

Lo studio del recettore dei linfociti T (TCR) in medicina molecolare: l'importanza della catena ζ e di zeta associated protein-70 (ZAP-70) nella diagnostica oncologica*

Bruno Brando¹, Vanna Chigorno², Massimiliano M. Corsi³

¹Servizio di Immunoematologia e Trasfusione (SIMT), Ospedale di Legnano

²Dipartimento di Chimica, Biochimica e Biotecnologie per la Medicina, L.I.T.A., Segrate, Università degli Studi di Milano

³Istituto di Patologia Generale, Laboratorio di Patologia Clinica, Università degli Studi di Milano

*Preparato per il Gruppo di Studio-Culture Cellulari in Biochimica Clinica-SiBioC

RIASSUNTO

L'anergia dei linfociti viene definita come uno stato nel quale tali cellule sono vive ma incapaci di produrre interleuchina-2 e di moltiplicarsi in risposta ad un ottimale stimolo antigenico. L'anergia è correlata alla mancanza di catena ζ e di ZAP-70. Capire bene questi meccanismi biochimici e molecolari è molto importante per sviluppare nuove strategie di trattamento contro i tumori. Comprendere tali meccanismi ci permetterà di sviluppare nuovi metodi di valutazione dello stato immunitario dei pazienti in differenti condizioni cliniche nelle quali la tolleranza ha un ruolo importante, quali appunto i tumori, le patologie autoimmuni ed i trapianti d'organo.

ABSTRACT

T lymphocytes (TCR-signalling) study in molecular medicine: role of ζ chain and zeta associated protein-70 (ZAP-70) in diagnostic oncology

Anergy is defined as the state in which T lymphocytes are alive but incapable of producing interleukin-2 and expanding in response to optimal antigenic stimulation. Specifically, anergy is characterized by lack of activation of ζ chain and ZAP-70. Precise understanding of these biochemical and molecular events is necessary in order to develop novel treatment strategies against cancer. Understanding of these basis will allow the development of new assays to evaluate the immune status of patients in a variety of clinical settings in which tolerance has an important role, including cancer, autoimmune diseases, and organ transplantation.

IL RECETTORE PER L'ANTIGENE DEI LINFOCITI T

La natura molecolare del recettore per l'antigene dei linfociti T (TCR) responsabile del riconoscimento major histocompatibility complex (MHC)-ristretto dell'antigene, è stata chiarita negli anni '80. Un singolo recettore delle cellule T riconosce specificamente l'antigene associato all'MHC. L'antigene processato e le molecole MHC sono espresse come complessi sulla superficie delle APC già prima del coinvolgimento dei linfociti T.

Caratteristiche Biochimiche del Recettore di Tipo $\alpha\beta$
Il recettore per il complesso peptide-MHC presente sulla maggior parte dei linfociti T (Fig.1), quali i linfociti T helper ed i linfociti T citotossici (CTL) ristretti per MHC, è un eterodimero formato da due catene polipeptidiche denominate α e β , legate covalentemente da un ponte disolfuro (Un tipo diverso di TCR, formato da catene γ e δ , è più raro e può essere riscontrato su una piccola sottopopolazione di linfociti T).

Ruolo del recettore $\alpha\beta$ nel riconoscimento dell'antigene associato all'MHC

L'eterodimero $\alpha\beta$ riconosce il complesso formato dal peptide generato per processazione degli antigeni proteici estranei, e da molecole MHC autologhe ad esso legate. Molti approcci sperimentali hanno portato a questa conclusione:

1. Anticorpi anti-idiotipo generati verso cloni di linfociti T antigene-specifici ed MHC-ristretti immunoprecipitano soltanto l'eterodimero $\alpha\beta$.

2. Le caratteristiche peculiari della specificità delle cellule T, e precisamente la restrizione per l'MHC autologo e il riconoscimento di antigeni estranei, sono sempre legate e non segregano indipendentemente. Ad esempio, quando due linfociti T con diversa specificità antigenica e restrizione per MHC vengono fusi, la linea cellulare ibrida che ne deriva riconosce entrambi gli antigeni riconosciuti dalle due cellule parentali, ma con una restrizione indipendente per ciascuno di essi, come avveniva per le cellule di origine. Un singolo recettore conferisce quindi specificità sia per l'antigene che per l'MHC.

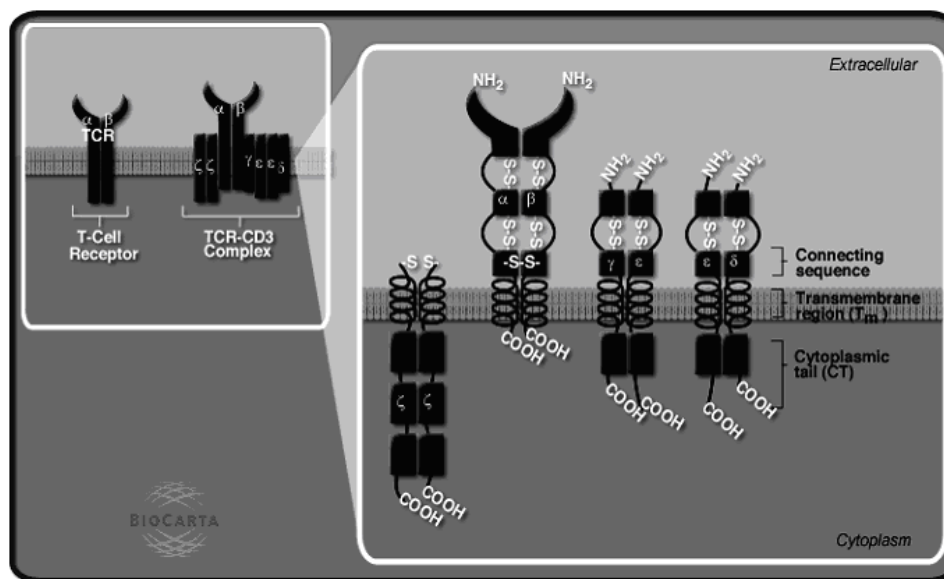


Figura 1
Rappresentazione del recettore T dei linfociti (TCR) (da www.BioCarta.com)

