

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Biologia e Patologia Molecolare

Ciclo XXII

STUDIO SULLA FUNZIONE DI CLUSTERINA NEL
LINFOMA DI HODGKIN

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Gian Carlo Gazzola

Tutor:

Chiar.mo Prof. Saverio Bettuzzi

Dottorando: Dott. Raffaele Frazzi

INDICE

Introduzione	pag. 2
- Caratteri fondamentali dei linfomi di Hodgkin	pag. 3
- CLUSTERINA: una proteina nota con diverse denominazioni e caratterizzata da una molteplicità di funzioni	pag. 6
- Un gene, tre trascritti	pag. 7
- La forma secretoria di clusterina	pag. 8
- Clusterina nel linfoma	pag. 9
 Scopo della tesi	pag. 11
 Materiali e metodi	pag. 12
 Risultati	pag. 18
 Discussione	pag. 30
 Conclusioni e prospettive	pag. 36
 Bibliografia	pag. 38
 Ringraziamenti	pag. 44

INTRODUZIONE

Caratteri fondamentali dei linfomi di Hodgkin

Il linfoma di Hodgkin (LH) è una neoplasia del sistema linfatico che origina da cellule B del centro germinale del linfonodo e rappresenta approssimativamente il 13% dei linfomi diagnosticati nei paesi occidentali. Il LH è anche una patologia caratterizzata da un profondo squilibrio immunologico sia a livello del microambiente del linfonodo, sia a livello sistemico (Kuppers, Schwering et al. 2002; Diehl, Stein et al. 2003; Cozen, Gill et al. 2008; Mani and Jaffe 2009; Altekruze SF 2010). Numerose sono le caratteristiche peculiari di questo linfoma che lo distinguono dai più eterogenei linfomi non Hodgkin (LNH), i quali rappresentano la maggior parte dei linfomi diagnosticati (Altekruze SF 2010). I LH sono essenzialmente rappresentati da quattro istotipi chiamati sclerosi nodulare, cellularità mista, ricco in linfociti ed a deplezione linfocitaria, i quali costituiscono i LH classici (Skinnider and Mak 2002; Mani and Jaffe 2009). I LH classici rappresentano il 95% di tutti i LH diagnosticati mentre il rimanente 5% è costituito da un ulteriore tipo istologico, chiamato nodulare a predominanza linfocitaria (NLPHL) che, in seguito alle sue caratteristiche immunofenotipiche ed istopatologiche, rappresenta un diverso tipo di linfoma (Kuppers 2009). Il NLPHL si può considerare una forma di linfoma “borderline” tra il LH ed il LNH caratterizzata da una proliferazione nodulare o nodulare e diffusa di una variante delle cellule di Reed-Sternberg chiamata cellule LP. Tali cellule esprimono, insieme ad altri antigeni B-associati, anche l’antigene di superficie CD20 allo stesso modo dei linfociti B maligni dei LNH mentre non esprimono (o lo fanno solo debolmente) l’antigene di superficie CD30 (Kuppers 2009; Carbone, Gloghini et al. 2010; Smith 2010).

Il tipo istologico chiamato sclerosi nodulare rappresenta il più frequente tra i LH ed è caratterizzato dalle cellule maligne di Reed-Sternberg (HRS). Tali cellule sono linfociti B del centro germinale (GC) del linfonodo che hanno acquisito mutazioni sfavorevoli nella regione variabile dei geni per le immunoglobuline (IgV) (Skinnider and Mak 2002; Kuppers 2009; Mani and Jaffe 2009).

È stato dimostrato che le cellule HRS presentano i riarrangiamenti dei geni IgV delle catene pesanti e leggere e che queste presentano ipermutazione somatica. Questo fatto depone in favore dell’origine di tali cellule da linfociti B maturi allo stadio GC o post-GC in quanto le ipermutazioni somatiche delle IgV avvengono nei linfociti B

attivati in seguito all'incontro con l'antigene i quali proliferano nel GC del linfonodo (Hebeda, Van Altena et al. 2009; Kuppers 2009).

Le cellule HRS non presentano le caratteristiche immunofenotipiche dei linfociti B e, di conseguenza, non esprimono né immunoglobuline (Ig) di superficie né alcuni degli antigeni tipici dei linfociti B quali CD19, CD20, Syk, A-myb (Stein, Marafioti et al. 2001; Schwering, Brauninger et al. 2003; Mathas, Lietz et al. 2004). Uno dei motivi alla base di queste caratteristiche è l'assenza di fattori di trascrizione che regolano l'espressione di geni B-specifici quali ad esempio Oct-2, Pu.1, Bob1 ed EBF (Re, Muschen et al. 2001; Stein, Marafioti et al. 2001; Torlakovic, Tierens et al. 2001). Le cellule HRS tuttavia esprimono Pax5, uno dei principali geni attivatori della linea B (Foss, Reusch et al. 1999).

Una citazione va fatta a proposito del fattore di trascrizione NF- κ B, il quale è costitutivamente espresso ad alti livelli nelle cellule HRS a differenza di quanto avviene normalmente nei linfociti B dove la sua espressione è solamente transiente (Bargou, Emmerich et al. 1997). Tale attivazione costitutiva può essere dovuta a fattori diversi. Una ipotesi è l'attivazione mediata da CD40, un recettore appartenente alla famiglia dei TNF (Carbone, Gloghini et al. 1995). Le cellule HRS sono infatti circondate da linfociti che esprimono CD40L (Carbone, Gloghini et al. 2009; Carbone, Gloghini et al. 2010). I LH classici sono inoltre positivi per il virus di Epstein-Barr (EBV) nel 40% dei casi. È possibile che sia proprio la presenza di questo virus nelle cellule HRS EBV⁺ che determina l'attivazione costitutiva del pathway di NF- κ B causando l'evasione di tali cellule dal processo di apoptosi (Mancao, Altmann et al. 2005). In aggiunta ai fenomeni appena descritti sono note le amplificazioni di diversi geni che contribuiscono all'attivazione di NF- κ B quali, ad esempio, l'amplificazione del gene REL, codificante per una delle subunità di NF- κ B (Joos, Menz et al. 2002; Martin-Subero, Gesk et al. 2002).

In accordo con l'ontogenesi dei linfociti B, le cellule che non esprimono Ig di superficie vanno incontro ad apoptosi, in condizioni normali. Il sistema dei recettori di morte (CD95) è ritenuto uno dei principali responsabili del mantenimento dell'omeostasi nel centro germinale del linfonodo tant'è vero che un difetto dell'espressione di CD95 sulla superficie dei linfociti B del GC determina l'insorgenza di malattie linfoproliferative in modelli animali (Krammer 1999; Hao, Duncan et al. 2008). È noto che il processo di selezione negativa dei linfociti B nel GC, così come

quello dei linfociti T nel timo, dipende dal sistema di CD95 anche *in vivo*. Al contrario, le cellule HRS non vanno incontro ad apoptosi ed evadono la lisi mediata dai linfociti T CD8⁺ nonostante l'assenza di Ig, ma sopravvivono e proliferano nel linfonodo (Takahashi, Ohta et al. 2001; Mathas, Lietz et al. 2004).

Le cellule HRS rappresentano una percentuale variabile tra il 2 ed il 5% delle cellule nei linfonodi malati e sono circondate da linfociti B, linfociti T, macrofagi, eosinofili, plasmacellule e fibroblasti. La maggior parte della massa tumorale è quindi costituita da questo infiltrato infiammatorio (Skinnider and Mak 2002; Diehl, Stein et al. 2003).

I LH sono curabili nella maggior parte dei casi, specialmente negli stadi precoci della malattia. La terapia di prima linea è rappresentata da una polichemioterapia comprendente doxorubicina, bleomicina, vinblastina e dacarbazina (abbreviata come ABVD) (Carver, Schuster et al. 2008; Gobbi, Rosti et al. 2009; Canellos, Abramson et al. 2010). La polichemioterapia può essere quindi seguita da radioterapia, utilizzata attualmente come terapia di consolidamento (Girinsky and Ghalibafian 2007; Bartlett 2008; Punnett, Tsang et al. 2010). I problemi che l'ematologia e l'oncologia cliniche devono affrontare nel trattamento dei pazienti affetti da LH riguardano l'insorgenza di resistenze alla chemioterapia, la ricaduta dei pazienti già trattati e la tossicità cardiopolmonare dei trattamenti utilizzati, la quale può manifestarsi anche a lungo termine (Girinsky and Ghalibafian 2007; Bartlett 2008; Carver, Schuster et al. 2008; Gobbi, Rosti et al. 2009; Canellos, Abramson et al. 2010; Punnett, Tsang et al. 2010). Inoltre esiste un problema di impatto sociale legato al LH in quanto la maggior parte dei pazienti sono giovani adulti oppure adolescenti. Tra il 2003 ed il 2007 l'età mediana alla diagnosi dei LH era 38 anni ed il 12% di questi era stato diagnosticato al di sotto dei 20 anni di età. Il LH è il più comune tipo di cancro diagnosticato tra gli adolescenti di età comprese tra i 15 ed i 19 anni. Ne consegue che il rischio di compromettere la fertilità di tali pazienti è un ulteriore problema da tenere in considerazione durante la pianificazione dei trattamenti terapeutici (Altekruse SF 2010; Punnett, Tsang et al. 2010).

CLUSTERINA: una proteina nota con diverse denominazioni e caratterizzata da una molteplicità di funzioni

Clusterina (anche chiamata SGP-2, TRPM-2, CLI, XIP8, etc.) è una glicoproteina eterodimerica secretoria di 449 aminoacidi ampiamente espressa nei tessuti e nei fluidi umani (Shannan, Seifert et al. 2006; Rizzi and Bettuzzi 2010). La sua distribuzione praticamente ubiquitaria ne ha fatto un soggetto di studio in diversi settori delle scienze biologiche e mediche. Clusterina venne inizialmente scoperta nel 1983 all'interno del liquido seminale del testicolo del montone (Fritz, Burdzy et al. 1983). In questo contesto, clusterina si era dimostrata in grado di promuovere l'aggregazione di diversi tipi cellulari. Clusterina è anche coinvolta in una serie di diverse funzioni quali la spermatogenesi, l'inibizione della lisi mediata dal complemento e la protezione degli spermatozoi (Ibrahim, Troedsson et al. 1999). Nella rete testis, nei dotti secretori e nell'epididimo dei ratti clusterina - sulphated glycoprotein 2 (SGP-2) viene sintetizzata e secreta in modo differenziale e risulta essere una delle proteine maggiormente prodotte dalle cellule del Sertoli e dell'epitelio dell'epididimo (Hermo, Wright et al. 1991).

Oltre alla spermatogenesi clusterina riveste una serie di funzioni in processi fisiologici quali il differenziamento cellulare, il trasporto dei lipidi, le interazioni cellula-cellula e cellula-substrato, la proliferazione e l'apoptosi. In aggiunta a questi ruoli clusterina è coinvolta anche in processi patologici quali la neurodegenerazione, l'invecchiamento ed il cancro (Rosenberg and Silkensen 1995; Wilson and Easterbrook-Smith 2000; Trougakos and Gonos 2002; Shannan, Seifert et al. 2006). Proprio il fatto che clusterina è stata caratterizzata da gruppi di ricerca diversi in tessuti e fluidi differenti, ha fatto sì che alla stessa proteina venissero dati nomi ed abbreviazioni diversi che dipendevano dal settore della ricerca nel quale tale proteina veniva descritta.

Nell'uomo clusterina è stata descritta per la prima volta da Jenne & Tschopp nel 1989 come fattore che inibiva la lisi mediata dal complemento (CLI) (Jenne and Tschopp 1989). CLI presentava una elevata omologia (75.6%) con la sopracitata proteina isolata dal testicolo dei ratti chiamata SGP-2. SGP-2 è una delle più importanti glicoproteine prodotte dalle cellule del Sertoli del testicolo dei ratti ed è coinvolta nella maturazione degli spermatozoi (Collard and Griswold 1987).

Nella prostata dei ratti clusterina venne identificata con il nome di testosterone-repressed prostate message 2 (TRPM-2) e, in seguito ad un accurato lavoro di clonaggio del cDNA, sequenziamento e confronto tra le sequenze, venne dimostrato che la sequenza del cDNA di TRPM-2 è completamente omologa a quella del cDNA di SGP-2 (Montpetit, Lawless et al. 1986; Bettuzzi, Hiipakka et al. 1989). Poco tempo prima era stato dimostrato che SGP-2 era omologa a clusterina, una proteina in grado di promuovere la aggregazione eterologa degli eritrociti (in inglese “to cluster” significa, appunto, “aggregare”). In seguito ad un consenso tra gli esperti di questa proteina a livello internazionale, è stato deciso di utilizzare il nome clusterina (CLU) (Rizzi and Bettuzzi 2010).

