратно миене с 45µl LNW1, а след това библиотеките се елуират с 30 µl 0.1 N NaOH. За целта плаката се раклаща за 5 мин на 1800 оборота/мин, после се премества върху магнитен стенд и избистрената супернатанта се прехвърля в нова ПВР плака. Финалната стъпка е събирането на определен обем от всяка нормализирана библиотека в една епруветка.

1.9.2. Секвениране на информационните РНКи от всяка изолирана клетка (Illumina, HiSeq 4000 система за секвениране, SY-401-4001).

Системата за секвениране е напълно автоматична. Използвани са HiSeq 3000/4000 SBS Kit (FC-410-1003) и HiSeq 3000/4000 PE Cluster Kit (PE-410-1001). Параметрите на секвенирането са: 2 x 150 bp (base pairs reads, рийдове), средно 3 милиона рийдове (разчитания) на клетка.

2. Анализ на антитяло-зависимата цитотоксичност (основен молекулен механизъм на действие на таргетните терапии) при пациенти с КТКЛ и при здрави индивиди (aCella™ - TOX: Bioluminescence Non Radioactive Cytotoxicity Assay GAPDH, Cell Technology).

2.1. aCella™ - TOX: биолуминесцентна нерадиоактивна методика за оценяване на цитотоксичност на базата на глицеалдехид фосфат дехидрогеназа.

В ин витро условия е оценена антитяло-зависимата цитотоксичност като за ефекторни клетки са използвани NK клетки от здрави индивиди и пациенти с КТКЛ, а за таргетни клетки бяха подбрани CD20+ Тилмфоцити, изолирани от кожни лезии на пациенти с диагноза КТКЛ. Използваното в експерименталния модел антитяло е Rituximab (MabThera®) - химерно мишка/човек моноклонално антитяло срещу CD20, който при човек е експресиран главно върху В-лимфоцити и се използва за таргетна терапия на В-клетъчна левкемия и В-клетъчна лимфома.

Малигнени Т-лимфоцити от пациенти с Микозис фунгоидес (10,000 клетки/ямка) се култивират в 96-ямкова плака в модифицирана RPMI 1640 хранителна среда за 24 часа преди да се използват като таргетни клетки.

След това се опсонизират с различни разреждания Rituximab (от 10 µg/mL до 0.0001 µg/mL). Таргетните клетки се инкубират с антитяло в продължение на 15 минути на 37°C. Пречистени NK клетки (CD56 microbeads, Miltenyi Biotec, #130-050-401) от здрави индивиди и пациенти се добавят към таргетните клетки (100,000 NK клетки/ямка, съотношение ефекторни/таргетни клетки 10:1). Плаките се инкубират за 2.5 часа на 37°C. След края на инкубацията, реакционната плака се оставя да се темперира до стайна температура и за 15 минути. В контролата за оценяване на максималната степен на лизис, към таргетните клетки се добавя лизис буфер и се изчаква 10-15 минути на стайна температура като лизирането на таргетните клетки се следи под микроскоп. Към всички реакционни ямки се добавят по 100µL серум без IgG. Клетките се утаяват с помощта на центрофугиране (1 мин, 750 g). Във всяка ямка от плака за луминометър (Perkin Elmer Optiplates, #6005290) се накапват по 50µl от компонент 2 (Enzyme Assay Diluent, #3008) , след което се добавят 50µL от изолираната в предишната стъпка супернатанта. За да се визуализира степента на лизис на таргетните клетки във всяка позиция се накапват 100µL 2X Enzyme Assay reagent, съдържащ субстрата на ензимната реакция, залегнала в основата на кита, глицералдехид-3-фосфат и се добавят 50µL 1X Detection reagent. Биолуминесценцията се отчита веднага на Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek). За правилното изчисляване на нивото на биолуминесценция на всяка реакционна плака се накапват следните контроли:

а. Контрола 1: спонтанно освобождаване на глицералдехид фосфат дехydroгеназа от таргетните клетки. Накапва се трипликат: 25 µl с 5000 таргетни клетки и 50 µl среда.

б. Контрола 2: спонтанно освобождаване на глицералдехид фосфат дехydroгеназа от ефекторните клетки. Накапва се трипликат: 25 µl с 50000 ефекторни клетки (съотношението ефекторни/таргетни клетки се запазва като в експеримента) и 50 µl среда.

в. Контрола 3: максимален лизис на таргетните клетки. Накапва се трипликат: 25 µl с 5000 таргетни клетки и 50 µl среда.

г. Контрола 4: само среда. Накапват се 75µl среда в трипликат.

д. Контрола 5: без антитяло. В трипликат се накапват 25µl среда, ефекторни клетки и таргетни клетки. Тази реакция е необходима за анализ на клетъчно-опосредстваната цитотоксичност, която води до директен лизис на таргетната клетка без участието на антитяло в контакта между таргетната и ефекторната клетка.

2.2. Блокада на HLA-ABC антигените, експресирани върху повърхността на туморните клетки

Свръхекспесираните върху повърхността на туморните клетки HLA-ABC антигени са блокирани с анти-човешко антитяло HLA-ABC (50 µg/mL, клон В9.12.1; Beckman Coulter). За да се докаже специфичността на HLA-ABC е използвана изотипна контрола - мише IgG2a антитяло.

3. Флоуцитометричен анализ на мононуклеарни клетки от периферна кръв на пациенти с левкемичен Т клетъчен лимфом. Оценяване на експресията на новооткритите потенциални туморни маркери на постранслационно ниво

3.1. Изолиране на мононуклеарни клетки от периферна кръв

От всеки пациент или здрав донор се взима венозна кръв в 5 броя епруветки с консервант ЕДТА и с обем 7.5 мл. Във Falcon епруветка от 50 мл се поставят 15 мл Фикол (1.077 г/мл) и кръвта бавно се наслоява върху него.

Така подготвените епруветки се центрофугират на 2200 оборота/мин, 25°C, ускорение=1, спиращка=0 за 25 мин. Формираният след центрофугирането пръстен от периферни моноклеарни клетки се прехвърля в нова епруетка с помощта на пипета.

3.2. Оцветяване на периферни моноклеарни клетки с флуоресцентно белязани моноклонални антитела и флуоцитометричен анализ на количеството на съответните антигени по повърхността на Т лимфоцитите

Оптималният брой клетки за всяко оцветяване е половин милион. Използвани са следните флуоресцентно белязани моноклонални античовешки антитела: CD3 PerCP (Miltenyi Biotec, #130-094-965), CD4 APC-Vio770 (Miltenyi Biotec, #130-096-652), CD8 PE-Vio770 (Miltenyi Biotec, #130-096-556), CD47 FITC (BD Pharmingen, #556045), CD26 PE-Cyanine7 (BioLegend, #302713), CD164 FITC (BioLegend, #324806), TIGIT APC (eBioscience, #17-9500-41). V β клоналните Т-клетъчни популации са визуализирани с IOTest Beta Mark TCR V β Repertoire kit (Beckman Coulter). Периферните моноклеарни клетки са инкубирани със съответните антитела за половин час на лед, след което са фиксирани с 1% параформалдехид. Всички антитела са предварително титрувани и е определено оптималното количество антитяло за съответния брой клетки. Анализът е извършен на флуоцитометър BD FACSCanto II (BD Biosciences).

4. Използван софтуеър при анализа на данните

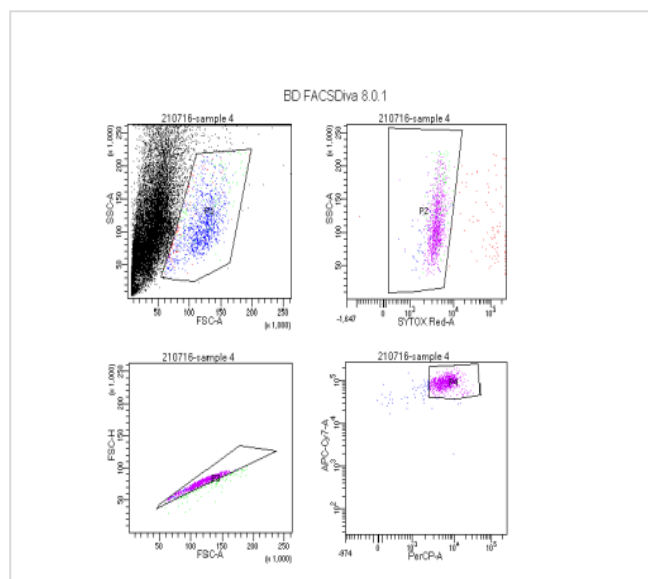
Скринингът за диференциално експресирани гени между популациите от клонални и неклонални кожни Т-лимфоцити се базира на SINGuLAR и R скрипти, с помощта на които е генерирана Heatmap графиката. За всеки ген, включен в проучването, е изчислена \log_2 експресията за съответната популация от Т-лимфоцити. Статистическата обработка на резултатите е направена с ANOVA. Флоуцитометричните данни са обработени и визуализирани посредством OriginPro и FCS Express 4 Flow Research Edition. Статистическата значимост на получените данни е оценена с помощта на ANOVA.

IV. Резултати

1. Скрининг за гени, диференциално експресирани между клоналните и неклонални популации кожни Т-лимфоцити от пациент с кожен Т-клетъчен лимфом

Благодарение на техниката за изолиране на кожни Т-лимфоцити с помощта на триизмерни матрици за култивиране на клетки, бяха успешно събрани и съхранени Т клетки от лезионна кожа на пациент с кожен Т клетъчен лимфом напреднал стадий. Непосредствено преди началото на процедурата за секвениране на информационни РНКи от единични клетки, кожните Т-лимфоцити от късен стадий заболяване бяха оцвететни с флуоресцентно белязани моноклонални анти-човешки CD3 PerCP и CD45 APC-Vio770 антитела. Селектираните по този начин Т-лимфоцити бяха сортирани (фигура 7) и честотата на Т-клетъчната популация след това бе 97.21% (фигура 8).

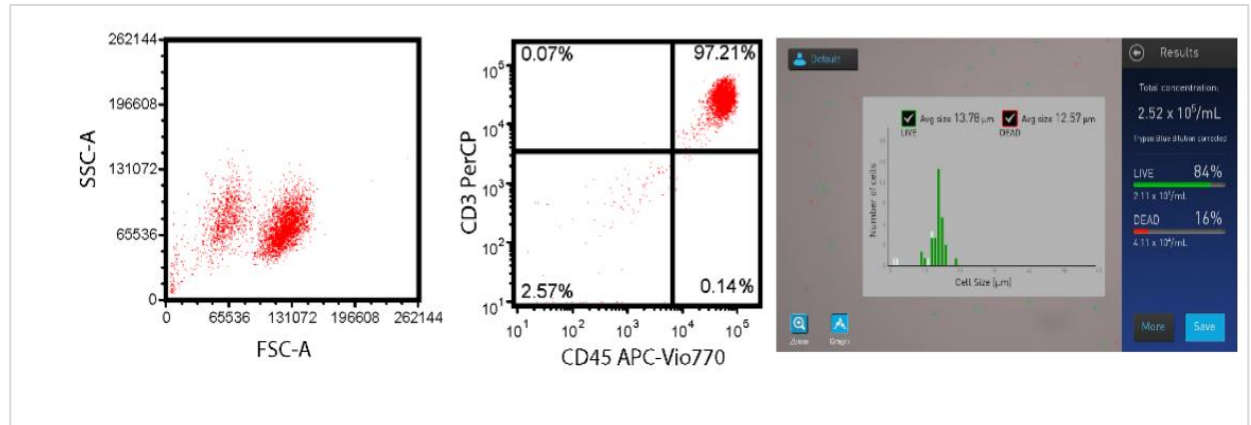
Фигура 7. Гейтинг за сортиране на CD3+CD45+ Т-лимфоцити



Означения: оцветяване за мъртви клетки - Sytox red, оцветяване за CD3 – PerCP, оцветяване за CD45 - APC Cy7; гейтове P1 – лимфоцити, P2 – живи клетки, P3 – единични клетки, P4 - CD3+ CD45+ Т лимфоцити (популацията подлежаща на сортиране).

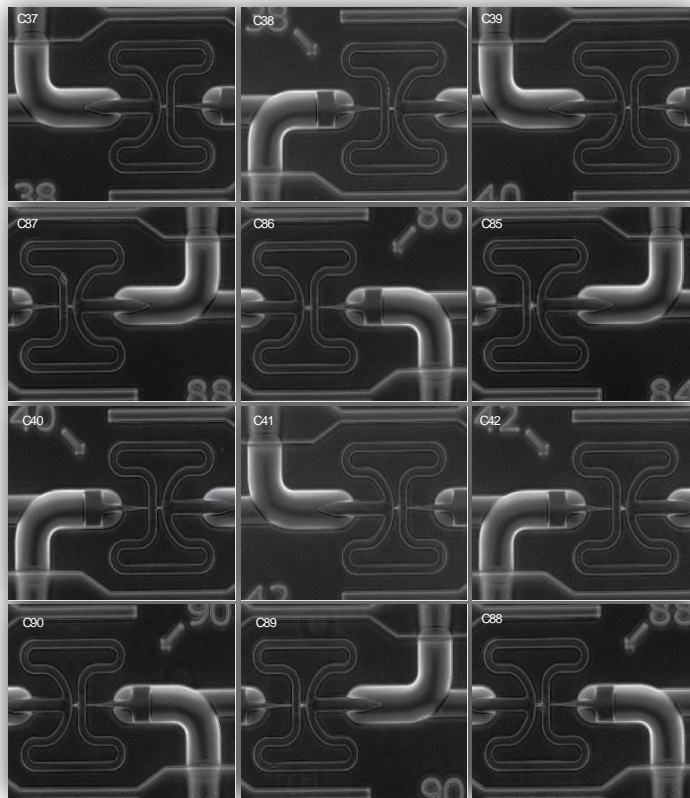
Тъй като виталността на клетките бе от първостепенно значение за анализите, свързани с изолиране на интактни информационни РНКи, бе определен процентът на живи клетки. 84% (фигура 8).

Фигура 8. Чистота и виталитет на сортираната популация Т-лимфоцити



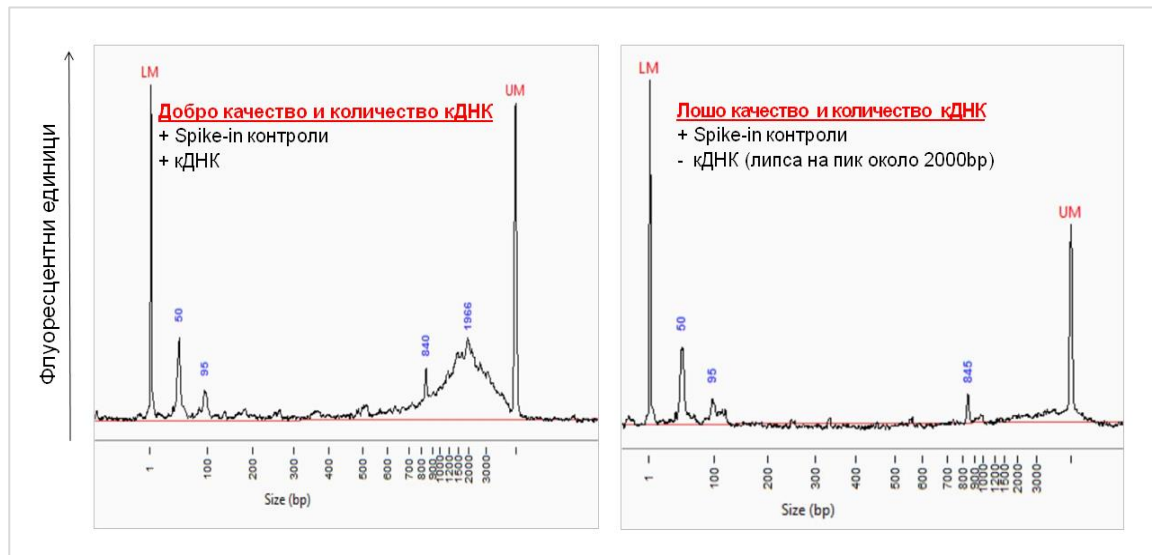
Кожните Т-лимфоцити бяха натоварени на чип за 96 клетки и с помощта на микроскоп бе заснета всяка ямка (фигура 9). Бе съставен протокол с описание на съдържанието на ямките: единична клетка, повече от една клетка, дебри или незапълнена позиция (фигура 9).

Фигура 9. Снимки на част от натоварените върху чипа клетки



От информационните РНКи, изолирани от единична клетка, бяха синтезирани кДНКи. На този етап бе направен качествен контрол на резултата от обратната транскрипция за всяка клетка. Количеството и размерът на кДНКите бе оценен с помощта на Agilent 2100 Bioanalyzer (фигура 10). Технология, при която се извършва традиционна електрофореза в микротръбички на чип. За секвениране бяха избрани само клетки, от които бе изолирано задоволително количество кДНК (приблизително 10ng) с размер около 2000bp.

Фигура 10. Аналитичен алгоритъм за подбор на клетки за секвениране.