3. La prova definitiva che l'eterodimero $\alpha\beta$ è responsabile sia della specificità per l'antigene che della restrizione per l'MHC autologo è venuta da esperimenti con geni isolati per il TCR. In questi esperimenti, geni funzionali per il TCR venivano transfettati da un clone cellulare T dotato di una determinata specificità ad un altro clone T. Ne il gene α ne il gene β del TCR, transfettati isolatamente, conferiscono specificità o restrizione per MHC ad una cellula. Sulla base della struttura terziaria predetta per il TCR, e della sequenza dei geni del TCR ottenuta da un larghissimo numero di cloni T, è stato possibile definire le seguenti proprietà fondamentali della specificità del TCR:

a) Nella maggior parte dei casi, sia la catena α che la β sono coinvolte nel legame al peptide estraneo e alla molecola MHC autologa.

b) Porzioni diverse delle regioni ipervariabili della catena α e β , vale a dire i segmenti V, D o J, interagiscono con le pareti ad α -elica della tasca per il peptide della molecola MHC, o con residui aminoacidici del peptide estraneo che sporgono dalla tasca stessa.

c) Il fatto che un dato linfocita T sia ristretto per l'MHC di classe I o II non è determinato dai geni V, D, J o C usati dalle catene α e β del TCR di quella cellula; in altre parole, lo stesso set di geni TCR può essere espresso su cellule ristrette in classe I o II, ed i singoli TCR non sono esclusivi per una delle due sottopopolazioni. La capacità delle cellule T di rispondere ad antigeni associati a classe I o II è principalmente determinata dall'espressione di CD8 o di CD4, rispettivamente.

Le proteine CD3, ζ ed η associate al complesso recettoriale T

L'eterodimero TCR $\alpha\beta$ permette alle cellule T di riconoscere gli antigeni peptidici legati alle molecole MHC, ma

sia l'espressione in superficie delle molecole TCR che la loro funzione nell'attivare i linfociti T dipendono da altre quattro o cinque proteine associate in maniera non covalente all'eterodimero $\alpha\beta$; nel loro insieme queste proteine costituiscono il complesso TCR. Tre componenti di questo complesso sono denominate proteine CD3: esse comprendono una catena γ glicosilata di 25-28 kD, una catena δ glicosilata di 20 kD, e una catena ϵ non glicosilata di 20 kD. Le catene CD3 esistono verosimilmente come monomeri nell'ambito del complesso TCR. Il 90% dei complessi TCR contiene inoltre un omodimero della catena ζ non glicosilata e del peso di 16 kD, mentre il restante 10% contiene un eterodimero costituito dalla catena ζ e da una catena η non glicosilata di 22 kD. La stechiometria minima dei complessi TCR più comuni è quindi la seguente: $\alpha\beta:\gamma/\delta/\epsilon/\zeta_2$ (Fig.2).

Struttura ed Associazione delle Proteine CD3, ζ ed η

Le proteine CD3 sono state identificate per prime, addirittura prima dell'eterodimero $\alpha\beta$, grazie all'impiego di anticorpi monoclonali evocati contro i linfociti T; le catene ζ ed η sono state identificate successivamente, in quanto esse immunoprecipitano assieme alle proteine $\alpha\beta$ e CD3. I geni delle catene γ , δ ed ϵ sono altamente omologhi fra loro, situati nell'uomo sul cromosoma 11. Ogni catena ζ , δ ed ϵ comprende una porzione N-terminale extra-cellulare, un breve peptide di connessione, un segmento transmembrana, ed una coda intra-citoplasmatica. Le regioni extra-cellulari delle catene ζ , δ ed ϵ contengono ciascuna un dominio di tipo Ig; queste proteine appartengono quindi alla superfamiglia delle Ig. Non è stata identificata variabilità o polimorfismo nei domini extra-cellulari delle proteine CD3 o nei loro geni, e quindi non

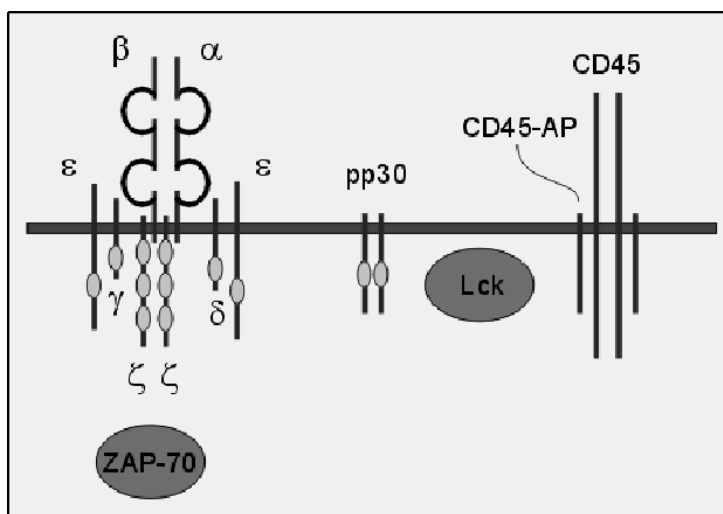


Figura 2

Stechiometria dei complessi TCR (da Yahoo Image search results for T Cell Receptor.url)

è verosimile che queste proteine contribuiscano alla specificità del riconoscimento antigenico. Il segmento trans-membrana di tutte e tre le catene contiene un residuo di acido aspartico caricato negativamente; questa insolita caratteristica può essere importante per l'associazione fisica o funzionale delle proteine CD3 con le catene α e β del TCR, dal momento che questi due ultimi polipeptidi contengono almeno un residuo caricato positivamente nel loro dominio trans-membrana. Le porzioni citoplasmatiche delle catene ζ , δ ed ε si estendono per 44-81 aa: esse sono quindi di lunghezza sufficiente a trasdurre segnali all'interno della cellula. In effetti, la coda citoplasmatica di ognuna delle catene che compongono CD3 contiene un motivo ritrovabile anche nella coda citoplasmatica di molte altre proteine di membrana coinvolte nella trasduzione del segnale, come le catene Ig- α ed Ig- β associate alle IgM e alle IgD di membrana, le catene β e γ di Fc ϵ RI, e le catene ζ ed η del complesso TCR stesso. Questo motivo, chiamato motivo di riconoscimento dell'antigene e di attivazione, è composto di 17 aa, in cui la sequenza tirosina-X-leucina si ripete due volte (X si riferisce ad un aa qualsiasi). Tale motivo è presente nella coda citoplasmatica di ognuna delle catene di CD3; esso è verosimilmente importante nel mediare la trasduzione del segnale.