Un gene, tre trascritti

Il gene *CLU* nell'uomo si trova sul cromosoma 8 in una regione che coinvolge circa 17877 coppie di basi (bp) e contiene 9 esoni di lunghezze differenti (Rizzi and Bettuzzi 2010). Articoli risalenti alla fine degli anni '80 riportavano già la presenza di sequenze differenti di RNA messaggeri trascritti a partire dall'estremità 5' del gene *CLU*. Tali differenze sono dovute alla presenza di sequenze non tradotte (5'-UTR) che generano, di conseguenza, RNA trascritti diversi (Jenne and Tschopp 1989; Kirszbaum, Sharpe et al. 1989; O'Bryan, Baker et al. 1990). La cellula quindi sintetizza isoforme di clusterina nelle quali il primo esone ha lunghezze e sequenze differenti. La versione aggiornata del database GeneBank riporta oggi che esistono due isoforme di trascritti del gene *CLU* nell'uomo, l'isoforma 1 avente il codice NM_001831.2 e l'isoforma 2 avente il codice NM_203339.1. Questi due trascritti originano da due diversi codoni d'inizio e sono presenti nell'uomo e nello scimpanzé (Cochrane, Wang et al. 2007). Vi è inoltre un terzo trascritto, chiamato isoforma 11036, il quale produce probabilmente un mRNA codificante (Andersen, Schepeler et al. 2007).

Tale fenomeno per cui un singolo gene può originare differenti trascritti che hanno estremità 5'-UTR diverse è piuttosto frequente nei mammiferi. Nei casi in cui il sito di inizio della traduzione si trovi all'interno del primo esone, il fenomeno appena descritto determina la sintesi di catene polipeptidiche diverse che possono avere anche funzioni biologiche opposte (Rizzi and Bettuzzi 2010). Le tre isoforme di CLU appena descritte condividono quindi gli esoni da 2 a 9 ma mantengono un esone 1

caratteristico. La sequenza aggiornata dell'mRNA codificante per la isoforma 1 prevede una proteina avente putativamente 501 aminoacidi ed un peso molecolare di 57.8 kDa. Uno studio computazionale che ha utilizzato il software PSORT è riuscito a predire le localizzazioni sub-cellulari di CLU (Horton, Park et al. 2007). In accordo con i risultati di questo studio, l'isoforma 1 si localizza nel citoplasma o nel nucleo.

L'isoforma 2 invece ha un esone 1 alternativo non tradotto ed il codone di inizio AUG si trova nell'esone 2, in una regione comune a tutte e tre le isoforme ed immediatamente a monte di una sequenza di localizzazione per il reticolo endoplasmatico (Rizzi and Bettuzzi 2010). Quest'ultimo mRNA è quello che codifica per la proteina secretoria di 449 aminoacidi la quale è la forma più estensivamente descritta di CLU (de Silva, Harmony et al. 1990; de Silva, Stuart et al. 1990; Burkey, deSilva et al. 1991; Choi-Miura, Takahashi et al. 1992). Tutti e tre i trascritti, infine, posseggono un terzo codone di inizio AUG localizzato sull'esone 3 che è in fase con i primi due AUG. È ormai comunemente accettato quindi che il gene *CLU* produce tre trascritti alternativi nell'uomo (Cochrane, Wang et al. 2007; Rizzi and Bettuzzi 2010). L'espressione degli mRNA delle isoforme 1, 2 ed 11036 è stata dimostrata in differenti linee cellulari comprese prostata e mammella (Andersen, Schepeler et al. 2007; Schepeler, Mansilla et al. 2007) benché la correlazione tra questi differenti trascritti e le forme proteiche osservate non sia ancora stata completamente chiarita. Per quanto riguarda l'emivita di CLU nella cellula, in cellule PC-3 di prostata è stato dimostrato che questa è breve e sembra essere meno di due ore (Rizzi, Caccamo et al. 2009). Infatti CLU viene degradata attraverso il sistema ubiquitina-proteasoma.

La forma secretoria di clusterina

Come detto precedentemente, CLU è una proteina presente nella maggior parte dei fluidi biologici umani e la forma meglio studiata di CLU è proprio quella secretoria (sCLU). Si tratta di un eterodimero costituito da due catene chiamate α e β , le quali sono unite mediante 5 ponti disolfuro (de Silva, Harmony et al. 1990). Il peso delle singole catene è di 40 kDa ed il peso molecolare dell'eterodimero è di 75-80 kDa. La sintesi di sCLU inizia dal codone di inizio AUG dell'esone 2 e produce una catena polipeptidica di 49 kDa. Tale precursore viene diretto verso il reticolo endoplasmatico (ER) grazie ad una sequenza leader segnale e, successivamente, entra

nel Golgi dove viene glicosilata e clivata, producendo un eterodimero legato mediante 5 ponti disolfuro (Kirszbaum, Bozas et al. 1992).

La forma non clivata e parzialmente glicosilata di 60 kDa è chiaramente visibile in elettroforesi monodimensionale SDS-PAGE (Rizzi and Bettuzzi 2010).

Intrigante, ma solo parzialmente nota, è la funzione di sCLU per la quale sono state formulate diverse ipotesi. Le evidenze scientifiche aggiornate sono complessivamente concordi nel definirla uno chaperon molecolare noto ormai da diversi anni (Kirszbaum, Sharpe et al. 1989; Humphreys, Carver et al. 1999; Lakins, Poon et al. 2002). In particolare, sCLU è il primo chaperon extracellulare identificato nei mammiferi e si lega a proteine nello stato unfolded o parzialmente unfolded (Lakins, Poon et al. 2002). Le proteine sottoposte a condizioni di stress di varia natura sono quelle che subiscono denaturazioni e perdite della conformazione tridimensionale e sono tipicamente il bersaglio delle heat shock proteins (chiamate anche chaperons molecolari) (Poon, Easterbrook-Smith et al. 2000; Wilson and Easterbrook-Smith 2000). Già da diversi anni l'analisi di sequenza ha dimostrato che, nella struttura di CLU, sono presenti tre elementi ad α -elica, i quali sono importanti nel mediare le interazioni con le strutture idrofobiche che vengono esposte dalle proteine durante la denaturazione (Humphreys, Carver et al. 1999). Inoltre nel promotore del gene *CLU* è presente una regione di 14 bp che viene riconosciuta dal fattore di trascrizione heat-shock factor transcription 1. Tale elemento di 14 bp è in grado di mediare la trascrizione indotta da stress termico e, più in generale, la inducibilità di *CLU* in risposta al variare delle condizioni ambientali (Michel, Chatelain et al. 1997). Questi dati, unitamente al fatto che numerosi partners molecolari noti per sCLU posseggono regioni idrofobiche, ne fanno un candidato chaperon extracellulare. I risultati ottenuti *in vitro* dimostrano che CLU possiede una attività di chaperon molecolare e che lega le proteine in uno stato unfolded solubilizzandole e proteggendo così le cellule dalle conseguenze citotossiche della precipitazione delle proteine (Humphreys, Carver et al. 1999).

Clusterina nel linfoma

I dati disponibili a tutt'oggi in letteratura presentano un quadro incompleto per quanto riguarda l'espressione e la funzione di CLU nei linfomi. È doveroso premettere

che questi tumori del sistema linfatico rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie e, di conseguenza, è necessario contestualizzare i risultati all'interno di uno specifico tipo di linfoma ed eventualmente all'interno di uno specifico tipo istologico. Le prime evidenze pubblicate risalgono all'anno 2000 (Wellmann, Thieblemont et al. 2000) e descrivono uno studio di espressione genica mediante macroarray finalizzato all'individuazione di geni differenzialmente espressi nei linfomi ed in altre neoplasie ematologiche, allo scopo di individuare nuovi biomarcatori. In questo lavoro Wellmann e coautori analizzavano una serie di linee cellulari derivate da differenti tipi di linfomi, leucemie o mielomi mediante macroarray di espressione. Sorprendentemente, il gene *CLU* era espresso preferenzialmente in 4 linee cellulari derivate da linfoma anaplastico a grandi cellule (ALCL) ma non nelle altre linee analizzate. Nelle stesse linee di ALCL erano visibili anche le isoforme di *CLU* in western blot. Inoltre, in un pannello di 198 campioni di tessuti paraffinati che includevano tipi differenti di linfoma nonché di tessuti linfoidei non neoplastici, tutti i 36 tessuti di ALCL sistemici analizzati erano positivi per *CLU* in immunoistochimica. Tale positività era citoplasmatica e spesso associata al Golgi. È interessante notare come, in questo lavoro, le cellule HRS di tutte le sezioni di LH fossero risultate negative per *CLU*. Un successivo articolo del 2004 analizzava l'espressione di *CLU* mediante colorazioni immunoistochimiche di sezioni paraffinate (Nascimento, Pinkus et al. 2004). Anche in questo caso, in 40 casi di ALCL su 41 analizzati le cellule tumorali erano positive per *CLU*. Anche in questo gruppo, la colorazione era localizzata nei corpi di Golgi nella maggior parte dei campioni oppure nel citoplasma. In questo articolo venivano descritti anche 17 casi di LH nei quali le cellule HRS erano negative (15 sezioni su 17) oppure manifestavano deboli positività membranose (6 casi) o citoplasmatiche (1), mentre solamente una era associata al Golgi. Recentemente invece è stato pubblicato un articolo riguardante l'espressione di *CLU* in un raro tipo di linfoma cutaneo chiamato micosi fungoide (Chandra, Plaza et al. 2009). In tale lavoro viene dimostrato che *CLU* correla positivamente con lo stadio e la presenza di grandi cellule nella micosi fungoide. Complessivamente è possibile affermare che l'espressione, la regolazione, la localizzazione e la funzione di *CLU* nel LH è poco caratterizzata e largamente incompleta, probabilmente anche a causa delle peculiarità di questa neoplasia, descritte precedentemente.

SCOPO DELLA TESI

Lo studio, il disegno sperimentale e gli esperimenti descritti nel presente lavoro hanno lo scopo di descrivere alcune caratteristiche della proteina chiamata CLU in un modello dove tale proteina non era stata caratterizzata precedentemente: il LH.

Nonostante un numero limitato di studi e ricerche fossero state pubblicate a partire dall'anno 2000 riguardanti CLU nei linfomi, le informazioni disponibili sulla biologia e la funzione di tale proteina nel LH sono, attualmente, estremamente ridotte.

La rilevanza che CLU ha assunto nel corso degli anni in riguardo al cancro ed alla tumorigenesi è considerevole. Numerosi gruppi afferenti ad Istituzioni diverse hanno descritto CLU in vari tipi patologie neoplastiche e si può complessivamente affermare che tale proteina è un bersaglio di notevole interesse scientifico e di potenziale rilevanza terapeutica.

Vengono qui descritti gli esperimenti svolti su linee cellulari derivate da LH, le quali rappresentano un modello sperimentale per lo studio del LH. Questi sono finalizzati a verificare gli effetti che stimoli di natura molto diversa hanno sull'espressione di CLU a livello prevalentemente intracellulare ma anche secretorio. Tali stimoli sono rilevanti nella fisiopatologia e nella terapia del LH.

Successivamente, al fine di verificare le eventuali potenzialità della forma circolante di CLU come biomarcatore, viene dosata la forma circolante in un gruppo iniziale di sieri di pazienti affetti da LH che sono stati sottoposti a chemioterapia ed indagini PET.

I risultati ottenuti rappresentano la prima caratterizzazione di CLU nei modelli cellulari linfoidei e gettano le basi per un suo potenziale utilizzo per scopi di sperimentazione clinica nell'ambito diagnostico e prognostico.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari e condizioni di crescita

Tre linee cellulari derivate da linfoma di Hodgkin sono state acquistate dalla banca tedesca DSMZ (German collection of microorganisms and cell cultures, Braunschweig, Germany). Tali linee cellulari sono chiamate L-428, L-540 (derivate dall'istotipo chiamato sclerosi nodulare) e KM-H2 (derivata dall'istotipo chiamato cellularità mista). Il terreno utilizzato è RPMI 1640 addizionato di L-glutamina, penicillina/streptomicina (Euroclone, Milano, Italia) e siero bovino fetale (Gibco-Invitrogen, S.Giuliano Milanese, Italia) ad una concentrazione finale del 10% v/v. La linea L-540 richiede il 20% di siero bovino fetale. Tali cellule crescono in sospensione e sono state coltivate in un incubatore umidificato NuAire DH Autoflow ad una temperatura di 37°C ed una concentrazione di CO₂ del 5% (NuAire, Plymouth, Minnesota).

