

Posible implicación de las alteraciones moleculares de la vía de TNF en la tumorigénesis de la micosis fungoide. Descripción de un posible chip de diagnóstico molecular en micosis fungoide

Lorraine Tracey¹, Raquel Villuendas¹, Ana M. Dotor², Inmaculada Spiteri¹, Juan F. García¹, José L. Rodríguez-Peralto⁴, Francisco Vanaclocha³, Mercedes García-Rodríguez⁵, Almudena Hernández⁶, Ignacio Mora⁸, Carmen García⁹, Santiago Vidal¹⁰, Javier Fraga⁷, Luis Requena¹¹, Miguel A. Piris¹ y Pablo L. Ortiz-Romero³

¹Programa de Patología Molecular. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Madrid. España. ²Servicio de Patología. Hospital Universitario de Getafe. Madrid. España. ³Servicios de ³Dermatología y ⁴Patología. Hospital 12 de Octubre. Madrid. España. ⁵Servicio de Dermatología. Hospital Príncipe de Asturias. Alcalá de Henares. Madrid. España. ⁶Servicios de ⁶Dermatología y ⁷Patología. Hospital de la Princesa. Madrid. España. ⁸Servicio de Dermatología. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. España. ⁹Servicio de Dermatología. Hospital Virgen de la Salud. Toledo. España. ¹⁰Servicio de Dermatología. Hospital Militar Gómez Ulla. Madrid. España. ¹¹Servicio de Dermatología. Clínica de la Concepción. Madrid. España.

Resumen.—*Introducción.* El diagnóstico de la micosis fungoide es difícil, sobre todo en las fases iniciales, debido a su similitud morfológica con las dermatosis inflamatorias y la baja proporción de células tumorales en el tejido.

Pacientes, material y métodos. Se utilizaron muestras de 29 pacientes con micosis fungoide con lesiones de mancha, placa o tumor; de 24 pacientes con micosis fungoide en estadios Ia, Ib o IIa provenientes de un ensayo clínico; de 11 dermatosis inflamatorias y de piel sana no fotoexpuesta. Se analizaron empleando un chip de ADN-c construido en nuestro laboratorio.

Resultados. Este estudio ha demostrado que, empleando estudios de micromatrices de ADN-c y normalización con muestras normales de la piel, es posible detectar una firma molecular que distingue este tipo de tumor de condiciones inflamatorias comunes de la piel. Se ha revelado una firma de 27 genes implicados en la tumorigénesis de micosis fungoide. Esta firma incluye la desregulación de señalización de factor de necrosis tumoral (TNF) además de un lazo autocrino de TNF que promueve señalización antiapoptótica. Además, fue posible identificar un modelo predictivo de sólo 6 genes que permite una distinción entre casos de micosis fungoide y casos de dermatosis inflamatorias con gran precisión. Este modelo predijo correctamente el diagnóstico del 97,3% de los casos en la serie original y en 97,0% de los casos en una serie de validación de 24 pacientes con micosis fungoide con estadios bajos.

Conclusiones. Hemos encontrado un grupo de 27 genes posiblemente implicados en la tumorigénesis de la micosis fungoide. Hemos identificado un posible chip de diagnóstico de 6 genes.

Palabras clave: micosis fungoide, micromatrices de ADN-c, modelo predictivo.

Correspondencia:

Pablo L. Ortiz-Romero. Servicio de Dermatología. Hospital 12 de Octubre. Madrid. España. portiz.hdoc@salud.madrid.org

Recibido el 14 de julio de 2003.

Aceptado el 1 de septiembre de 2003.

A este trabajo se le concedió el premio Academia Española de Dermatología 2003.

Ha sido financiado por concesiones del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Bio2000-0275-c02/01 y/02, Saf2001-0060), España. L.T. tiene becas del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y del Departamento de Hematología y el Instituto de Medicina Molecular, Hospital St. James, Dublín, Irlanda (beca PRTL del Higher Education Authority de Irlanda).

MOLECULAR ALTERATIONS OF THE TNF PATHWAY MAY BE INVOLVED IN THE TUMORIGENESIS OF MYCOSIS FUNGOIDES. DESCRIPTION OF A POSSIBLE MOLECULAR DIAGNOSTIC CHIP IN MYCOSIS FUNGOIDES

Abstract.—*Introduction.* The diagnosis of mycosis fungoides (MF) is difficult, especially in the initial stages, due to its morphological similarity with inflammatory dermatoses (ID) and the low proportion of tumor cells in the tissue.

Patients, material and methods. Samples were used from 29 MF patients with spot, plaque or tumor lesions; from 24 MF patients in stages Ia, Ib or IIa from a clinical trial; and from 11 ID patients with healthy, non-photoexposed skin. They were analyzed using a cDNA chip built in our laboratory.

Results. This study showed that it is possible to detect a molecular signature that distinguishes this type of tumor from common inflammatory conditions of the skin by using cDNA micromatrix studies and standardization with normal skin samples. The signature of 27 genes involved in MF tumorigenesis was revealed. This MF signature includes the deregulation of TNF signaling, in addition to an autocrine TNF loop that promotes anti-apoptotic signaling. It was also possible to identify a predictive model with only 6 genes that enables a very accurate distinction to be made between MF and ID cases. This model correctly predicted the diagnosis of 97.3% of the cases in the original series, and 97.0% of the cases in a validation series of 24 MF patients in the early stages.

Conclusions. We have found a group of 27 genes that may be involved in the tumorigenesis of MF. We have identified a possible six-gene diagnostic chip.

Key words: mycosis fungoides, cDNA micromatrices, predictive model.

INTRODUCCIÓN

La micosis fungoide es un linfoma de células T periféricas que se caracteriza por la infiltración y acumulación de células T tumorales en la piel¹. Es el tipo más frecuente de linfoma cutáneo de células T (LCCT), y representa más de la mitad de todos los linfomas de origen en la piel².

El diagnóstico clinicopatológico de la micosis fungoide resulta muy difícil debido al hecho de que guarda muchas semejanzas con algunas dermatosis inflamatorias que se caracterizan por infiltración y acumulación de células T benignas en la piel. Además, sobre todo en fases iniciales, el bajo porcentaje de células tumorales en la piel (muy frecuentemente por debajo del 5 % de la celularidad total) también dificulta el diagnóstico.

La mayoría de casos de LCCT tienen el fenotipo de linfocitos Th de memoria (CD3+, CD4+) y una minoría de casos tiene fenotipos como CD4- o CD8+. Los casos CD8+ posiblemente representan un subgrupo agresivo de la enfermedad³. Además, la pérdida de expresión de CD7 está considerada una característica distintiva de micosis fungoide⁴.

La etiología de la micosis fungoide es fundamentalmente desconocida, aunque se han propuesto algunos factores provocadores, como estimulación crónica con antígenos⁵ o infección con el virus de la leucemia humana (HTLV-I) u otras infecciones virales. Sin embargo, los resultados de dichos estudios han sido algo polémicos^{6,7}. Estudios moleculares de micosis fungoide han revelado algunos resultados interesantes, aunque la mayoría de estos estudios moleculares están limitados a grupos pequeños de genes y proteínas. Se ha propuesto que la disrupción de señalización por FAS puede ser un mecanismo de la patogénesis de micosis fungoide, debido a defectos en señalización de apoptosis en células T de la piel⁸. Se ha descrito reducción de expresión de FAS en linfocitos CD4+ de sangre periférica en casos de LCCT⁹.