Le catene ζ ed η sono codificate a partire da uno stesso gene, situato sul cromosoma 1, per "splicing" alternativo del trascritto RNA. Sia la catena ζ che η posseggono aa identici nella porzione extracellulare e trans-membrana, mentre differiscono nella coda citoplasmatica. I domini intra-cellulari sono brevi (9 aa), il dominio trans-membrana contiene un residuo di acido aspartico caricato negativamente (come per le catene γ , δ ed ε di CD3); il dominio citoplasmatico è molto esteso (113 e 155 aa per la catena ζ ed η rispettivamente). La coda citoplasmatica della catena ζ contiene il motivo di riconoscimento e di attivazione presente nella coda citoplasmatica delle catene CD3, ma ripetuto ben tre volte. La catena ζ può associarsi

ad altri recettori, come il recettore Fc γ (Fc γ RIII) delle cellule natural killer (NK).

L'associazione fisica tra eterodimero α/β CD3 e catena ζ/η è stata dimostrata mediante due approcci diversi:

1. Anticorpi diretti contro l'eterodimero α/β del TCR o le proteine CD3 co-precipitano da lisati cellulari sia l'eterodimero che le proteine ad esso associate.
2. Quando cellule T intatte vengono trattate con anticorpi anti-CD3 o anti-eterodimero α/β , l'intero complesso TCR viene endocitato e scompare dalla superficie cellulare; in altre parole, tutte le proteine, co-modulano.

Il ruolo delle proteine ζ ed η nell'assemblaggio del complesso recettoriale TCR

Una delle principali funzioni delle proteine CD3, ζ ed η è quello di favorire l'espressione dell'intero complesso TCR; in effetti, l'eterodimero TCR α/β e le catene CD3, ζ ed η sono dipendenti l'una dall'altra per l'espressione sulla superficie cellulare. La sintesi dei componenti del complesso recettoriale TCR, il loro assemblaggio e la conseguente espressione sulla superficie cellulare sono fenomeni strettamente regolati e coordinati che si verificano durante la maturazione dei linfociti T a livello timico. L'associazione dell'eterodimero α/β del TCR con il complesso CD3 $\gamma/\delta/\varepsilon$ avviene nel reticolo endoplasmico (ER); da qui il complesso viene trasportato al Golgi dove si verificano ulteriori modifiche dello stato di N-glicosilazione. Complessi incompleti non possono raggiungere la membrana plasmatica, probabilmente perché alcuni meccanismi ne inibiscono il trasporto fuori dal Golgi finché le molecole non sono tutte fisicamente associate tra loro. Le catene TCR/ α , TCR/ β , CD3/ γ , CD3/ δ e CD3/ ε vengono sintetizzate in grande eccesso rispetto alla quantità espressa sulla superficie cellulare; al contrario, la catena ζ viene sintetizzata in quantità limitante. Alcuni dati suggeriscono che omodimeri ζ/ζ debbano associarsi con un

complesso TCR α/β - CD3 $\gamma/\delta/\epsilon$ perché l'intera serie di proteine possa essere avviata verso la membrana plasmatica. La sintesi della catena ζ e la sua associazione con le altre proteine sono quindi un fattore limitante l'assemblaggio e l'espressione del TCR sulla superficie cellulare.

Trasduzione del segnale da parte delle proteine CD3, ζ ed ϵ

Quando l'antigene si lega al TCR le catene CD3 e le catene ζ/η ad esso associate trasducono il segnale nel citoplasma del linfocita T, portando alla sua attivazione funzionale (Fig. 3).

Molti dati sperimentali suffragano questa conclusione:

1. Anticorpi anti-CD3 possono stimolare risposte funzionali dei linfociti T del tutto identiche a quelle indotte dall'antigene. Tuttavia, a differenza dell'antigene, che stimola soltanto i linfociti T specifici, gli anticorpi anti-CD3 stimolano tutti i linfociti T di una popolazione cellulare, indipendentemente dalla loro specificità antigenica; gli anticorpi anti-CD3 si comportano quindi come attivatori policlonali delle cellule T.
2. La coda citoplasmatica della catena ϵ di CD3 e della catena ζ può trasdurre i segnali necessari per l'attivazione T in assenza di altri componenti del complesso TCR.
3. Le proteine CD3 e ζ possono legare tirosin-chinasi, e ne sono un substrato; le tirosin-chinasi vengono rapidamente attivate dopo il legame del complesso MHC-peptide al TCR. L'attività tirosinchinasica è considerata una tappa centrale nella cascata di segnali che porta alla trascrizione genica e alla risposta funzionale dei linfociti T.

Il riconoscimento dell'antigene è dunque legato esclu-

sivamente all'eterodimero TCR α/β , mentre i segnali che scatenano l'attivazione vengono trasdotti non da questo eterodimero, ma dalle proteine ad esso associate. Dobbiamo anche tener presente che, sebbene i segnali trasdotti dal complesso TCR siano necessari per avviare l'attivazione di un linfocita T normale, essi da soli non sono di solito sufficienti: sono anche necessari segnali co-stimolatori aggiuntivi, che interagiscono con molecole presenti sulla superficie dei linfociti T diverse dal TCR.

Le molecole accessorie coinvolte nell'attivazione dei linfociti T e nelle interazioni cellulari

Le proteine che compongono il complesso TCR sono le molecole cardine coinvolte nel riconoscimento specifico dell'antigene e nella conseguente attivazione funzionale dei linfociti T helper e dei CTL ristretti per MHC. Sulla superficie dei linfociti T sono tuttavia espresse numerose altre proteine integrali di membrana che svolgono un ruolo significativo sia nel riconoscimento dell'antigene che nelle risposte funzionali ad esso associate. Queste molecole mostrano numerose proprietà comuni:

Le molecole accessorie contribuiscono in varia maniera alla regolazione delle risposte immuni. È stato infatti osservato come la stimolazione del TCR in assenza di molecole costimolatorie comporti una fosforilazione parziale di TCR- ζ con induzione di anergia; al contrario, in loro presenza, la fosforilazione di TCR- ζ è completa e ciò permette il reclutamento di ZAP-70 ed in conclusione l'attivazione immunologicamente valida del linfocita T (84).