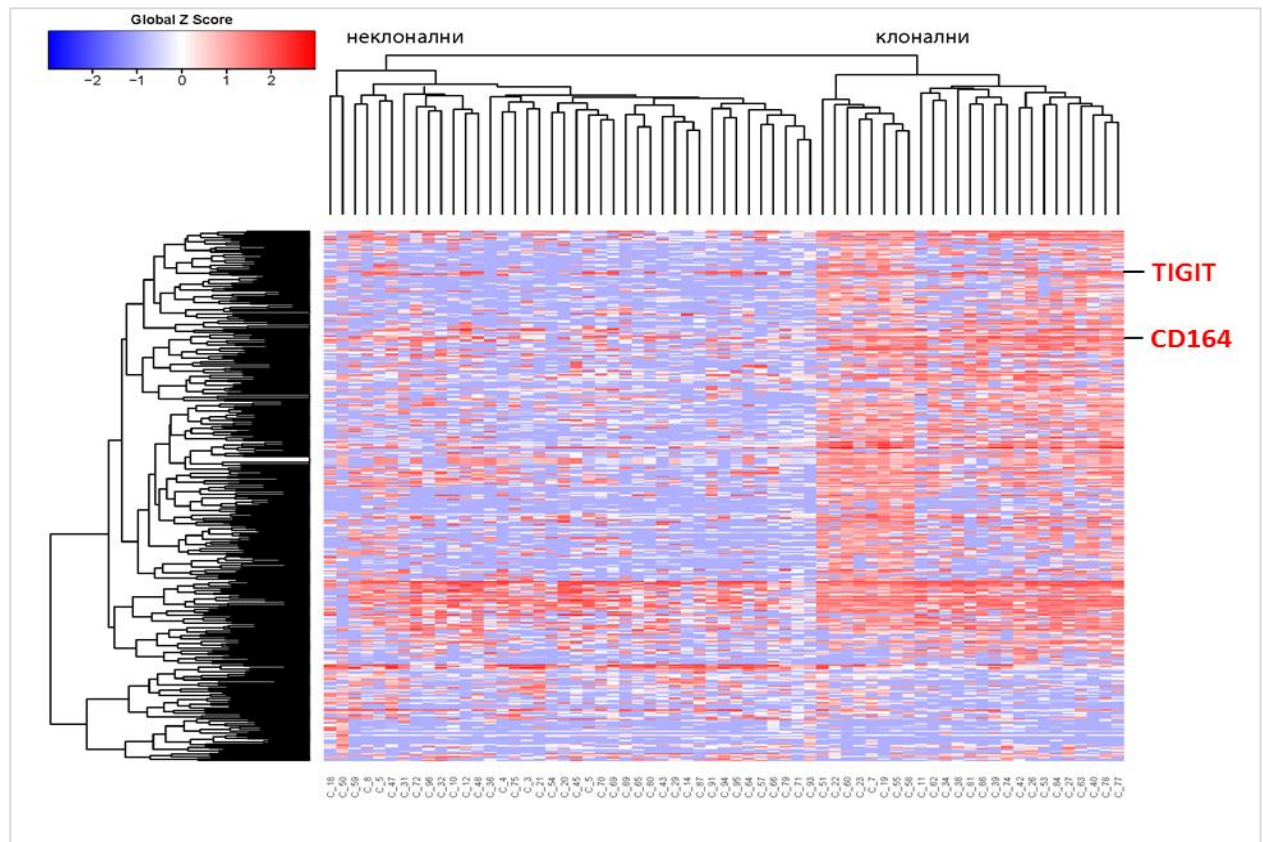


Общо 65 кожни Т-лимфоцити от напреднал стадий КТКЛ бяха секвенирани. Така получените сурови данни за генната експресия в отделните клетки бяха количествено оценени и нормализирани с помощта на TPM (transcripts per million) метод. За целта бе използван Kallisto софтуеър, посредством който бе определен броя на транскриптите в първоначалните данни от РНК секвенирането. Параметрите на програмата не бяха променени. Рийдовете за всяка клетка бяха картирани на Homo Sapiens геном (Ensembl archive GRCh37), за да се оцени генната експресия като транскрипти на милион. С помощта на флуоресцентно белязване с анти-човешко V β антитяло, Т-лимфоцитите, натоварени върху чипа, бяха разделени на клонална и неклонална популация. 25 клетки бяха определени като клонални, а останалите 40 като неклонални.

С помощта на SINGuLAR, специално разработен софтуерен пакет за анализ на данни от РНК секвениране на единични клетки, бе направен скрининг за диференциално експресирани гени между клоналната и неклоналната популация Т-лимфоцити. След анализ на получените резултати и справка с публикуваните данни до момента CD164 и TIGIT бяха селектирани

за по-нататъшни анализи като потенциални туморни и диагностични маркери (фигура 11).

Фигура 11. Диференциално експресирани гени между клоналната и неклоналната популация кожни Т-лимфоцити от пациент с КТКЛ.



2. Флоуцитометричен анализ на експресията на CD164 и TIGIT върху Т-лимфоцити от периферна кръв на пациенти с левкемичен Т клетъчен лимфом

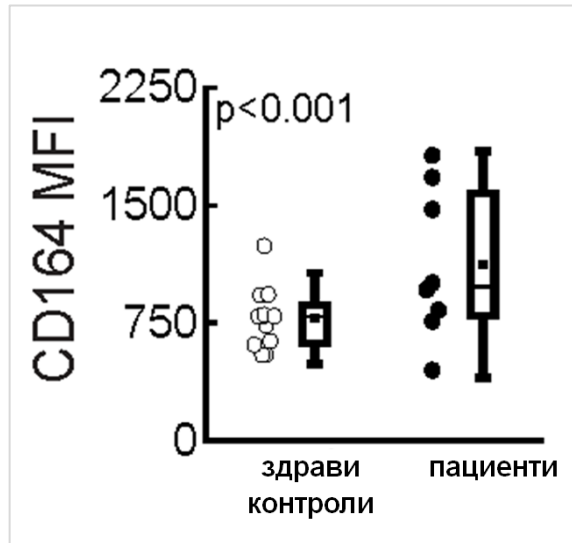
Вторият етап от скрининга за нови потенциални туморни маркери и прицелни молекули за таргетна терапия, които биха улеснили диагностиката и

лечението на кожен Т-клетъчен лимфом, бе фокусиран върху протеиновата експресия на CD164 и TIGIT. За целта от периферна кръв на пациенти с левкемичен КТКЛ и с ясно разграничима циркулираща клонална Т-клетъчна популация бяха изолирани моноклерни клетки. Посредством флуоцитометрия бе измерен интензитета на флуоресценция, отговарящ на експресията на съответния антиген, върху клоналната и неклоналната популация от Т-лимфоцити за всеки пациент и бе сравнен с този при здрави индивиди. Предварително бе определен преобладаващия ТКР в кръвта на включените в анализа болни и бе подбрано специфично за V β веригата антитяло с цел да бъде възможно разграничаването на клоналните, малигнени Т-лимфоцити от неклоналните Т-клетки.

За анализ на експресията на CD164 бяха подбрани 8 пациента с левкемичен кожен Т-клетъчен лимфом. Диагнозата Сезари синдром бе поставена в съответствие с критериите на Световната Здравна Организация - Европейска Организация за Изследване и Лечение на Рак за левкемичен КТКЛ/Сезари синдром. За контроли бяха използвани здрави индивиди.

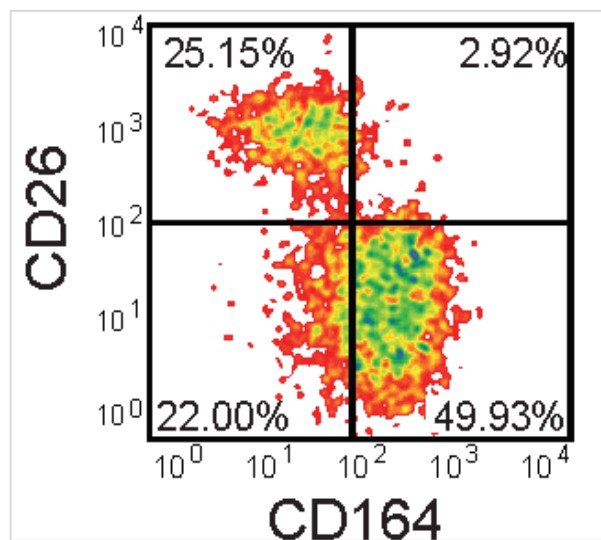
Експресията на CD164 върху клетъчната повърхност на CD4⁺T хелпер лимфоцитите от пациенти с левкемичен КТКЛ бе значително увеличена в сравнение със здравите контроли и с пациентите с възпалително заболяване на кожата (фигура 12). Осредненият интензитет на флуоресценция на CD164 за популацията от Т-лимфоцити, изолирани от пациенти, бе около 1200, докато MFI на CD164 върху Т-клетките от здрави донори бе приблизително 800.

Фигура 12. Експресия на CD164 върху популацията от CD4+ Т-лимфоцити при здрави индивиди и пациенти с левкемичен КТКЛ.



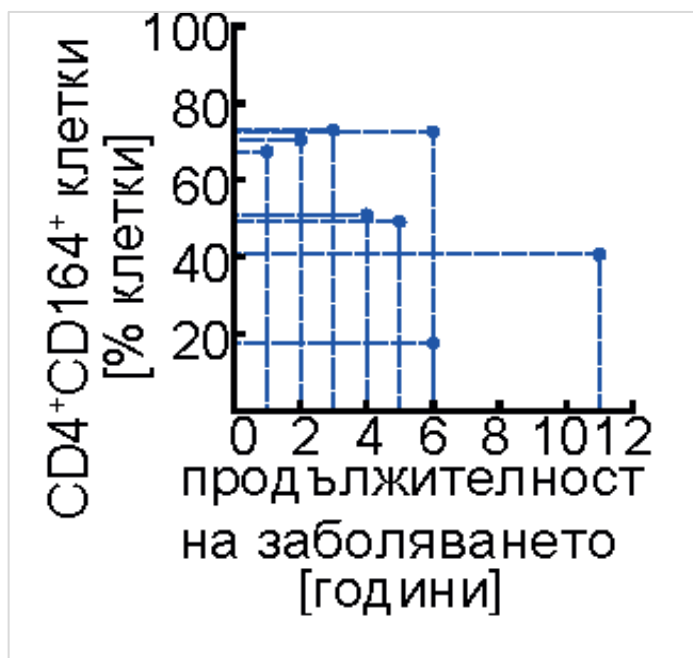
Важно е да се отбележи, че в групата на пациентите експресията на CD164 върху популацията от CD4+ Т-лимфоцити не бе хомогенна. В повечето случаи CD4⁺CD26⁺ доброкачествените Т хелпер лимфоцити бяха CD164⁻, а повишената експресия на CD164 бе характерна за CD4⁺ лимфоцити със загуба на CD26 (фигура 13).

Фигура 13. Предоминантна експресия на CD164 върху CD4+ Т- лимфоцити със загуба на CD26.



За контролите не бе установена зависимост между експресията на CD164 и загубата на CD26. В групата на пациентите с левкемичен КТКЛ осреднената експресия на CD164 бе около 30.8% и варираше от 4.3% до 96.0% от общия брой на CD4⁺ Т-клетките. CD164 експресията при здрави контроли бе приблизително 8.0%, като интервалът бе от 2.3% до 18.2% от цялата популация CD4⁺Т-лимфоцити . Важно е да се отбележи, че експресията на CD164 върху CD4⁺ Т- клетките периферна кръв от пациенти с левкемичен КТКЛ бе почти изцяло ограничена в субпопулацията от CD4⁺CD26⁻лимфоцити. Не бе открита зависимост между процента на CD164 положителните Т клетки и агресивността на заболяването (фигура 14). Продължителността на боледуване за пациенти #2 ,#3, #4 и #7 бе изчислена като интервал от поставянето на диагноза до смъртта, а за за живите пациенти #1, #5, #6 и #7- от поставянето на диагноза до момента на провеждане на изследването.

Фигура 14. Зависимост между процента на CD164+CD4+CD26- Т-лимфоцити и агресивността на заболяването.

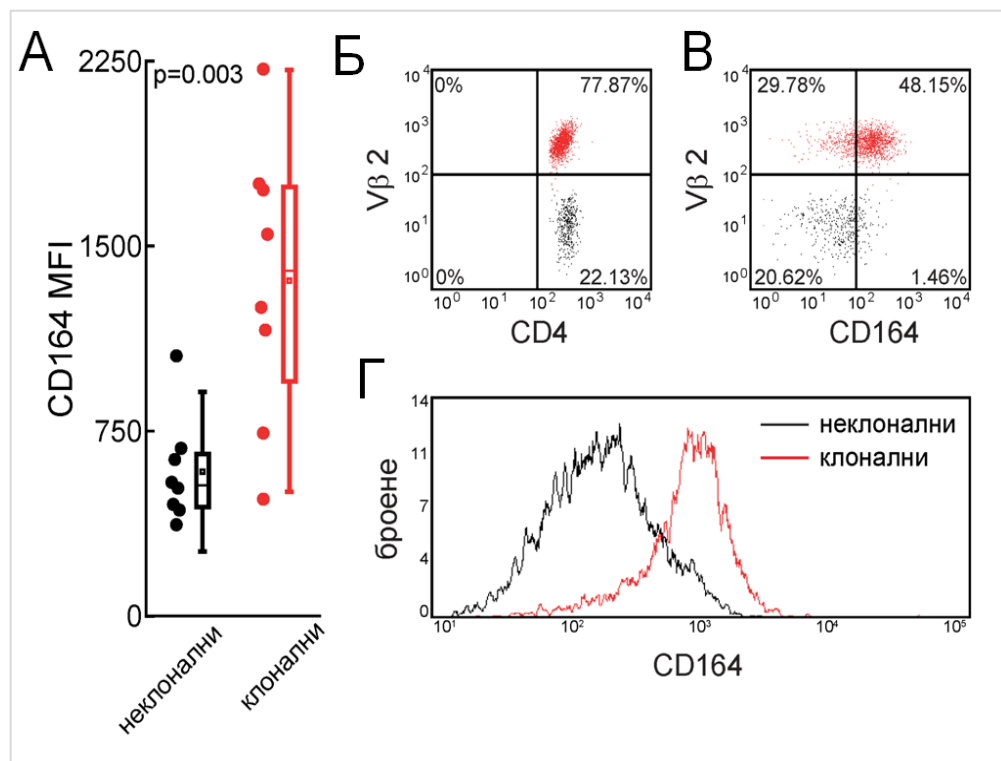


Като следваща стъпка бе анализирано дали има разлика в нивата на експресия на CD164 върху малигнените, клонални Т-клетки и

доброкачествените, неклонални клетки в кръвта на отделните пациенти. Разликите бяха отчетени индивидуално за всеки болен. MFI на CD164 върху неклоналните Т клетки от левкемичен КТКЛ бе сходен с този, измерен върху лимфоцити от здрави донори (MFI 600 или 800 съответно). Експресията на CD164 бе силно повишена (MFI 1360) единствено за малигнената популация от Т-лимфоцити, детектирана посредством експресията на съответния специфичен за болния Vβ клон (фигура 15).

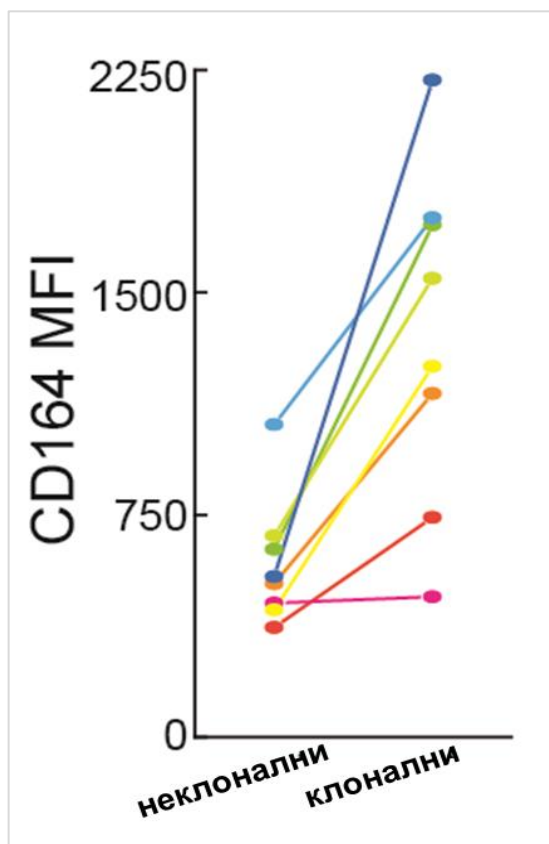
При повечето пациенти (шест от общо осем), високата експресия на CD164 бе лимитирана върху малигнената, клонална Т-клетъчна популация и бе ниска за немалигнените клетки.

Фигура 15. А и Г: преобладаваща експресия на CD164 върху клоналните CD4+ Т-лимфоцити; Б и В: ограничаване на експресията на CD164 главно върху клоналната популация.



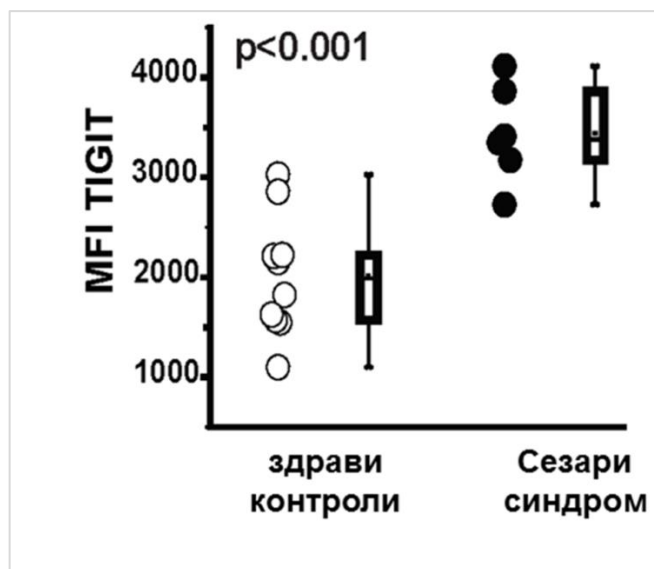
Посредством детайлно сравнение по двойки на експресията на CD164 върху неклонални и клонални CD4⁺ Т-лимфоцити за всеки пациент, бе установено, че за пациент #3 експресията на CD164 върху клоналните, малигнени (Benoit, Jariwala et al. 2016)Т-клетки (MFI=741.92) не бе завишена в сравнение със здравите контроли. Въпреки това бе два пъти по-висока от тази върху неклоналните клетки от същия пациент (MFI=370.37) (фигура 17; означение с тъмно оранжев цвят). Само при един болен с диагноза Сезари синдром (пациент #4), бе измерена сравнително ниска експресия на CD164 и не бе отчетена интраиндивидуална разлика в стойностите на MFI за неклонални (MFI=452.9) и клонални (MFI=473.92) Т лимфоцити (фигура 16).