Le conte vitali per determinare l'inibizione della crescita o per costruire le curve di crescita sono state eseguite utilizzando Trypan blue come colorante vitale. Dopo aver risospeso i campioni, le cellule sono state diluite 1:1 con Trypan blue 0.4% in tampone PBS e contate al microscopio ottico su un vetrino emocitometro. Le cellule blu sono quelle morte.

Doxorubicina ed IFN- γ

La soluzione stock di Doxorubicin hydrochloride (Sigma-Aldrich) è stata preparata dissolvendo la polvere in H₂O sterile ad una concentrazione di 10mM e conservata in congelatore a -20°C. una soluzione 1 mM è stata preparata e conservata a 4°C. La citochina ricombinante umana IFN- γ è stata acquistata liofilizzata (Peprotech, Rocky Hill, New Jersey) e dissolta in un tampone phosphate buffered saline (PBS) sterile avente un pH 7.2 addizionato di albumina di siero bovina (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 0.1% w/v. La composizione del tampone PBS utilizzato è la seguente (per 500ml): NaCl 4 g; Na₂HPO₄ 0,565 g; KCl 0,1 g; KH₂PO₄ 0,1 g.

IFN- γ è stato dissolto ad una concentrazione di 1 mg/ml e conservato in aliquote a -20°C.

Citofluorimetria

Le cellule (1.8×10^5 cellule iniziali per campione) analizzate al citofluorimetro sono state prima centrifugate per eliminare il terreno di coltura e lavate due volte con il tampone PBS pH 7.2 (impostazione della centrifuga: 1100 rpm per 7 minuti). Successivamente sono state marcate con l'anticorpo monoclonale anti-IFNGR1 coniugato con fluoresceina (FITC) (Genetex, Irvine, California) diluito 1:250 nel tampone PBS per 30 min a 37°C. I

campioni di controllo sono stati trattati nello stesso modo ma non marcati. Dopo un ulteriore lavaggio i campioni sono stati acquisiti mediante un citofluorimetro Cytomics FC500 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, California) ed i risultati analizzati mediante il software CXP analysis (Beckman Coulter Inc., Fullerton, California).

Irraggiamento con raggi X

Un irradiatore per sacche da trasfusione Raycell blood irradiator (MDS Nordion, Ottawa, Ontario) è stato scelto per trattare le linee cellulari con radiazioni ionizzanti. Tale strumento è equipaggiato con due tubi a raggi X opposti aventi un potenziale di 160 kV. Una dose media ($\pm 1\sigma$) di 12.00 ± 0.24 Gray (Gy) è stata erogata in un tempo di 1 min e 53 sec a ciascun campione di cellule poste all'interno di una fiaschetta da colture cellulari con una superficie di 25 cm² (Euroclone, Milano, Italia). Al fine di limitare le variazioni dovute ad una non-uniforme irradiazione all'interno del contenitore, la fiaschetta è stata alloggiata su un supporto in plastica sagomato che consente di irradiare tutti i campioni nella stessa posizione. All'inizio le cellule sono state contate con un emocitometro (Sigma-Aldrich), quindi 1.5×10^6 cellule sono state seminate in ogni fiaschetta. Per ottenere la massima omogeneità di dose ricevuta le fiaschette sono state riempite di terreno di coltura (RPMI addizionato con il 10% di siero bovino fetale) sino all'orlo ed il contenitore nel quale il supporto era fissato è stato riempito di acqua. Dopo l'irraggiamento, l'intero contenuto della fiasca è stato centrifugato, il liquido eliminato e le cellule risospese nel terreno di coltura e contate nuovamente con l'emocitometro. Un uguale numero di cellule di controllo ovvero di cellule irradiate è stato quindi seminato in un volume di 10 ml finali in fiaschette indipendenti ed incubato per tempi variabili in un incubatore umidificato ad una temperatura di 37°C ed una concentrazione di CO₂ del 5%.

Anticorpi ed immunoblotting

Gli estratti cellulari utilizzati per gli esperimenti di immunoblotting (da qui in avanti chiamato "western blot") sono stati preparati come segue. Le cellule sono state centrifugate (1100 rpm per 6 min) ed il sopranatante scartato. Le cellule sono state risospese e lavate 2 volte con tampone PBS pH 7.2. Dopo l'ultima centrifugazione il liquido è stato scartato completamente ed il pellet risospeso in un tampone di lisi così composto (tutte le concentrazioni indicate sono quelle finali):

- tampone Tris HCl 10 mM avente pH 7.4

- MgCl_2 3 mM
- NaCl 10 mM
- Sodio dodecil-solfato (SDS) 0.1%
- Triton X-100 0.1%
- Acido etilendiaminotetraacetico (EDTA) 0.5 mM

Tale tampone è stato mantenuto in ghiaccio e appena prima dell'utilizzo è stato aggiunto un cocktail di inibitori delle proteasi (protease inhibitor cocktail for general use, Sigma-Aldrich).

Gli estratti proteici totali sono stati ottenuti mediante risospensione con un puntale e successiva incubazione in agitazione ad una temperatura di 4°C per 40 min al fine di ottenere una lisi completa delle membrane. Gli estratti sono quindi stati congelati a -20°C e centrifugati il giorno successivo (13000 rpm, 4°C, 20 min) al fine di eliminare le membrane ed i detriti cellulari. Le concentrazioni proteiche sono quindi state determinate mediante Bio-Rad Dc Protein assay (Bio-Rad, Segrate, Milano) il quale segue il metodo di Lowry. I campioni quantificati sono quindi stati aliquotati e conservati a -20°C sino al momento dell'utilizzo. Al fine di determinare dal punto di vista qualitativo e quantitativo i diversi antigeni oggetto delle ricerche, le proteine sono state separate mediante elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE). Per separare sia gli estratti cellulari che il terreno di coltura delle linee cellulari è stata scelta una percentuale di poliacrilamide del 10% ed i gel sono stati preparati a mano oppure sono stati utilizzati gel precast commerciali. Al termine della corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa del tipo Hybond-ECL oppure Hybond-C super (GE Amersham, Milano).

Gli anticorpi utilizzati e le relative diluizioni sono i seguenti:

- mouse anti-p53 monoclonal antibody (mAb) clone PAB1801 (Zymed, San Francisco, California), diluito 1:2000
- mouse anti-clusterin mAb clone Hs-3 (Biovendor, CTPark Modrice, Repubblica Ceca), diluito 1:2000
- mouse anti- β actin mAb clone AC-15 (Sigma-Aldrich), diluito 1:24000
- rabbit anti-Bax polyclonal antibody (Immunological Sciences, Roma), diluito 1:400
- anti-mouse IgG HRP-linked (GE Amersham, Milano), diluito 1:10000
- anti-rabbit IgG HRP-linked (GE Amersham, Milano), diluito 1:10000

Il legame dell'anticorpo primario con quello secondario (coniugato con perossidasi di rafano, HRP) è stato rivelato mediante reazione di Enhanced Chemiluminescence (ECL) utilizzando il sistema GE Amersham ECL (GE Amersham, Milano) nel quale la soluzione di sviluppo è stata preparata unendo un uguale volume di soluzione A e di soluzione B ed incubando la membrana di nitrocellulosa in tale soluzione per 5 min. Al termine di tale incubazione la membrana è stata esposta ad una lastra autoradiografica Kodak BioMax XAR Film (Sigma-Aldrich) per tempi variabili a seconda del tipo di antigene (da 30 sec per l'actina sino ad un massimo di circa 30 min per antigeni aventi segnali deboli). La lastra autoradiografica è stata quindi sviluppata in camera oscura mediante i liquidi Kodak GBX developer e GBX fixer (Sigma-Aldrich). Tutti i pesi molecolari indicati nelle figure sono stati calcolati mediante costruzione di una retta di calibrazione (Ferguson plot). L'actina è stata utilizzata come proteina di riferimento in tutti gli esperimenti di western blot ed il suo peso molecolare è di 42 kDa.

Saggio di liberazione dei nucleosomi

Al fine di determinare la liberazione di mono- ed oligonucleosomi nel citoplasma delle cellule trattate, è stato utilizzato il sistema Cell death detection ELISA plus (Roche Diagnostics GmbH). In breve, si tratta di un saggio immunoenzimatico quantitativo che utilizza pozzetti rivestiti di streptavidina. Nel pozzetto si dispensa un'aliquota dell'estratto citoplasmatico che può contenere o meno gli istoni e si aggiunge una miscela di due anticorpi monoclonali murini. Uno di questi (biotinilato) è diretto contro gli istoni mentre l'altro (coniugato con perossidasi di rafano) riconosce il DNA. Al "sandwich" che si forma così nei pozzetti che contengono i campioni dove sono presenti nucleosomi liberi viene aggiunto, dopo opportuni lavaggi, il substrato della perossidasi (ABTS) e la reazione che si sviluppa viene misurata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 405 nm.

Saggi immunoenzimatici

I valori di clusterina circolante sono stati misurati nei sieri dei pazienti con diagnosi confermata di LH. I sieri erano stati conservati in congelatore a -80°C. Il sistema utilizzato è il human clusterin ELISA (Biovendor, CTPark Modrice, Repubblica Ceca) che consiste in un saggio immunoenzimatico tipo "sandwich". I sieri sono stati diluiti 1:3000 ed un volume di 100 µl è stato dispensato in ogni pozzetto. Ciascun campione è stato saggiato in due pozzetti e per alcuni di essi è stato ripetuto il dosaggio una seconda

volta. Le assorbanze sono state lette ad una lunghezza d'onda di 450 nm con un filtro di riferimento di 620 nm mediante un lettore multicanale Seac Sirio S.

Applicativi informatici ed analisi statistica

Il software Un-Scan.It (Silk Scientific Inc., Orem, Utah) è stato utilizzato per la quantificazione densitometrica delle bande dei western blot. Tutti gli istogrammi dei rapporti di densità tra le bande dei western blot, le curve di crescita delle linee cellulari, gli istogrammi ed i grafici dei saggi immunoenzimatici sono stati preparati mediante GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc., La Jolla, California). I dati di citofluorimetria sono stati analizzati mediante il software CXP analysis (Beckman Coulter Inc., Fullerton, California). I test statistici one-way ANOVA e test t per dati appaiati sono stati eseguiti sempre mediante GraphPad Prism 5.0. Le figure del capitolo "Risultati" sono state preparate ed impaginate mediante i software Adobe Photoshop ed Illustrator (Adobe).

RISULTATI

IFN- γ up-regola l'espressione di clusterina intracellulare nelle cellule L-428

Inizialmente è stato analizzato l'effetto della citochina IFN- γ sulle cellule L-428. Come già spiegato nell'introduzione, uno dei meccanismi di evasione delle cellule HRS dalla risposta cellulo-mediata del sistema immunitario coinvolge i linfociti T regolatori che popolano il linfonodo malato (Marshall, Christie et al. 2004; Cozen, Gill et al. 2008). IFN- γ è una citochina Th1 prodotta dai linfociti T CD4⁺ che infiltrano il linfonodo malato la quale potrebbe avere una rilevanza sulla sopravvivenza e sulla proliferazione delle cellule HRS (Yamamoto, Nishikori et al. 2008). Le citochine sono da sempre considerate dei protagonisti cruciali nella patogenesi del LH ed i pazienti affetti da LH sono caratterizzati da livelli più bassi di citochine Th1, da un tipo di immunità sbilanciata in senso Th2/Treg e da livelli più bassi di IL-12 circolante (Cozen, Gill et al. 2008). Recenti evidenze sottolineano che bloccando le interazioni inibitorie PD-1/PD-1L tra i linfociti T e le cellule tumorali nel LH, si ha un riattivazione della produzione di IFN- γ secreto dai linfociti T CD4⁺ presenti nel linfonodo (Yamamoto, Nishikori et al. 2008; Yamamoto, Nishikori et al. 2009).