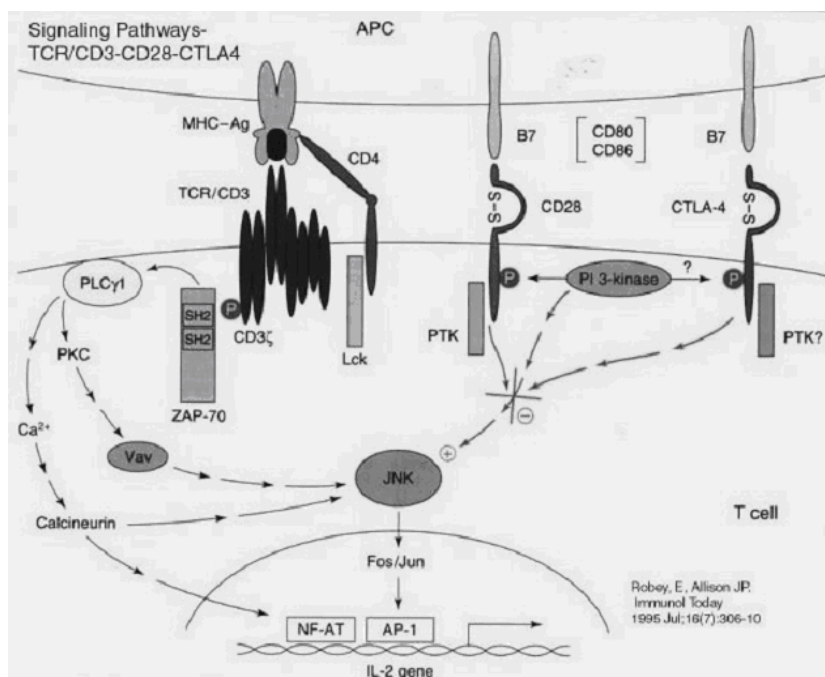


Figura 3
Via del segnale del complesso TCR (da Yahoo Image search results for T Cell Receptor.url)

Attivazione dei linfociti T

La proliferazione dei linfociti T in risposta al riconoscimento antigenico è sostenuta principalmente da un meccanismo di crescita autocrina: il linfocita T antigene-specifico produce le citochine che promuovono la sua stessa crescita, esprimendo al contempo sulla superficie cellulare anche i recettori per tali citochine. Il principale fattore di crescita autocrina per le cellule T è l'IL-2. Il risultato della risposta proliferativa è l'espansione clonale dei linfociti T antigene-specifici, necessari in gran numero per fronteggiare l'antigene estraneo. Parte della progenie delle cellule responsive all'antigene si evolve in linfociti T specifici della memoria, che daranno l'avvio ad una risposta immunitaria secondaria più vigorosa in occasione dei successivi contatti con l'antigene. Le funzioni effettrici dei linfociti T messe in moto dal riconoscimento dell'antigene sono il fondamento biologico che permette a cellule T di contrapporre una risposta immune efficace agli antigeni estranei.

La principale funzione effettrice dei linfociti T helper CD4⁺ è la secrezione di citochine, attive sulle stesse cellule T che le producono. La principale funzione effettrice dei CTL è quella di lisare le cellule bersaglio che espongono l'antigene; inoltre, anche i CTL secernono alcune citochine. La risposta linfocitaria T ai peptidi antigenici associati all'MHC consiste in una serie di eventi cellulari, chiamati nel loro insieme attivazione dei linfociti T. Il legame dei complessi antigene-MHC al complesso recettoriale TCR:CD3 genera segnali intra-cellulari che aumentano in maniera transitoria la trascrizione di molti geni inespresi nelle cellule T quiescenti; questo evento porta a sua volta alla temporanea produzione di proteine essenziali per la mitosi e la funzione delle cellule T.

L'attivazione dei linfociti T comprende quindi le seguenti tappe interdipendenti:

1. Eventi precoci di trasduzione del segnale
2. Attivazione trascrizionale di numerosi geni

3. Espressione di nuove molecole di superficie
4. Secrezione di molecole effettrici quali le citochine e/o dispiegamento delle funzioni citotossiche
5. Induzione dell'attività mitotica

Segnali di membrana ed intracellulari precoci

Quando un antigene viene presentato ad un linfocita T, o quando il TCR viene legato da un anticorpo ad azione attivatrice o da una lectina, si verificano rapidamente una serie di fenomeni di membrana e citoplasmatici. I principali eventi interconnessi che si verificano precocemente durante l'attivazione T sono essenzialmente quattro:

1. la fosforilazione in tirosina di molecole citoplasmatiche e di membrana
2. l'idrolisi dei fosfoinositoli di membrana
3. l'aumento della concentrazione intra-citoplasmatica del calcio
4. l'aumento dell'attività della proteinchinasi C.

Fosforilazione in tirosina e ruolo delle tirosin-chinasi nell'attivazione dei linfociti T

È noto che la fosforilazione di residui tirosinici delle proteine rappresenta una componente essenziale della trasduzione del segnale da parte di molti recettori per fattori di crescita in numerosi tipi cellulari. In effetti, le modificazioni biochimiche più precoci che si possono evidenziare, dopo interazione del ligando col TCR, sono la comparsa di residui tirosinici fosforilati su una serie di proteine citoplasmatiche e di membrana. Questi eventi fosforilativi sono mediati da fosfotirosinchinasi (PTK). La fosforilazione dei residui tirosinici di una proteina comporta due effetti generali. Anzitutto, essa permette ad altre proteine che contengono specifici siti di legame per tirosin-fosfato di legarsi alla proteina fosforilata (Fig.4). Negli

