

Difetti di "signalling" in linfociti T di pazienti con neoplasie: ruolo delle colture cellulari in biologia molecolare diagnostica

Massimiliano M. Corsi*, Vanna Chigorno ^

*Istituto di Patologia Generale, Laboratorio di Patologia Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Milano

^Dipartimento di Chimica e Biochimica Medica-L.I.T.A., Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Milano

Preparato per il Gruppo di Studio 04-Culture Cellulari in Biochimica Clinica-SIBioC

ABSTRACT

Signalling defects in T lymphocytes of patients with cancer: role of cell culture in diagnostic molecular biology

The purpose of this brief review is to summarize current evidence for the possibility that tumor induces abnormalities in the signalling pathways mediated via TCR in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) as well as peripheral blood T cells (PBL-T) of patients with cancer. In addition, the mechanisms that might be responsible for TCR-associated signalling defects in these T cell are discussed. The overall objective is to emphasize the unlikely possibility that human tumors can and do induce immune cell dysfunction, and that the understanding of the mechanisms involved in subversion of antitumor responses is important for the design of future clinical trials with biological agents, which are expected to upregulate host antitumor responses.

RIASSUNTO

Lo scopo di questa breve rassegna è quella di mettere in evidenza la possibilità che un tumore possa indurre anomalie nel sistema segnale mediato dal TCR nei linfociti infiltranti il tumore (TIL) come anche nei linfociti T da sangue periferico (PBL-T) di pazienti portatori di cancro. In aggiunta, si discutono i meccanismi che potrebbero essere responsabili dei difetti del sistema segnale associato al TCR in questi linfociti T. L'obiettivo è quello di mettere in evidenza la sfortunata possibilità che i tumori umani possano indurre una disfunzione nelle cellule del sistema immunitario, e che il capire i meccanismi coinvolti nella inversione delle risposte antitumorali sia importante nel predisporre futuri trials clinici con agenti ad attività biologica, i quali si pensa che potrebbero essere coinvolti nella up-regolazione delle risposte antitumorali dell'ospite.

INTRODUZIONE

In pazienti affetti da cancro, sono state riportate alterazioni nella espressione del recettore dei linfociti T (TCR) sia nei linfociti infiltranti il tumore (TIL) che nei linfociti circolanti da sangue periferico (PBL). Attraverso un metodo quantitativo mediante citofluorimetria a flusso, è stata dimostrata una minore espressione della catena ζ del TCR in cellule CD4+ e CD8+ come anche in cellule natural killer (NK) in pazienti con patologia tumorale maligna. Cambiamenti nella espressione della catena ζ del TCR sono biologicamente significativi, perché l'assenza o la bassa espressione di questa molecola segnale nei TIL di pazienti allo stadio III o IV di tumori della testa e del collo (head and neck cancer) è predittiva di una ridotta sopravvivenza inferiore ai cinque anni rispetto ai pazienti con una normale espressione della catena ζ . Appare subito chiaro che l'espressione della catena ζ del TCR nei TIL può non solo

influenzarne la sopravvivenza ma anche predire una favorevole risposta alle terapie biologiche. I pazienti affetti da tumore inoltre mostrano una tendenza spontanea ex vivo al processo apoptotico nelle cellule mononucleari da sangue periferico (PBMC) paragonata a controlli normali, attraverso metodica del "TUNEL-test". Sembra che la catena ζ del TCR venga clivata dalle caspasi in cellule T coincubate con cellule tumorali; i risultati di alcuni di questi esperimenti hanno dimostrato che una ridotta o assente l'espressione della catena ζ del TCR e l'apoptosi dei linfociti T possano risultare in un effetto negativo del tumore sulle difese immunitarie dell'ospite. È nostra intenzione in questo breve articolo delineare le modalità di utilizzo nella diagnostica di laboratorio del dosaggio della l'espressione della catena ζ del TCR in pazienti con tumori maligni e le eventuali ricadute nel monitoraggio della terapia di tali pazienti.

RIDUZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA CATENA ζ DEL TCR DI LINFOCITI T IN PAZIENTI PORTATORI DI TUMORE

La catena ζ del TCR è responsabile della trasduzione di segnali inviati attraverso il recettore e di conseguenza la sua espressione è importante per l'attivazione delle cellule T (1). Studi recenti hanno dimostrato anomalie di espressione della catena ζ e di altre molecole di trasduzione del segnale associate con il TCR in TIL ottenuti da pazienti con tumore (2,3,4).

- Inizialmente queste anomalie sono state riportate nel modello murino con linee tumorali stabilizzate (5,6).
- Successivamente, utilizzando metodiche di Western Blot, sono state trovate le stesse anomalie in TIL di pazienti con tumore al colon, al rene, alla prostata, alla cervice uterina e all'ovaio (3,7,8,4,9), nei melanomi (10,11) ed anche nei tumori della testa e del collo (2).