Date anche le caratteristiche di disregolazione immunologica del LH (Marshall, Christie et al. 2004) abbiamo quindi deciso di indagare la possibilità che questa citochina potesse avere un effetto anche sulla regolazione dell'espressione di CLU. Abbiamo innanzitutto verificato che le cellule L-428 esprimessero il recettore per IFN- γ sulla loro superficie. Mediante citofluorimetria abbiamo confermato l'espressione del recettore IFNGR1 come mostrato nella figura 1A.

Abbiamo quindi trattato per 24 ore le cellule con concentrazioni scalari di IFN- γ ricombinante umano, preparato gli estratti proteici totali e saggiato i campioni mediante western blot come descritto nel capitolo Materiali e Metodi. Con una concentrazione di 0.1 μ g/ml ed a partire da una concentrazione di 0.05 μ g/ml è chiaramente visibile la up-regolazione di CLU ed in particolare della isoforma avente peso molecolare di 55 kDa (Fig. 1B). Compaiono inoltre due bande di peso molecolare intermedio tra 80 e 55 kDa, le quali sono quasi invisibili nel campione di controllo.

Anche l'oncosoppressore p53 sembra essere up-regolato da IFN- γ benché in maniera modesta se paragonato con i livelli che si osservano dopo trattamento con doxorubicina 0.1 μ M (Fig. 1C). In questi esperimenti il chemioterapico doxorubicina è stato utilizzato come controllo per la modulazione di p53, dal momento che si tratta di un farmaco pro-apoptotico (Donner, Hoover et al. 2007; Yeh, Lai et al. 2007). Se rapportiamo le intensità

delle bande di p53 alle relative intensità delle bande di actina possiamo ottenere un rapporto quantitativo di densità che ci mostra l'aumento di p53 in risposta ad IFN- γ (Fig. 1C pannello in basso).

Le conte vitali ottenute dai campioni di controllo e da quelli trattati hanno mostrato solo una modesta inibizione della crescita con IFN- γ , al contrario di quanto si osserva invece con doxorubicina 0.1 μ M (dati non mostrati). I risultati ottenuti dopo il trattamento con IFN- γ e riguardanti p53, ci hanno suggerito di valutare l'instaurarsi dell'apoptosi. È quindi stata studiata la frammentazione del DNA e la conseguente liberazione dei nucleosomi che caratterizza il processo apoptotico in campioni trattati con IFN- γ mediante un saggio immunoenzimatico. I valori di assorbanza a 405 nm mostrano quindi un aumento dei mono- ed oligonucleosomi nei campioni trattati rispetto ai campioni di controllo ed il test statistico ANOVA ad una coda dimostra la significatività di tali differenze (Fig. 1D).

I risultati sin qui descritti non erano ancora stati riportati in letteratura e richiedono ulteriori approfondimenti a diversi livelli. Sarebbe necessario chiarire quali sono gli effetti di IFN- γ sull'espressione di p53 e sulla conseguente liberazione di nucleosomi nelle cellule trattate. Tali risultati infatti suggeriscono una diretta attività pro-apoptotica di IFN- γ sulle cellule L-428. Sarebbe inoltre interessante caratterizzare le due bande di CLU aventi peso molecolare compreso tra 80 e 55 kDa che compaiono dopo un trattamento di 24 ore con la citochina.

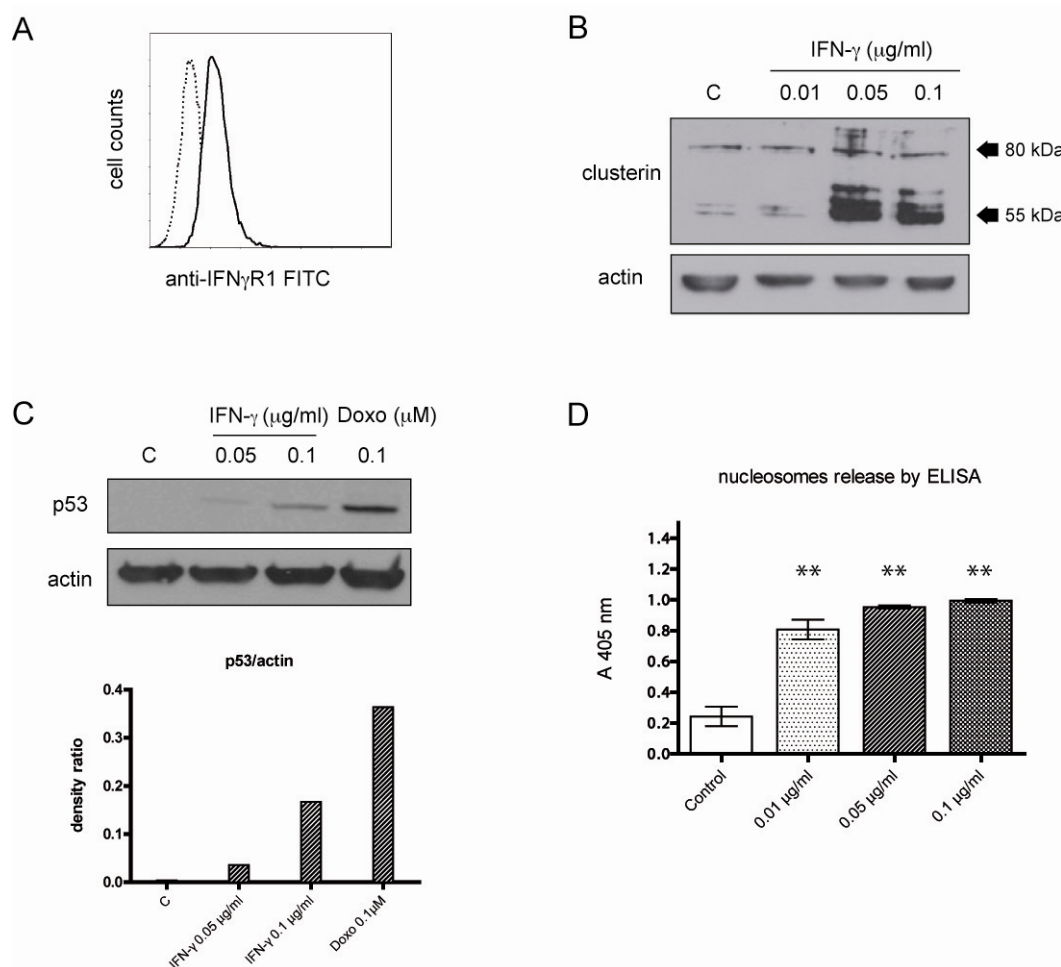


Figura 1. IFN- γ up-regola l'espressione di clusterina intracellulare e di p53 nelle cellule L-428. **A.** le cellule L-428 esprimono il recettore IFNGR1. **B.** IFN- γ up-regola l'isoforma di 55kDa e due forme di peso molecolare intermedio. **C.** IFN- γ up-regola p53 in modo dose-dipendente. Le cellule trattate con doxorubicina sono state utilizzate come controllo positivo dell'aumento di p53. **D.** IFN- γ determina l'aumento della liberazione dei nucleosomi nelle cellule trattate. Il test statistico utilizzato è ANOVA ad una coda; ** = $p < 0.001$.

Doxorubicina up-regola l'espressione di clusterina intracellulare nelle cellule L-428

Come già detto nell'Introduzione, doxorubicina viene utilizzata efficacemente nella terapia dei LH in combinazione con altri chemioterapici. Al fine di valutare un potenziale effetto di questo chemioterapico di prima linea sull'espressione di CLU, le cellule L-428 sono state trattate per 24 ore con concentrazioni scalari di doxorubicina. Le isoforme di 80 e 55 kDa di CLU intracellulare aumentano in modo dose-dipendente in risposta a tale

trattamento a partire da una concentrazione di 0.5 μM (Fig. 2). È interessante notare come, in accordo con l'attività pro-apoptotica esercitata da doxorubicina, p53 aumenta parallelamente a CLU. Come calcolato mediante i rapporti di densitometria, l'aumento medio dell'isoforma da 55 kDa nei campioni trattati con doxorubicina rispetto all'espressione nei campioni di controllo è 2.4 volte superiore in esperimenti indipendenti (Fig. 2, pannello in basso). Tali evidenze rappresentano la prima correlazione diretta tra l'up-regolazione di p53 indotta da doxorubicina e l'up-regolazione delle isoforme principali di CLU intracellulare in cellule linfoidi.

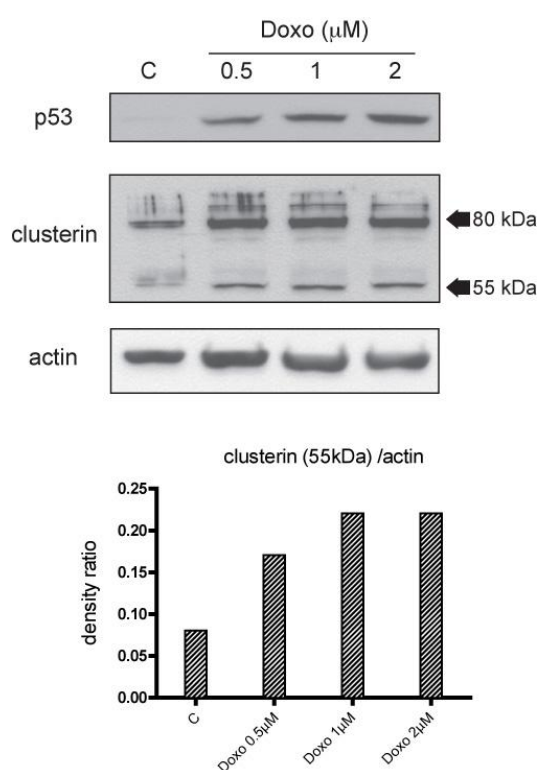


Figura 2. Concentrazioni scalari di doxorubicina aumentano simultaneamente i livelli di clusterina intracellulare (80 e 55 kDa) e di p53 (pannello in alto). L'analisi densitometrica dimostra un aumento medio di 2.4 volte dell'isoforma da 55 kDa nelle cellule trattate rispetto al valore delle cellule di controllo in esperimenti indipendenti (pannello in basso).

Una dose di 12 Gy di raggi X inibisce la crescita delle cellule linfoidi ed attiva la via intrinseca di apoptosi

La letteratura riporta che le radiazioni ionizzanti, ed i raggi X in particolare, sono uno stimolo capace di indurre l'espressione di CLU nelle cellule di carcinoma della mammella MCF-7 sia a livello di trascrizione dell'mRNA che a livello di sintesi proteica (Yang, Leskov et al. 2000; Klovov, Criswell et al. 2004).

Tuttavia non sono disponibili evidenze che parlano degli effetti delle IR nei linfomi o nelle linee cellulari linfoidi con riguardo all'espressione di CLU. Come già spiegato nel capitolo "Introduzione", gli unici dati pubblicati che riguardano linee cellulari derivate da differenti tipi di linfomi sono quelli pubblicati nel 2000 sulla rivista Blood (Wellmann, Thieblemont et al. 2000), i quali descrivono i livelli basali di alcune linee cellulari derivate da linfomi (nessuna delle quali derivata da LH).

Abbiamo quindi ritenuto interessante verificare se quanto descritto per linee cellulari di origine epiteliale fosse vero anche per cellule tumorali linfoidi. Innanzitutto abbiamo messo a punto un semplice sistema per l'irraggiamento di fiaschette per colture cellulari contenenti cellule in sospensione. Come già descritto in "Materiali e Metodi", abbiamo sagomato un supporto di plastica in modo da immobilizzare una fiaschetta per colture cellulari da 25 cm² e lo abbiamo incollato sul fondo di un contenitore di sezione circolare per irraggiamento di sacche di sangue. Prendendo come riferimento i valori descritti in letteratura per altre cellule tumorali, ci siamo concentrati su alte dosi di raggi X. Abbiamo scelto una dose di 12 Gy in quanto è quella che, in esperimenti indipendenti, ha dimostrato di inibire dell' 80-85% la crescita delle linee derivate da LH dopo 72 ore dall'irraggiamento.