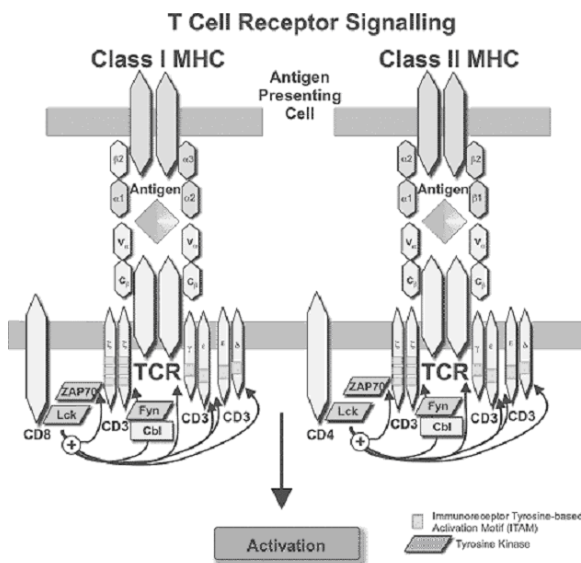


Figura 4
Attivazione cellulare attraverso il segnale di trasduzione correlato a ZAP70 (da Yahoo Image search results for T Cell Receptor.url)

eventi precoci di fosforilazione coinvolti nell'attivazione T sono state chiamate in causa tre diverse PTK. Due di queste, denominate *lck* e *fyn*, appartengono alla famiglia *src* delle PTK. *Lck* è espressa principalmente nei linfociti T ed è fisicamente associata con la coda citoplasmatica di CD4 e CD8. *Fyn* è espresso in molti tipi di cellule ematopoietiche, e può essere debolmente associato col motivo di riconoscimento e attivazione della catena del complesso TCR. L'attività chinasi *fyn* aumenta rapidamente a seguito della stimolazione via TCR. La terza PTK chiamata in causa nella trasduzione del segnale dal TCR è la proteina associata alla catena zeta del peso molecolare di 70 kD e per questo denominata zeta-associated protein 70 (ZAP-70), omologa ad una PTK dei linfociti B denominata *syk*, ma espressa esclusivamente in linfociti T e cellule NK. La chinasi ZAP contiene domini SH2, e si associa strettamente al motivo citoplasmatico di attivazione della catena zeta, nonché (forse) delle catene di CD3 dopo stimolazione del TCR. L'attività enzimatica della chinasi ZAP sembra dipendere da questa associazione; i suoi substrati sono tuttavia scarsamente definiti.

In un modello semplificato ma attuale del ruolo delle PTK negli eventi precoci coinvolti nell'attivazione T, il riconoscimento da parte del TCR dei complessi peptide-MHC induce l'associazione di CD4 (o di CD8) col complesso TCR, portando così *lck* in stretta vicinanza con la coda citoplasmatica delle proteine del complesso TCR. *Lck* o altre tirosin-chinasi fosforilano quindi i residui tirosinici sui motivi di attivazione delle catene CD3 e ζ ; questo permette l'aggancio, la fosforilazione e l'attivazione enzimatica della chinasi ZAP. Anche PI-PLC- γ 1 viene agganciato al complesso TCR, e fosforilato da una PTK, forse proprio dalla chinasi ZAP. PI-PLC- γ 1 attivata e forse altri substrati della chinasi ZAP sono responsabili degli eventi successivi della cascata di trasduzione del segnale. La ridondanza dei motivi di attivazione sulla coda citoplasmatica delle proteine del complesso TCR serve probabilmente ad amplificare l'effetto dell'interazione con l'antigene, permettendo il legame di molte molecole effettrici, quali la chinasi ZAP; in alternativa è anche possibile che molecole effettrici differenti si leghino a copie diverse di tali motivi.

INTERAZIONE TUMORE - OSPITE

Sebbene i tumori originino da tessuti "self", il processo di trasformazione maligna può accompagnarsi all'espressione di antigeni tumorali in grado di indurre una risposta immunitaria diretta contro le cellule neoplastiche che li esprimono, come dimostra la frequente infiltrazione intratumorale di cellule immunocompetenti (1).

Il riscontro di una iperplasia a livello dei linfonodi drenanti la sede della neoplasia costituisce un altro segno della correlazione esistente tra risposta immunitaria e tumore (2): numerosi studi evidenziano infatti una maggiore incidenza di neoplasie del distretto testa e collo, del polmone e della mammella in pazienti immunocompromessi (3).

Gli antigeni espressi dalle cellule tumorali possono

essere suddivisi in due gruppi principali: molecole riconosciute dai linfociti T (proteine cellulari processate e presentate come complessi MHC-peptide) e molecole che possono essere messe in evidenza con anticorpi prodotti per immunizzazione di animali di una specie con cellule tumorali ottenute da una specie diversa (anticorpi xenogenetici) (2).

Alla luce di tali considerazioni, risulta evidente che il sistema immunitario svolge un'azione di immunosorveglianza anche nei confronti delle cellule neoplastiche, benché le regole che governano tali meccanismi non siano del tutto chiare e tale azione di immunosorveglianza risulti spesso inefficace (4).

Partecipano alla risposta immunitaria antitumorale cellule NK, cellule dendritiche, macrofagi, neutrofilii, eosinofili, il complemento, varie citochine, anticorpi specifici e linfociti T specifici (5,6). Le risposte immunitarie cellulari possono essere suddivise in due categorie: una immunità antigenica specifica mediata da cellule T in grado di riconoscere antigeni peptidici tumorali espressi in associazione a molecole MHC di I e II classe e una immunità antigenica non specifica mediata da cellule NK attivate dalla mancata espressione, da parte delle cellule neoplastiche, di molecole MHC di I classe (7).

I linfociti T citotossici (CD8⁺) rappresentano i maggiori effettori coinvolti nella distruzione immunologicamente determinata delle cellule neoplastiche (8), e la presenza di linfociti T infiltranti il tumore (TILs) è associata, per talune neoplasie, con la regressione tumorale ed una migliore prognosi (9,10). Inoltre, specificatamente per il distretto della testa e del collo, è stato osservato che pazienti con carcinomi squamocellulari in stadio meno avanzato e privi di recidiva dopo trattamento presentavano un numero di linfociti T maggiore rispetto ai pazienti con neoplasie in stadio più avanzato o con recidiva (11).

Le cellule NK sono linfociti in grado di attaccare preferenzialmente cellule che presentano una ridotta espressione di antigeni MHC di classe I. In seguito alla loro attivazione, rilasciano citochine pro-infiammatorie e modulano l'attività e la differenziazione di monociti, cellule dendritiche e granulociti, influenzando in ultima analisi la risposta immunitaria (12).

Accanto a linfociti T e cellule NK, che rappresentano sicuramente i maggiori effettori della risposta immunitaria al cancro, un importante ruolo di bilanciamento tra risposta umorale e cellulosa-mediata sembra essere svolto dai polimorfonucleati grazie alla loro capacità di promuovere una risposta Th-1 o Th-2 (13).

I polimorfonucleati, inoltre, non solo giocano un ruolo fondamentale in tutte le reazioni citochino-mediate (14), ma sono anche in grado di produrre numerosi mediatori citotossici, quali radicali liberi dell'ossigeno, proteasi, TNF- α , IL-1 ed interferoni (15-18).