Фигура 16. Разликата в средния интензитет на флуоресценция за CD164 между клонални и неклонални клетки за всеки включен в проучването пациент.



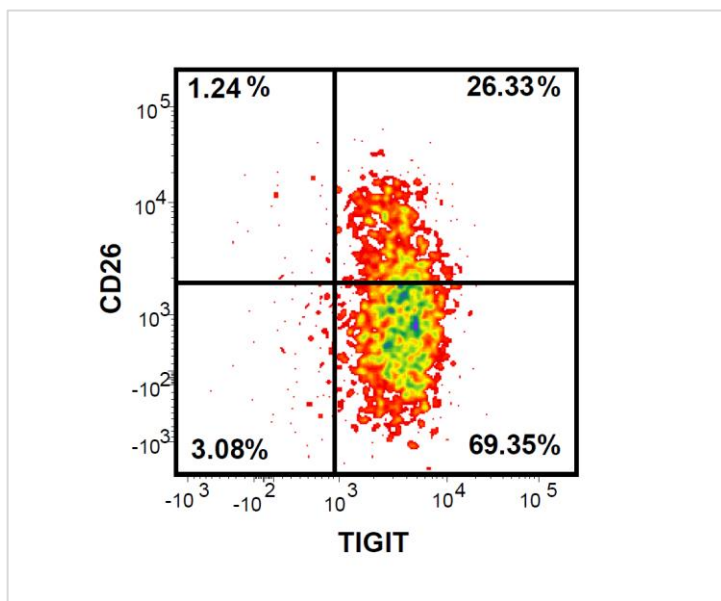
Аналогичен флоуцитометричен анализ на пост-транслационната експресия бе направени и за TIGIT. За целта бяха изолирани мононуклерани клетки от периферна кръв на 10 здрави донора и 6 пациента с левкемичен кожен Т-клетъчен лимфом. Диагнозата Сезари синдром бе поставена в съответствие с критериите на Световната Здравна Организация - Европейска Организация за Изследване и Лечение на Рак за левкемичен КТКЛ/Сезари синдром. За контроли бяха използвани здрави индивиди. Бе установена повишена експресия на TIGIT върху CD4+ Т-лимфоцити, изолирани от пациенти със Сезари синдром, в сравнение с CD4+ Т-клетки от здрави донори (фигура 17).

Фигура 17. Завишена експресия на TIGIT върху CD4+ Т-лимфоцити от Сезари синдром пациенти в сравнение със същата популация клетки, изолирана от здрави индивиди.



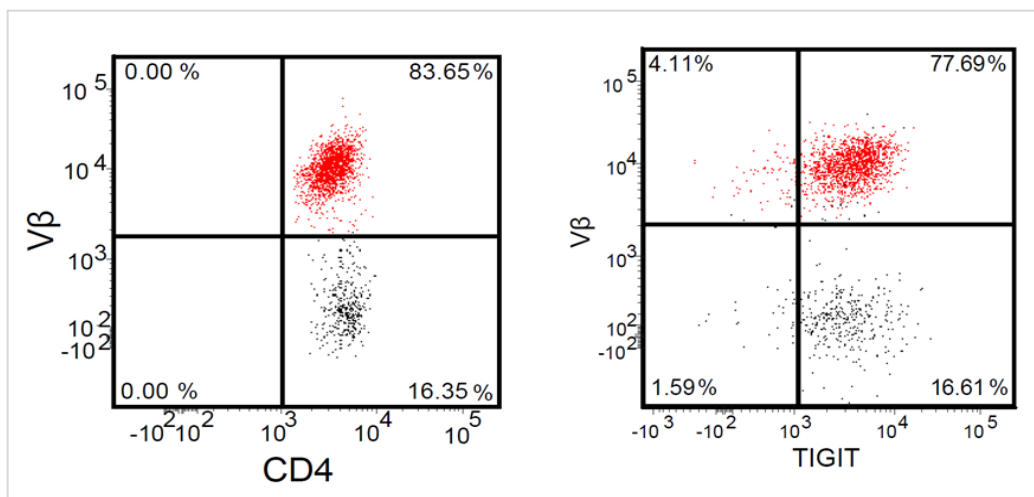
Повечето CD4+TIGIT+клетки бяха със загуба на CD26, характерна за раковите клетки (фигура 18).

Фигура 18. Връзка между експресията на TIGIT и загубата на CD26.



За разлика от CD164, TIGIT бе експресиран както върху клоналната популация от Т-лимфоцити, идентифицирана с помощта на специфично за всеки пациент анти-V β антитяло, така и върху неклоналните Т-клетки (фигура 19).

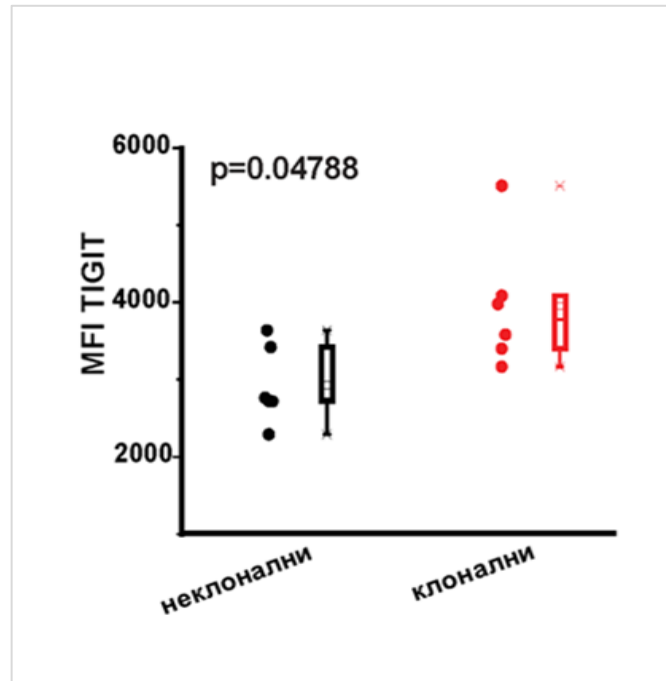
Фигура 19. Детекция на TIGIT протеини върху клоналната и неклоналната популация от CD4+ Т-лимфоцити.



Независимо от това, че TIGIT бе експресиран и на клоналната, и на неклоналната популация Т-лимфоцити, средният интензитет на флуоресценция

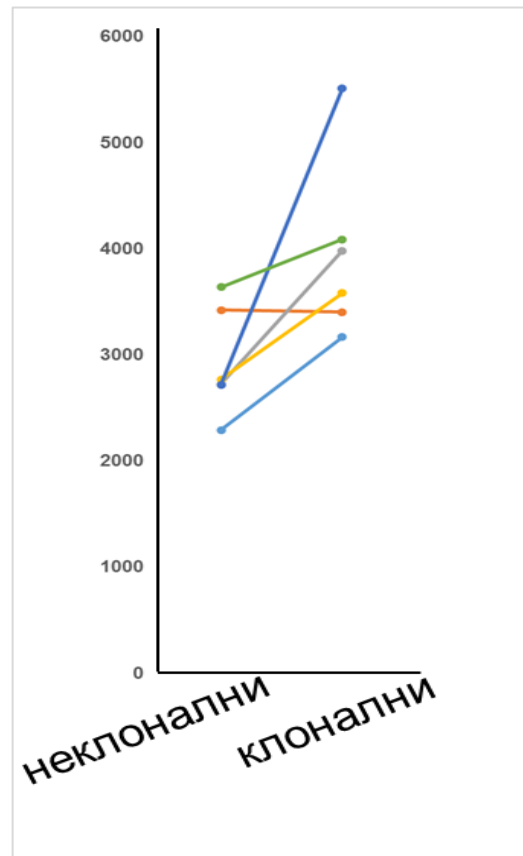
бе завишен за клоналната популация като отчетената разлика бе със статистическа значимост (фигура 20).

Фигура 20. Завишен MFI на TIGIT за клоналната популация CD4+ Т-лимфоцити.



Бяха анализирани нивата на експресия на TIGIT върху популациите от клонални и неклонални Т-клетки за всеки пациент индивидуално и резултатите бяха съпоставени един на друг (фигура 21). При пет (от общо шест, включени в изследването пациента) бяха установени завишени нива на експресия на TIGIT върху клоналната популация (MFI около 3967) в сравнение с неклоналната популация (MFI приблизително 2400). Само при един пациент (означен на графиката с оранжев цвят) не бе наблюдавана разлика в експресията на TIGIT между двете популации CD4+ Т-клетки.

Фигура 21. Експресия на TIGIT върху клонални и неклонални Т-лимфоцити, изолирани от един и същи пациент (n=6).

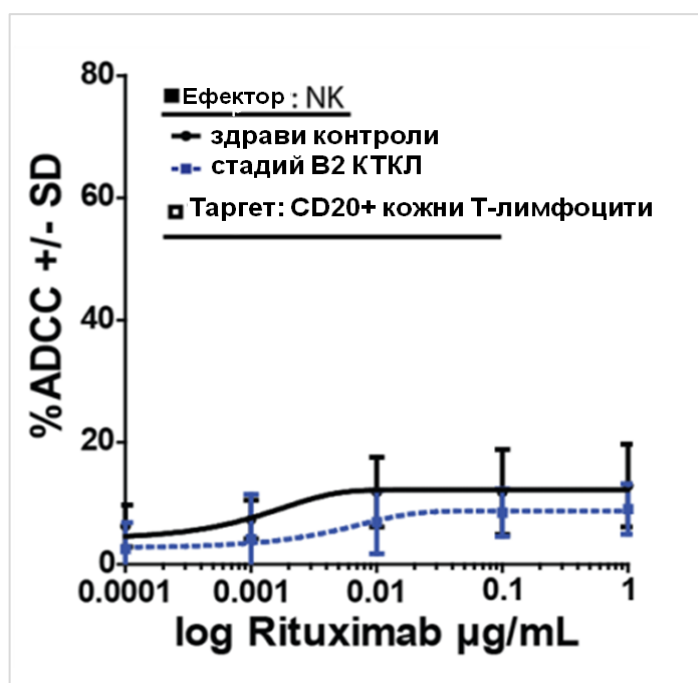


3. Анализ на ефективността на евентуална таргетна терапия при пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом. Оценяване на нивата на антияло-зависимата цитотоксичност (основен молекулен механизъм на таргетните терапии като цяло) при пациенти и здрави индивиди.

За целта бе създаден ин витро модел на таргетна терапия с Ритуксимаб при КТКЛ пациенти с доказана експресия на CD20 върху Т-лимфоцитите. По този начин бе оценена силата на антияло-зависимата цитототоксичност при 3 пациента с кожен Т-клетъчен лимфом и 3 здрави донора. За ефекторни клетки бяха използвани NK клетки от пациенти и от здрави донори. В

експерименталната постановка като таргетни клетки бяха използвани: кожни Т-лимфоцити от пациенти с CD20+ Т-клетъчен лимфом и Ramos клетки. Бяха доказани понижени нива на ADCC в случаите, когато ефекторните клетки бяха клетки естествени-убийци от пациенти (фигура 22).

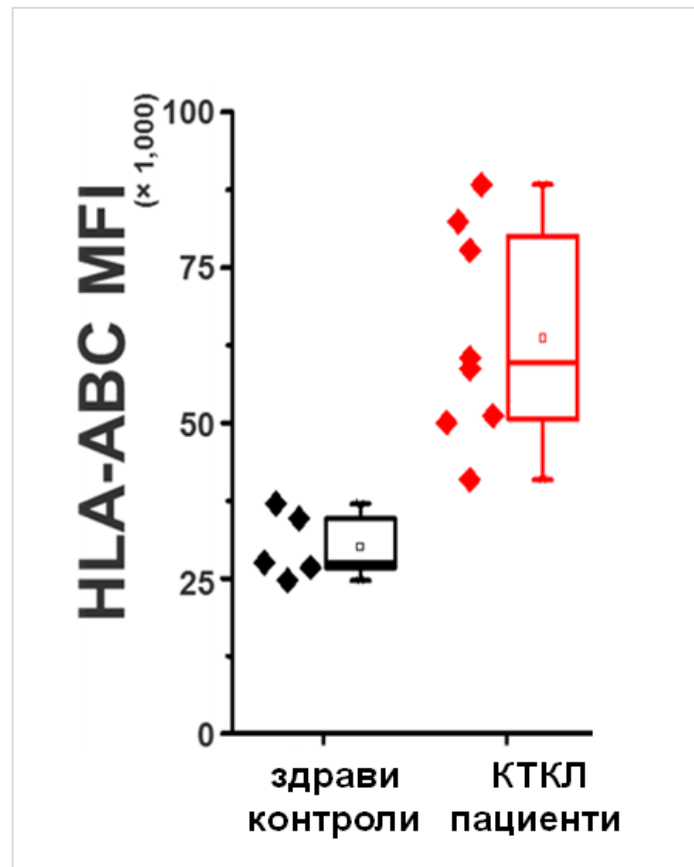
Фигура 22. Сравнителен анализ на антитяло-зависима цитотоксичност (ефекторни клетки: NK клетки от пациенти или здрави донори, таргетни клетки: CD20+ Т-лимфоцити, изолирани от лезионна кожа на пациенти с КТКЛ); n=3 за всяка експериментална постановка;



Един от основните механизми за подтискане на цитотоксичната функция на NK клетките е експресия на МНС клас I молекули по повърхността на таргетните клетки. Същите тези антигени се разпознават от KIR рецептори върху клетките естествени убийци и това супресира секрецията на перфорини и гранзими, необходими за лизис на прицелната клетка. Ето защо бе проучена експресията на МНС клас I антигените върху туморните клетки при пациенти с КТКЛ и бе сравнена с тази при здрави контроли. Бяха изолирани мононуклеарни клетки от периферна кръв на 8 пациента и 5 здрави донора.

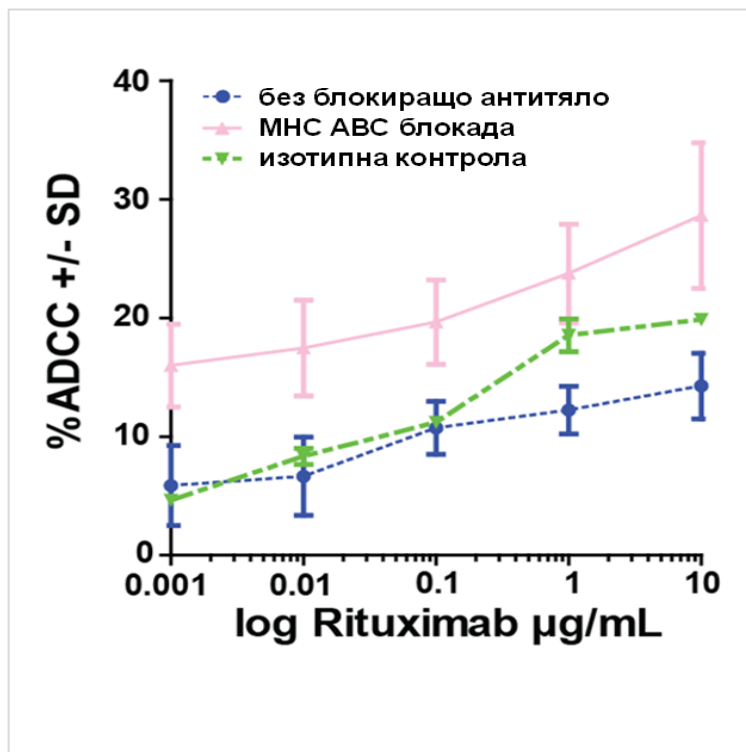
Бе установена повишена експресия на МНС клас I в групата на болните (фигура 23).

Фигура 23. Свърхекспресия на МНС клас I молекули върху CD4+ Т-лимфоцити от пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом.



Бе проверено дали блокиране на МНС клас I молекулите върху повърхността на туморните клетки би подобрило антитяло-зависимата цитотоксична функция на NK клетките от болни. Анализът отново бе базиран на описания по-горе хемилуминесцентен метод за оценяване на степента на лизиране на таргетните клетки с помощта на глицералдехид фосфат дехидрогена. Цитотоксичната функция на клетките естествени убийци, изолирани от пациенти, бе възстановена след блокадата на МНС клас I антигените по повърхността на туморните клетки.

Фигура 24. Възстановяване на антитяло-зависимата цитотоксичност на НК клетките след блокада на МНС клас I молекулите по повърхността на туморните клетки.



V. Дискусия

Кожните Т-клетъчни лимфоми (КТКЛ) са втората най-често срещана група на екстранодални Неходжкинови лимфоми и представляват приблизително 75% от всички първични кожни лимфоми. Средно 53% от случаите на кожни Т-клетъчни лимфоми се диагностицират като Микозис фунгоидес или Сезари синдром. Сезари синдром представлява малигнена трансформация на Т-лимфоцити част от централната имунна памет, докато раковите клетки, участващи в патогенезата на Микозис фунгоидес, се категоризират към ефекторната имунна памет (таблица 3).