L'espressione di tale molecola è diminuita anche nei linfociti T da sangue periferico (PBL) di pazienti con tumore rispetto a quelli ottenuti da volontari sani. La tecnica di Western Blot non è però né così sensibile né quantitativa, e la variabilità di espressione di tale catena ζ e di altre molecole crea molti problemi nella interpretazione di questi dati.

- E' stata suggerita la possibilità che il difetto di segnale osservato nei TIL e nei PBL di pazienti con tumore sia un artefatto indotto da proteasi derivanti da granulociti o monociti rilasciati durante la processazione dei campioni tissutali o ematici (12).
- Comunque l'assenza o la bassa espressione di tale catena ζ nei TIL osservata in immunocitochimica in criopreparati di biopsie di tumori umani di differente origine indica che queste anomalie esistono "in situ", e non possono essere determinate dalla processazione del tessuto (13,2,11).
- La riduzione nella espressione della catena ζ è più evidente nei TIL rispetto ai PBL degli stessi pazienti; questo sta ad indicare come le anomalie di tale catena siano indotte nelle cellule T dal tumore direttamente e che queste siano meno evidenti nei PBL-T rispetto che nella sede tumorale (TIL).

La citometria a flusso quantitativa applicata allo studio della catena ζ nelle cellule T di pazienti con tumore ha grandemente facilitato l'interpretazione di queste scoperte che per molto tempo avevano indotto perplessità nei ricercatori. E' parso subito evidente che valutando il "mean fluorescence intensity" (MFI), ovvero l'intensità media di fluorescenza, delle cellule T marcate con specifici anticorpi, si potevano quantificare significative differenze tra le cellule T di pazienti con tumore e quelle di soggetti controllo sani. Nella esperienza di uno degli autori di questa minireview, avendo approntato e perfezionato tale tecnica già nel 1996 presso il Microbiology and Tumor Biology Center (MTC), Dipartimento di Immunologia, Laboratorio di Oncologia Sperimentale diretto dal Prof. Rolf Kiessling MD PhD (14), l'espressione della catena ζ è normalmente più bassa rispetto a quella di CD-3 ϵ (15). Il MFI della catena ζ è sempre più basso nei TIL o nei linfociti da

linfonodi di pazienti con tumore con metastasi linfonodale, rispetto ai PBL-T degli stessi pazienti. La catena ζ responsabile della trasduzione del segnale del TCR è sottoppressa o assente nelle cellule T ottenute da pazienti portatori di tumore (2).

EVIDENZE PER L'INTERVENTO DIRETTO DEI TUMORI NELLA SOTTOREGOLAZIONE DELLA CATENA ζ

Il decremento della espressione della catena ζ nelle cellule T di pazienti con tumore è associata con difetti della trasduzione di segnale, come è manifestato dalla ridotta o assente mobilitazione di ioni Ca⁺⁺ e dal decremento della attività tirosin-chinasica; in aggiunta la bassa espressione della catena ζ in pazienti con tumore è stata associata con un alterato profilo citochinico, con conseguente riduzione a livello di proteina e di mRNA per interleuchina-2 e interferone- γ (13).

- Per testare direttamente l'ipotesi che il tumore induca aberrazioni esso stesso delle cellule T, sono state incubate cellule di tumore ovarico umano con PBL-T allogeneici o autologhi per vari periodi di tempo. Lo scopo è stato quello di determinare quali difetti nella trasduzione di segnale nei linfociti o altre funzioni linfocitarie fossero indotti dal contatto con le cellule tumorali. E' stata osservata una riduzione della espressione della catena ζ nelle cellule T attraverso metodiche di Western blot e di citofluorimetria a flusso dopo 24 di cocoltura (16). Questi risultati suggeriscono che il tumore induce l'attivazione di peptidasi nei linfociti T, e che questa degradazione enzimatica indotta dal tumore è responsabile del decremento o della assenza di espressione di molecole di trasduzione del segnale, incluso la catena ζ in linfociti attivati. (2,16). E' apparso come la cocoltura di linfociti con cellule tumorali potesse condurre all'inizializzazione del processo apoptotico nelle cellule T attivate; usando il TUNEL test, o i frammenti di DNA, è stata dimostrata la presenza di rotture al DNA in diverse popolazioni di linfociti coincubati con cellule tumorali. La via delle caspasi sembra essere la chiave di avvio degli eventi di inizio ed esecuzione del processo apoptotico (17). Recentemente un'analisi computerizzata della sequenza aminoacidica della catena ζ ha rivelato la presenza di siti sensibili all'azione di clivaggio attuata dalle caspasi, ed è stato dimostrato che la catena ζ è un substrato per la proteolisi mediata dalle caspasi intracellulatri (18). L'attivazione, indotta dal tumore, delle caspasi sembra essere responsabile della bassa od assente espressione della catena ζ e forse di altre proteine di segnale nei linfociti presenti nella zona limitrofa alla massa tumorale (TIL) o in quelli coincubati con il tumore "ex vivo".
- Un altro meccanismo, che include la generazione di radicali liberi dell'ossigeno in sede tumorale, è stato proposto per spiegare la riduzione della espressione della catena ζ nei pazienti portatori di neoplasia (19). Dal momento che il processo apoptotico è seguito dalla

produzione di radicali liberi dell'ossigeno, i due meccanismi di decremento della catena ζ non sembrano essere incompatibili.