Nonostante tale complessa e strutturata risposta immunitaria, risulta evidente come il sistema immunitario non sia in grado di espletare una immunosorveglianza costantemente efficace (2). Il processo di elusione delle difese immunitarie non è del tutto chiarito, ma verosimilmente riconosce differenti meccanismi:

1. L'espressione delle molecole MHC di I classe sulle cellule tumorali può essere regolata negativamente; in tal modo non è possibile la formazione dei complessi tra peptidi antigenici tumorali e molecole MHC necessari per il riconoscimento e l'attivazione dei linfociti T citotossici. Tuttavia, come già precedentemente esposto, la down-regulation dell'espressione MHC di I classe espone la cellula all'attacco da parte delle cellule NK. L'esatta dinamica ed i rapporti tra questi due eventi non è ancora completamente chiarita (19).

2. La maggior parte delle cellule tumorali non esprime molecole MHC di classe II e quindi non è in grado di attivare direttamente i linfociti T helper CD4⁺. La mancata adeguata infiltrazione nel tessuto neoplastico da parte di Antigen Presenting Cells (APC), in grado di attivare a loro volta i T helper, non permetterà una ottimale produzione di linfociti T citotossici specifici. Inoltre, anche qualora la cellula neoplastica esprima il complesso peptide/MHC-II, la frequente mancanza di produzione di molecole costimolatorie (quali ad esempio B7) potrebbe indurre una anergia clonale periferica da parte dei linfociti T tumore-specifici (20).

3. Sono stati dimostrati, in linfociti T isolati da pazienti affetti da neoplasie cervico-cefaliche, numerosi difetti funzionali quali una ridotta capacità di attivare linfociti alloge-nici, un deficit di capacità replicativa ed una ridotta capacità di espressione di antigeni Ia (21); questi riscontri indicano che l'immunocompetenza di questi pazienti risulta compromessa, in particolar modo nell'interazione tra linfociti T e macrofagi, analogamente a quanto avviene in pazienti affetti da altre forme di immunodeficienza (22).

4. Prodotti tumorali possono sopprimere la risposta immunitaria verso il tumore. Capacità inibenti un'ampia gamma di funzioni linfocitarie sono state dimostrate per il TGF- β e l'IL-13 (23-25); per il TGF- β sono stati inoltre dimostrati un effetto antiproliferativo diretto sulle cellule T ed un'inibizione della capacità di agire da "Antigen Presenting Cells" da parte di cellule immunocompetenti midollari stimulate da citocine (26). L'IL-2 ha azione pro-apoptotica per i linfociti T attivati (27,28). L'IL-10 inibisce l'espressione delle molecole MHC di classe II e regola negativamente l'espressione di molecole costimolatorie necessarie all'attivazione dei linfociti T (29,30). Più complessa e non ancora del tutto chiarita sembra essere l'attività dell'IFN- γ : secondo alcuni studi inibisce l'attività delle cellule T ed NK (27,28), mentre secondo altri sarebbe coinvolto nell'attivazione di segnali che conducono la cellula all'apoptosi (31).

5. La risposta antitumorale stessa potrebbe tradursi nella selezione di cellule tumorali alterate che hanno perduto la capacità di esprimere complessi immunogenici MHC-correlati in seguito a mutazioni o delezioni a carico dei geni che codificano per gli antigeni tumorali; in alternativa, l'immuno-selezione potrebbe favorire la crescita di cellule tumorali con mutazioni o delezioni a carico dei geni MHC, i cui prodotti sono necessari per la corretta presentazione dei peptidi antigenici (2).

6. La cinetica della crescita tumorale potrebbe permettere lo stabilirsi di tumori resistenti all'attacco del sistema

immunitario prima che si sviluppi una efficace risposta immunitaria nei loro confronti. Tale fenomeno è definito "sneaking through" o "dilution escape" (ossia la crescita eccessiva ed irreversibile di un tumore prima dell'attuazione di una adeguata risposta immunitaria) ed è stato dimostrato con studi di trapianto tumorale su modello animale: il trapianto di un piccolo numero di cellule neoplastiche può portare allo sviluppo di un tumore fatale senza che si verificano segni di rigetto, mentre con l'introduzione di un numero di cellule più elevato si assisteva ad un rigetto della neoplasia. Una delle possibili spiegazioni per questo apparente paradosso è che una ridotta dose anticorpale non sia sufficiente a stimolare il sistema immunitario e successivamente, allorché le cellule tumorali sono numericamente espanse, nei geni che codificano per gli antigeni tumorali possono già essersi verificate mutazioni tali da precludere la possibilità di un riconoscimento immunologico (32-34).

7. Gli antigeni presenti sulle cellule neoplastiche possono celarsi al sistema immunitario, mediante un "mascheramento antigenico" dato da mucopolisaccaridi ricchi in acido sialico, espressi in gran quantità dalle cellule neoplastiche o da fibrina, prodotta in seguito all'attivazione della cascata della coagulazione (2).

8. L'ipossia, che spesso si verifica durante lo sviluppo di tumori solidi per la loro rapida crescita o che, secondo evidenze più recenti, rappresenterebbe un'adattamento della neoplasia al fine di favorire la propria crescita, potrebbe contribuire ad una riduzione della risposta immunitaria. Benché il significato di tale fenomeno non sia del tutto chiarito, è stato proposto che l'ipossia attivi una risposta adrenergica locale in grado di inibire la funzione T-helper 1, vitale per la risposta antineoplastica dell'ospite, in favore della T-helper 2 (35). Secondo altri studi, invece, l'ipossia indurrebbe la produzione, da parte delle cellule neoplastiche, di fattori di crescita in grado di promuovere la metastatizzazione (27). Entrambe queste ipotesi necessitano di ulteriori validazioni.

9. È stata osservata, in numerosi tumori solidi, una elevata produzione di vascular endothelial growth factor (VEGF), in grado di ridurre il numero di linfociti T e B negli organi linfatici periferici e di inibire la maturazione e la migrazione delle cellule dendritiche, che ricoprono un ruolo fondamentale nel trasporto degli antigeni dai tessuti agli organi linfatici (6,36).