Таблица 3. Различни фенотипове Т-клетки на имунната памет при Сезари синдром и Микозис фунгоидес.

	T_{цп}	СС	T_{Еп}	МФ
ко-експресия на CCR7, L-селектин	✓	✓		
рециркулация между кръвта, лимфните възли и кожата	✓	✓		
висок пролиферативен потенциал	✓	✓		
ко-експресия на CLA, CCR4			✓	✓
резидентни в кожата			✓	✓
фиксирана локализация			✓	✓
ограничен пролиферативен потенциал			✓	✓
предимно ефекторни функции			✓	✓

Различните фенотипове на Т-лимфоцитите, които участват в патогенезата на Микозис фунгоидес и на Сезари синдром, предполагат различен клиничен ход на болестта. По правило протичането на КТКЛ е агресивно, когато се наблюдава пролиферация на малигнени Т клетъчни клонове в кръвта. За Сезари синдром популация Т-клетки, експресираща един преобладаващ Т-клетъчен рецептор, се открива още в начален стадий, докато при Микозис фунгоидес това е характерно само за агресивните варианти и говори за напреднал срадий заболяване. Прогнозата за левкемичен тип пациенти е лоша: средна продължителност на живота след откриване на болестта е около пет години. Ето защо точното и бързо откриване на раковите клетки в кръвта на пациенти с кожен Т клетъчен лимфом е от водещо значение за правилната диагностика и прогностика. В наши дни, изчезването на клетъчни маркери като CD26, CD27 и CD7 от повърхността на малигнените Т-лимфоцити се счита за една от основните характеристики на левкемичен КТКЛ и се използва в рутинната диагностика. За съжаление единствен и специфичен маркер за откриване на туморните клетки в кръвта все още не е доказан. Откриването на свръхекспресирани и локализирани предимно върху малигнените клетки молекули би дало възможност за подобряване на диагностиката на КТКЛ и поставянето на точна диагноза в начален стадий Сезари синдром.

От друга страна различният фенотип на раковите клетки при двата най-често срещани варианта КТКЛ и големите интраиндивидуални различия между пациентите с една и съща диагноза, налага индивидуален диагностичен и терапевтичен подход при лечението на всеки болен. Методиката за секвениране на иРНКи от единични клетки позволява разграничаване на малигнени от немалигнени клетки в туморната маса, откриване на субпопулации в привидно хомогенната популация от ракови клетки, скрининг за диференциално експресирани гени между детектираните субпопулации от клонални клетки, което я прави подходящ приоритет за откриване на диагностични маркери и прицелни молекули за нови

таргетни терапии. При хетерогенна популация от туморни клетки дава възможност за разработване на комбинирани таргетни терапии, насочени срещу повече от един антиген, защото техниката дава пълна информация за транскриптома във всяка клетка, изолирана от болния, което от своя страна позволява детектиране на всеки диференциално експресиран ген между клетъчните популации обект на интерес. Също така СЕК биха могло да замени инвазивните методи на взимане на хистологичен материал, тъй като данните получени с помощта на СЕК, са достатъчни за определяне на стадия на заболяването, назначаване на подходяща терапия и проследяване на ефекта и'.

Именно благодарение на секвениране на иРНКи на ниво единична клетка бяха открити два нови потенциални маркера за туморни клетки TIGIT и CD164, които бяха с различна експресия между популациите от клонални и неклонални клетки, изолирани от конкретния пациент. Бе установено, че техниката дава възможност за индивидуален подход при диагностиката и лечението на пациентите, защото позволява детайлно фенотипно характеризиране на раковите клетки, откриването на субпопулации от туморни клетки, за които е възможно разработване на таргетни подходи, и дава разликата между "нормални" клетки и такива с патологични промени.

В последните години все повече се засилва интересът към разработване на таргетни терапии за лечение на кожен Т-клетъчен лимфом. Няколко нови открития в областта на КТКЛ бяха посрещнати с интерес в медицинските среди, защото доведоха до разработване на нови и ефективни таргетни терапии. Мултицентрични фаза III клинични проучвания вече текат за анти-CD30 и анти--CCR4, като таргетната група са пациенти с рефракторен кожен Т-клетъчен лимфом. Подготвя се и ново мултицентрично фаза I клинично проучване на хуманизирано анти-CD158k моноклонално антитяло (Sokolowska-Wojdylo, Wenzel et al. 2005, Ortonne, Le Gouvello et al. 2012, Guenova, Hoetzenecker et al. 2014, Duvic, Tetzlaff et al. 2015, Mehra, Ikenberg et al. 2015, Moins-Teisserenc, Daubord et al. 2015). Въпреки това скринингът за

други маркери с потенциал за таргетна терапия, насочена срещу тях, усилено продължава.

CD164 е описан като адхезивен сиаломуцин върху CD34⁺ клетките, който подтиска пролиферацията на хематопоеичните клетки (Zannettino, Buhring et al. 1998). При скрининг посредством секвениране на иРНКи от единични Т-лимфоцити CD164 бе детектиран като диференциално експресиран ген между клонални и неклонални кожни Т-лимфоцити от пациент с Микозис фунгоидес. Впоследствие бе доказана повишена експресия на CD164 върху малигнени Т-лимфоцити в кръв от пациенти с левкемичен кожен Т-клетъчен лимфом. В проби от различни пациенти установихме, че MFI на CD164 за популацията от Т-лимфоцити, изолирани от болни с КТКЛ, е значително по-висок от този, измерен при здрави контроли. CD164 експресията в повечето случаи бе лимитирана върху CD4⁺CD26⁻ малигнените Т-лимфоцити, които бяха идентифицирани по експресията на специфичния за всеки анализиран пациент V β клон.

Данните от проведените изследвания съвпадат със скорошно проучване на Wysocka и колектив (Wysocka, Kossenkov et al. 2014) и подсказват, че увеличена експресия на CD164 би могло да се използва като диагностичен маркер за левкемичен Т-клетъчен лимфом/Сезари синдром. На базата на данните от контролните популации, бе установено, че флоуцитометрично детектиране на > 20% CD164 върху CD4⁺ клетките в периферна кръв от еритродерматични пациенти би трябвало най-малкото да събуди съмнение за Сезари синдром.

В някои проучвания се откриват данни за CD164 като сигнален рецептор, участващ в пролиферацията, клетъчната адхезия и миграцията на хематопетичните стволови клетки, както и на прогениторните клетки (Watt, Butler et al. 2000, Forde, Tye et al. 2007). Скорошни данни от функционални експерименти подсказват връзка между експресията на CD164 и прогресия при рак на яйчниците (Huang, Chen et al. 2013). Таргетиране на CD164 в D283-MED медулобластомна клетъчна линия и в HCT116 клетъчна линия от рак на дебелото черво води до намалена туморна пролиферация, миграция и

инвазивност (Tang, Zhang et al. 2012, Shi, Lu et al. 2014). Всички тези данни категорично подсказват, че CD164 е подходящ маркер за таргетна терапия на КТКЛ.

Аналогични бяха и данните за TIGIT, за който по време на скрининга за нови туморни маркери, също бе установена различна експресия на пост-транскрипционно ниво в малигнените, клоналните CD4+ Т-лимфоцити, изолирани от лезионна кожа на пациент с КТКЛ, в сравнение с неклоналните Т-клетки. Когато експресията на TIGIT бе анализирана и на пост-транслационно ниво, бяха установени завишени нива на TIGIT върху популацията от Т-лимфоцити от болни (MFI приблизително 3180) в сравнение със същите клетки при здрави индивиди (MFI около 2090). Средният интензитет на флуоресценция за TIGIT бе по-висок за клоналните CD4+ Т-лимфоцити (MFI 3967) при сравнение с неклонални (MFI 2400). Експресията на TIGIT корелираше със загубата на CD26 от клетъчната повърхност на Т-клетките. Бе направен извод, че TIGIT също би могъл да бъде използван като диагностичен маркер за КТКЛ и е подходящ за разработване на таргетна терапия срещу него.

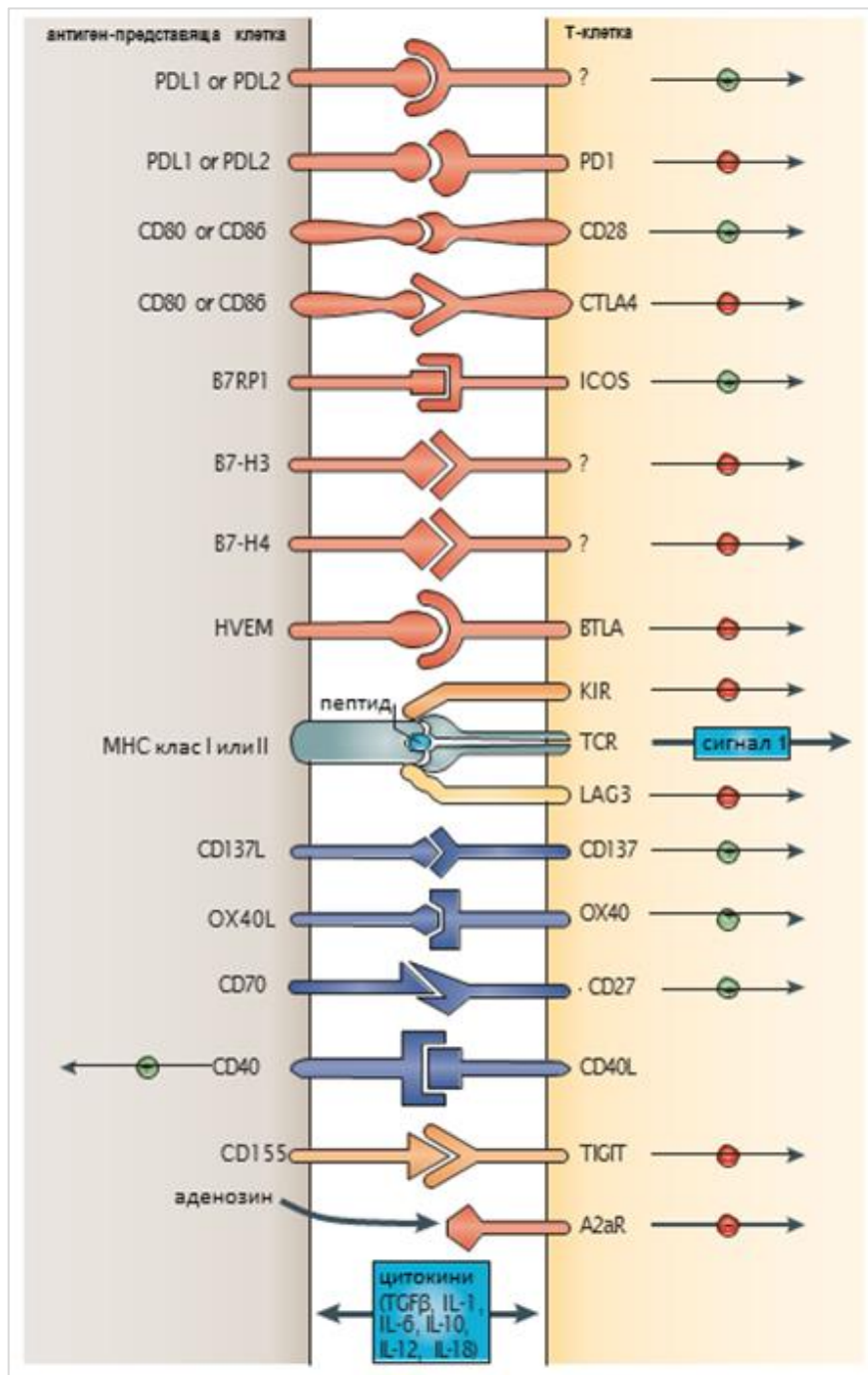
Свърхекспресията на TIGIT върху лимфоцити от пациенти с КТКЛ подсказва и възможен механизъм на имunosупресия при конкретното заболяване. Според публикация на Xin Yu и колеktiv (Yu, Harden et al. 2009) повърхностната експресия на протеина TIGIT потиска активирането на Т-клетките чрез генериране на зрели имунорегулаторни дендритни клетки. Човешките дендритни клетки експресират полиовирусен рецептор (CD155), който се свързва с TIGIT с висок афинитет, което води до засилена продукция на инетрлевкин-10 и намалена секреция на интерлевкин 12p40.

Много литературни данни сочат, че цитокиновата среда играе важна роля в потискането на имунния отговор срещу тумора, тъй като е част от сигнализацията през имунологичния синапс по време на инфекция (Friedl, den Boer et al. 2005). При пациенти с КТКЛ самите малигнени клетки са източник на супресивни Th2 цитокини (Guenova, Watanabe et al. 2013) и се наблюдава прогресиращо потискане на клетъчния имунитет с напредване на

заболяването (Girardi, Heald et al. 2004). Неутрализирането на Th2 цитокините възстановява Th1, но не и Th17 имунните отговори независимо от това, че IL-4 директно понижава нивата на *t-bet* and *rorc* (транскрипционни фактори в CD4⁺T клетките съответно за Th1 и Th17) (Park, Li et al. 2005). Този факт подсказва нарушени имунорегулаторни механизми, които са по-сложни от просто взаимодействие между малигнените и немалигнените Т-лимфоцити. Предполага се, че дендритните клетки също играят важна роля в молекулните механизми на имунна супресия при КТКЛ. Дендритните клетки са ключови участници в модулирането на имунния отговор срещу "непознато" и дирижират диференцирането на ефекторните CD4⁺ Т-клетки в Th1, Th2, Th17, Th22 и т.н.(Zhu, Yamane et al. 2010). За IL-4 е доказано, че може да инициира Th2 клетъчна диференциация посредством директно въздействие върху Т-лимфоцитите (Zhu and Paul 2008, Zhu and Paul 2010), но от друга страна може да даде началото на IL-12 зависимо възстановяване на Th1 имунния отговор с помощта на дендритните клетки (Guenova, Volz et al. 2008). Именно с този регулаторен механизъм се обяснява преходът от остра Th2- към хронична Th1-доминирана проява на atopичен дерматит (Hamid, Boguniewicz et al. 1994, Guenova, Volz et al. 2008). Съвпадението между повишена продукция на IL-4 и потиснатата секреция на IL-12 при напреднал стадий КТКЛ подсказва, че важната обратна връзка между дендритните клетки и Т-лимфоцитите най-вероятно в случая не функционира. Доказаната свръхекспресия на TIGIT върху Т-лимфоцити, изолирани от болни, е един възможен молекулен механизъм, използван от туморните клетки за "изключване" на дендритните клетки и за потискане на "опасната" за тях обратна връзка, активираща Th1 имунния отговор. TIGIT по повърхността на малигнените Т-лимфоцити се свързва с CD155 върху дендритните клетки, което води до супресия на продукцията на интерлевкин-12 от дендритните клетки, които всъщност са основен източник на този цитокин при човек, и до засилена секреция на интерлевкин-10. По този начин се осигурява тумор-специфично цитокиново обкръжение, в което преобладава интерлевкин-4 и липсва интерлевкин-12.

TIGIT се оказва подходяща молекула за таргетиране и по още една причина: участва в имунния синапс между антиген - представящите клетки (дендритните клетки) и Т-лимфоцитите (фигура 25).

Фигура 25. Схема на ключови участници в имунологичния синапс (адаптирана от The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy, Drew M. Pardoll, Nature reviews, 2012)



Характерни особености на кожен Т-клетъчен лимфом са подтиснатост на антиген-специфичните отговори, нарушена клетъчно-медирана цитотоксичност и намалено разнообразие на Т-клетъчните популации (редуциран репертоар на Т-клетъчния рецептор и поява на преобладаващ клон). Всички по-горе описани процеси предполагат участието на антиген-представящите клетки (основно дендритните клетки) в оркестрирането на такъв тип профил на имунния отговор. В зависимост от сигналите, които получават дендритните клетки могат да изпълняват функции с противоположен ефект. От една страна стимулират наивните или на имунната памет Т - клетки, а от друга страна могат да индуцират толеранс посредством отстраняване на авто-реактивните Т-лимфоцити в тимуса, генериране на анергия в зрелите Т-клетки и индуциране на Т регулаторни клетки.

Механизмите, стоящи зад този важен имунологичен феномен в КТКЛ са все още не добре изяснени. Ето защо от първостепенно значение е да се обясни как малигнените Т-клетки повлияват имунологичния синапс, модулират функцията на антиген-представящите клетки и по този начин индиректно повлияват диференциацията на "здравите" Т-клетки в тяхното обкръжение. Повишената експресия на супресорния протеин TIGIT върху клоналните Т-лимфоцити от болни с КТКЛ се предполага, че повлиява дендритните клетки в туморната микросреда и подтиска имунния отговор от страна на неклоналните Т-клетки.