Lo scopo è stato quello di ottenere una popolazione di cellule che sopravvivono sino a 72 ore dall'irraggiamento nelle quali poter misurare i livelli di CLU intracellulare. Abbiamo irradiato le tre linee L-428, KM-H2 ed L-540, eseguito le conte vitali mediante Trypan blue dopo 24, 48 e 72 ore e costruito le rispettive curve di crescita riportate nella figura 3A. Ciascun punto rappresenta la media di 3 campioni indipendenti e le barre di errore rappresentano l'errore standard medio. Al fine di verificare l'attivazione della via intrinseca di apoptosi nelle cellule così irradiate abbiamo poi dimostrato l'up-regolazione di p53 e di Bax nella linea rappresentativa L-428 (Fig. 3B). Come noto Bax è una proteina appartenente alla superfamiglia di Bcl-2 la quale, in seguito a stimoli diversi tra cui la frammentazione del DNA, dimerizza all'interno della membrana mitocondriale determinando la fuoriuscita di citocromo c. Bax viene trans attivato da

p53 durante l'apoptosi mediata da IR ed è quindi considerato uno dei mediatori dell'apoptosi (Criswell, Leskov et al. 2003). I nostri risultati sono in accordo con il fatto che le IR inducono morte apoptotica nelle cellule linfoidi in seguito all'attivazione/stabilizzazione di p53 (Pettitt, Sherrington et al. 2001).

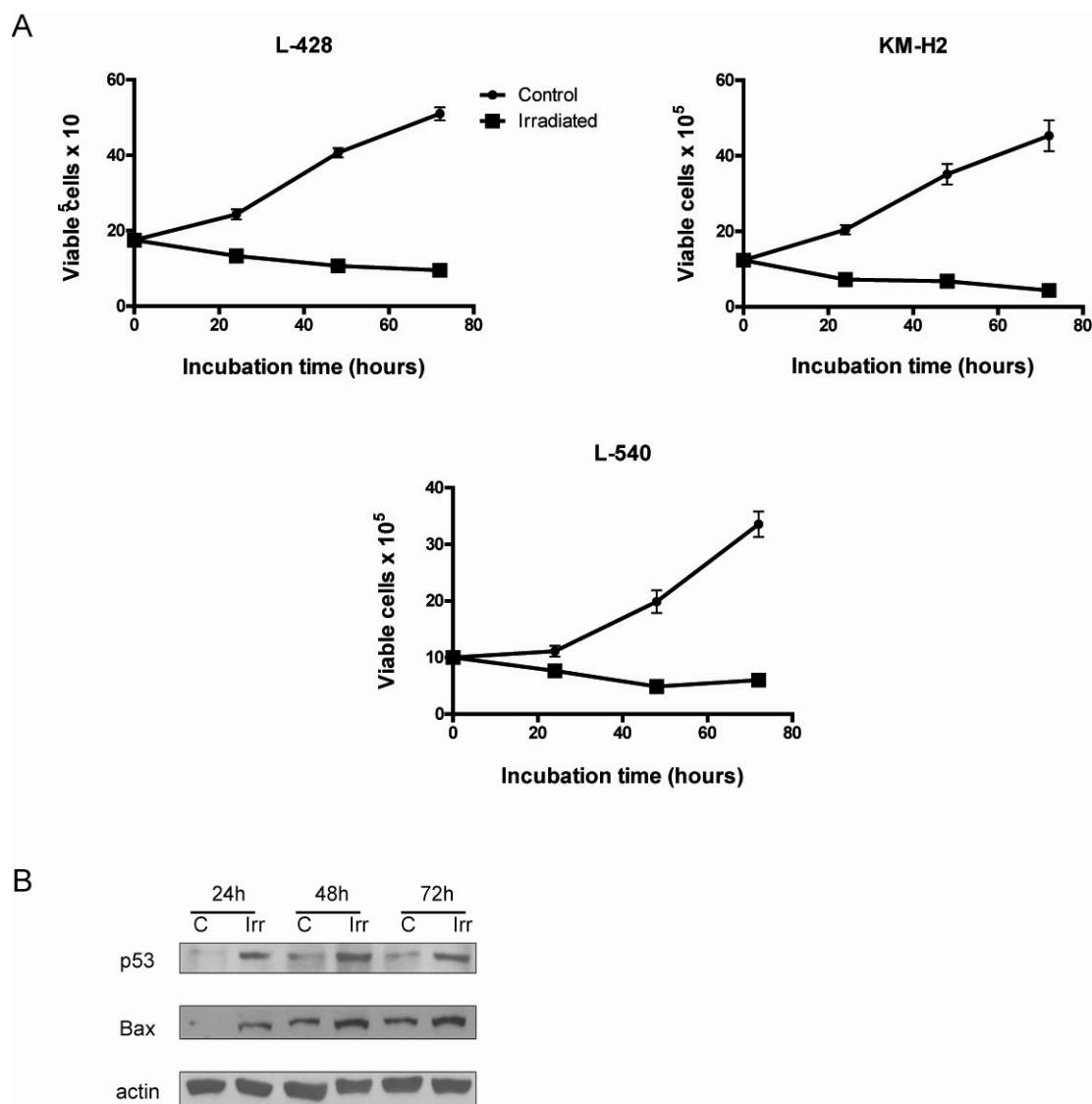


Figura 3. Una dose di 12 Gy di raggi X inibisce la crescita delle cellule linfoidi ed attiva la via intrinseca di apoptosi. **A.** Curve di crescita delle tre linee di HL. Sull'asse delle ordinate è riportato il numero di cellule vive x 10⁵ mentre sull'asse delle ascisse è riportato il tempo di incubazione (ore). **B.** Up-regolazione di p53 e Bax in seguito ad irraggiamento della linea L-428.

Le cellule che sopravvivono dopo l'irraggiamento esprimono livelli più alti di CLU

I western blot eseguiti sugli estratti totali delle tre linee irraggiate come descritto nel paragrafo precedente dimostrano come tutte e tre le isoforme maggiori di CLU (80, 63 e 55 kDa) siano up-regolate da una dose di raggi X (Fig. 4). L'aumento di CLU è simultaneo a quello di p53 e di Bax, mostrati nella figura 3B. Questi dati suggeriscono perciò che le cellule che sopravvivono ad una dose di 12 Gy hanno livelli più alti di CLU e che questa proteina è coinvolta nella risposta delle cellule di linfoma ai danni sul DNA indotti dalle radiazioni ionizzanti. Le osservazioni qui presentate sono in accordo con le funzioni di proteina da stress e chaperon molecolare già descritte per CLU nella letteratura ed estendono queste funzioni anche alle linee cellulari derivate da LH.

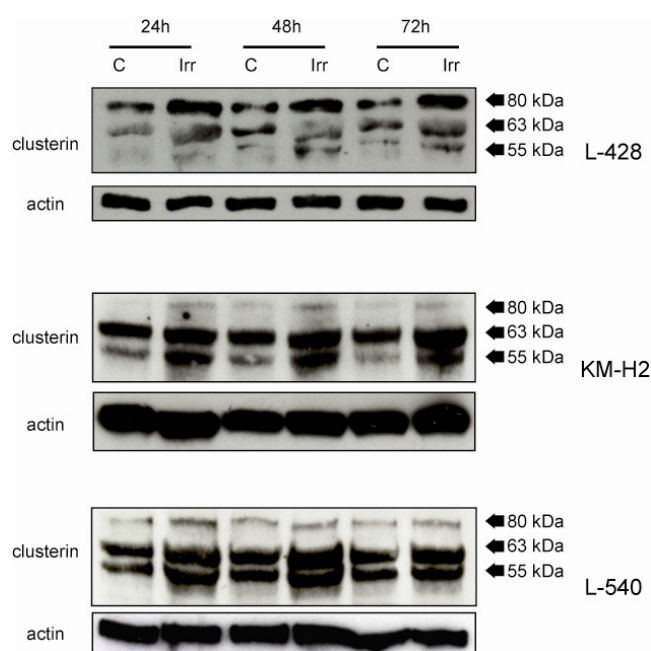


Figura 4. Le cellule che sopravvivono dopo l'irraggiamento esprimono livelli più alti di CLU. Nelle tre linee L-428, KM-H2 ed L-540 le cellule irraggiate con 12 Gy di raggi X hanno livelli aumentati di CLU intracellulare (80, 63 e 55 kDa).

Doxorubicina up-regola sCLU in modo dose-dipendente

Abbiamo quindi indagato successivamente se doxorubicina fosse in grado di influenzare la secrezione di CLU nel mezzo di coltura delle cellule di linfoma. Le tre linee cellulari L-428, KM-H2 ed L-540 sono state trattate con concentrazioni di doxorubicina crescenti, le

stesse in grado di aumentare i livelli intracellulari di CLU (vedi fig. 2). Come mostrato nella figura 5, doxorubicina determina un aumento dose-dipendente di sCLU nel mezzo di coltura condizionato dopo 24 ore di incubazione. Come è evidente dalle immagini, sono presenti due isoforme aventi pesi molecolari apparenti di 67 e 50 kDa. L'aspetto sfocato ed i pesi molecolari diversi da quelli delle isoforme intracellulari indicano chiaramente che si tratta della isoforma secretoria fortemente glicosilata. Non è ancora chiaro come sia spiegabile la presenza di due bande, dal momento che ciascun monomero di sCLU dovrebbe dare origine ad una singola banda di 40 kDa. L'aumento di sCLU nel terreno di coltura suggerisce che doxorubicina determina l'aumento della secrezione da parte delle cellule linfoidee e non solo l'aumento dell'espressione all'interno della cellula. Una possibile implicazione di questo fenomeno è che sCLU svolga un ruolo nella risposta adattativa della cellula tumorale di linfoma al trattamento chemioterapico.

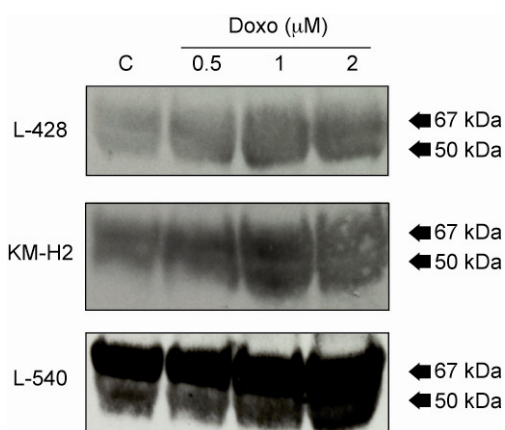


Figura 5. Il trattamento con doxorubicina determina l'aumento di sCLU nel mezzo di coltura condizionato. L'aumento sembra essere dose-dipendente e sono visibili due bande. L'aspetto sfocato delle due bande è dovuto alla glicosilazione della forma secretoria.

Clusterina circolante nel siero dei pazienti affetti da LH

I risultati sino ad ora descritti ci suggeriscono che, anche *in vivo*, le cellule HRS presenti nella massa tumorale dei linfonodi possano contribuire ai livelli circolanti di sCLU in condizioni fisiologiche. Il trattamento con il chemioterapico doxorubicina, presente nella chemioterapia ABVD (descritta nell'Introduzione), potrebbe inoltre determinare un aumento della secrezione di questa proteina. Abbiamo pianificato ed eseguito uno studio

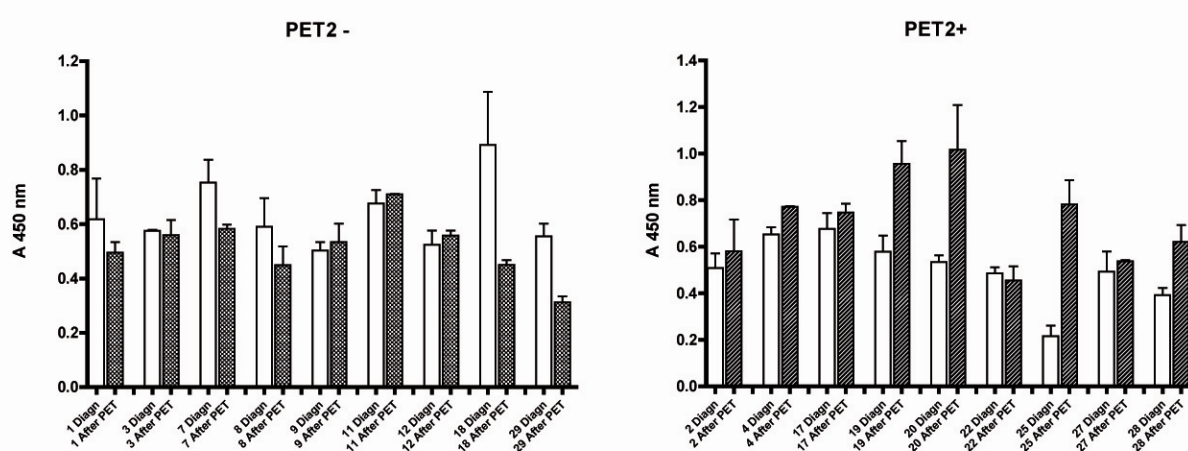
preliminare osservazionale su un gruppo iniziale di pazienti aventi diagnosi confermata di LH. In tale studio abbiamo inserito pazienti di entrambi i sessi, di età maggiore di 18 anni ed aventi una storia di LH appartenente agli istotipi sclerosi nodulare o cellularità mista di gradi differenti. Tali pazienti erano stati trattati con regimi chemioterapici contenenti doxorubicina (polichemioterapie ABVD o BEACOPP) e sottoposti all'indagine strumentale Positron Emission Tomography (PET) ai fini della diagnosi e del monitoraggio della malattia.