La reducción en la expresión de FAS puede ser el resultado de mutaciones de FAS, que no son frecuentes, pero se han descrito en algunos casos⁸. Los defectos en la señalización por FAS pueden ser complementados por mutaciones o defectos en la actividad de caspasas o miembros de la familia de BCL2. No obstante, estudios de BCL2¹⁰ y BAX⁸ indican que alteraciones en estos genes no tienen un papel importante en la patogénesis de la micosis fungoide. De modo parecido, el análisis molecular de P53, el gen con más frecuencia mutado en neoplasias humanas, ha ilustrado que mutaciones en este gen están presentes únicamente en casos avanzados y es poco probable que desempeñen un papel importante en la patogénesis temprana de micosis fungoide⁸. Estudios sobre p16 han revelado una reducción de la expresión de p16 en lesiones de micosis fungoide progresivas a fase tumoral^{11,12}, y algunos estudios han descrito un efecto silenciador sobre la expresión del gen p15 asociado con micosis fungoide y el síndrome de Sézary¹³. Estudios adicionales han implicado STAT1¹⁴, STAT3¹⁵, CD30¹⁶, CD40/CD40L¹⁷, IL15¹⁸, IL16¹⁸, receptores de quimocinas¹⁹ y reducción del tamaño de telómeros y actividad incrementada de telomerasas²⁰ en la patogénesis y progresión de

micosis fungoide. Últimamente, estudios *in vitro* han ilustrado que NF-kappa B puede ser importante en la patogénesis de micosis fungoide²¹.

En este estudio se han enfocado los mecanismos de tumorigénesis de micosis fungoide empleando análisis con micromatrices (chips o microchips) de ADN-c. Los datos obtenidos permiten la identificación de una firma de micosis fungoide que tiene la capacidad de distinguir entre casos de micosis fungoide y casos de dermatosis inflamatorias y es válido en un grupo aislado de casos. La técnica de micromatrices de ADN-c es una técnica muy potente que permite el análisis de la expresión de miles de genes simultáneamente. Estos estudios han revolucionado la investigación del cáncer y permiten una clasificación más precisa de los tumores²², predicción de la respuesta al tratamiento^{23,24} y predicción de supervivencia²⁵.

Estos tipos de análisis se han empleado previamente en el estudio *in vitro* de células de micosis fungoide para identificar genes que posiblemente desempeñan un papel en el desarrollo de resistencia a interferón alfa²⁴. Aquí, la técnica de micromatrices de ADN-c se ha utilizado para examinar el perfil de expresión génica en un total de 53 casos de micosis fungoide (29 pacientes en el grupo de estudio y un grupo de 24 pacientes adicionales para validación) y 11 casos de dermatosis inflamatorias. Los resultados permiten la identificación de 27 genes implicados en la tumorigénesis. Muchos de los genes identificados están directamente implicados en la señalización antiapoptótica por la ruta del factor de necrosis tumoral (TNF). Posteriormente, se ha identificado y validado un modelo predictivo de sólo 6 genes en el grupo de estudio (29 pacientes) y en el grupo de validación (24 pacientes).

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de casos

Se obtuvieron 11 muestras de dermatosis inflamatorias, 29 muestras de micosis fungoide, seis muestras de control de piel normal (no fotoexpuesta) y 24 muestras de micosis fungoide para validación en varios hospitales españoles. Todas las muestras fueron recogidas y manipuladas siguiendo un protocolo estandarizado con consentimiento informado de todos los pacientes en el estudio, supervisado por los comités éticos de los hospitales. Las muestras de micosis fungoide representan biopsias consecutivas, elegidas al azar de los hospitales colaboradores. Se revisaron centralmente por un panel de patólogos. Los diagnósticos se realizaron empleando criterios uniformes, aceptados y previamente descritos²⁶ basados en las características clínicas, histológicas, inmunofenotípicas y moleculares, con la ayuda de datos de hematoxilina-eosina, inmunohistoquímica

con CD3, CD4 y CD8, y análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de reordenamiento del gen del receptor de superficie de las células T (TCR). Las muestras de micosis fungoide representan muestras iniciales de diagnóstico de pacientes con varios estadios de enfermedad incluyendo pacientes con lesiones de mancha, placa y tumor. Los pacientes con micosis fungoide del grupo de validación (24 casos) están incluidos en un ensayo clínico y representan únicamente los estadios Ia, Ib y IIa.

Las 11 muestras de dermatosis inflamatorias representan casos de dermatitis de la interfase y dermatitis espongíotica incluidos pitiriasis rosada, lupus eritematoso sistémico, dermatitis herpetiforme, dermatitis seborreica y dermatitis espongíotica.

Preparación de muestras para estudios de micromatrices de ADN-c

Se extrajo ARN total usando Trizol (Life technologies, Inc., Grand island, NY) purificado usando el método de RNeasy (Qiagen Inc., Valencia, CA) y tratado con DNase 1 (libre de ARNsas) según las instrucciones de fabricante. Se amplificaron 1-3 μ g de ARN según un protocolo previamente descrito²⁴, empleando un sistema de transcripción *in vitro* usando T7. Se marcaron directamente con Cy5 (*cyanine 5-conjugated dUTP*) 5 μ g de ARN de cada muestra y 5 μ g de ARN de un ARN de referencia (Universal Human Reference RNA, Stratagene, La Jolla, CA) con Cy3 (*cyanine 3-conjugated dUTP*) como referencia. Todos los análisis de micromatrices de ADN-c emplearon un chip de micromatrices construido en nuestro laboratorio según un protocolo previamente descrito²⁴. La captura de imágenes se ha realizó con el Scanarray 5000 XL (GSI Lumonics, Kanata, Ontario, Canadá) y las imágenes se analizaron con el programa GenePix 4.0 Pro (Axon Instruments Inc., Union City, CA). Cada una de las muestras se analizó por duplicado. Se descartaron los resultados inconsistentes en cada una de las dos muestras analizadas.

Análisis y normalización de datos

Los datos de la intensidad de fluorescencia han sido sujetos a una resta automática de la fluorescencia de fondo y las *ratios* de Cy3/Cy5 se normalizaron frente a un valor mediana de la *ratio* de todos los puntos de la micromatriz. Se calculó la suma de las medianas del fondo y se descartaron aquellos puntos en los que el valor de intensidad total era menor que la suma de las medianas del fondo. Toda *ratio* se convirtió en escala LOG (base 2). También se descartaron los duplicados inconsistentes. Se calculó la media para todos los duplicados de clon y gen consistentes. Se excluyeron de análisis posteriores aquellos genes en

los que se obtuvieron datos consistentes en menos de 80% de las muestras analizadas de pacientes²⁷.

Para reducir el fondo de señal debido a la presencia de células normales en el tejido usado, hemos utilizado dos métodos distintos: normalización por centralización de la mediana de todos los genes en cada caso de micosis fungoide y dermatosis inflamatorias y normalización de estos casos frente al grupo de muestras de piel normal no fotoexpuesta. Dado que el segundo método tuvo más éxito en cuanto a separación de los casos empleando la técnica de agrupación jerárquica, cada muestra en el estudio se normalizó frente a una colección de muestras de piel normal. Se seleccionaron seis muestras de piel normal (no fotoexpuesta) y se calculó una media para cada gen en el que estaban disponibles datos de un mínimo de cuatro muestras. Esta media se utilizó en la normalización de todos los casos de micosis fungoide y dermatosis inflamatorias.