10. In alcune neoplasie è stata osservata una over-espressione di proteine di membrana in grado di rendere la cellula resistente all'attacco del complemento, quali CD55, CD46, CD35 e CD59. Le cellule neoplastiche possono inoltre secernere inibitori del complemento ed esprimere proteasi, come C3 o C9, in grado di degradare o fosforilare proteine del complemento (37,38).

In conclusione è oggi indubbio che la maggior parte delle neoplasie siano in grado di indurre una risposta immunitaria dell'ospite inefficace.

L'esatta comprensione dei meccanismi alla base di tale inefficacia non è ad oggi ancora sufficientemente chiarita e numerose sono le ricerche sull'attività del sistema immunitario e sulla evoluzione clinico-prognostica dei

carcinomi della testa e del collo, che soventemente presentano una evoluzione differente a parità di stadio clinico-patologico iniziale.

Come esposto nei paragrafi precedenti, è ormai acquisito che la presenza di cellule neoplastiche determini l'instaurarsi di una risposta immunitaria da parte dell'organismo ospite, principalmente ad opera dei linfociti T, che tuttavia si dimostra nella maggior parte dei casi insufficiente (39). Nonostante ciò, il motivo del mancato controllo della neoplasia da parte dei linfociti T ed i meccanismi che permettono alla stessa di sfuggire alla risposta immunitaria risultano, ad oggi, uno dei problemi irrisolti della immunologia moderna. Numerosi studi sono stati condotti con lo scopo di chiarire le basi biochimiche e molecolari responsabili dell'anergia T cellulare (40), ossia quella condizione nella quale i linfociti T helper sono vivi ma non in grado di proliferare e di produrre IL-2 come risposta ad una stimolazione antigenica correttamente presentata. In tale condizione i linfociti T citotossici sono attivati dall'antigene in assenza di costimolazione da parte dell'IL-2 con conseguente mancata attivazione di quella cascata enzimatica che si realizza per una attivazione recettoriale completa del TCR (41,42). Per una corretta attivazione della stimolazione TCR-mediata, è infatti indispensabile non solo che l'antigene specifico venga presentato al linfocita T in associazione a molecole MHC di classe II, ma anche che siano presenti molecole costimolatorie che si legano a specifici recettori di membrana del linfocita (43). La stimolazione antigenica in assenza di costimolazione comporta in ultima analisi una ridotta fosforilazione di TCR ζ ed un deficit di attivazione di Ick e ZAP-70 (44,45).

Gli studi condotti sui rapporti tra neoplasie e sistema immunitario hanno portato alle seguenti considerazioni preliminari:

1. In pazienti affetti da carcinoma squamocellulare della testa e del collo è stata osservata, rispetto ai controlli sani, una riduzione statisticamente significativa del numero dei linfociti T circolanti, espressione di un incremento del numero di apoptosi (46,47).

2. Il numero assoluto dei linfociti T tende a risalire e normalizzarsi dopo trattamento chirurgico radicale, mentre si mantiene a valori più bassi nei pazienti che presentano recidiva o seconde neoplasie (48).

3. Il numero dei linfociti T è predittivo della sopravvivenza nei pazienti affetti da neoplasia (49).

4. E' stata osservata un'associazione statisticamente significativa tra le alterazioni a carico dei linfociti T ed un peggioramento della prognosi in pazienti affetti da numerose neoplasie, tra cui il melanoma, il carcinoma della mammella ed il carcinoma cervico-cefalico (49-51).

5. Una alterata espressione della catena ζ del recettore dei linfociti T è stata osservata in pazienti affetti da carcinoma renale, del colon-retto, della prostata, dell'ovaio, del distretto testa-collo e della cervice uterina. L'espressione di tale molecola è diminuita anche nei linfociti T prelevati da sangue periferico di pazienti affetti da neoplasia rispetto a controlli sani. (52-53).

6. In pazienti affetti da melanoma è stata osservata una correlazione tra riduzione della sopravvivenza e ridotta

espressione della catena ζ del TCR (54).

7. In linfociti T circolanti ed infiltranti il tumore di pazienti affetti da melanoma, carcinoma renale, ovarico e della mammella è stata osservata una concomitante ridotta espressione della catena ζ e di tirosin kinesi quali Ick e ZAP-70 (55,56).

8. L'espressione di ZAP-70 è un fattore prognostico nella leucemia linfoblastica cronica (57).

9. L'assenza o la bassa espressione della catena ζ del TCR nei linfociti T infiltranti il tumore di pazienti affetti da carcinoma squamocellulare della testa e del collo allo stadio III e IV è predittiva di una ridotta sopravvivenza a cinque anni rispetto ai pazienti con una normale espressione della catena ζ (53).

10. Le neoplasie caratterizzate da una normale espressione della catena ζ presentano una maggiore sensibilità a nuove terapie basate sulla somministrazione di molecole che attivano il sistema immunitario (53).

11. In differenti neoplasie, tra cui quelle del cavo orale, la riduzione nella espressione della catena ζ è più evidente nei linfociti T infiltranti il tumore rispetto a quelli circolanti; questo sta ad indicare come le anomalie di tale catena siano indotte nelle cellule T direttamente dal tumore (53,58).

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas AK, Lichtman AH and Pober JS. Cellular and molecular immunology, 2nd Edition. By WB Saunders Company, Philadelphia 1994.
2. Hadden JW. Immunodeficiency and cancer: prospects for correction. *Int Immunopharmacol* 2003; 3:1061-1071.
3. Bartholomae WC, Rininsland FH, Eisenberg JC, Boehm BO, Lehmann PV and Lehmann M. T cell immunity induced by live, necrotic and apoptotic tumor cells. *J Immunol* 2004; 173:1012-1022.
4. Jakobisiak M, Lasek W and Golab J. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett* 2003; 90:103-122.
5. Vicari AP, Caux C, Trinchieri G. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol.* 2002; 12:33-42.
6. Walzer EK. Cellular immunotherapy and cancer. *Semin Oncol* 2004; 31:87-90.
7. Shiku H. Importance of CD4+ helper T-cells in antitumor immunity. *Int J Hematol* 2003; 77:435-438.
8. Trojan A, Urosevic M, Dummer R, Giger R, Weder W, Stahel RA. Immune activation status of CD8+ T cells infiltrating non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 44:143-147.
9. Kus J, Miodonki AJ, Olszewski E, Sekula J. Cellular elements of the immune system in the larynx cancer, SEM study. *Folia Histochem Cytobiol* 1985; 23:155-158.
10. Guo M, Rabin BS, Johnson JT, Paradis IL. Lymphocyte phenotypes at tumor margins in patients with head and neck cancer. *Head Neck Surg* 1987; 9:265-271.
11. Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 2003; 90:127-156.
12. Romani L, Bistoni F, Puccetti P. Initiation of T-helper cell immunity to *Candida albicans* by IL-12: the role of neutrophils. *Chem Immunol* 1997; 68:110-135.
13. Musiani P, Allione A, Modica A, et al. Role of neutrophils and lymphocytes in inhibition of a mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-2, IL-4, IL-7, IL-10,