È necessario a questo punto descrivere brevemente il ruolo che la PET svolge nel LH. La PET è una potente procedura di imaging non invasiva, utilizzata ampiamente nella diagnosi oncologica, la quale ha assunto un rilievo sempre maggiore negli anni recenti oltre che per la diagnosi, anche per il monitoraggio della terapia e per fini prognostici. Si basa sull'incorporazione del radiocomposto 18-fluorodesossiglucosio (18-FDG). L'incorporazione di 18-FDG è maggiore per le cellule tumorali rispetto a quelle sane, in quanto le prime sono caratterizzate da una più alta attività metabolica. La PET rappresenta perciò un saggio funzionale che consente di localizzare le masse di cellule ipercaptanti nel corpo del paziente. Specificamente, la PET nel LH ha dimostrato di essere estremamente utile e rappresenta oggi una pratica di routine (Goldschmidt, Or et al. 2010; Molnar, Simon et al. 2010). Di solito viene eseguita al momento della diagnosi (PET0) e dopo due cicli di chemioterapia (PET2). Le evidenze scientifiche ottenute da differenti gruppi di lavoro internazionali hanno recentemente dimostrato che il valore prognostico della PET2 è superiore all'International Prognostic Score, cioè che la PET2 ha una elevata attendibilità nel predire l'evolversi del LH dopo due cicli di chemioterapia (Gallamini, Hutchings et al. 2007; Castagna, Bramanti et al. 2009). In particolare, i pazienti caratterizzati da una PET2 negativa (PET2⁻) hanno una prognosi favorevole mentre quelli caratterizzati da una PET2 positiva (PET2⁺) hanno una prognosi sfavorevole (Gallamini, Hutchings et al. 2007).

Il gruppo di 18 pazienti inseriti nel nostro studio iniziale (tutti in forma anonima) avevano tutti eseguito una PET0 ed una PET2 ed il sangue periferico era stato prelevato ai rispettivi tempi. CLU circolante è stata quindi misurata mediante saggi immunoenzimatici eseguiti in doppio sui sieri prelevati al momento della diagnosi (PET0) oppure sui sieri prelevati dopo due cicli di chemioterapia (PET2). I 18 pazienti sono stati divisi in base all'esito della PET2 (negativa oppure positiva) ed i livelli circolanti di CLU sono stati rappresentati come istogrammi. I risultati dei 9 PET2⁻ e dei 9 PET2⁺ sono rappresentati nella figura 6A. Come viene riassunto nella Tabella I, i pazienti

PET2⁻ sono caratterizzati da livelli di CLU circolante stazionari o diminuiti rispetto al momento della diagnosi. Al contrario, 7/9 pazienti PET2⁺ mostrano livelli di CLU circolante aumentati rispetto ai valori della PET0 (Fig. 6A, pannello di destra). Nonostante il modesto numero di sieri analizzati, le differenze nei valori di CLU circolante dei PET2⁺ prima e dopo due cicli di chemioterapia sono statisticamente significative (Fig. 6B, test t per dati appaiati).

A



B

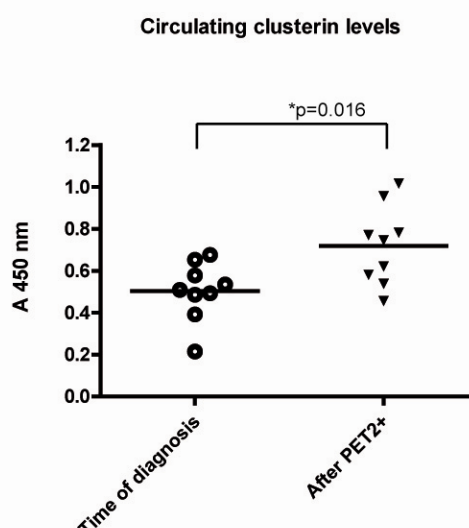


Figura 6. Clusterina circolante nel siero dei pazienti affetti da LH. **A.** istogrammi dei saggi immunoenzimatici sui sieri dei 9 PET2⁻ (pannello di sinistra) e sui sieri dei 9 PET2⁺

(pannello di destra). **B.** i valori di CLU circolante nei PET2⁺ sono più alti dopo due cicli di chemioterapia contenente doxorubicina quando confrontati con i valori al momento della diagnosi ($p < 0.05$, test t per dati appaiati).

Tabella I. Dati riassuntivi dei valori di CLU circolante nei sieri di pazienti affetti da LH.^a

	N° di pazienti	livelli diminuiti di CLU	livelli aumentati di CLU	livelli di CLU stazionari
PET2⁻	9	5/9 (55.6%)	0/9	4/9 (44.4%)
PET2⁺	9	0/9	7/9 (77.8%)	2/9 (22.2%)

^aI sieri di 18 casi confermati di LH sono stati saggiati al momento della diagnosi e dopo due cicli di chemioterapia contenente doxorubicina seguita dall'esame PET

DISCUSSIONE

La dimostrazione che stimoli di natura molto diversa nelle cellule tumorali linfoidi sono in grado di aumentare l'espressione dello chaperon molecolare CLU, almeno a livello intracellulare, estende le nostre conoscenze sulla biologia e sulla funzione di CLU nei linfomi. Come è noto, i linfociti B del nostro sistema immunitario esprimono i recettori per diversi tipi di citochine (Roitt I 2001; Northrup and Allman 2008). Le linee cellulari di LH e le cellule HRS derivano, nella maggioranza dei casi, da linfociti B del GC o del post-GC e, benché abbiano perso alcune delle caratteristiche proprie dei linfociti B (espressione di Ig di superficie, espressione delle HLA di classe I, etc.) ne conservano molte altre (quali ad esempio l'espressione del gene Pax5, fondamentale per il differenziamento dei precursori in senso B e per il mantenimento del fenotipo) (Skinnider and Mak 2002; Mani and Jaffe 2009). IFN- γ è una citochina Th1 che *in vivo* svolge una grande varietà di funzioni (Roitt I 2001; Seliger, Ruiz-Cabello et al. 2008; Chen and Liu 2009; McCall MB 2010). Il suo ruolo specificamente nel LH è stato recentemente descritto e sembra essere direttamente correlato alla funzione che hanno i linfociti T CD4⁺ che circondano le cellule HRS dei linfonodi di pazienti affetti da LH classico. Tali linfociti T infatti interagiscono con le cellule tumorali HRS anche mediante il ligando per un recettore di morte programmata chiamato Programmed death-1 (PD-1). Il recettore PD-1 è espresso sulla superficie dei linfociti CD4⁺ e due articoli pubblicati recentemente su autorevoli riviste sottolineano il ruolo inibitorio di tale interazione PD-1-PD-1L (Yamamoto, Nishikori et al. 2008; Yamamoto, Nishikori et al. 2009). Come già accennato infatti, la presenza di linfociti T regolatori (insieme al microambiente umorale) nella massa dei linfonodi di LH rappresenta una delle maggiori cause della mancata distruzione delle cellule neoplastiche da parte del sistema immunitario che infiltra e circonda i linfonodi malati (Marshall, Christie et al. 2004). La inibizione mediata da anticorpi monoclonali della interazione PD-1-PD-1L determina una riattivazione della produzione di IFN- γ che si associa alla inibizione delle cellule HRS. Sono tuttavia poche, a tutt'oggi, le evidenze che descrivono una attività pro-apoptotica di IFN- γ . La morte cellulare apoptotica delle cellule β del pancreas mediata da una sinergia con la citochina TNF- α rappresenta, al meglio delle nostre conoscenze, una delle poche evidenze disponibili in questo senso (Kim and Lee 2009).

L'utilizzo di IFN- γ è un nuovo stimolo che non era ancora stato descritto in relazione all'espressione di CLU nelle cellule tumorali. Negli esperimenti da noi svolti IFN- γ ricombinante umano non determina una inibizione riproducibile della crescita della

linea L-428. Tuttavia, come mostrato nella figura 1, è in grado di aumentare i livelli intracellulari di CLU (in particolare la isoforma da 55 kDa) e di determinare la comparsa di due bande aventi peso intermedio tra 55 ed 80 kDa. Il significato biologico di questa regolazione e del pathway coinvolto è al momento ignota. L'up-regolazione della isoforma da 55 kDa potrebbe essere in accordo con il fatto che l'isoforma nucleare di CLU è un interruttore di morte apoptotica nelle cellule bersaglio, ipotesi già descritta anche da altri autori (Scaltriti, Santamaria et al. 2004; Cochrane, Wang et al. 2007; Rizzi and Bettuzzi 2008). Abbiamo quindi preso spunto da questo fatto per studiare il possibile effetto proapoptotico di IFN- γ su L-428 ed abbiamo misurato prima di tutto i livelli di p53 totale nelle cellule trattate o meno con concentrazioni diverse. Come mostrato nella figura 1C, l'aumento di p53 è modesto ma dose-dipendente e correla quindi con l'aumento di CLU. In secondo luogo abbiamo misurato la liberazione dei nucleosomi, uno dei saggi utilizzati per misurare l'attività proapoptotica di una molecola. L'aumento della liberazione dei nucleosomi osservato nei campioni trattati rispetto ai controlli è in accordo con l'aumento di p53, benché questo dato necessiti di riconferme mediante l'utilizzo, ad esempio, della microscopia a fluorescenza dopo avere marcato le cellule con un colorante nucleare (Hoechst o DAPI) che possa evidenziare la presenza dei corpi apoptotici.

Doxorubicina è un farmaco chemioterapico di prima linea che viene attualmente utilizzato con successo nella terapia dei LH (Carver, Schuster et al. 2008; Canellos, Abramson et al. 2010). L'aumento di CLU riguarda, in questo caso, entrambe le isoforme maggiori da 55 ed 80 kDa ed è simultaneo con l'aumento di p53. Tali risultati sono congruenti con il meccanismo di azione di doxorubicina che è un intercalante del DNA, inibitore della topoisomerasi II nonché un agente proapoptotico (Cummings and Smyth 1993; Ling, Priebe et al. 1993; Shimada, Saeki et al. 2010). Oltre alle isoforme intracellulari abbiamo potuto verificare che sCLU aumenta nel mezzo di coltura condizionato dopo 24 ore di incubazione con doxorubicina. L'aumento sembra essere dose-dipendente ed indica come la secrezione di clusterina aumenti rapidamente in risposta al trattamento con il chemioterapico. Le bande secrete nel terreno di coltura dalle tre linee L-428, KM-H2 ed L-540 sono due ed entrambe glicosilate. I pesi molecolari non corrispondono né a quelli del monomero (40 kDa) né a quelli dell'eterodimero (75-80 kDa) ma sono, rispettivamente, di 50 e 67 kDa, così come calcolato mediante costruzione di una retta di calibrazione utilizzando le distanze di migrazione dei marcatori di peso molecolare (Ferguson plot). Questa discrepanza

potrebbe essere spiegabile con la glicosilazione di sCLU, la quale modifica il peso molecolare apparente del monomero. La glicosilazione operata dalle linee derivate da LH potrebbe essere tessuto specifica. Un'altra ipotesi invece è che, nelle linee linfoidi, le catene polipeptidiche di sCLU abbiano un peso molecolare differente rispetto a quello di sCLU prodotta nei carcinomi e nei tumori di origine epiteliale. La forma secretoria è la meglio studiata e viene tradotta a partire dall'ATG dell'esone 2 (Rizzi and Bettuzzi 2008). Il polipeptide precursore, di 427 aminoacidi, viene veicolato al reticolo endoplasmatico da una sequenza leader iniziale. La catena polipeptidica dopo essere stata glicosilata, viene clivata in due catene a livello dei residui Arg205 e Ser206, originando le catene alfa (da 34 a 36 kDa) e beta (da 36 a 39 kDa). Queste sono legate tra loro mediante 5 ponti disolfuro e, quindi, secrete (Choi-Miura, Takahashi et al. 1992).