Agrupación jerárquica y análisis estadístico

Se empleó el programa SOTA²⁸ para los estudios de agrupación jerárquica. Los perfiles de expresión se han visualizado usando el programa TreeView. La función biológica de los genes se ha asignado usando la base de datos GENECARDS²⁹.

Para identificar genes importantes en la distinción entre casos de micosis fungoide y casos de dermatosis inflamatorias utilizamos un valor p (la versión de Welsh que no requiere varianzas iguales) y se obtuvieron valores de p no ajustados por permutaciones. Los valores de p ajustado se obtuvieron usando el método de control de la frecuencia de falsos positivos de Benjamini y Hochberg³⁰. Los genes con un valor de p no ajustado inferior a 0,001 y valor de p ajustado inferior a 0,1 se han considerado como genes significativos en la distinción de muestras de micosis fungoide y dermatosis inflamatorias.

Para validar el modelo predictivo de micosis fungoide, se utilizó el programa SOM³¹ (*Self-Organizing Map Algorithm*) para agrupar los 27 genes que se encontraron en los experimentos previos, definiendo un máximo de 7 grupos de genes.

La media calculada para cada grupo de genes se ha utilizado para validación mediante análisis discriminante (SPSS Base versión 10.0 [SPSS Inc., Chicago, IL]) en el grupo de pacientes del estudio (29 casos) y en el grupo de validación (24 casos). Para identificar un subgrupo reducido de genes predictivo, se seleccionó el gen con el valor de p más bajo de cada agrupación de genes identificado por SOM. El modelo predictivo de 6 genes se validó mediante análisis discriminante en el grupo de pacientes del estudio (29 casos) y en el grupo de validación (24 casos).

RESULTADOS

Normalización de datos

Hemos realizado estudios preliminares con 6 casos de dermatosis inflamatorias y 8 casos de micosis fungoide. El estudio de agrupamiento jerárquico no demostró separación de las muestras (fig. 1A). Teniendo en cuenta que en muchos casos de micosis fungoide y dermatosis inflamatorias el infiltrado de células T supone menos del 10 % de todas las células del tejido, tratamos de eliminar la señal debido a células normales en ambos tejidos. Para esto, intentamos dos métodos de normalización: a) normalización por centralización de la mediana de señal de todos los genes en cada caso de micosis fungoide y dermatosis inflamatorias, y b) normalización de casos de micosis fungoide y dermatosis inflamatorias frente a grupo de muestras de piel normal no fotoexpuesta. Este segundo método obtuvo resultados óptimos. En la figura 1B se puede observar cómo se separan perfectamente las señales moleculares de las micosis fungoide y las dermatosis inflamatorias (fig. 1B). Consideramos entonces que este método de normalización es válido para enriquecer los datos obtenidos de este tipo de muestras, en las que la proporción de células tumorales es baja, y permite una agrupación y clasificación de estos tumores. Durante el resto de este estudio, este tipo de normalización se ha aplicado en todos los datos de cada paciente, usando un total de seis muestras de piel normal.

Firma molecular de micosis fungoide: expresión diferencial con pieles inflamatorias

A fin de identificar genes implicados en la tumorigénesis de la micosis fungoide se utilizaron un total de 29 muestras de micosis fungoide y 11 muestras de dermatosis inflamatorias. Los datos de los estudios de micromatrices de ADN-c de cada uno de estos casos se normalizaron contra la señal media a partir de 6 muestras piel normal no fotoexpuesta. Usando el método de t de Student, con un valor p ajustado (tabla 1), se identificaron 27 genes significativos en la separación de casos de micosis fungoide y dermatosis inflamatorias (tabla 1).

El patrón de la expresión de estos 27 genes es notablemente diferente entre los casos de ambos procesos (fig. 2). Estos genes están implicados en una variedad grande de funciones como el control del ciclo celular, apoptosis y transducción de señales. Sin embargo, el resultado más llamativo es la inducción de expresión de 7 genes implicados directamente en señalización por la vía de TNF incluyendo genes como *TRAF1*, *BIRC3* y *TNFSF5*.

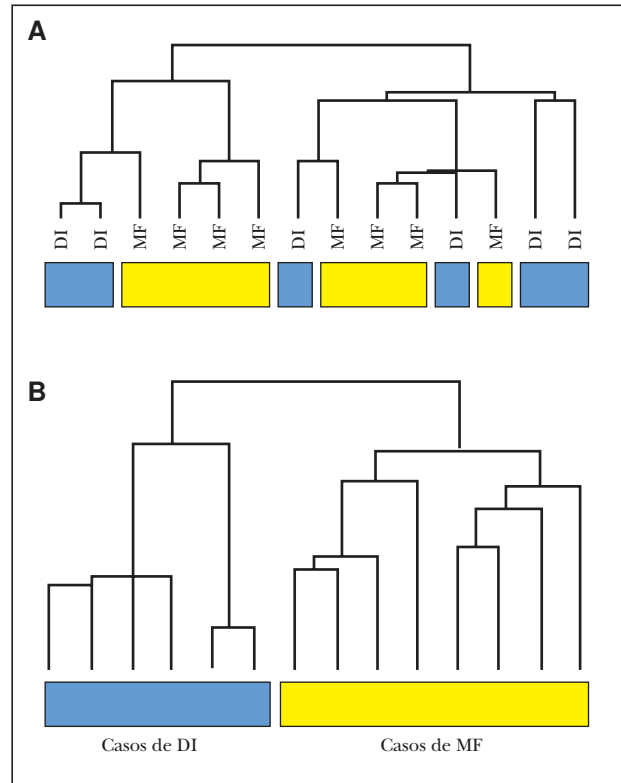


Fig. 1.—Agrupación jerárquica de datos brutos (sin normalizar) y datos normalizados de casos de micosis fungoide (MF) y dermatosis inflamatorias (DI). A) Utilizando los datos brutos (sin normalizar) en 8 casos de micosis fungoide y en 6 casos de dermatosis inflamatorias, no fue posible la separación de los grupos. B) Normalizando las muestras frente a pieles normales se consiguieron separar los casos de micosis fungoide de los de dermatosis inflamatorias.

Construcción y validación del modelo de predicción de micosis fungoide

Usando el algoritmo de SOM, sobre los 27 genes significativos en la separación de casos de micosis fungoide de casos de dermatosis inflamatorias, se demostraron seis agrupamientos de genes (fig. 3), es decir, que los 27 genes pertenecían a seis familias distintas. Posteriormente, de cada una de esas familias se escogió el gen que tenía la máxima significación estadística (valor de p más bajo), con lo que se obtuvo un conjunto de 6 genes representativo del grupo original de 27 genes (tabla 2).