Голямото разнообразие от различно експресирани в сравнение със здрави контроли молекули, характерни за малигнените Т-лимфоцити при кожен Т-клетъчен лимфом, представляват антигени, по които туморните клетки биха могли да бъдат различени от нормалните клетки от същия вид. Когато става въпрос за Т-лимфоцити, силата и качеството на имунния отговор, който започва с разпознаване на антигена от Т-клетъчния рецептор, се регулира от баланса от стимулаторни и инхибиторни сигнали (така наречения имуен чекпойнт) (Pardoll 2012). При нормални физиологични условия, имуният чекпойнт е от първостепенно значение за запазване на толеранс към собствените клетки, за подтискане на автоимунни прояви и за предпазването

тъканите, когато имунната система реагира на нашествие на патоген. Един от механизмите, по който туморните клетки се предпазват от имунен отговор срещу тях, е повишена експресия на някои от супресивните протеини, участващи в имунния синапс (в случая бе доказана повишена експресия на инхибиторния TIGIT). Т-клетките са основен обект на множество нови терапевтични подходи, имащи за цел да манипулират ендогенните анти-туморни имунни отговори. Активирането на немалигнените, неклонални Т-лимфоцити срещу клоналните, ракови клетки при КТКЛ би било успешен лечебен метод поради уникалните функции на този тип клетки. Т-лимфоцитите селективно разпознават пептиди, произлизащи от всички клетъчни компартменти, могат директно да убият клетката, представяща съответния антиген (тази роля се изпълнява от CD8+ Т-клетки, познати още като цитотоксични Т-лимфоцити (ЦТЛ)) и имат способността да оркестрират различен тип имунни отговори (посредством CD4+ Т-хелперни клетки. Обобщено, Т-лимфоцитите са ключова популация от имунни клетки, интегриращи адаптивните и вродените ефекторни механизми. Неслучайно, голяма част от клиничните изпитвания, провеждани в момента, включват агонисти на ко-стимулаторните рецептори или агонисти на инхибиторните сигнали от имунологичния синапс (Falchi, Sawas et al. 2016, Fujimura, Kambayashi et al. 2016, Menon, Shin et al. 2016, Du, Herbst et al. 2017). Множество литературни данни потвърждават, че блокада на имунния чекпойнт води до повишаване на анти-туморния отговор и че това е ниша за разработване на ново поколение лекарствени препарати за лечение на рак. Медиацията от Т-лимфоцитите имунитет включва няколко последователни стъпки: клонална селекция на антиген-специфични Т-клетки, тяхното активиране и пролифериране във вторичните лимфоидни тъкани, транспортът им до тъканите със завишена експресия на съответния антиген, отключване на ефекторните им функции и комуникация с останалите клетки на имунната система чрез секреция на цитокини и мембранни лиганди. Всеки етап на този процес се регулира от баланса между стимулаторни и инхибиторни сигнали, които позволяват фино модулиране на имунния отговор. Въпреки че инхибиторните сигнали повлияват главно вътреклетъчни пътища, много от тях започват с мембранен рецептор, чийто лиганд е свързан с мембрана и

разположен в екстрацелуларния матрикс или разтворим фактор (цитокин например). По правило ко-стимулаторните, ко-инхибиторните рецептори и съответните им лиганди, регулиращи Т-клетъчното активиране, не е задължително да бъдат свръхекспресирани в раковите клетки и нивата им са сходни с тези при нормални клетки от същия вид. Инхибиторните лиганди и техните рецептори, регулиращи ефекторните функции на Т-клетките са тези, които обикновено са свръхекспресирани върху туморните клетки или върху нетрансформирани клетки в туморното обкръжение. Разтворимите и мембранно-свързани рецептор-лиганд двойки (като TIGIT) от имунния чекпойнт са най-подходящи за разработване на терапия, защото биха могли да бъдат използвани антители-агонисти за ко-стимулаторните пътища и антители-антагонисти за ко-инхибиторните пътища. При кожен Т-клетъчен лимфом туморните клетки са Т-лимфоцити. Следвайки по-горе описаната логика малигнените Т-лимфоцити би трябвало да свръхекспресират някои супресорни молекули, с помощта на които да изключват ефекторната функция на антиген-представящите клетки, както и на останалите имунни клетки в обкръжението им. Имунната супресия при пациенти с напреднал кожен Т-клетъчен лимфом би могла да се дължи също на нарушен баланс между инхибиторните и стимулаторните сигнали, изпращани и получавани от Т-лимфоцитите.

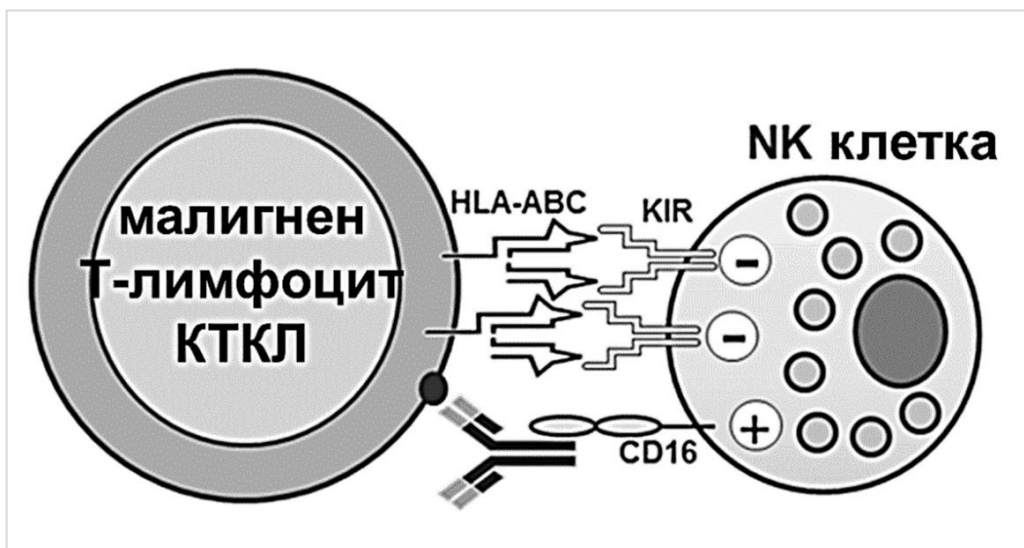
Впредвид на по-горе написаното евентуално таргетиране на TIGIT би довело до няколко взаимно допълващи се терапевтични ефекта, чийто краен резултат е лизис на туморните клетки: активиране на антияло-зависимата цитотоксичност на клетките естествени убийци (принцип на таргетната терапия), възстановяване на протективния Th1 имуен отговор и блокада на инхибиторните сигнали по повърхността на клоналните Т-лимфоцити част от имунологичния синапс.

Принципът, който е залегнал в таргетните терапии, е активиране на NK клетките и принуждаването им да лизират туморните клетки, които са опсонизирани от антитела, насочени срещу антигени, специфични за раковите клетки. По повърхността на клетките естествени убийци са разположени Fc -

рецептори (CD16a), които разпознават консервативните домени на антителата, свързани с туморните клетки, и това води до индуциране на ефекторната цитотоксична функция на NK клетките и секреция на прерфорини и гранзими, които лизират таргетната клетка (фигура 26).

Клетките естествени убийци са лимфоцити, които са класифицирани като ефекторни клетки на вродения имунитет и представляват първа линия на защита срещу инфекция или трансформирани туморни клетки. NK клетките осигуряват бърз и директен имуен отговор посредством техните ефекторни функции: цитотоксичност и секреция на цитокини (Cerwenka and Lanier 2001). Активността и цитотоксичността на NK клетките зависи от баланса между активиращи и потискащи сигнали, които получава от прицелната клетка (Pegram, Andrews et al. 2011, Long, Kim et al. 2013). Голямото разнообразие от рецептори, разположени по повърхността, дава възможност на NK клетките да "оценят" количеството на стимулаторните и инхибиторните молекули върху таргетната клетка, което от своя страна отключва или не повлиява ефекторната им функция. За да се достигне до лизис на прицелната клетка от страна на клетките естествени убийци, трябва активиращите сигнали са надделят. Силни инхибиторни сигнали от страна на раковата клетка в много случаи са причина за поддържане на неактивното състояние на NK клетките. Причина за наблюдавания процес е повишена експресия на NK супресорни молекули върху туморните клетки (Pahl and Cerwenka 2015).

Фигура 26. Молекулен механизъм на действие на таргетна терапия, адаптирана от интернет.



При пациентите с диагноза КТКЛ, изследвани от нас, бяха доказани понижени нива на антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност. Тези данни подсказват, че евентуалното назначаване на таргетна терапия при такива болни, не би дало очаквания добър резултат, поради наблюдаваната анергия на клетките естествени убийци. Ето защо бе необходимо да бъдат проучени молекулните механизми, използвани от малигнените CD4+ Т-лимфоцити за супресирание на ефекторната функция на NK клетките.

Добре изследвани инхибиторни лиганди за NK клетките са човешки левкицитни антигени (HLA): HLA-A (разпознава се от рецептор по повърхността на клетките естествени убийци, носещ името имуноглобулиноподобен рецептор на клетките убийци, killer-cell immunoglobulin-like receptors, KIR), HLA-B (съответстващ рецептор KIR), HLA-C (съответстващ рецептор KIR), HLA-E (съответстващ рецептор CD94-NKG2A) и лектин- подобен транскрипт 1, lectin-like transcript 1: LLT1 (съответен рецептор NKRP1A) (Mathew, Horton et al. 2014, Mathew and Mathew 2015, Pahl and Cerwenka 2015) - фигура 26.

Когато бе изследвана експресията на МНС клас I протеините по повърхността на Т-лимфоцити от болни с КТКЛ, бяха установени завишени нива на средния интензитет на флуоресценция за МНС ABC върху туморните клетки, което би могло да бъде възможно обяснение за анергията на NK клетките при пациенти с КТКЛ. След блокиране на МНС клас I протеините по повърхността на туморните клетки, цитотоксичната ефекторна функция на NK клетките бе възстановена. Засиленото лизиране на туморни клетки от страна на клетките естествени убийци след блокада на МНС ABC подсказва, че евентуално комбиниране на таргетна терапия и инхибиране на KIR рецепторите по повърхността на NK клетките, теоритично би дало по-добър лечебен ефект.

VI. Приноси

1. Бе използвано и валидирано секвениране на иРНКи от единични клетки, като нов подход за откриване на нови туморни маркери, приложими в рутинната диагностика и даващи възможност за разработване на таргетни терапии за лечение на пациенти с диагноза кожен Т-клетъчен лимфом.
2. Бяха открити два нови маркера CD164 и TIGIT, специфични за малигнената популация CD4+ Т-лимфоцити, което ги прави подходящи за откриване на циркулиращи туморни клетки в периферното кръвообръщение на пациенти с КТКЛ и подходящи за употреба в рутинната диагностика.
3. Бе доказано, че е възможно разработване на таргетна терапия, насочена срещу CD164 и TIGIT.
4. Бе установена понижена антитяло-зависима цитотоксичност на клетките естествени убийци при болни от КТКЛ.
5. Бе доказано, че назначаване единствено на подходяща таргетна терапия на съответния пациент с КТКЛ не би довело до добър лечебен ефект и успешно справяне със заболяването.
6. Бе предложен терапевтичен подход за активиране на клетките естествени убийци при пациенти с КТКЛ.
7. Бе постулирано, че при лечение на КТКЛ комбиниране на блокада на KIR рецепторите по повърхността на клетките естествени убийци със специфична за пациента таргетна терапия би подобрило ефекта от назначената таргетна терапия .

VII. Публикации

- Amann VC, Dreier J, **Ignatova D**, Kamarashev J, Kerl K, Kempf W, Pascolo S, Dummer R, Cozzio A, Guenova E. **Disseminated Primary Cutaneous CD8+ Small/medium-sized Pleomorphic T-cell Lymphoma Responding to Hydroxychloroquine**. *ActaDermVenereol.* 2015 May;95(5):602-3. doi: 10.2340/00015555-2002.
- DeSimone JA, Sodha P, **Ignatova D**, Dummer R, Cozzio A, Guenova E. **Recent advances in primary cutaneous T-cell lymphoma**. *Curr Opin Oncol.* 2015 Mar;27(2):128-33. doi:10.1097/CCO.000000000000161.
- Guenova E, Skabytska Y, Hoetzenecker W, Weindl G, Sauer K, Tham M, Kim KW, Park JH, Seo JH, **Ignatova D**, Cozzio A, Levesque MP, Volz T, Köberle M, Kaesler S, Thomas P, Mailhammer R, Ghoreschi K, Schäkel K, Amarov B, Eichner M, Schaller M, Clark RA, Röcken M, Biedermann T. **IL-4 abrogates T(H)17 cell-mediated inflammation by selective silencing of IL-23 in antigen-presenting cells**. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Feb 17;112(7):2163-8. doi: 10.1073/pnas.1416922112.
- Desislava Ignatova***, Emmanuella Guenova*, Yun-Tsan Chang, Emmanuel Contassot, Tarun Mehra, Ieva Saulite, Alexander Navarini, Vanyo Mitev, Reinhard Dummer, Dmitry V. Kazakov, Lars Einar French, Wolfram Hoetzenecker, Antonio Cozzio. **Expression of CD164 on malignant T cells in Sézary Syndrome**. *ActaDermVenereol.*, equally contributed. . 2016 May;96(4):464-7. doi: 10.2340/00015555-2264.PMID:26524186.
- Sönnichsen A, Saulite I, Mangana J, Kerl K, Mehra T, **Desislava I**, Chang YT, Petrusch U, Schmid-Grendelmeier P, Hoetzenecker W, Cozzio A, Guenova E. **Interleukin-1 receptor antagonist (anakinra) for Schnitzler syndrome**. *J Dermatolog Treat.* 2016 Oct;27(5):436-8. doi: 10.3109/09546634.2015.1136048. Epub 2016 Feb 10.
- Kollmann D., **D. Ignatova**, J. Jedamzik, YT Chang, G. Jomrich, M. Paireder, I. Kristo, D. Kazakov, M. Michal, W. Hoetzenecker, T. Schatton, R. Asari, M. Preusser, P. Birner, E. Guenova, S. F. Schoppmann. **Overexpression of PD1 not only on tumor infiltrating lymphocytes but also on tumor cells is associated with worse clinical outcome in esophageal adenocarcinoma**. *Annals of Surgical Oncology* 2017. in revision.
- Saulite I, **Ignatova D**, Chang YT, Contassot E, Mehra T, Navarini AA, Mitev V, Dummer R, Kazakov DV, French LE, Hoetzenecker W, Cozzio A, Guenova E. **Expression pattern of inhibitory checkpoint molecules in patients with Sézary syndrome: increased expression of PD-1 and TIGIT**. *подготовка за публикуване

VIII. Участие в международни конференции

1. **11th World Immune Regulation Meeting, Davos (Switzerland), March 2017.**
 - 1.1. Постер, устно представяне и награда от организаторите на конференцията: **Malignant T cells inhibit anti-cancer and anti-infectious immunity in cutaneous T cell lymphoma.** Desislava Ignatova, Yun-Tsan Chang, Reinhard Dummer, Lars E. French, Antonio Cozzio, Wolfram Hoetzenecker, Emmanuella Guenova.
 - 1.2. Постер, устно представяне и награда от спонсор на конференцията: **Ineffective antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with late stage cutaneous T cell lymphoma.** Y.T. Chang, M. Ziegler, D. Ignatova, P. Ivanov, R. Profanter, K. Kerl, R. Dummer, E. Contassot, L. French, P. Nestorov, S. Misailovic, M. Vechev, A. Cozzio, W. Hötzenecker, E. Guenova.
2. **HSM-2 Symposium Immunotolerance: Moving towards Clinical Application, Zurich (Switzerland), May 2016.**
 - 2.1. Постер: **Expression of CD164 on malignant T cells in Sézary Syndrome.** Desislava Ignatova, Yun-Tsan Chang, Emmanuel Contassot, Tarun Mehra, Vanyo Mitev, Reinhard Dummer, Lars Einar French, Wolfram Hoetzenecker, Antonio Cozzio, Emmanuella Guenova.
 - 2.2. Постер: **Ineffective antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with late stage cutaneous T cell lymphoma.** Y.T. Chang, M. T. Ziegler, D. Ignatova, K. Kerl, L.E. French, R. Dummer, W. Hötzenecker, A. Cozzio, E. Guenova.
3. **ADF (Arbeitschaft Dermatologische Forschung) Tagung, Ulm (Germany), March 2016.**
 - 3.1. Постер: **Expression of CD164 on malignant T cells in Sézary Syndrome.** Desislava Ignatova, Yun-Tsan Chang, Emmanuel Contassot, Tarun Mehra, Vanyo Mitev, Reinhard Dummer, Lars Einar French, Wolfram Hoetzenecker, Antonio Cozzio, Emmanuella Guenova.
 - 3.2. Постер: **Ineffective antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with late stage cutaneous T cell lymphoma.** Y.T. Chang, M. T. Ziegler, D. Ignatova, K. Kerl, L.E. French, R. Dummer, W. Hötzenecker, A. Cozzio, E. Guenova.
4. **15th Day of Clinical Research, Zurich (Switzerland), March 2016.**

- 4.1. Постер: **Expression of CD164 on malignant T cells in Sézary Syndrome.** **Desislava Ignatova**, Yun-Tsan Chang, Emmanuel Contassot, TarunMehra, VanyoMitev, Reinhard Dummer, Lars Einar French, Wolfram Hoetzenecker, Antonio Cozzio, Emmanuella Guenova.
- 4.2. Постер: **Ineffective antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with late stage cutaneous T cell lymphoma.** Y.T. Chang, M. T. Ziegler, **D. Ignatova**, K. Kerl, L.E. French, R. Dummer, W. Hötzenecker, A. Cozzio, E. Guenova.
5. **EORTC CLTF MEETING, Clinical trials and translational researches from an European multicentric perspective, Turin (Italy), September 2015.**
 - 5.1. Постер и устно представяне: **Expression of CD164 on malignant T cells in Sézary Syndrome.** **Desislava Ignatova**, Emmanuella Guenova, Yun-Tsan Chang, Emmanuel Contassot, TarunMehra, VanyoMitev, Reinhard Dummer, Lars Einar French, Wolfram Hoetzenecker, Antonio Cozzio.
 - 5.2. Постер и устно представяне: **Resistance to antibody-dependent cellular cytotoxicity impairs antitumor activity of Rituximab in CD20+ Mycosis fungoides.** Y.T. Chang, M. T. Ziegler, **D. Ignatova**, L.E. French, A. Cozzio, E. Guenova.
6. **XI International Congress of Medical Sciences, Sofia (Bulgaria), May 2012.** Постер: **E-sources of understanding JAK-STAT transduction mechanism.** **Ignatova D**, Dimitrova V, Isaeva A.