Gli esperimenti volti a determinare l'inducibilità di CLU intracellulare in seguito ad alte dosi di IR hanno mostrato che, in tutte e tre le linee, le cellule che sopravvivono ad una dose di 12 Gy hanno valori aumentati di CLU. Le tre isoforme intracellulari di 80, 63 e 55 kDa si trovano up-regolate sino a tre giorni dopo l'irraggiamento. Tale fenomeno è in accordo con i dati già pubblicati su linee di carcinoma della mammella e della prostata, i quali avevano portato alla definizione di CLU come X-ray inducible protein 8 (XIP8) (Yang, Leskov et al. 2000). I risultati presentati qui rappresentano le prime evidenze che una dose elevata di raggi X è in grado di aumentare i livelli intracellulari di CLU in linee linfoidi di LH. La caratterizzazione del significato di tale modulazione tuttavia non è ancora stata eseguita. Dosi elevate di raggi X sono le stesse in grado di determinare la rottura del DNA sul singolo e sul doppio filamento come effetto diretto e di generare un danno indiretto attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno. Sarebbe interessante determinare se le cellule che sono sopravvissute e che ricominciano a dividersi dopo 72 ore dall'irraggiamento sviluppano una maggiore resistenza ad una seconda dose di IR di uguale intensità. La determinazione dei livelli di CLU in questa popolazione di cellule espanse a partire da quelle sopravvissute ad un primo irraggiamento fornirebbe delle utili informazioni sui meccanismi adattativi di resistenza alla radioterapia. Tali informazioni sarebbero particolarmente utili nel caso dei LH proprio perché la radioterapia rappresenta ancora una soluzione terapeutica nei casi in cui una terapia di consolidamento segue la chemioterapia (Girinsky and Ghalibafian 2007; Punnett, Tsang et al. 2010).

I dati sino a qui descritti dimostrano che CLU è una proteina inducibile da stress anche in linee cellulari linfoidi e che i suoi livelli intracellulari sono aumentati in risposta ad

una varietà di stimoli diversi quali una citochina, un farmaco proapoptotico ed una dose elevata di raggi X.

Gli esperimenti condotti sulla forma solubile ci hanno suggerito di misurare sCLU anche nel siero dei pazienti affetti da LH. Benché, come noto, è il fegato uno degli organi che produce la maggior quantità di CLU circolante, non è noto se un linfonodo tumorale contribuisca, ed in che modo, alla secrezione di CLU. Abbiamo reclutato un gruppo iniziale di pazienti affetti da LH che erano stati inizialmente sottoposti ad un esame PET0 e ad una successiva valutazione mediante PET2. Questi pazienti erano stati trattati con un regime chemioterapico contenente doxorubicina (quasi tutti erano ABVD). Abbiamo quindi misurato i livelli di CLU circolante mediante un saggio immunoenzimatico nei sieri di tali pazienti al momento della diagnosi e dopo due cicli di chemioterapia. I risultati ottenuti su 18 coppie di sieri sono quindi stati classificati in base all'esito della PET2 che, come già spiegato, ha un elevato valore prognostico nei LH. Mentre nei 9 pazienti che erano risultati PET2⁻ non è visibile alcuna correlazione tra la variazione dei livelli di CLU circolante e l'esito della PET, nei 9 che erano invece risultati PET2⁺ è possibile osservare che il 77,8% presenta un aumento di CLU circolante dopo due cicli di chemioterapia rispetto al momento della diagnosi. Il numero modesto di coppie di sieri non ci ha consentito di eseguire una analisi statistica robusta benché le differenze nei PET2⁺ siano statisticamente significative (test t per dati appaiati). È tutt'ora in corso uno studio che prevede, previa firma del consenso informato da parte dei pazienti, il reclutamento di nuovi casi di LH. Di questi nuovi casi verranno eseguiti i prelievi al tempo della PET0 e della PET2 ed i regimi chemioterapici utilizzati conterranno doxorubicina.

Per quanto riguarda l'aumento o la diminuzione di CLU durante la trasformazione neoplastica o la progressione del cancro, la letteratura riporta dati diversi a seconda del tipo di tumore. Ad esempio, cellule epiteliali trasformate con l'oncogene myc down-regolano CLU (Thomas-Tikhonenko, Viard-Leveugle et al. 2004), così come casi di carcinoma della prostata sia di basso che di alto grado mostrano una diminuzione dell'espressione di CLU (Scaltriti, Brausi et al. 2004). Altre evidenze invece riportano che l'espressione di CLU è aumentata in cellule di prostata a seguito della terapia di deplezione degli androgeni (July, Akbari et al. 2002) e secondo alcuni autori CLU media la resistenza delle cellule di tumore della prostata a TRAIL (Sallman, Chen et al. 2007). I nostri dati descrivono un aumento dei livelli proteici di CLU intracellulari in risposta a differenti stimoli ed un aumento della secrezione di sCLU in risposta a doxorubicina.

Non chiariscono, tuttavia, quelli che possono essere gli effetti biologici di tale aumento. Una correlazione, benché preliminare, sembra associare una prognosi negativa del LH (associata alla positività della PET2) con l'aumento dei livelli circolanti di CLU. Tali evidenze assumono un rilievo particolare in relazione al ruolo che sCLU riveste nei meccanismi di chemioresistenza di diversi tipi di tumori (Djeu and Wei 2009). È probabile che anche i linfonodi e le cellule neoplastiche contribuiscano a determinare tali livelli, benché sia difficile tuttavia sapere quale possa essere il loro contributo quantitativo in rapporto al contributo degli altri tessuti ed organi che vengono interessati dal trattamento chemioterapico. L'equilibrio tra le forme intracellulari e quelle secretorie nelle cellule linfoidi è un ulteriore aspetto che potrebbe spiegare le variazioni di CLU circolante nei pazienti che sono stati sottoposti a trattamento con doxorubicina.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

I dati qui riportati rappresentano la prima dimostrazione che, anche in linee cellulari linfoidi, CLU è una proteina da stress coinvolta nella risposta al chemioterapico doxorubicina. Le informazioni ottenute in questa serie di esperimenti preliminari richiedono ulteriori approfondimenti per capire se, come accade in altri tumori, sCLU è coinvolta nella chemioresistenza e, se sì, a quale livello. Fondamentale sarà chiarire se p53 (il quale aumenta in risposta agli stessi stimoli) attiva la trascrizione di CLU in queste linee cellulari e determinare dove si localizza l'isoforma intracellulare che si up-regola in seguito al trattamento. Sono attualmente in corso esperimenti di silenziamento genico mediante l'utilizzo di siRNA. Vorremmo infatti studiare l'effetto della diminuzione di CLU e di sCLU sulla sensibilità delle cellule al trattamento con doxorubicina.

I dati riguardanti IFN- γ ed i raggi X estendono inoltre le conoscenze disponibili sull'espressione di CLU nelle linee linfoidi.

Un'altra prospettiva è lo studio delle interazioni tra CLU ed NF-kB, il quale si trova spesso costitutivamente attivato nelle cellule HRS ed è un mediatore anti-apoptotico nelle cellule tumorali. Le informazioni ottenute saranno utili per la comprensione dei meccanismi di sopravvivenza delle cellule linfoidi e per la caratterizzazione di nuovi bersagli terapeutici.

Infine, il lavoro preliminare condotto sui sieri mostra una associazione tra la presenza di masse ipercaptanti nei pazienti affetti da LH anche dopo due cicli di chemioterapia contenente doxorubicina e l'aumento di CLU circolante. Il significato biologico è tutt'ora sconosciuto ma potrebbe essere spiegato da una aumentata secrezione di sCLU da parte dei tessuti tumorali trattati con chemioterapici. Sono stati pianificati esperimenti finalizzati a confermare i dati ottenuti mediante saggi immunoenzimatici anche con altre tecniche, quali per esempio il western blot su siero. Il reclutamento di un numero significativo di sieri inoltre è fondamentale per riuscire ad acquisire delle informazioni attendibili e per potere eseguire una analisi statistica robusta. Se i risultati preliminari saranno incoraggianti, verrà proposto uno studio multicentrico che coinvolga diversi Ospedali ed Università italiani. La ricerca di nuovi parametri che consentano di ottimizzare le attuali terapie e di ridurre gli effetti tossici secondari è una delle priorità della ricerca sul cancro clinica e di base. In questo contesto, l'individuazione di nuovi biomarcatori circolanti che correlino con gli esiti degli esami PET è un settore di grande interesse per le ricadute che potrebbe avere sulla salute umana.

BIBLIOGRAFIA

- Altekruse SF, K. C., Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlader N, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Cronin K, Chen HS, Feuer EJ, Stinchcomb DG, Edwards BK (2010). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/, based on November 2009 SEER data submission. posted to the SEER web site, 2010.
- Andersen, C. L., T. Schepeler, et al. (2007). "Clusterin expression in normal mucosa and colorectal cancer." *Mol Cell Proteomics* **6**(6): 1039-1048.
- Bargou, R. C., F. Emmerich, et al. (1997). "Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells." *J Clin Invest* **100**(12): 2961-2969.
- Bartlett, N. L. (2008). "Modern treatment of Hodgkin lymphoma." *Curr Opin Hematol* **15**(4): 408-414.
- Bettuzzi, S., R. A. Hiipakka, et al. (1989). "Identification of an androgen-repressed mRNA in rat ventral prostate as coding for sulphated glycoprotein 2 by cDNA cloning and sequence analysis." *Biochem J* **257**(1): 293-296.
- Burkey, B. F., H. V. deSilva, et al. (1991). "Intracellular processing of apolipoprotein J precursor to the mature heterodimer." *J Lipid Res* **32**(6): 1039-1048.
- Canellos, G. P., J. S. Abramson, et al. (2010). "Treatment of favorable, limited-stage Hodgkin's lymphoma with chemotherapy without consolidation by radiation therapy." *J Clin Oncol* **28**(9): 1611-1615.
- Carbone, A., A. Gloghini, et al. (2010). "B-cell lymphomas with features intermediate between distinct pathologic entities. From pathogenesis to pathology." *Hum Pathol* **41**(5): 621-631.
- Carbone, A., A. Gloghini, et al. (2009). "The Germinal centre-derived lymphomas seen through their cellular microenvironment." *Br J Haematol* **145**(4): 468-480.
- Carbone, A., A. Gloghini, et al. (1995). "CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease." *Am J Pathol* **147**(4): 912-922.
- Carver, J. R., S. J. Schuster, et al. (2008). "Doxorubicin cardiotoxicity in the elderly: old drugs and new opportunities." *J Clin Oncol* **26**(19): 3122-3124.
- Castagna, L., S. Bramanti, et al. (2009). "Predictive value of early 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) during salvage chemotherapy in relapsing/refractory Hodgkin lymphoma (HL) treated with high-dose chemotherapy." *Br J Haematol* **145**(3): 369-372.
- Chandra, P., J. A. Plaza, et al. (2009). "Clusterin expression correlates with stage and presence of large cells in mycosis fungoides." *Am J Clin Pathol* **131**(4): 511-515.
- Chen, J. and X. Liu (2009). "The role of interferon gamma in regulation of CD4+ T-cells and its clinical implications." *Cell Immunol* **254**(2): 85-90.
- Choi-Miura, N. H., Y. Takahashi, et al. (1992). "Identification of the disulfide bonds in human plasma protein SP-40,40 (apolipoprotein-J)." *J Biochem* **112**(4): 557-561.
- Cochrane, D. R., Z. Wang, et al. (2007). "Differential regulation of clusterin and its isoforms by androgens in prostate cells." *J Biol Chem* **282**(4): 2278-2287.
- Collard, M. W. and M. D. Griswold (1987). "Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells." *Biochemistry* **26**(12): 3297-3303.
- Cozen, W., P. S. Gill, et al. (2008). "Interleukin-2, interleukin-12, and interferon-gamma levels and risk of young adult Hodgkin lymphoma." *Blood* **111**(7): 3377-3382.