Utilizando el grupo inicial de 27 genes, el 100 % de las muestras se podían diagnosticar perfectamente como micosis fungoide o como dermatosis inflamatorias (tabla 3). Posteriormente utilizamos este conjunto de 6 genes (tabla 2) para ver si se podía discriminar de manera aceptable entre las muestras de micosis fungoide y las de dermatosis inflamatorias. Al aplicar este pequeño grupo de genes sobre los 29 casos de micosis iniciales (que incluían lesiones en mancha, placa y tumor) y las dermatosis, el 97,3 % de los casos quedó identificado en una u otra

TABLA 1. 27 GENES QUE DIFERENCIAN DE MANERA SIGNIFICATIVA LOS CASOS DE MICOSIS FUNGOIDE DE LOS CASOS DE DERMATOSIS INFLAMATORIAS

<i>Símbolo del gen</i>	<i>Valor de p no ajustado</i>	<i>Valor de p ajustado</i>	<i>Función</i>
FJX1	0,00002000	0,0210896	Diferenciación y desarrollo
Hs.127160	0,00002000	0,0210896	EST – función desconocida
STAT4	0,00002000	0,0210896	Traducción de señales, diferenciación/proliferación de células T
SYNE-1B	0,00004000	0,0210896	Traducción de señales
CDC16	0,00004000	0,0210896	Control de ciclo celular
BCL7A	0,00004000	0,0210896	Oncogénesis
TRAF1	0,00006000	0,0210896	Inhibición de apoptosis, señalización por TNF
BIRC3	0,00006000	0,0210896	Inhibición de apoptosis
PRO0823	0,00006000	0,0210896	Proteína teórica – función desconocida
WBSCR14	0,00006000	0,0210896	Diferenciación y proliferación
ITGAX	0,00010000	0,0319539	Integrina, adhesión celular
MGC5363	0,00014000	0,0395430	Proteína teórica – función desconocida
LYN	0,00016000	0,0395430	Traducción de señales, oncogén
EBI2	0,00016000	0,0395430	Inducido por EBV, traducción de señales, respuesta inmunitaria
BARX2	0,00018000	0,0395430	Diferenciación y desarrollo, adhesión celular
FBP17	0,00018000	0,0395430	Unión con formin
RASSF2	0,00022000	0,0454873	Oncogén
WASPIP	0,00026000	0,0507712	Organización del citosqueleto, traducción de señales
LCP2	0,00031999	0,0562389	Traducción de señales en células T
PCTAIRE2BP	0,00031999	0,0562389	Control de ciclo celular
HCK	0,00033999	0,0569084	Traducción de señales
DEDD	0,00037999	0,0607124	Apoptosis
ACTN1	0,00039999	0,0611292	Organización del citosqueleto
SELP	0,00043999	0,0644404	Adhesión celular
CD5	0,00047999	0,0674867	Marcador de células T, proliferación de células T
UBE2L3	0,00061999	0,0838176	Vía de ubiquitina
TNFRSF5	0,00069999	0,0911278	Familia de TNF, activación de células T, inhibición de apoptosis

EST: ???; TNF: factor de necrosis tumoral; VEB: virus de Epstein-Barr.

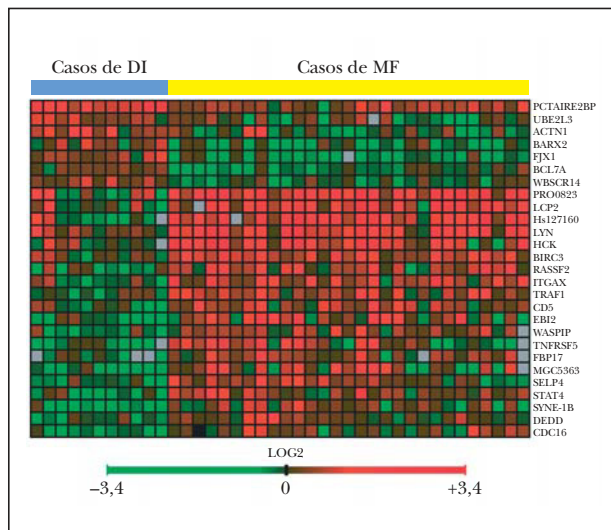


Fig. 2.—Imagen del microchip de ADN-c que muestra los 27 genes significativos en la separación de casos de micosis fungoide (MF) y casos de dermatosis inflamatorias (DI) (29 muestras de MF, 11 muestras de DI). Véase la casi perfecta separación de la imagen en cuatro cuadrantes. En rojo se representan los genes sobreexpresados. El cuadrante superior izquierdo muestra los 7 genes sobreexpresados en las muestras de DI. En el cuadrante inferior derecho, los 20 genes sobreexpresados en las muestras de MF.

de los casos quedó identificado en una u otra enfermedad (tabla 3).

Para la validación de estos resultados, utilizamos las muestras procedentes del ensayo clínico de micosis fungoide en estadios Ia, Ib y IIa. El grupo inicial de 27 genes volvió a identificar correctamente el 100 % de las muestras (tabla 3A). Además, el grupo reducido de 6 genes permitió el diagnóstico del 97,0 % de las muestras (tabla 3B).

DISCUSIÓN

Normalización de datos

Para entender mejor la tumorigénesis de micosis fungoide, se analizaron muestras de pacientes con esta enfermedad y las de dermatosis inflamatorias usando una micromatriz de ADN-c, que se ha diseñado específicamente para el estudio de cáncer²⁴. Los datos en bruto de cada muestra se normalizaron a un promedio de la señal de un grupo de piel normal (no fotoexpuesta), para reducir la señal que venía de células normales en el tejido. Este paso ha conseguido reducir el ruido de fondo en estas muestras donde las