DOWN-REGOLAZIONE DELLA CATENA ζ IN PBL-T DI PAZIENTI PORTATORI DI TUMORE

La riduzione nella espressione della catena ζ in PBL-T ottenuti da pazienti portatori di neoplasie è stata osservata da tanti gruppi di ricerca. Attraverso l'uso della citofluorimetria a flusso, è stato riscontrato un MFI più basso rispetto ai controlli (2,3,7,8,4,10,20). Tuttavia queste aberrazioni nella espressione della catena ζ non sono state riscontrate in tutti i pazienti con neoplasia, e se riscontrate, non in tutte le cellule T circolanti. I dati in letteratura mostrano come si sia anche riscontrata una bassa espressione della catena ζ in PBL-T di lesioni pre-maligne in donne con neoplasia cervicale intraepiteliale (3). Queste alterazioni nel segnale intracitoplasmatico delle cellule T e di altre funzioni cellulari divengono molto più evidenti se la malattia progredisce: per cui le implicazioni in campo diagnostico appaiono abbastanza evidenti, delineando la catena ζ del TCR come un ipotetico biomarker di questa progressione.

Inoltre la normale espressione di tale catena del TCR è biologicamente importante e non influenza solo la sopravvivenza dei pazienti con neoplasia, ma anche può essere un fattore prognostico per monitorare la risposta alla immunoterapia. Attualmente infatti, sembra evidente che la protezione delle cellule effettrici ad attività antitumorale dalle disfunzioni indotte dal tumore stesso, possa divenire il primario obiettivo della immunoterapia.

DISREGOLAZIONE DELLA CATENA ζ DEL TCR IN PATOLOGIE NON-TUMORALI

È stata descritta una riduzione della espressione della catena ζ localmente e nel liquido sinoviale di pazienti con artrite reumatoide (RA) (21,22). I risultati di tali studi suggeriscono che un difetto nella trasduzione di segnale dovuto a deficit del TCR possa spiegare la bassa reattività dei linfociti T sinoviali in pazienti con artrite reumatoide. Queste alterazioni della catena ζ del TCR hanno alcune correlazioni in comune con il fenomeno osservato nei pazienti con neoplasia.

- Recentemente in malattie reumatologiche su base autoimmunitarie quali il lupus (LES) è stata osservata una difettiva espressione della catena ζ del TCR (23)
- Durante processi di infiammazione cronica possono insorgere difetti in molecole deputate alla trasduzione del segnale. Questo appare evidente in infezioni croniche batteriche e virali; tra le infezioni batteriche, gli stadi avanzati di lebbra e tubercolosi sono caratterizzati da una perdita delle funzioni delle cellule T, la cui eziopatogenesi rimane oscura. Recentemente, è stata osservata una riduzione nella espressione della catena ζ del TCR in pazienti affetti da lebbra (24).

CONCLUSIONI

Rimane tuttavia difficile dimostrare quale parametro possa predire al meglio la perdita di funzionalità dei linfociti in patologie come le neoplasie, o le infiammazioni croniche; si evince dalla letteratura che il dosaggio della espressione della catena ζ del TCR attraverso metodiche di biologia molecolare o citofluorimetriche possa risultare utile nel monitoraggio di pazienti portatori di neoplasia, soprattutto per riuscire a predire quali pazienti potranno rispondere meglio alla immunoterapia, o addirittura valutare l'efficacia della stessa (25).