- Criswell, T., K. Leskov, et al. (2003). "Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation." *Oncogene* **22**(37): 5813-5827.
- Cummings, J. and J. F. Smyth (1993). "DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs." *Ann Oncol* **4**(7): 533-543.
- de Silva, H. V., J. A. Harmony, et al. (1990). "Apolipoprotein J: structure and tissue distribution." *Biochemistry* **29**(22): 5380-5389.
- de Silva, H. V., W. D. Stuart, et al. (1990). "Purification and characterization of apolipoprotein J." *J Biol Chem* **265**(24): 14292-14297.
- Diehl, V., H. Stein, et al. (2003). "Hodgkin's lymphoma: biology and treatment strategies for primary, refractory, and relapsed disease." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 225-247.
- Djeu, J. Y. and S. Wei (2009). "Clusterin and chemoresistance." *Adv Cancer Res* **105**: 77-92.
- Donner, A. J., J. M. Hoover, et al. (2007). "Stimulus-specific transcriptional regulation within the p53 network." *Cell Cycle* **6**(21): 2594-2598.
- Foss, H. D., R. Reusch, et al. (1999). "Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin." *Blood* **94**(9): 3108-3113.
- Fritz, I. B., K. Burdzy, et al. (1983). "Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro." *Biol Reprod* **28**(5): 1173-1188.
- Gallamini, A., M. Hutchings, et al. (2007). "Early interim 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography is prognostically superior to international prognostic score in advanced-stage Hodgkin's lymphoma: a report from a joint Italian-Danish study." *J Clin Oncol* **25**(24): 3746-3752.
- Girinsky, T. and M. Ghalibafian (2007). "Radiotherapy of hodgkin lymphoma: indications, new fields, and techniques." *Semin Radiat Oncol* **17**(3): 206-222.
- Gobbi, P. G., V. Rosti, et al. (2009). "The early- and intermediate-term toxicity to primitive hematopoietic progenitor cells of three chemotherapy regimens for advanced hodgkin lymphoma." *Clin Lymphoma Myeloma* **9**(6): 425-429.
- Goldschmidt, N., O. Or, et al. (2010). "The role of routine imaging procedures in the detection of relapse of patients with Hodgkin lymphoma and aggressive non-Hodgkin lymphoma." *Ann Hematol*.
- Hao, Z., G. S. Duncan, et al. (2008). "Fas receptor expression in germinal-center B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis." *Immunity* **29**(4): 615-627.
- Hebeda, K. M., M. C. Van Altena, et al. (2009). "PCR clonality detection in Hodgkin lymphoma." *J Hematop* **2**(1): 34-41.
- Hermo, L., J. Wright, et al. (1991). "Role of epithelial cells of the male excurrent duct system of the rat in the endocytosis or secretion of sulfated glycoprotein-2 (clusterin)." *Biol Reprod* **44**(6): 1113-1131.
- Horton, P., K. J. Park, et al. (2007). "WoLF PSORT: protein localization predictor." *Nucleic Acids Res* **35**(Web Server issue): W585-587.
- Humphreys, D. T., J. A. Carver, et al. (1999). "Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins." *J Biol Chem* **274**(11): 6875-6881.
- Ibrahim, N. M., M. H. Troedsson, et al. (1999). "Reproductive tract secretions and bull spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytotoxicity." *J Androl* **20**(2): 230-240.
- Jenne, D. E. and J. Tschopp (1989). "Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxicity inhibitor found in blood and seminal plasma:

- identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(18): 7123-7127.
- Joos, S., C. K. Menz, et al. (2002). "Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2." Blood **99**(4): 1381-1387.
- July, L. V., M. Akbari, et al. (2002). "Clusterin expression is significantly enhanced in prostate cancer cells following androgen withdrawal therapy." Prostate **50**(3): 179-188.
- Kim, K. A. and M. S. Lee (2009). "Recent progress in research on beta-cell apoptosis by cytokines." Front Biosci **14**: 657-664.
- Kirszbaum, L., S. E. Bozas, et al. (1992). "SP-40,40, a protein involved in the control of the complement pathway, possesses a unique array of disulphide bridges." FEBS Lett **297**(1-2): 70-76.
- Kirszbaum, L., J. A. Sharpe, et al. (1989). "Molecular cloning and characterization of the novel, human complement-associated protein, SP-40,40: a link between the complement and reproductive systems." EMBO J **8**(3): 711-718.
- Klokov, D., T. Criswell, et al. (2004). "IR-inducible clusterin gene expression: a protein with potential roles in ionizing radiation-induced adaptive responses, genomic instability, and bystander effects." Mutat Res **568**(1): 97-110.
- Krammer, P. H. (1999). "CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die." Adv Immunol **71**: 163-210.
- Kuppers, R. (2009). "The biology of Hodgkin's lymphoma." Nat Rev Cancer **9**(1): 15-27.
- Kuppers, R. (2009). "Molecular biology of Hodgkin lymphoma." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 491-496.
- Kuppers, R., I. Schwering, et al. (2002). "Biology of Hodgkin's lymphoma." Ann Oncol **13 Suppl 1**: 11-18.
- Lakins, J. N., S. Poon, et al. (2002). "Evidence that clusterin has discrete chaperone and ligand binding sites." Biochemistry **41**(1): 282-291.
- Ling, Y. H., W. Priebe, et al. (1993). "Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells." Cancer Res **53**(8): 1845-1852.
- Mancao, C., M. Altmann, et al. (2005). "Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus." Blood **106**(13): 4339-4344.
- Mani, H. and E. S. Jaffe (2009). "Hodgkin lymphoma: an update on its biology with new insights into classification." Clin Lymphoma Myeloma **9**(3): 206-216.
- Marshall, N. A., L. E. Christie, et al. (2004). "Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma." Blood **103**(5): 1755-1762.
- Martin-Subero, J. I., S. Gesk, et al. (2002). "Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma." Blood **99**(4): 1474-1477.
- Mathas, S., A. Lietz, et al. (2004). "c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis." J Exp Med **199**(8): 1041-1052.
- McCall MB, S. R. (2010). "Interferon- γ -central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria." J Leukoc Biol **88**(6): 1131-1143.
- Michel, D., G. Chatelain, et al. (1997). "Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene." Biochem J **328 (Pt 1)**: 45-50.
- Molnar, Z., Z. Simon, et al. (2010). "Prognostic value of FDG-PET in Hodgkin lymphoma for posttreatment evaluation. Long term follow-up results." Neoplasma **57**(4): 349-354.

- Montpetit, M. L., K. R. Lawless, et al. (1986). "Androgen-repressed messages in the rat ventral prostate." *Prostate* **8**(1): 25-36.
- Nascimento, A. F., J. L. Pinkus, et al. (2004). "Clusterin, a marker for anaplastic large cell lymphoma immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic malignant neoplasms." *Am J Clin Pathol* **121**(5): 709-717.
- Northrup, D. L. and D. Allman (2008). "Transcriptional regulation of early B cell development." *Immunol Res* **42**(1-3): 106-117.
- O'Bryan, M. K., H. W. Baker, et al. (1990). "Human seminal clusterin (SP-40,40). Isolation and characterization." *J Clin Invest* **85**(5): 1477-1486.
- Pettitt, A. R., P. D. Sherrington, et al. (2001). "p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation." *Blood* **98**(3): 814-822.
- Poon, S., S. B. Easterbrook-Smith, et al. (2000). "Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state." *Biochemistry* **39**(51): 15953-15960.
- Punnett, A., R. W. Tsang, et al. (2010). "Hodgkin lymphoma across the age spectrum: epidemiology, therapy, and late effects." *Semin Radiat Oncol* **20**(1): 30-44.
- Re, D., M. Muschen, et al. (2001). "Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells." *Cancer Res* **61**(5): 2080-2084.
- Rizzi, F. and S. Bettuzzi (2008). "Targeting Clusterin in prostate cancer." *J Physiol Pharmacol* **59 Suppl 9**: 265-274.
- Rizzi, F. and S. Bettuzzi (2010). "The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis." *Endocr Relat Cancer* **17**(1): R1-17.
- Rizzi, F., A. E. Caccamo, et al. (2009). "Clusterin is a short half-life, poly-ubiquitinated protein, which controls the fate of prostate cancer cells." *J Cell Physiol* **219**(2): 314-323.
- Roitt I, B. J., Male D., Ed. (2001). *Immunology, sixth edition*, Mosby.
- Rosenberg, M. E. and J. Silksen (1995). "Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations." *Int J Biochem Cell Biol* **27**(7): 633-645.
- Sallman, D. A., X. Chen, et al. (2007). "Clusterin mediates TRAIL resistance in prostate tumor cells." *Mol Cancer Ther* **6**(11): 2938-2947.
- Scaltriti, M., M. Brausi, et al. (2004). "Clusterin (SGP-2, ApoJ) expression is downregulated in low- and high-grade human prostate cancer." *Int J Cancer* **108**(1): 23-30.
- Scaltriti, M., A. Santamaria, et al. (2004). "Intracellular clusterin induces G2-M phase arrest and cell death in PC-3 prostate cancer cells1." *Cancer Res* **64**(17): 6174-6182.
- Schepeler, T., F. Mansilla, et al. (2007). "Clusterin expression can be modulated by changes in TCF1-mediated Wnt signaling." *J Mol Signal* **2**: 6.
- Schwering, I., A. Brauning, et al. (2003). "Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma." *Blood* **101**(4): 1505-1512.
- Seliger, B., F. Ruiz-Cabello, et al. (2008). "IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors." *Adv Cancer Res* **101**: 249-276.
- Shannan, B., M. Seifert, et al. (2006). "Clusterin and DNA repair: a new function in cancer for a key player in apoptosis and cell cycle control." *J Mol Histol* **37**(5-7): 183-188.
- Shannan, B., M. Seifert, et al. (2006). "Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer." *Cell Death Differ* **13**(1): 12-19.

- Shimada, K., M. Saeki, et al. (2010). "RPAP3 enhances cytotoxicity of doxorubicin by impairing NF-kappa B pathway." Biochem Biophys Res Commun.
- Skinninger, B. F. and T. W. Mak (2002). "The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma." Blood **99**(12): 4283-4297.
- Smith, L. B. (2010). "Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma: diagnostic pearls and pitfalls." Arch Pathol Lab Med **134**(10): 1434-1439.
- Stein, H., T. Marafioti, et al. (2001). "Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription." Blood **97**(2): 496-501.
- Takahashi, Y., H. Ohta, et al. (2001). "Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire." Immunity **14**(2): 181-192.
- Thomas-Tikhonenko, A., I. Viard-Leveugle, et al. (2004). "Myc-transformed epithelial cells down-regulate clusterin, which inhibits their growth in vitro and carcinogenesis in vivo." Cancer Res **64**(9): 3126-3136.
- Torlakovic, E., A. Tierens, et al. (2001). "The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease." Am J Pathol **159**(5): 1807-1814.
- Trougakos, I. P. and E. S. Gonos (2002). "Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer." Int J Biochem Cell Biol **34**(11): 1430-1448.
- Wellmann, A., C. Thieblemont, et al. (2000). "Detection of differentially expressed genes in lymphomas using cDNA arrays: identification of clusterin as a new diagnostic marker for anaplastic large-cell lymphomas." Blood **96**(2): 398-404.
- Wilson, M. R. and S. B. Easterbrook-Smith (2000). "Clusterin is a secreted mammalian chaperone." Trends Biochem Sci **25**(3): 95-98.
- Yamamoto, R., M. Nishikori, et al. (2008). "PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma." Blood **111**(6): 3220-3224.
- Yamamoto, R., M. Nishikori, et al. (2009). "B7-H1 expression is regulated by MEK/ERK signaling pathway in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma." Cancer Sci **100**(11): 2093-2100.
- Yang, C. R., K. Leskov, et al. (2000). "Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5907-5912.
- Yeh, Y. C., H. C. Lai, et al. (2007). "Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes." Biochem Pharmacol **74**(7): 969-980.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare va al Dott. Francesco Merli, Direttore della Struttura Complessa di Ematologia dell'Azienda Ospedaliera S.Maria Nuova di Reggio Emilia, il quale ha supportato e supervisionato le ricerche sino dal loro inizio. Un ringraziamento va al Laboratorio di Biologia Molecolare della stessa Azienda Ospedaliera.

Un sentito ringraziamento va anche al Prof. Saverio Bettuzzi ed alla Dott.ssa Federica Rizzi dell'Università degli Studi di Parma, in quanto hanno sempre dimostrato grande disponibilità e mi hanno saputo dare utili consigli.

Un doveroso ringraziamento è infine rivolto a tutta la mia famiglia.