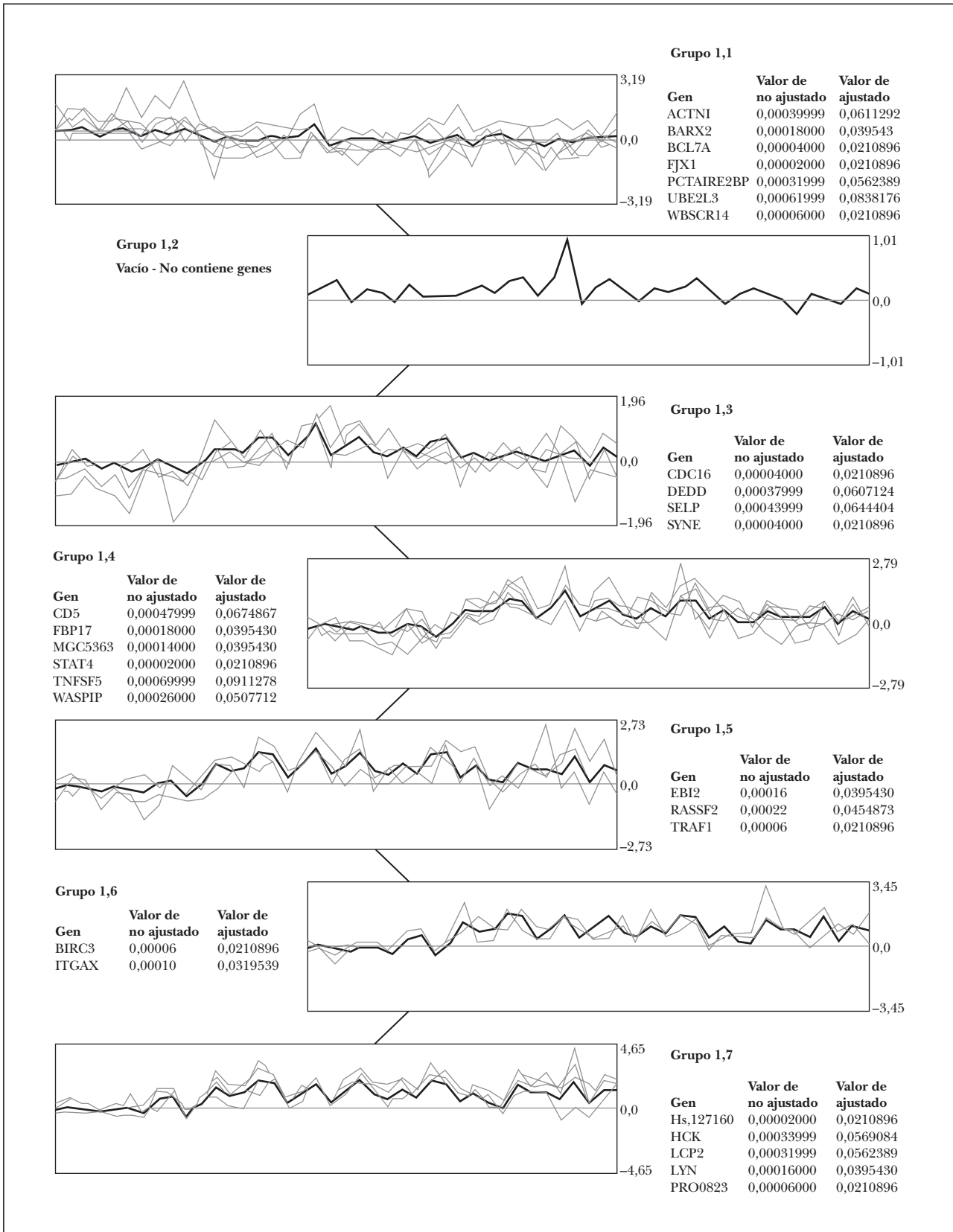


Fig. 3.—Agrupación de genes por el algoritmo de SOM. Selección de un modelo predictivo de micosis fungoide (MF). La agrupación de genes utilizando el algoritmo de SOM identificó 6 grupos de genes relevantes dentro del grupo de 27 genes implicados en la tumorigénesis de la MF. Para construir el modelo predictivo de MF con 6 genes se seleccionó el gen con el valor p más bajo en cada grupo.

TABLA 2. MODELO PREDICTIVO CON 6 GENES EN MICOSIS FUNGOIDE

<i>Símbolo del gen</i>	<i>Valor de p no ajustado</i>	<i>Valor de p ajustado</i>	<i>Función</i>
FJX1	0,00002000	0,0210896	Diferenciación y desarrollo
Hs.127160	0,00002000	0,0210896	EST – función desconocida
STAT4	0,00002000	0,0210896	Traducción de señales, diferenciación/proliferación de células T
SYNE-1B	0,00004000	0,0210896	Traducción de señales
TRAF1	0,00006000	0,0210896	Inhibición de apoptosis, señalización por TNF
BIRC3	0,00006000	0,0210896	Inhibición de apoptosis

EST: ???; TNF: factor de necrosis tumoral.

TABLA 3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DISCRIMINANTE

	<i>Clase</i>	<i>Clase prevista</i>		<i>Total</i>
		<i>Micosis fungoide</i>	<i>Dermatitis inflamatorias</i>	
<i>Modelo de 27 genes*</i>				
<i>Serie original</i>				
Número	Micosis fungoide	29	0	29
	Dermatitis inflamatorias	0	11	11
Porcentaje	Micosis fungoide	100	0	100
	Dermatitis inflamatorias	0	100	100
<i>Grupo de validación</i>				
Número	Micosis fungoide	24	0	24
	Dermatitis inflamatorias	0	11	11
Porcentaje	Micosis fungoide	100	0	100
	Dermatitis inflamatorias	0	100	100
<i>Modelo predictivo con 6 genes**</i>				
<i>Serie original</i>				
Número	Micosis fungoide	27	0	27
	Dermatitis inflamatorias	1	9	10
Porcentaje	Micosis fungoide	100	0	100
	Dermatitis inflamatorias	10	90	100
<i>Grupo de validación</i>				
Número	Micosis fungoide	22	1	23
	Dermatitis inflamatorias	0	10	10
Porcentaje	Micosis fungoide	95,7	4,3	100
	Dermatitis inflamatorias	0	100	100

Se muestran los datos de la serie original (29 casos de micosis fungoide y 11 casos de dermatitis inflamatorias) y del grupo de validación (24 casos de micosis fungoide).

* El 100% de los casos de la serie original quedan clasificados correctamente; el 100% de los casos del grupo de validación quedan clasificados correctamente.

** Se han incluido todos los casos de los que se disponían todos los datos para los 6 genes: el 97,3% de los casos de la serie original quedan clasificados correctamente; el 97,0% de los casos del grupo de validación quedan clasificados correctamente.

células tumorales suponen menos del 10% de las células totales y subsiguiente agrupación de muestras en subgrupos correctos (fig. 1B). Sin esta normalización, la separación de las muestras por métodos de agrupación jerárquicos no hubiera sido posible (fig. 1A).

Activación de la vía antiapoptótica del camino de TNF en la tumorigénesis de micosis fungoide

Usando los datos normalizados de micromatrices de ADN-c a partir de 29 pacientes con micosis fungoide y de 11 pacientes de dermatitis inflamatorias, se identificaron 27 genes. La expresión de los 27 genes es perceptiblemente diferente entre casos de una y otra enfermedad (tabla 1) (fig. 2). Veinte de los 27 genes identificados estaban sobreexpresados en los casos de micosis fungoide