BIBLIOGRAFIA

1. Weiss A, Littman DR. Signal Transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 1994; 76:263-74.
2. Reichert TE, Rabinowich H, Johnson JT, Whiteside TL. Immune cells in the tumor microenvironment: mechanisms responsible for signaling and functional defects. *J Immunother* 1998; 21:295-306.
3. Kono K, Rensing ME, Brandt SMP, Melief CJM, Potkul RK, Andersson B, Petersson M, Kast WM, Kiessling R. Decreased expression of signal-transducing ζ chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2:1825-8.
4. Lai P, Rabinowich H, Crowley-Nowick PA, Bell MC, Mantovani G, Whiteside TL. Alterations in expression and function of signal-transducing proteins in tumor-associated T and natural killer cells in patients with ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 1996; 2:161-73.
5. Loeffler CM, Smyth MJ, Longo DL, Kopp WC, Harvery LK, Tribble HR, Tase JE, Urba WJ, Leonard AS, Young HA, Ochoa AC. Immunoregulation in cancer bearing hosts. Down regulation of gene expression and cytotoxic function in CD8+ T cells. *J Immunol* 1992; 149:949-56.
6. Mizoguchi H, O'Shea JJ, Longo DL, Loeffler CM, McVicar DW, Ochoa AC. Alteration in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science* 1992; 258:1975-8.
7. Nakagomi H, Petersson M, Magnusson I, Juhlin C, Matsuda M, Mellstedt H, Taupin JL, Vivier E, Anderson P, Kiessling R. Decreased expression of signal-transducing ζ chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53:5610-12.
8. Finke JH, Zea AH, Stanley J, Longo DL, Mizoguchi H, Tubbs RR, Wiltrout RH, O'Shea JJ, Kudoh S, Klein E, Bukowski RM, Ochoa AC. Loss of T-cell receptor chain and p56^{lck} in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53:5613-6.
9. Healy CG, Simons JW, Carducci MA, DeWeese TL, Bartkowski M, Tong KP, Bolton WE. Impaired expression and function of signal-transducing ζ chains in peripheral T cells and natural killer cells in patients with prostate cancer. *Cytometry* 1998; 32:109-19.
10. Zea AH, Brendan CD, Longo DL, Alvord WG, Strobl SL, Mizoguchi H, Creekmore SP, O'Shea JJ, Powers GC, Urba WJ, Ochoa AC. Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1995; 1:1327-35.
11. Rabinowich H, Banks M, Reichert TE, Logan TF, Kirkwood JM, Whiteside TL. Expression and activity of signaling molecules in T lymphocytes obtained from patients with metastatic melanoma before and after interleukin-2 therapy. *Clin Cancer Res* 1996; 2:1263-72.
12. Aoe T, Okamoto Y, Saito T. Activated macrophages induce

- structural abnormalities of the T cell receptor-CD3 complex. *J Exp Med* 1995; 181:1881-86.
13. Rabinowich H, Suminami Y, Reichert TE, Crowley-Nowick P, Bell M, Edwards R, Whiteside TL. Expression of cytokine genes or proteins and signaling molecules in lymphocytes associated with human ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 1996; 68:276-84.
 14. Corsi MM, Maes HH, Wasserman K, Fulgenzi A, Gaja G, Ferrero ME. L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid (OTC) can protect CD3 and CD16 ζ chains down regulation induced by hydrogen peroxide in human PBLs and LAK cells. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 657-62.
 15. Kiessling R, Wasserman K, Horiguchi S, Kono K, Sjoberg J, Pisa P, Petersson M. Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48:353-62.
 16. Rabinowich H, Reichert TE, Kashii Y, Bell MC, Whiteside TL. Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand-expressing ovarian cancer cells: implications for altered expression of TCR in tumor-associated lymphocytes. *J Clin Invest* 1998; 101:2579-88.
 17. Gastman BR, Whiteside TL, Rabinowich H. Mechanisms of cytokine-mediated protection of lymphocytes from tumor-induced apoptosis. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1998 ; 39:145.
 18. Gastman BR, Johnson DE, Whiteside TL, Rabinowich H. Caspase-mediated degradation of TCR- ζ chain. *Cancer Res* 1999; 59:1422-27.
 19. Kono K, Salazar-Onfray F, Petersson M, Hansson J, Malsucci G, Wasserman K, Nakazawa T, Anderson P, Kiessling R. Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing ζ molecules and inhibits tumor-specific T cell- and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 1996; 26:1308.
 20. Kuss I, Saito T, Johnson JT, Whiteside TL. Clinical significance of decreased ζ chain expression in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5:329-34.
 21. Matsuda M, Ulfgren AK, Lenkei R, Petersson M, Ochoa AC, Lindblad S, Anderson P, Klareskog L, Kiessling R. Decreased expression of signal-transducing CD3- ζ chains in T cells from the joints and peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *Scand J Immunol* 1998; 47:254-8
 22. Maurice MM, Lankester AC, Bezemer AC, Geertsma MF, Tak PP, Breedveld FC, Lier RA van, Verweij CL. Defective TCR-mediated signaling in synovial T cells in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1997; 159:2973-9.
 23. Tsokos GC, Wong HK, Enyedy EJ, Nambiar MP. Immune cell signaling in lupus. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12:355-63.
 24. Zea AH, Ochoa MT, Ghosh P, Longo DL, Alvord WG, Valderrama L, Falabella R, Harvey LK, Saravia N, Moreno LH, Ochoa AC. Changes in expression of signal transduction proteins in T lymphocytes of patients with leprosy. *Infect Immun* 1998; 66:499-505.
 25. Whiteside TL. Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48:346-52.