IX Награди

Стипендиант по програма Sciex-NMSCH в Катедра Дерматология, Университетска Болница Цюрих, 11 месеца, награденият проект е на тема " Биология на кожен Т клетъчен лимфом", изработен е с помощта на Доц. Емануела Генова, дм, дбн, и Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн.

WIRM Travel Grant Winner (11th World Immune Regulation Meeting, Davos, Switzerland), Март 2017. Постер, устно представяне и награда от организаторите на конференцията. Награденият абстракт е озаглавен: Malignant T cells inhibit anti-cancer and anti-infectious immunity in cutaneous T cell lymphoma.

IX. Използвана литература

- Alix-Panabieres, C. and K. Pantel (2014). "Challenges in circulating tumour cell research." Nat Rev Cancer **14**(9): 623-631.
- Bahler, D. W., L. Hartung, S. Hill, G. M. Bowen and E. C. Vonderheid (2008). "CD158k/KIR3DL2 is a useful marker for identifying neoplastic T-cells in Sezary syndrome by flow cytometry." Cytometry B Clin Cytom **74**(3): 156-162.
- Barrio, S., T. D. Shanafelt, J. Ojha, K. G. Chaffee, C. Secreto, K. M. Kortum, S. Pathangey, D. L. Van-Dyke, S. L. Slager, R. Fonseca, N. E. Kay and E. Braggio (2016). "Genomic characterization of high-count MBL cases indicates that early detection of driver mutations and subclonal expansion are predictors of adverse clinical outcome." Leukemia.
- Beck, R. C., S. Stahl, C. L. O'Keefe, J. P. Maciejewski, K. S. Theil and E. D. Hsi (2003). "Detection of mature T-cell leukemias by flow cytometry using anti-T-cell receptor V beta antibodies." Am J Clin Pathol **120**(5): 785-794.
- Benoit, B. M., N. Jariwala, G. O'Connor, L. K. Oetjen, T. M. Whelan, A. Werth, A. B. Troxel, H. Sicard, L. Zhu, C. Miller, J. Takeshita, D. W. McVicar, B. S. Kim, A. H. Rook and M. Wysocka (2016). "CD164 identifies CD4+ T cells highly expressing genes associated with malignancy in Sezary syndrome: the Sezary signature genes, FCRL3, Tox, and miR-214." Arch Dermatol Res.
- Bohle, B., H. Schwihla, H. Z. Hu, R. Friedl-Hajek, S. Sowka, F. Ferreira, H. Breiteneder, C. A. Bruijnzeel-Koomen, R. A. de Weger, G. C. Mudde, C. Ebner and F. C. Van Reijssen (1998). "Long-lived Th2 clones specific for seasonal and perennial allergens can be detected in blood and skin by their TCR-hypervariable regions." J Immunol **160**(4): 2022-2027.
- Bolgert, M. (1957). "Albert Sezary, 1880-1856." AMA Arch Derm **75**(5): 782-783.
- Booken, N., A. Gratchev, J. Utikal, C. Weiss, X. Yu, M. Qadoumi, M. Schmuth, N. Sepp, D. Nashed, K. Rass, T. Tuting, C. Assaf, E. Dippel, R. Stadler, C. D. Klemke and S. Goerdts (2008). "Sezary syndrome is a unique cutaneous T-cell lymphoma as identified by an expanded gene signature including diagnostic marker molecules CDO1 and DNM3." Leukemia **22**(2): 393-399.
- Boonk, S. E., W. H. Zoutman, A. Marie-Cardine, L. van der Fits, J. J. Out-Luiting, T. J. Mitchell, I. Tosi, S. L. Morris, B. Moriarty, N. Booken, M. Felcht, P. Quaglino, R. Ponti, E. Barberio, C. Ram-Wolff, K. Jantti, A. Ranki, M. G. Bernengo, C. D. Klemke, A. Bensussan, L. Michel, S. Whittaker, M. Bagot, C. P. Tensen, R. Willemze and M. H. Vermeer (2016). "Evaluation of Immunophenotypic and Molecular Biomarkers for Sezary Syndrome Using Standard Operating Procedures: A Multicenter Study of 59 Patients." J Invest Dermatol **136**(7): 1364-1372.

- Carson, K. R., S. D. Newsome, E. J. Kim, N. D. Wagner-Johnston, G. von Geldern, C. H. Moskowitz, A. J. Moskowitz, A. H. Rook, P. Jalan, A. W. Loren, D. Landsburg, T. Coyne, D. Tsai, D. W. Raisch, L. B. Norris, P. B. Bookstaver, O. Sartor and C. L. Bennett (2014). "Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with brentuximab vedotin therapy: a report of 5 cases from the Southern Network on Adverse Reactions (SONAR) project." Cancer **120**(16): 2464-2471.
- Casasent, A. K., M. Edgerton and N. E. Navin (2016). "Genome evolution in ductal carcinoma in situ: invasion of the clones." J Pathol.
- Caudron, A., A. Marie-Cardine, A. Bensussan and M. Bagot (2012). "[New developments in Sezary syndrome]." Ann Dermatol Venereol **139**(1): 31-40.
- Cedeno-Laurent, F., R. Watanabe, J. E. Teague, T. S. Kupper, R. A. Clark and C. J. Dimitroff (2012). "Galectin-1 inhibits the viability, proliferation, and Th1 cytokine production of nonmalignant T cells in patients with leukemic cutaneous T-cell lymphoma." Blood **119**(15): 3534-3538.
- Cerwenka, A. and L. L. Lanier (2001). "Natural killer cells, viruses and cancer." Nature Reviews Immunology **1**(1): 41-49.
- Chakraborty, A. R., R. W. Robey, V. L. Luchenko, Z. Zhan, R. L. Piekarz, J. P. Gillet, A. V. Kossenkov, J. Wilkerson, L. C. Showe, M. M. Gottesman, N. L. Collie and S. E. Bates (2013). "MAPK pathway activation leads to Bim loss and histone deacetylase inhibitor resistance: rationale to combine romidepsin with an MEK inhibitor." Blood **121**(20): 4115-4125.
- Chung, J. S., L. H. Shiue, M. Duvic, A. Pandya, P. D. Cruz, Jr. and K. Ariizumi (2011). "Sezary syndrome cells overexpress syndecan-4 bearing distinct heparan sulfate moieties that suppress T-cell activation by binding DC-HIL and trapping TGF-beta on the cell surface." Blood **117**(12): 3382-3390.
- Coiffier, B., B. Pro, H. M. Prince, F. Foss, L. Sokol, M. Greenwood, D. Caballero, F. Morschhauser, M. Wilhelm, L. Pinter-Brown, S. Padmanabhan Iyer, A. Shustov, T. Nielsen, J. Nichols, J. Wolfson, B. Balser and S. Horwitz (2014). "Romidepsin for the treatment of relapsed/refractory peripheral T-cell lymphoma: pivotal study update demonstrates durable responses." J Hematol Oncol **7**(1): 11.
- Corey, K., D. Cook, J. Bekker, E. Mugnaini and J. H. Lin (2014). "A case of refractory Sezary syndrome with large-cell transformation responsive to brentuximab vedotin." JAMA Dermatol **150**(2): 210-212.
- de Masson, A., P. Guitera, P. Brice, I. Moulounguet, F. Mouly, J. D. Bouaziz, M. Battistella, I. Madelaine, J. Roux, C. Ram-Wolff, J. M. Cayuela, H. Bachelez, A. Bensussan, L. Michel and M. Bagot (2014). "Long-term efficacy and safety of alemtuzumab in advanced primary cutaneous T-cell lymphomas." Br J Dermatol **170**(3): 720-724.
- Deaver, D., A. Cauthen, G. Cohen, L. Sokol and F. Glass (2014). "Excimer laser in the treatment of mycosis fungoides." J Am Acad Dermatol **70**(6): 1058-1060.
- DeSimone, J. A., E. Guenova, J. B. Carter, K. S. Chaney, J. R. Aldridge, C. M. Noell, A. A. Dorosario, J. L. Hansen, T. S. Kupper and P. M. Devlin (2013). "Low-dose high-dose-rate brachytherapy in the treatment of facial lesions of cutaneous T-cell lymphoma." J Am Acad Dermatol **69**(1): 61-65.

- Dey, S. S., L. Kester, B. Spanjaard, M. Bienko and A. van Oudenaarden (2015). "Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell." Nat Biotechnol **33**(3): 285-289.
- Du, L., R. S. Herbst and D. Morgensztern (2017). "Immunotherapy in Lung Cancer." Hematol Oncol Clin North Am **31**(1): 131-141.
- Dummer, R., S. Rozati, E. Guenova and A. Cozzio (2013). "Less can be more: the impact of chemotherapy on cutaneous T-cell lymphomas." Future Oncol **9**(8): 1061-1064.
- Duvic, M., H. Tetzlaff, P. Gangar, A. L. Clos and R. Talpur (2013). "Phase II trial of Brentuximab vedotin (SGN-35) for CD30+cutaneous T-cell lymphomas and lymphoproliferative disorders." Journal of Investigative Dermatology **133**: S180-S180.
- Duvic, M., M. T. Tetzlaff, P. Gangar, A. L. Clos, D. Sui and R. Talpur (2015). "Results of a Phase II Trial of Brentuximab Vedotin for CD30+ Cutaneous T-Cell Lymphoma and Lymphomatoid Papulosis." J Clin Oncol.
- Edsall, L. C. and J. W. Patterson (2010). "Cutaneous T-cell lymphoma: important diagnostic tools." G Ital Dermatol Venereol **145**(3): 323-344.
- Ehsani, A. H., A. Azizpour, P. Noormohammadpoor, H. Seirafi, F. Farnaghi, K. Kamyab-Hesari, M. Sharifi and M. Nasimi (2016). "Folliculotropic Mycosis Fungoides: Clinical and Histologic Features in Five Patients." Indian J Dermatol **61**(5): 554-558.
- Falchi, L., A. Sawas, C. Deng, J. E. Amengual, D. S. Colbourn, E. A. Lichtenstein, K. A. Khan, L. H. Schwartz and O. A. O'Connor (2016). "High rate of complete responses to immune checkpoint inhibitors in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma previously exposed to epigenetic therapy." J Hematol Oncol **9**(1): 132.
- Ferenczi, K., R. C. Fuhlbrigge, J. Pinkus, G. S. Pinkus and T. S. Kupper (2002). "Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma." J Invest Dermatol **119**(6): 1405-1410.
- Ferrara G, P. M., Votino C, Quaglino P, Tomasini C, Santucci M, Pimpinelli N, Cusano F, Sabatino L, Colantuoni V (2014). "A specific DNA methylation profile correlates with a high risk of disease progression in stage I classical (Alibert-Bazin type) mycosis fungoides." Br J Dermatol **170**(6): 10.
- Forde, S., B. J. Tye, S. E. Newey, M. Roubelakis, J. Smythe, C. P. McGuckin, R. Pettengell and S. M. Watt (2007). "Endolyn (CD164) modulates the CXCL12-mediated migration of umbilical cord blood CD133+ cells." Blood **109**(5): 1825-1833.
- Friedl, P., A. T. den Boer and M. Gunzer (2005). "Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse." Nat Rev Immunol **5**(7): 532-545.
- Fujimura, T., Y. Kambayashi, S. Furudate, T. Hidaka, Y. Sato, K. Tanita, H. Tono, A. Tsukada, A. Hashimoto and S. Aiba (2016). "Successful treatment of multiple in-transit melanomas on the leg with intensity-modulated radiotherapy and immune checkpoint inhibitors: Report of two cases." J Dermatol.
- Furukawa, F., Y. Tokura, K. Matsushita, K. Iwasaki-Inuzuka, K. Onagi-Suzuki, H. Yagi, H. Wakita and M. Takigawa (1996). "Selective expansions of T cells expressing V beta

- 8 and V beta 13 in skin lesions of patients with chronic cutaneous lupus erythematosus." J Dermatol **23**(10): 670-676.
- Girardi, M., P. W. Heald and L. D. Wilson (2004). "The pathogenesis of mycosis fungoides." N Engl J Med **350**(19): 1978-1988.
- Gkountela, S., B. Szczerba, C. Donato and N. Aceto (2016). "Recent advances in the biology of human circulating tumour cells and metastasis." ESMO Open **1**(4): e000078.
- Grun, D., A. Lyubimova, L. Kester, K. Wiebrands, O. Basak, N. Sasaki, H. Clevers and A. van Oudenaarden (2015). "Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types." Nature **525**(7568): 251-255.
- Guenova, E., W. Hoetzenecker, S. Rozati, M. P. Levesque, R. Dummer and A. Cozzio (2014). "Novel therapies for cutaneous T-cell lymphoma: what does the future hold?" Expert Opin Investig Drugs **23**(4): 457-467.
- Guenova, E., S. Schanz, W. Hoetzenecker, J. A. DeSimone, T. Mehra, B. Voykov, M. Urosevic-Maiwald, M. Berneburg, R. Dummer, L. E. French, K. Kerl, J. Kamarashev, G. Fierlbeck and A. Cozzio (2014). "Systemic corticosteroids for subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma." Br J Dermatol.
- Guenova, E., T. Volz, K. Sauer, S. Kaesler, M. R. Muller, F. Wolbing, K. Chen, C. Schwarzler, P. Brossart, M. Rocken and T. Biedermann (2008). "IL-4-mediated fine tuning of IL-12p70 production by human DC." Eur J Immunol **38**(11): 3138-3149.
- Guenova, E., R. Watanabe, J. E. Teague, J. A. Desimone, Y. Jiang, M. Dowlatshahi, C. Schlapbach, K. Schaekel, A. H. Rook, M. Tawa, D. C. Fisher, T. S. Kupper and R. A. Clark (2013). "TH2 cytokines from malignant cells suppress TH1 responses and enforce a global TH2 bias in leukemic cutaneous T-cell lymphoma." Clin Cancer Res **19**(14): 3755-3763.
- Hamid, Q., M. Boguniewicz and D. Y. Leung (1994). "Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis." J Clin Invest **94**(2): 870-876.
- Han, L., X. Zi, L. X. Garmire, Y. Wu, S. M. Weissman, X. Pan and R. Fan (2014). "Co-detection and sequencing of genes and transcripts from the same single cells facilitated by a microfluidics platform." Sci Rep **4**: 6485.
- Hashikawa, K., S. Yasumoto, K. Nakashima, F. Arakawa, J. Kiyasu, Y. Kimura, H. Saruta, T. Nakama, K. Yasuda, K. Tashiro, S. Kuhara, T. Hashimoto and K. Ohshima (2014). "Microarray analysis of gene expression by microdissected epidermis and dermis in mycosis fungoides and adult T-cell leukemia/lymphoma." Int J Oncol **45**(3): 1200-1208.
- Hodges, E., A. P. Williams, S. Harris and J. L. Smith (2005). "T-cell receptor molecular diagnosis of T-cell lymphoma." Methods Mol Med **115**: 197-215.
- Hoetzenecker, W., E. Guenova, K. Hoetzenecker, A. Yazdi, M. Rocken and M. Berneburg (2009). "Successful treatment of recalcitrant lymphomatoid papulosis in a child with PUVA-bath photochemotherapy." Eur J Dermatol **19**(6): 646-647.
- Horna, P., D. M. Deaver, D. Qin, L. C. Moscinski, E. M. Sotomayor, L. F. Glass and L. Sokol (2014). "Quantitative flow cytometric identification of aberrant T cell clusters in

- erythrodermic cutaneous T cell lymphoma. Implications for staging and prognosis." J Clin Pathol **67**(5): 431-436.
- Huang, A. F., M. W. Chen, S. M. Huang, C. L. Kao, H. C. Lai and J. Y. Chan (2013). "CD164 regulates the tumorigenesis of ovarian surface epithelial cells through the SDF-1alpha/CXCR4 axis." Mol Cancer **12**(1): 115.
- Huen, A. O. and A. H. Rook (2014). "Toll receptor agonist therapy of skin cancer and cutaneous T-cell lymphoma." Curr Opin Oncol **26**(2): 237-244.
- Hughes, A. E., V. Magrini, R. Demeter, C. A. Miller, R. Fulton, L. L. Fulton, W. C. Eades, K. Elliott, S. Heath, P. Westervelt, L. Ding, D. F. Conrad, B. S. White, J. Shao, D. C. Link, J. F. DiPersio, E. R. Mardis, R. K. Wilson, T. J. Ley, M. J. Walter and T. A. Graubert (2014). "Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia defined by single-cell sequencing." PLoS Genet **10**(7): e1004462.
- James, E., J. G. Sokhn, J. F. Gibson, K. Carlson, A. Subtil, M. Girardi, L. D. Wilson and F. Foss (2014). "CD4+ Primary Cutaneous Small/Medium-Sized Pleomorphic T-Cell Lymphoma: A Retrospective Case Series and Review of Literature." Leuk Lymphoma: 1-12.
- Jones CL, F. S., McKenzie RC, Tosi I, Caesar JA, Bagot M, Whittaker SJ, Mitchell TJ (2012). "Regulation of T-plastin expression by promoter hypomethylation in primary cutaneous T-cell lymphoma." J Invest Dermatol **132**(8): 8.
- Kari, L., A. Loboda, M. Nebozhyn, A. H. Rook, E. C. Vonderheid, C. Nichols, D. Virok, C. Chang, W. H. Horng, J. Johnston, M. Wysocka, M. K. Showe and L. C. Showe (2003). "Classification and prediction of survival in patients with the leukemic phase of cutaneous T cell lymphoma." J Exp Med **197**(11): 1477-1488.
- Kelemen, K., C. R. White, K. Gatter, R. M. Braziel and G. Fan (2010). "Immunophenotypic correlation between skin biopsy and peripheral blood findings in mycosis fungoides." Am J Clin Pathol **134**(5): 739-748.
- Kempf, W., D. V. Kazakov and K. Kerl (2014). "Cutaneous lymphomas: an update. Part 1: T-cell and natural killer/t-cell lymphomas and related conditions." Am J Dermatopathol **36**(2): 105-123.
- Kempf, W. and C. A. Sander (2010). "Classification of cutaneous lymphomas - an update." Histopathology **56**(1): 57-70.
- Khamaysi, Z., Y. Ben-Arieh, O. B. Izhak, R. Epelbaum, E. J. Dann and R. Bergman (2008). "The applicability of the new WHO-EORTC classification of primary cutaneous lymphomas to a single referral center." Am J Dermatopathol **30**(1): 37-44.
- Kim, E. J., S. Hess, S. K. Richardson, S. Newton, L. C. Showe, B. M. Benoit, R. Ubriani, C. C. Vittorio, J. M. Junkins-Hopkins, M. Wysocka and A. H. Rook (2005). "Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma." J Clin Invest **115**(4): 798-812.
- Kim, K. T., H. W. Lee, H. O. Lee, S. C. Kim, Y. J. Seo, W. Chung, H. H. Eum, D. H. Nam, J. Kim, K. M. Joo and W. Y. Park (2015). "Single-cell mRNA sequencing identifies subclonal heterogeneity in anti-cancer drug responses of lung adenocarcinoma cells." Genome Biol **16**: 127.