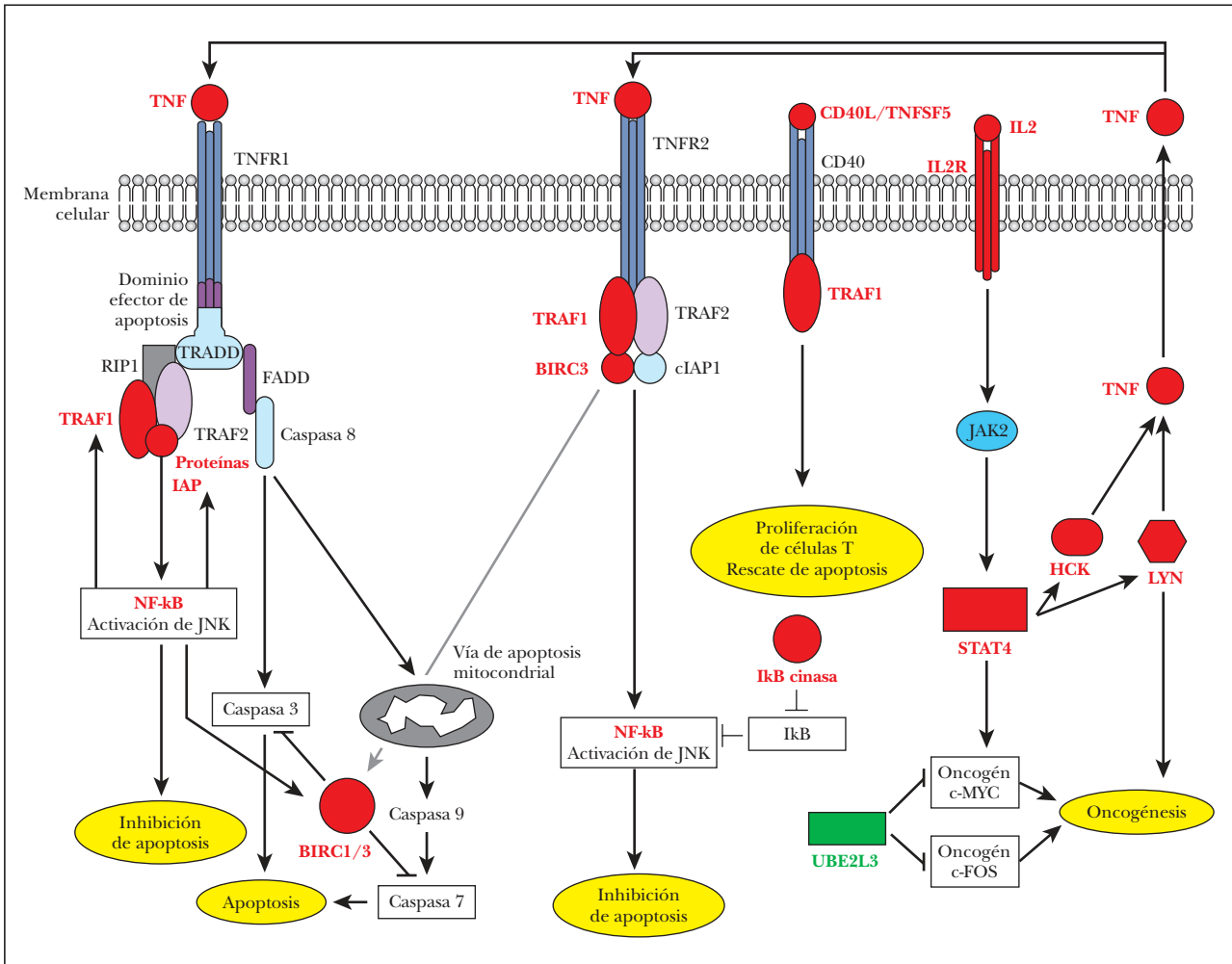


Fig. 4.—Desregulación de señalización de TNF en la tumorigénesis de micosis fungoide (MF): una combinación de señalización antiapoptótica por TNFR1, impulsado por la sobreexpresión de *TRAF1* y proteínas de la familia BIRC/IAP. La señalización apoptótica de TNFR1 está reprimida por la inhibición de caspasas por BIRC1/BIRC3. La señalización antiapoptótica por TNFR2 está activada debido a la sobreexpresión de TRAF1 y BIRC3. La sobreexpresión de CD40L/TNFSF5 puede inducir proliferación de células T por el receptor de CD40 y TRAF1. La sobreexpresión de IL2R activa Jak2 y STAT4 e induce la expresión subsiguiente de los oncogenes *c-MYC*, *LYN* y *HCK*. Los oncogenes *LYN* y *HCK* participan en un lazo de realimentación de la señalización antiapoptótica de TNF debido a la producción endógena de TNF y la autoestimulación subsiguiente de TNFR1 y TNFR2. Texto rojo: genes sobreexpresados en casos de MF. Texto verde: genes reprimidos en casos de MF.

mientras que los 7 genes restantes estaban reprimidos en los casos de micosis fungoide (o lo que es lo mismo, sobreexpresados en las dermatosis inflamatorias).

Lo más interesante es la observación de la sobreexpresión de 7 genes implicados directamente en la regulación de señalización de TNF, incluyendo *BIRC3*, un miembro de la familia «proteína inhibidora de apoptosis» (IAP), regulada transcricionalmente por NF-κB³². Los genes de esta familia se caracterizan por la presencia de una región IAP o región BIR³³, esencial para sus efectos antiapoptóticos³²; *BIRC3* o *c-IAP2* poseen el dominio antiapoptótico BIR³², un dominio de CARD para unión a caspasas y un dominio RING para la degradación de proteínas diana³⁴ tal como caspasas 3 y 7³⁵ (fig. 4). El *BIRC1* también conocido como NAIP, que se une a la región

citoplásmica de *TNFR2*, el receptor tipo 2 de TNF³⁶. También fue encontrado como gen sobreexpresado en los casos de micosis fungoide (fig. 4). Sin embargo, la significación de esta sobreexpresión era justo fuera del rango considerado aquí ($p = 0,00088$; p -ajustado = $0,100698$). El *BIRC1*, aunque carece de los dominios CARD o RING que se mencionan arriba, ejerce su acción antiapoptótica inhibiendo caspasas 3 y 7 a través de sus dominios BIR³⁷ (fig. 4).

El *TRAF1* se ha identificado aquí como un gen sobreexpresado en los casos de micosis fungoide, lo que extiende las observaciones anteriores referentes a la importancia de *TRAF1* en los linfomas de células B³⁸. El *TRAF1* es inducible por NF-κB³⁹ e interactúa con *TNFR2* y varios miembros de la familia de TNF como CD40^{40,41} (fig. 4). TNFR2, un receptor de la superfamilia de TNF que carece del dominio intrace-

lular de muerte celular, media la señalización de supervivencia reclutando *TRAF1*, *TRAF2*^{36,42} y proteínas inhibidoras de apoptosis como *BIRC3*. El *TNFR2* activa NF-κB y las vías de supervivencia de JNK^{36,42-44} y el complejo de proteínas de IAP/BIRC del receptor inhiben señalización apoptótica (fig. 4).

El receptor de TNF tipo 1, *TNFR1*, posee un dominio intracelular de muerte e induce apoptosis por el reclutamiento de TRADD y la activación subsiguiente de caspasa 8 a través de una proteína adaptadora, FADD^{44,45} (fig. 4). No obstante, TRAF2 se une con alta afinidad a TRADD⁴⁶ y el reclutamiento subsiguiente de RIP1, TRAF1 y proteínas de la familia IAP/BIRC, conduce a la supresión de señales apoptóticas de este receptor^{32,46} (fig. 4).

El TNFSF5 (CD40L o TRAP) es un miembro de la familia de TNF implicado en la prevención de apoptosis y en el aumento de la proliferación celular^{47,48}. La expresión de CD40L se ha descrito previamente en casos de micosis fungoide donde fue sugerido que CD40L pudo desempeñar un papel en un lazo paracrino importante para la prevención de apoptosis y/o regulación positiva de crecimiento¹⁷. También se ha sugerido que la expresión de CD40L puede ser importante para el acuartelamiento en piel de las células T neoplásicas¹⁷ (fig. 4).

El HCK y el oncogén *LYN* son tirosincinasas sobreexpresadas en casos de micosis fungoide. El HCK es responsable de la producción de TNF en células murinas⁴⁹ y HCK y *LYN* han estado implicados en la producción de TNF en monocitos humanos⁵⁰. En este estudio, además de sobreexpresión de HCK y de *LYN* en casos de micosis fungoide, el TNF estaba sobreexpresado, aunque la significación era justa fuera del rango riguroso usado aquí.

Además, HCK⁵¹ y *LYN*⁵² y el oncogén *c-MYC*⁵³ son inducidos por IL-2 a través de la activación de JAK2 y de STAT4. En este estudio, STAT4 está sobreexpresado en los casos de micosis fungoide, al igual que el receptor IL-2 (IL2R), pero con una significación más baja. Según los resultados de este estudio, es posible que en casos de micosis fungoide, la sobreexpresión de HCK y *LYN*, inducido por IL2, conduzca a la producción de TNF y señalización antiapoptótica por *TNFR1* y *TNRF2* (fig. 4).

La UBE2L3, una proteína de la vía de ubiquitina, también conocida como UbcH7, es reprimida en esta serie de micosis fungoide. Esta proteína está implicada en ubiquitinización y degradación de los oncogenes *MYC*⁵⁴ y *c-FOS*⁵⁵. Por lo tanto, la expresión reprimida de UBE2L3 en casos de micosis fungoide puede ayudar a la tumorigénesis de micosis fungoide (fig. 4).

Puesto que solamente los genes con un máximo de 20 % de valores desconocidos se podían incluir en este estudio, se excluyeron del análisis muchos genes con un papel posible en esta vía. Haciendo un promedio de los patrones de la expresión génica para

los subgrupos de micosis fungoide y dermatosis inflamatorias para los genes con más de 20 % valores desconocidos, se proporciona una cierta evidencia de soporte para este modelo. Brevemente, NF-κB está sobreexpresado en los casos de micosis fungoide comparado con los casos de dermatosis inflamatorias (1,54 veces más expresión de NFκB1), mientras que IL2 demuestra una expresión mayor (1,86 veces más) en los casos de micosis fungoide (fig. 4). La cinasa IκB, responsable de la fosforilación de IκB y por lo tanto de la activación de NF-κB, también demostró una tendencia a estar sobreexpresado en casos de micosis fungoide. Finalmente, en estos casos también hay un aumento muy leve en la expresión de los genes implicados en las vías proliferativas e inflamatorias de JNK y p38 (JunB, JunD, MAPK14 (p38), ATF3 y TRAF2) y en las vías de la activación de NF-κB (miembros de la familia HSP90, CDC37 y TRAF2).

En conclusión, la tumorigénesis de micosis fungoide se asocia a cambios en la regulación de una combinación de señalización antiapoptótica por *TNFR1* (inducido por sobreexpresión de TRAF1 y BIRC/IAP) y la inhibición de las vías apoptóticas de *TNFR1* (por la inhibición de la caspasa por BIRC1/BIRC3). Además, la señalización antiapoptótica por *TNFR2* sigue estando activa según lo señalado por la sobreexpresión de TRAF1 y BIRC3.

La sobreexpresión de CD40L/TNFSF5 contribuye a la tumorigénesis de micosis fungoide induciendo la proliferación de células T por el receptor CD40 y TRAF1. La IL-2 también puede desempeñar un papel crítico en la tumorigénesis de micosis fungoide a través de su receptor, activando JAK2 y STAT4 y posteriormente induciendo la expresión de oncogenes *c-MYC*, *LYN* y *HCK*.

Finalmente, *LYN* y HCK participan en un lazo autocrino, participando en la producción endógena de TNF y subsiguiente activación de *TNFR1* y *TNFR2*, lo que autoestimula la activación de la vía de supervivencia de TNF. El silencio de la vía apoptótica de TNF puede ser debido a la sobreexpresión de BIRC1/BIRC3 y la inhibición de caspasas.

Modelo predictivo de micosis fungoide

El modelo predictivo que usa la señal media de los racimos de los 27 genes puede asignar correctamente la clase (micosis fungoide o dermatosis inflamatorias) en el 100 % de la serie de micosis fungoide y en un grupo de validación de 24 casos. Posteriormente se eligió el gen con el valor p más bajo de cada racimo (fig. 3) (tabla 2) y este modelo predictivo de 6 genes clasificó correctamente 97,3 % de la serie original y 97,0 % de la serie de validación. La validación de este modelo tiene un peso adicional porque la serie de validación consta únicamente de casos de bajo estadio clínico y representan casos cuya histología se parece más a los casos de dermatosis inflamatorias, y por lo

tanto, se trata de casos en los que el diagnóstico clásico es más difícil.

En conclusión, este estudio ha demostrado que, empleando estudios de micromatrices de ADN-c y normalización con muestras normales de la piel, es posible detectar una firma molecular que distingue este tipo de tumor de condiciones inflamatorias comunes de la piel. Esta firma de micosis fungoide incluye la desregulación de señalización de TNF además de un lazo autocrino de TNF que promueve señalización antiapoptótica. Además, fue posible identificar un modelo predictivo de sólo 6 genes que permite una distinción entre casos de micosis fungoide y casos de dermatosis inflamatorias en el 97,3 % de los casos en la serie original y en el 97,0 % de los casos en una serie de validación de 24 pacientes con micosis con estadios bajos.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Isabel Fernández y Mar López por su ayuda con la extracción del ARN del tejido congelado y de la amplificación subsiguiente. Gracias también a los miembros del departamento de análisis de *microarray* por la ayuda con la preparación e hibridación de las muestras. Agradecemos a Ramón Díaz y Javier Herrero, ambos de la unidad de bioinformática del CNIO, su ayuda y consejo sobre métodos estadísticos y agrupación jerárquica, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Siegel RS, Pandolfino T, Guitart J, Rosen S, Kuzel TM. Primary cutaneous T-cell lymphoma: Review and current concepts. *J Clin Oncol* 2000;18:2908-25.
- Edelson RL. Cutaneous T cell lymphoma: Mycosis fungoides, Sezary syndrome, and other variants. *J Am Acad Dermatol* 1980;2:89-106.
- Berti E, Tomasini D, Vermeer MH, Meijer CJ, Alessi E, Willemze R. Primary cutaneous CD8-positive epidermotropic cytotoxic T cell lymphomas. A distinct clinicopathological entity with an aggressive clinical behavior. *Am J Pathol* 1999;155:483-92.
- Murphy M, Fullen D, Carlson JA. Low CD7 expression in benign and malignant cutaneous lymphocytic infiltrates: Experience with an antibody reactive with paraffin-embedded tissue. *Am J Dermatopathol* 2002;24:6-16.
- Wood GS. Lymphocyte activation in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 1995;105:105S-9S.
- Hall WW, Liu CR, Schneewind O, Takahashi H, Kaplan MH, Roupe G, et al. Deleted HTLV-I provirus in blood and cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Science* 1991;253:317-20.
- Wood GS, Schaffer JM, Boni R, Dummer R, Burg G, Takeshita M, et al. No evidence of HTLV-I proviral integration in lymphoproliferative disorders associated with cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Pathol* 1997;150:667-73.
- Dereure O, Levi E, Vonderheid EC, Kadin ME. Infrequent Fas mutations but no Bax or p53 mutations in early mycosis fungoides: A possible mechanism for the accumulation of malignant T lymphocytes in the skin. *J Invest Dermatol* 2002;118:949-56.
- Dereure O, Portales P, Clot J, Guilhou JJ. Decreased expression of Fas (APO-1/CD95) on peripheral blood CD4+ T lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol* 2000;143:1205-10.
- Dummer R, Michie SA, Kell D, Gould JW, Haeffner AC, Smoller BR, et al. Expression of bcl-2 protein and Ki-67 nuclear proliferation antigen in benign and malignant cutaneous T-cell infiltrates. *J Cutan Pathol* 1995;22:11-7.
- Navas IC, Algara P, Mateo M, Martínez P, García C, Rodríguez JL, et al. p16 (INK4a) is selectively silenced in the tumoral progression of mycosis fungoides. *Lab Invest* 2002; 82:123-32.
- Navas IC, Ortiz-Romero PL, Villuendas R, Martínez P, García C, Gómez E, et al. p16 (INK4a) gene alterations are frequent in lesions of mycosis fungoides. *Am J Pathol* 2000; 156:1565-72.
- Scarlsbrick JJ, Woolford AJ, Calonje E, Photiou A, Ferreira S, Orchard G, et al. Frequent abnormalities of the p15 and p16 genes in mycosis fungoides and sezary syndrome. *J Invest Dermatol* 2002;118:493-99.
- Qin JZ, Kamarashev J, Zhang CL, Dummer R, Burg G, Dobbeling U. Constitutive and interleukin-7- and interleukin-15-stimulated DNA binding of STAT and novel factors in cutaneous T cell lymphoma cells. *J Invest Dermatol* 2001;117:583-9.
- Nielsen M, Kaltoft K, Nordahl M, Ropke C, Geisler C, Mustelin T, et al. Constitutive activation of a slowly migrating isoform of Stat3 in mycosis fungoides: Tyrphostin AG490 inhibits Stat3 activation and growth of mycosis fungoides tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6764-9.
- LeBoit PE. Lymphomatoid papulosis and cutaneous CD30+ lymphoma. *Am J Dermatopathol* 1996;18:221-35.
- Storz M, Zeppter K, Kamarashev J, Dummer R, Burg G, Haffner AC. Coexpression of CD40 and CD40 ligand in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides). *Cancer Res* 2001;61:452-4.
- Asadullah K, Haeussler-Quade A, Gellrich S, Hanneken S, Hansen-Hagge TE, Docke WD, et al. IL-15 and IL-16 overexpression in cutaneous T-cell lymphomas: Stage-dependent increase in mycosis fungoides progression. *Exp Dermatol* 2000;9:248-51.
- Jones D, O'Hara C, Kraus MD, Pérez-Atayde AR, Shahsafaei A, Wu L, et al. Expression pattern of T-cell-associated chemokine receptors and their chemokines correlates with specific subtypes of T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2000;96:685-90.
- Wu KD, Hansen ER. Shortened telomere length is demonstrated in T-cell subsets together with a pronounced increased telomerase activity in CD4 positive T cells from blood of patients with mycosis fungoides and parapsoriasis. *Exp Dermatol* 2001;10:329-36.
- Izban KF, Ergin M, Qin JZ, Martínez RL, Pooley RJ, Saeed S, et al. Constitutive expression of NF-kappa B is a characteristic feature of mycosis fungoides: Implications for apoptosis resistance and pathogenesis. *Hum Pathol* 2000; 31:1482-90.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma

- identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403:503-11.
23. Staunton JE, Slonim DK, Collier HA, Tamayo P, Angelo MJ, Park J, et al. Chemosensitivity prediction by transcriptional profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10787-92.
 24. Tracey L, Villuendas R, Ortiz P, Dopazo A, Spiteri I, Lombardia L, et al. Identification of Genes Involved in Resistance to Interferon-alpha in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Am J Pathol* 2002;161:1825-37.
 25. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002;8:68-74.
 26. Jaffe ES HN, Stein H, Vardiman JW. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World health organization classification of tumours. Lyon: IARC Press, 2001.
 27. Herrero J, Díaz-Uriarte R, Dopazo J. Gene expression data preprocessing. *Bioinformatics* 2003;19:655-6.
 28. Herrero J, Valencia A, Dopazo J. A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics* 2001;17:126-36.
 29. Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, Lancet D. GeneCards: A novel functional genomics compendium with automated data mining and query reformulation support. *Bioinformatics* 1998;14:656-64.
 30. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Statistical Society, Series B* 1995;57:289-300.
 31. Kohonen T. Self Organizing Maps. Berlin: Springer Verlag, 1997.
 32. Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli KJ, Thompson CB, Armstrong RC. Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c. *Mol Cell Biol* 1998;18:608-15.
 33. Miller LK. An exegesis of IAPs: Salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* 1999;9:323-8.
 34. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388:300-4.
 35. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* 1997;16:6914-25.
 36. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995;83:1243-52.
 37. Maier JK, Lahoua Z, Gendron NH, Fetni R, Johnston A, Davoodi J, et al. The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *J Neurosci* 2002;22:2035-43.
 38. Zapata JM, Krajewska M, Krajewski S, Kitada S, Welsh K, Monks A, et al. TNFR-associated factor family protein expression in normal tissues and lymphoid malignancies. *J Immunol* 2000;165:5084-96.
 39. Schwenzer R, Siemienski K, Liptay S, Schubert G, Peters N, Scheurich P, et al. The human tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1999;274:19368-74.
 40. Pullen SS, Labadia ME, Ingraham RH, McWhirter SM, Everdeen DS, Alber T, et al. High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry* 1999;38:10168-77.
 41. Pullen SS, Dang TT, Crute JJ, Kehry MR. CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs. *J Biol Chem* 1999;274: 14246-54.
 42. Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1994;78:681-92.
 43. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: Blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:401-10.
 44. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11:372-7.
 45. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996;84: 299-308.
 46. Park YC, Ye H, Hsia C, Segal D, Rich RL, Liou HC, et al. A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell* 2000;101:777-87.
 47. Aldinucci D, Poletto D, Nanni P, Degan M, Rupolo M, Pinto A, et al. CD40L induces proliferation, self-renewal, rescue from apoptosis, and production of cytokines by CD40-expressing AML blasts. *Exp Hematol* 2002;30: 1283-92.
 48. Tsubata T, Wu J, Honjo T. B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40. *Nature* 1993;364:645-8.
 49. English BK, Ihle JN, Myracle A, Yi T. Hck tyrosine kinase activity modulates tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J Exp Med* 1993;178:1017-22.
 50. Beaty CD, Franklin TL, Uehara Y, Wilson CB. Lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes: Role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *Eur J Immunol* 1994;24: 1278-84.
 51. Bosco MC, Curiel RE, Zea AH, Malabarba MG, Ortaldo JR, Espinoza-Delgado I. IL-2 signaling in human monocytes involves the phosphorylation and activation of p59hck. *J Immunol* 2000;164:4575-85.
 52. Torigoe T, Saragovi HU, Reed JC. Interleukin 2 regulates the activity of the lyn protein-tyrosine kinase in a B-cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2674-8.
 53. Grigorieva I, Grigoriev VG, Rowney MK, Hoover RG. Regulation of c-myc transcription by interleukin-2 (IL-2). Identification of a novel IL-2 response element interacting with STAT4. *J Biol Chem* 2000;275:7343-50.
 54. Gross-Mesilaty S, Reinstein E, Bercovich B, Tobias KE, Schwartz AL, Kahana C, et al. Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8058-63.
 55. Moynihan TP, Cole CG, Dunham I, O'Neil L, Markham AF, Robinson PA. Fine-mapping, genomic organization, and transcript analysis of the human ubiquitin-conjugating enzyme gene UBE2L3. *Genomics* 1998;51:124-7.