- Kim, M., L. A. Thompson, S. D. Wenger and C. L. O'Bryant (2012). "Romidepsin: a histone deacetylase inhibitor for refractory cutaneous T-cell lymphoma." Ann Pharmacother **46**(10): 1340-1348.
- Kim, Y. H., M. Girardi, M. Duvic, T. Kuzel, B. K. Link, L. Pinter-Brown and A. H. Rook (2010). "Phase I trial of a Toll-like receptor 9 agonist, PF-3512676 (CPG 7909), in patients with treatment-refractory, cutaneous T-cell lymphoma." J Am Acad Dermatol **63**(6): 975-983.
- Kim, Y. H. and R. T. Hoppe (1999). "Mycosis fungoides and the Sezary syndrome." Semin Oncol **26**(3): 276-289.
- Klein, A. M., L. Mazutis, I. Akartuna, N. Tallapragada, A. Veres, V. Li, L. Peshkin, D. A. Weitz and M. W. Kirschner (2015). "Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells." Cell **161**(5): 1187-1201.
- Klemke, C. D., N. Booken, C. Weiss, J. P. Nicolay, S. Goerdts, M. Felcht, C. Geraud, W. Kempf, C. Assaf, N. Ortonne, M. Battistella, M. Bagot, R. Knobler, P. Quaglino, B. Arheiliger, M. Santucci, P. Jansen, M. H. Vermeer and R. Willemze (2015). "Histopathological and immunophenotypical criteria for the diagnosis of Sezary syndrome in differentiation from other erythrodermic skin diseases: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Cutaneous Lymphoma Task Force Study of 97 cases." Br J Dermatol **173**(1): 93-105.
- Kogge, A., C. Volteau, M. Saint-Jean, L. Peuvrel, A. Brocard, A. C. Knol, J. J. Renaut, B. Dreno and G. Quereux (2014). "Vorinostat for Refractory or Relapsing Epidermotropic T-cell Lymphoma: a Retrospective Cohort Study of 15 Patients." Acta Derm Venereol.
- Kolodziejczyk, A. A., J. K. Kim, V. Svensson, J. C. Marioni and S. A. Teichmann (2015). "The technology and biology of single-cell RNA sequencing." Mol Cell **58**(4): 610-620.
- Krejsgaard, T., A. Willerslev-Olsen, L. M. Lindahl, C. M. Bonefeld, S. B. Koralov, C. Geisler, M. A. Wasik, R. Gniadecki, M. Kilian, L. Iversen, A. Woetmann and N. Odum (2014). "Staphylococcal enterotoxins stimulate lymphoma-associated immune dysregulation." Blood **124**(5): 761-770.
- Li, Y., X. Xu, L. Song, Y. Hou, Z. Li, S. Tsang, F. Li, K. M. Im, K. Wu, H. Wu, X. Ye, G. Li, L. Wang, B. Zhang, J. Liang, W. Xie, R. Wu, H. Jiang, X. Liu, C. Yu, H. Zheng, M. Jian, L. Nie, L. Wan, M. Shi, X. Sun, A. Tang, G. Guo, Y. Gui, Z. Cai, J. Li, W. Wang, Z. Lu, X. Zhang, L. Bolund, K. Kristiansen, J. Wang, H. Yang, M. Dean and J. Wang (2012). "Single-cell sequencing analysis characterizes common and cell-lineage-specific mutations in a muscle-invasive bladder cancer." Gigascience **1**(1): 12.
- Long, E. O., H. S. Kim, D. Liu, M. E. Peterson and S. Rajagopalan (2013). "Controlling NK cell responses: integration of signals for activation and inhibition." Annual review of immunology **31**.
- Lovett, M. (2013). "The applications of single-cell genomics." Hum Mol Genet **22**(R1): R22-26.
- Macaulay, I. C., W. Haerty, P. Kumar, Y. I. Li, T. X. Hu, M. J. Teng, M. Goolam, N. Saurat, P. Coupland, L. M. Shirley, M. Smith, N. Van der Aa, R. Banerjee, P. D. Ellis, M. A.

- Quail, H. P. Swerdlow, M. Zernicka-Goetz, F. J. Livesey, C. P. Ponting and T. Voet (2015). "G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes." Nat Methods **12**(6): 519-522.
- Macaulay, I. C. and T. Voet (2014). "Single cell genomics: advances and future perspectives." PLoS Genet **10**(1): e1004126.
- Macosko, E. Z., A. Basu, R. Satija, J. Nemesh, K. Shekhar, M. Goldman, I. Tirosh, A. R. Bialas, N. Kamitaki, E. M. Martersteck, J. J. Trombetta, D. A. Weitz, J. R. Sanes, A. K. Shalek, A. Regev and S. A. McCarroll (2015). "Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets." Cell **161**(5): 1202-1214.
- Mancebo, S. E., M. Cordova, P. L. Myskowski, E. S. Flores, K. Busam, S. I. Jawed, A. Skripnik, M. Rajadhyaksha and C. Querfeld (2016). "Reflectance confocal microscopy features of mycosis fungoides and Sezary syndrome: correlation with histopathologic and T-cell receptor rearrangement studies." J Cutan Pathol **43**(6): 505-515.
- Mathew, P., N. Horton, K. Bowen and S. Mathew (2014). "Lectin-like transcript-1 (LLT1) and exosomal PCNA inhibit NK cell effector function against prostate cancer cells (TUM2P. 892)." The Journal of Immunology **192**(1 Supplement): 71.16-71.16.
- Mathew, S. and P. Mathew (2015). "Overexpression of LLT1 (CLEC2D) on prostate cancer cells inhibits NK cell-mediated killing through LLT1-NKRP1A interaction (TUM10P. 1052)." The Journal of Immunology **194**(1 Supplement): 211.233-211.233.
- Mayba, O., H. N. Gilbert, J. Liu, P. M. Haverty, S. Jhunjunwala, Z. Jiang, C. Watanabe and Z. Zhang (2014). "MBASED: allele-specific expression detection in cancer tissues and cell lines." Genome Biol **15**(8): 405.
- McGirt LY, A. C., Baerenwald DA, Zwerner JP, Zic JA, Eischen CM (2014). "miR-223 regulates cell growth and targets proto-oncogenes in mycosis fungoides/cutaneous T-cell lymphoma." J Invest Dermatol **134**(4): 1101-1107.
- Mehra, T., K. Ikenberg, R. M. Moos, R. Benz, G. Nair, U. Schanz, E. Haralambieva, W. Hoetzenecker, R. Dummer, L. E. French, E. Guenova and A. Cozzio (2015). "Brentuximab as a treatment for CD30+ mycosis fungoides and Sezary syndrome." JAMA Dermatol **151**(1): 73-77.
- Mehra, T., K. Ikenberg, M. R.M., R. Benz, G. Nair, U. Schanz, E. Haralambieva, W. Hoetzenecker, R. Dummer, L. E. French, E. Guenova and A. Cozzio (2014). "Brentuximab as a Treatment for CD30+ Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome." JAMA Dermatol.
- Menon, S., S. Shin and G. Dy (2016). "Advances in Cancer Immunotherapy in Solid Tumors." Cancers (Basel) **8**(12).
- Mishra A, G. R. (2014). "Blood. 2014 Mar 6;123(10):1438. doi: 10.1182/blood-2014-01-548578. The (miR)e of CTCL." Blood **123**(10): 1.
- Miyamoto, D. T., Y. Zheng, B. S. Wittner, R. J. Lee, H. Zhu, K. T. Broderick, R. Desai, D. B. Fox, B. W. Brannigan, J. Trautwein, K. S. Arora, N. Desai, D. M. Dahl, L. V. Sequist, M. R. Smith, R. Kapur, C. L. Wu, T. Shioda, S. Ramaswamy, D. T. Ting, M. Toner, S. Maheswaran and D. A. Haber (2015). "RNA-Seq of single prostate CTCs

- implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance." Science **349**(6254): 1351-1356.
- Moins-Teisserenc, H., M. Daubord, E. Clave, C. Douay, J. Felix, A. Marie-Cardine, C. Ram-Wolff, G. Maki, K. Beldjord, L. Homyrda, L. Michel, A. Bensussan, A. Toubert and M. Bagot (2015). "CD158k is a reliable marker for diagnosis of Sezary syndrome and reveals an unprecedented heterogeneity of circulating malignant cells." J Invest Dermatol **135**(1): 247-257.
- Moller, E. K., P. Kumar, T. Voet, A. Peterson, P. Van Loo, R. R. Mathiesen, R. Fjellidal, J. Grundstad, E. Borgen, L. O. Baumbusch, B. Naume, A. L. Borresen-Dale, K. P. White, S. Nord and V. N. Kristensen (2013). "Next-generation sequencing of disseminated tumor cells." Front Oncol **3**: 320.
- Navin, N. and J. Hicks (2011). "Future medical applications of single-cell sequencing in cancer." Genome Med **3**(5): 31.
- Nguyen, L. V., C. L. Cox, P. Eirew, D. J. Knapp, D. Pellacani, N. Kannan, A. Carles, M. Moksa, S. Balani, S. Shah, M. Hirst, S. Aparicio and C. J. Eaves (2014). "DNA barcoding reveals diverse growth kinetics of human breast tumour subclones in serially passaged xenografts." Nat Commun **5**: 5871.
- Nihal M, A. N., Wood GS. (2014). "SIRT1 is upregulated in cutaneous T-cell lymphoma, and its inhibition induces growth arrest and apoptosis." Cell Cycle **13**(4): 9.
- Novelli, M., P. Fava, C. Sarda, R. Ponti, S. Osella-Abate, P. Savoia, M. Bergallo, F. Lisa, M. T. Fierro and P. Quaglino (2015). "Blood flow cytometry in Sezary syndrome: new insights on prognostic relevance and immunophenotypic changes during follow-up." Am J Clin Pathol **143**(1): 57-69.
- O'Shea, U. D., K. M. Hollowood and A. W. Boylston (1996). "Demonstration of the oligoclonality of an enteropathy associated T-cell lymphoma by monoclonal antibodies and PCR analysis of the T-cell receptor V-beta repertoire on fixed tissue." Hum Pathol **27**(5): 509-513.
- Ogura, M., T. Ishida, K. Hatake, M. Taniwaki, K. Ando, K. Tobinai, K. Fujimoto, K. Yamamoto, T. Miyamoto, N. Uike, M. Tanimoto, K. Tsukasaki, K. Ishizawa, J. Suzumiya, H. Inagaki, K. Tamura, S. Akinaga, M. Tomonaga and R. Ueda (2014). "Multicenter phase II study of mogamulizumab (KW-0761), a defucosylated anti-cc chemokine receptor 4 antibody, in patients with relapsed peripheral T-cell lymphoma and cutaneous T-cell lymphoma." J Clin Oncol **32**(11): 1157-1163.
- Ohmatsu, H., D. Humme, N. Gulati, J. Gonzalez, M. Mobs, M. Suarez-Farinas, I. Cardinale, H. Mitsui, E. Guttman-Yassky, W. Sterry and J. G. Krueger (2014). "IL32 Is Progressively Expressed in Mycosis Fungoides Independent of Helper T-cell 2 and Helper T-cell 9 Polarization." Cancer Immunol Res **2**(9): 890-900.
- Ortonne, N., S. Le Gouvello, R. Tabak, A. Marie-Cardine, J. Setiao, F. Berrehar, A. Nghe-Tang, N. Martin, M. Bagot and A. Bensussan (2012). "CD158k/KIR3DL2 and NKp46 are frequently expressed in transformed mycosis fungoides." Exp Dermatol **21**(6): 461-463.
- Paguirigan, A. L., J. Smith, S. Meshinchi, M. Carroll, C. Maley and J. P. Radich (2015). "Single-cell genotyping demonstrates complex clonal diversity in acute myeloid leukemia." Sci Transl Med **7**(281): 281re282.

- Pahl, J. and A. Cerwenka (2015). "Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity." Immunobiology.
- Palladino, C., B. Bruno and M. Boccadoro (2014). "Discovering the meaning of monoclonal gammopathy of undetermined significance: current knowledge, future challenges." Transl Med UniSa **8**: 12-18.
- Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." Nat Rev Cancer **12**(4): 252-264.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-1141.
- Patrawala, S. A., K. C. Broussard, L. Wang and J. A. Zic (2016). "Tumor stage mycosis fungoides: a single-center study on clinicopathologic features, treatments, and patient outcome." Dermatol Online J **22**(5).
- Pegram, H. J., D. M. Andrews, M. J. Smyth, P. K. Darcy and M. H. Kershaw (2011). "Activating and inhibitory receptors of natural killer cells." Immunology and cell biology **89**(2): 216-224.
- Picelli, S., A. K. Bjorklund, O. R. Faridani, S. Sagasser, G. Winberg and R. Sandberg (2013). "Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells." Nat Methods **10**(11): 1096-1098.
- Pircher, A., I. Verdorfer, A. Brunner, G. Hopfinger and M. Steurer (2014). "Paraneoplastic phenomena and diagnostic challenges in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL): report of two cases and review of the literature." In Vivo **28**(3): 327-332.
- Plaza, J. A. and M. Sanguenza (2014). "Hydroa Vacciniforme-Like Lymphoma With Primarily Periorbital Swelling: 7 Cases of an Atypical Clinical Manifestation of this Rare Cutaneous T-Cell Lymphoma." Am J Dermatopathol.
- Poszepczynska-Guigne, E., V. Schiavon, M. D'Incan, H. Echchakir, P. Musette, N. Ortonne, L. Boumsell, A. Moretta, A. Bensussan and M. Bagot (2004). "CD158k/KIR3DL2 is a new phenotypic marker of Sezary cells: relevance for the diagnosis and follow-up of Sezary syndrome." J Invest Dermatol **122**(3): 820-823.
- Qin, Y., H. P. Buermans, M. S. van Kester, L. van der Fits, J. J. Out-Luiting, S. Osanto, R. Willemze, M. H. Vermeer and C. P. Tensen (2012). "Deep-sequencing analysis reveals that the miR-199a2/214 cluster within DN3os represents the vast majority of aberrantly expressed microRNAs in Sezary syndrome." J Invest Dermatol **132**(5): 1520-1522.
- Quintanilla-Martinez, L., P. M. Jansen, M. C. Kinney, S. H. Swerdlow and R. Willemze (2013). "Non-mycosis fungoides cutaneous T-cell lymphomas: report of the 2011 Society for Hematopathology/European Association for Haematopathology workshop." Am J Clin Pathol **139**(4): 491-514.
- Ramskold, D., S. Luo, Y. C. Wang, R. Li, Q. Deng, O. R. Faridani, G. A. Daniels, I. Khrebtkova, J. F. Loring, L. C. Laurent, G. P. Schroth and R. Sandberg (2012). "Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells." Nat Biotechnol **30**(8): 777-782.

- Robson, A., C. Assaf, M. Bagot, G. Burg, J. Calonje, C. Castillo, L. Cerroni, N. Chimenti, P. Dechelotte, F. Franck, M. Geerts, S. Gellrich, J. Goodlad, W. Kempf, R. Knobler, C. Massone, C. Meijer, P. Ortiz, T. Petrella, N. Pimpelli, J. Roewert, R. Russell-Jones, M. Santucci, M. Steinhoff, W. Sterry, J. Wechsler, S. Whittaker, R. Willemze and E. Berti (2014). "Aggressive Epidermotropic Cutaneous CD8+ Lymphoma: A cutaneous lymphoma with distinct clinical and pathological features Report of an EORTC Cutaneous Lymphoma Task Force Workshop." Histopathology.
- Rotem, A., O. Ram, N. Shores, R. A. Sperling, M. Schnall-Levin, H. Zhang, A. Basu, B. E. Bernstein and D. A. Weitz (2015). "High-Throughput Single-Cell Labeling (Hi-SCL) for RNA-Seq Using Drop-Based Microfluidics." PLoS One **10**(5): e0116328.
- Saliba, A. E., A. J. Westermann, S. A. Gorski and J. Vogel (2014). "Single-cell RNA-seq: advances and future challenges." Nucleic Acids Res **42**(14): 8845-8860.
- Sarah I. Jawed, P. L. M., Steven Horwitz, Alison Moskowitz, Christiane Querfeld (2014). "Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): Part I. Diagnosis: Clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers." J Am Acad Dermatol **70**(2): 15.
- Sausville, E. A., G. F. Worsham, M. J. Matthews, R. W. Makuch, A. B. Fischmann, G. P. Schechter, A. F. Gazdar and P. A. Bunn, Jr. (1985). "Histologic assessment of lymph nodes in mycosis fungoides/Sezary syndrome (cutaneous T-cell lymphoma): clinical correlations and prognostic import of a new classification system." Hum Pathol **16**(11): 1098-1109.
- Scala, E., D. Abeni, D. Pomponi, M. G. Narducci, G. A. Lombardo, A. Mari, M. Frontani, M. C. Picchio, M. A. Pilla, E. Caprini and G. Russo (2010). "The role of 9-O-acetylated ganglioside D3 (CD60) and α 4 β 1 (CD49d) expression in predicting the survival of patients with Sezary syndrome." Haematologica **95**(11): 1905-1912.
- Scheffer, E., C. J. Meijer, W. A. van Vloten and R. Willemze (1986). "A histologic study of lymph nodes from patients with the Sezary syndrome." Cancer **57**(12): 2375-2380.
- Shalek, A. K., R. Satija, J. Shuga, J. J. Trombetta, D. Gennert, D. Lu, P. Chen, R. S. Gertner, J. T. Gaub, N. Yosef, S. Schwartz, B. Fowler, S. Weaver, J. Wang, X. Wang, R. Ding, R. Raychowdhury, N. Friedman, N. Hacohen, H. Park, A. P. May and A. Regev (2014). "Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation." Nature **510**(7505): 363-369.
- Shi, J. A., D. L. Lu, X. Huang and W. Tan (2014). "miR-219 inhibits the proliferation, migration and invasion of medulloblastoma cells by targeting CD164." Int J Mol Med **34**(1): 237-243.
- Singer, E. M., D. B. Shin, L. A. Nattkemper, B. M. Benoit, R. S. Klein, C. A. Didigu, A. W. Loren, T. Dentchev, M. Wysocka, G. Yosipovitch and A. H. Rook (2013). "IL-31 is produced by the malignant T-cell population in cutaneous T-Cell lymphoma and correlates with CTCL pruritus." J Invest Dermatol **133**(12): 2783-2785.
- Sokolowska-Wojdylo, M., J. Wenzel, E. Gaffal, J. Lenz, P. Speuser, S. Erdmann, F. Abuzahra, E. Bowman, J. Roszkiewicz, T. Bieber and T. Tuting (2005). "Circulating clonal CLA(+) and CD4(+) T cells in Sezary syndrome express the skin-homing chemokine receptors CCR4 and CCR10 as well as the lymph node-homing chemokine receptor CCR7." Br J Dermatol **152**(2): 258-264.

- Sokolowska-Wojdylo, M., J. Wenzel, E. Gaffal, J. Steitz, J. Roszkiewicz, T. Bieber and T. Tuting (2005). "Absence of CD26 expression on skin-homing CLA+ CD4+ T lymphocytes in peripheral blood is a highly sensitive marker for early diagnosis and therapeutic monitoring of patients with Sezary syndrome." Clin Exp Dermatol **30**(6): 702-706.
- Steinhoff, M., S. Schopp, C. Assaf, M. Muche, M. Beyer, W. Sterry and A. Lukowsky (2009). "Prevalence of genetically defined tumor cells in CD7 as well as CD26 positive and negative circulating T-cell subsets in Sezary syndrome." Leuk Res **33**(1): 88-99.
- Subramaniam, J. M., G. Whiteside, K. McKeage and J. C. Croxtall (2012). "Mogamulizumab: first global approval." Drugs **72**(9): 1293-1298.
- Suga, H., M. Sugaya, T. Miyagaki, H. Ohmatsu, M. Kawaguchi, N. Takahashi, H. Fujita, Y. Asano, Y. Tada, T. Kadono and S. Sato (2014). "Skin barrier dysfunction and low antimicrobial peptide expression in cutaneous T-cell lymphoma." Clin Cancer Res **20**(16): 4339-4348.
- Sun, H., T. Olsen, J. Zhu, J. Tao, B. Ponnaiya, S. A. Amundson, D. J. Brenner and Q. Lin (2015). "A Bead-Based Microfluidic Approach to Integrated Single-Cell Gene Expression Analysis by Quantitative RT-PCR." RSC Adv **5**(7): 4886-4893.
- Takahashi, Y., K. Takata, S. Kato, Y. Sato, N. Asano, T. Ogino, K. Hashimoto, Y. Tashiro, S. Takeuchi, T. Masunari, Y. Hiramatsu, Y. Maeda, M. Tanimoto and T. Yoshino (2014). "Clinicopathological analysis of 17 primary cutaneous T-cell lymphoma of the gammadelta phenotype from Japan." Cancer Sci **105**(7): 912-923.
- Takata, K., M. E. Hong, P. Sitthinamsuwan, F. Loong, S. Y. Tan, J. Y. Liau, P. P. Hsieh, S. B. Ng, S. F. Yang, T. Pongpruttipan, S. Sukpanichnant, Y. L. Kwong, Y. Hyeh Ko, Y. T. Cho, W. J. Chng, T. Matsushita, T. Yoshino and S. S. Chuang (2014). "Primary Cutaneous NK/T-cell Lymphoma, Nasal Type and CD56-positive Peripheral T-cell Lymphoma: A Cellular Lineage and Clinicopathologic Study of 60 Patients From Asia." Am J Surg Pathol.
- Talpur R, S. L., Daulat S, Liu P, Seyfer S, Trynosky T, Wei W, Duvic M (2012). " Long-term outcomes of 1,263 patients with mycosis fungoides and Sezary syndrome from 1982 to 2009." Clin Cancer Res **18**: 10.
- Tang, J., L. Zhang, X. She, G. Zhou, F. Yu, J. Xiang and G. Li (2012). "Inhibiting CD164 expression in colon cancer cell line HCT116 leads to reduced cancer cell proliferation, mobility, and metastasis in vitro and in vivo." Cancer Invest **30**(5): 380-389.
- Thode, C., A. Woetmann, H. H. Wandall, M. C. Carlsson, K. Qvortrup, C. S. Kauczok, M. Wobser, A. Printzlau, N. Odum and S. Dabelsteen (2014). "Malignant T Cells Secrete Galectins and Induce Epidermal Hyperproliferation and Disorganized Stratification in a Skin Model of Cutaneous T-Cell Lymphoma." J Invest Dermatol.
- Tirosh, I., A. S. Venteicher, C. Hebert, L. E. Escalante, A. P. Patel, K. Yizhak, J. M. Fisher, C. Rodman, C. Mount, M. G. Filbin, C. Neftel, N. Desai, J. Nyman, B. Izar, C. C. Luo, J. M. Francis, A. A. Patel, M. L. Onozato, N. Riggi, K. J. Livak, D. Gennert, R. Satija, B. V. Nahed, W. T. Curry, R. L. Martuza, R. Mylvaganam, A. J. Iafrate, M. P. Frosch, T. R. Golub, M. N. Rivera, G. Getz, O. Rozenblatt-Rosen, D. P. Cahill, M.

- Monje, B. E. Bernstein, D. N. Louis, A. Regev and M. L. Suva (2016). "Single-cell RNA-seq supports a developmental hierarchy in human oligodendroglioma." Nature **539**(7628): 309-313.
- Tuzova, M., J. Richmond, D. Wolpowitz, C. Curiel-Lewandrowski, K. Chaney, T. Kupper and W. Cruikshank (2014). "CCR4 + T cell recruitment to the skin in mycosis fungoides: potential contributions by thymic stromal lymphopoietin and interleukin-16." Leuk Lymphoma: 1-10.
- van der Fits, L., J. J. Out-Luiting, C. P. Tensen, W. H. Zoutman and M. H. Vermeer (2014). "Exploring the IL-21-STAT3 Axis as Therapeutic Target for Sezary Syndrome." J Invest Dermatol **134**(10): 2639-2647.
- van der Fits, L., J. J. Out-Luiting, M. A. van Leeuwen, J. N. Samsom, R. Willemze, C. P. Tensen and M. H. Vermeer (2012). "Autocrine IL-21 stimulation is involved in the maintenance of constitutive STAT3 activation in Sezary syndrome." J Invest Dermatol **132**(2): 440-447.
- van Doorn R, Z. W., Dijkman R, de Menezes RX, Commandeur S, Mulder AA, van der Velden PA, Vermeer MH, Willemze R, Yan PS, Huang TH, Tensen CP (2005). "Epigenetic profiling of cutaneous T-cell lymphoma: promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes including BCL7a, PTPRG, and p73." J Clin Oncol **23**(17): 11.
- van Kester MS, B. E., Benner MF, Chen XH, Saunders NJ, van der Fits L, van Doorn R, Vermeer MH, Willemze R, Tensen CP, Lawrie CH. (2011). "miRNA expression profiling of mycosis fungoides." Mol Oncol **5**(3): 8.
- Vander Lugt, B., N. J. Tubo, S. T. Nizza, M. Boes, B. Malissen, R. C. Fuhlbrigge, T. S. Kupper and J. J. Campbell (2013). "CCR7 plays no appreciable role in trafficking of central memory CD4 T cells to lymph nodes." J Immunol **191**(6): 3119-3127.
- Vandergriff, T., K. A. Nezafati, J. Susa, L. Karai, A. Sanguinetti, L. S. Hynan, J. M. Ambruzs, D. H. Oliver and A. G. Pandya (2015). "Defining early mycosis fungoides: validation of a diagnostic algorithm proposed by the International Society for Cutaneous Lymphomas." J Cutan Pathol **42**(5): 318-328.
- Vaque, J. P., G. Gomez-Lopez, V. Monsalvez, I. Varela, N. Martinez, C. Perez, O. Dominguez, O. Grana, J. L. Rodriguez-Peralto, S. M. Rodriguez-Pinilla, C. Gonzalez-Vela, M. Rubio-Camarillo, E. Martin-Sanchez, D. G. Pisano, E. Papadavid, T. Papadaki, L. Requena, J. A. Garcia-Marco, M. Mendez, M. Provencio, M. Hospital, D. Suarez-Massa, C. Postigo, D. San Segundo, M. Lopez-Hoyos, P. L. Ortiz-Romero, M. A. Piris and M. Sanchez-Beato (2014). "PLCG1 mutations in cutaneous T-cell lymphomas." Blood **123**(13): 2034-2043.
- Wang, Y. and N. E. Navin (2015). "Advances and applications of single-cell sequencing technologies." Mol Cell **58**(4): 598-609.
- Wang, Y., J. Waters, M. L. Leung, A. Unruh, W. Roh, X. Shi, K. Chen, P. Scheet, S. Vattathil, H. Liang, A. Multani, H. Zhang, R. Zhao, F. Michor, F. Meric-Bernstam and N. E. Navin (2014). "Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing." Nature **512**(7513): 155-160.

- Watanabe, R., J. E. Teague, D. C. Fisher, T. S. Kupper and R. A. Clark (2014). "Alemtuzumab therapy for leukemic cutaneous T-cell lymphoma: diffuse erythema as a positive predictor of complete remission." JAMA Dermatol **150**(7): 776-779.
- Watt, S. M., L. H. Butler, M. Tavian, H. J. Buhring, I. Rappold, P. J. Simmons, A. C. Zannettino, D. Buck, A. Fuchs, R. Doyonnas, J. Y. Chan, J. P. Levesque, B. Peault and I. Roxanis (2000). "Functionally defined CD164 epitopes are expressed on CD34(+) cells throughout ontogeny but display distinct distribution patterns in adult hematopoietic and nonhematopoietic tissues." Blood **95**(10): 3113-3124.
- Wedderburn, L. R., R. E. O'Hehir, C. R. Hewitt, J. R. Lamb and M. J. Owen (1993). "In vivo clonal dominance and limited T-cell receptor usage in human CD4+ T-cell recognition of house dust mite allergens." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 8214-8218.
- Wenzel, J., S. Henze, E. Worenkamper, E. Basner-Tschakarjan, M. Sokolowska-Wojdylo, J. Steitz, T. Bieber and T. Tuting (2005). "Role of the chemokine receptor CCR4 and its ligand thymus- and activation-regulated chemokine/CCL17 for lymphocyte recruitment in cutaneous lupus erythematosus." J Invest Dermatol **124**(6): 1241-1248.
- Willemze, R. (2003). "Cutaneous T-cell lymphoma: epidemiology, etiology, and classification." Leuk Lymphoma **44 Suppl 3**: S49-54.
- Willerslev-Olsen, A., T. Krejsgaard, L. M. Lindahl, I. V. Litvinov, S. Fredholm, D. L. Petersen, C. Nastasi, R. Gniadecki, N. P. Mongan, D. Sasseville, M. A. Wasik, C. M. Bonfeld, C. Geisler, A. Woetmann, L. Iversen, M. Kilian, S. B. Koralov and N. Odum (2016). "Staphylococcal enterotoxin A (SEA) stimulates STAT3 activation and IL-17 expression in cutaneous T-cell lymphoma." Blood **127**(10): 1287-1296.
- Wolk, K., H. Mitsui, K. Witte, S. Gellrich, N. Gulati, D. Humme, E. Witte, M. Gonsior, M. Beyer, M. E. Kadin, H. D. Volk, J. G. Krueger, W. Sterry and R. Sabat (2014). "Deficient cutaneous antibacterial competence in cutaneous T-cell lymphomas: role of Th2-mediated biased Th17-function." Clin Cancer Res.
- Wolk, K., H. Mitsui, K. Witte, S. Gellrich, N. Gulati, D. Humme, E. Witte, M. Gonsior, M. Beyer, M. E. Kadin, H. D. Volk, J. G. Krueger, W. Sterry and R. Sabat (2014). "Deficient cutaneous antibacterial competence in cutaneous T-cell lymphomas: role of Th2-mediated biased Th17 function." Clin Cancer Res **20**(21): 5507-5516.
- Wong, H. (2013). "Novel biomarkers, dysregulated epigenetics, and therapy in cutaneous T-cell lymphoma." Discov Med **16**(87): 8.
- Wysocka, M., A. V. Kossenkov, B. M. Benoit, A. B. Troxel, E. Singer, A. Schaffer, B. Kim, T. Dentchev, S. Nagata, T. Ise, L. C. Showe and A. H. Rook (2014). "CD164 and FCRL3 are highly expressed on CD4+CD26- T cells in Sezary syndrome patients." J Invest Dermatol **134**(1): 229-236.
- Xu, X., Y. Hou, X. Yin, L. Bao, A. Tang, L. Song, F. Li, S. Tsang, K. Wu, H. Wu, W. He, L. Zeng, M. Xing, R. Wu, H. Jiang, X. Liu, D. Cao, G. Guo, X. Hu, Y. Gui, Z. Li, W. Xie, X. Sun, M. Shi, Z. Cai, B. Wang, M. Zhong, J. Li, Z. Lu, N. Gu, X. Zhang, L. Goodman, L. Bolund, J. Wang, H. Yang, K. Kristiansen, M. Dean, Y. Li and J. Wang (2012). "Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor." Cell **148**(5): 886-895.

- Yawalkar, N., K. Ferenczi, D. A. Jones, K. Yamanaka, K. Y. Suh, S. Sadat and T. S. Kupper (2003). "Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma." Blood **102**(12): 4059-4066.
- Yu, C., J. Yu, X. Yao, W. K. Wu, Y. Lu, S. Tang, X. Li, L. Bao, X. Li, Y. Hou, R. Wu, M. Jian, R. Chen, F. Zhang, L. Xu, F. Fan, J. He, Q. Liang, H. Wang, X. Hu, M. He, X. Zhang, H. Zheng, Q. Li, H. Wu, Y. Chen, X. Yang, S. Zhu, X. Xu, H. Yang, J. Wang, X. Zhang, J. J. Sung, Y. Li and J. Wang (2014). "Discovery of biclonal origin and a novel oncogene SLC12A5 in colon cancer by single-cell sequencing." Cell Res **24**(6): 701-712.
- Yu, X., K. Harden, L. C. Gonzalez, M. Francesco, E. Chiang, B. Irving, I. Tom, S. Ivelja, C. J. Refino, H. Clark, D. Eaton and J. L. Grogan (2009). "The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells." Nat Immunol **10**(1): 48-57.
- Zannettino, A. C., H. J. Buhring, S. Niutta, S. M. Watt, M. A. Benton and P. J. Simmons (1998). "The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis." Blood **92**(8): 2613-2628.
- Zhao, M. J., B. Abdul-Fattah, X. Y. Qu, C. Y. Wang, X. Wang, Y. Ran, T. Lai, S. Y. Chen and C. Z. Huang (2016). "Mycosis fungoides patient accompanied actinic keratosis, actinic keratosis with squamous cell carcinoma transformation, and porokeratosis after NBUBV therapy - 1st case report and review of the literature." Medicine (Baltimore) **95**(41): e5043.
- Zhu, J. and W. E. Paul (2008). "CD4 T cells: fates, functions, and faults." Blood **112**(5): 1557-1569.
- Zhu, J. and W. E. Paul (2010). "Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors." Immunol Rev **238**(1): 247-262.
- Zhu, J., H. Yamane and W. E. Paul (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." Annu Rev Immunol **28**: 445-489.