- IFN- α , IFN- γ , and TNF- α . *Lab Invest* 1996; 74:146-157.
14. Jaeschke H, Wayne Smith C. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 1997; 61:647-653.
 15. Schreiber GJ, Hellstrom KE, Hellstrom I. An unmodified anticarcinoma antibody, BR96, localizes to and inhibits the outgrowth of human tumors in nude mice. *Cancer Res* 1992; 52:3262-3266.
 16. Lichtenstein AK, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. Synergistic cytotoxicity mediated by Hydrogen peroxide combined with peptide defensins. *Cell Immunol* 1988; 114:104-116.
 17. Okrent DG, Lichtenstein AK, Ganz T. Direct cytotoxicity of polymorphonuclear leukocyte granule proteins to human lung-derived cells and endothelial cells. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:179-185.
 18. Bubenik J. MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? (review). *Int J Oncol* 2004; 25:487-491.
 19. Remedi MM, Bonacci G, Vides MA, Donadio AC. Immune control of tumors by antigen presentation improvement. *Tumor Biol* 2003; 24:228-235.
 20. Pierri I, Cordone G, Rogna S, Piccardo C, Barbino A, Indiveri F. T-lymphocytes phenotype and functions in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* 1985; 95:577-581.
 21. Pierri I, Cordone G, Rogna S, Pende D, Garaventa G, Barbino A, Indiveri F. Decreased sensitivity of T lymphocytes to normal adherent suppressor cells in patients with head and neck cancer. *Cancer Detect Prev* 1984; 7:73-78.
 22. Terabe M, Park JM, Berzofski JA. Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53:79-85.
 23. Wojtowicz-Praga S. Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF- β inhibitors. *Invest New Drugs* 2003; 21:21-32.
 24. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:425-56.
 25. Bonham CA, Lu L, Banas RA, Fontes P, Rao AS, Starzl TE, Zeevi A, Thomson AW. TGF- β 1 pretreatment impairs the allostimulatory function of human bone marrow-derived antigen presenting cells for both naive and primed T cells. *Transplant Immunol* 1994; 4:186-191.
 26. Pawelec G. Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing? *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53:262-274.
 27. Lukacher AE. IFN- γ suspends the killing license of anti-tumor CTLs. *J Clin Invest* 2002; 110:1407-1409.
 28. Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role of IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* 1993; 151:2390-2398.
 29. Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997; 159:4772-4780.
 30. Blanck G. Components of the IFN- γ signaling pathway in tumorigenesis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2002;50(3):151-8.
 31. Mengersen R, Schick R, Kolsch E. Correlation of "sneaking through" of tumor cells with specific immunological impairment of the host. *Eur J Immunol* 1975; 5:532-7.
 32. Klein G. Mechanisms of escape from immune surveillance. *Natl Cancer Inst Monogr* 1976; 44:135-6.
 33. De Boer RJ, Hogeweg P. Tumor escape from immune elimination: simplified precursor bound cytotoxicity models. *J Theor Biol* 1985 Apr 21;113:719-36.
 34. Joon Yun A, Bazar KA, Lee PY. Tumors may modulate host immunity partly through hypoxia-induced sympathetic bias. *Med Hypotheses* 2004; 63:352-356.
 35. Carbone JE, Ohm DP. Immune dysfunction in cancer patients. *Oncology (Huntingt)* 2002; 16:11-18.
 36. Jurianz K, Ziegler S, Garcia-Schuler H, Kraus S, Bohana-Kashtan O, Fishelson Z, Kirschfink M. Complement resistance of tumor cells: basal and induced mechanisms. *Mol Immunol* 1999; 36:929-39.
 37. Gorter A, Meri S. Immune evasion of tumor cells using membrane-bound complement regulatory proteins. *Immunol Today* 1999; 20:576-82.
 38. Whiteside TL. Down-regulation of ζ -chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53:865-878.
 39. Appleman LJ, Tzachains D, Grader-Beck T, van Puijbroek AAFL, Boussiotis VA. Helper T cell anergy: from biochemistry to cancer pathophysiology and therapeutics. *J Mol Med* 2001; 78:673-683.
 40. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248:1349-1356.
 41. Schwartz RH. T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:351-357.
 42. Harding FA, McArthur JG, Gross Ja, Raulet DH, Allison JP. CD-28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992; 356:607-609.
 43. Migita K, Eguchi K, Kawabe Y, Tsukada T, Ichinose Y, Nagataki S. Defective TCR-mediated signaling in anergic T cells. *J Immunol* 1995; 155:5083-5087.
 44. Sloan-Lancaster J, Shaw AS, Rothbard JB, Allen PM. Partial T cell signaling: altered phospho- ζ and lack of Zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* 1994; 79:913-922.
 45. Dworacki G, Meidenbauer N, Kuss I, Hoffmann TK, Gooding W, Lotze M and Whiteside TL. Decreased zeta chain expression and apoptosis in CD3+ peripheral blood T lymphocytes of patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7:947-957.
 46. Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihito T, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson JT and Whiteside T. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 2002; 8:2553-2562.
 47. Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W and Whiteside TL. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2004; 10:3755-3762.
 48. Kay NE, Leong TL, Bone N, Vesole DH, greipp PR, Van Ness B, Oken NM and Kyle RA. Blood levels of immune cells predict survival in melanoma patients: results of an Eastern Cooperative Oncology Group phase 3 trial of newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood* 2001; 98:23-28.
 49. Murta EF, de Andrade JM, Falcao RP, Bighetti S. Lymphocyte subpopulation in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Tumori* 2000; 86:403-407.
 50. Hernberg M, Muhonen T, Turunen JP, Hahka-Kemppinen M and Pyrohonen S. The CD4+/CD8+ ratio as a prognostic factor in patients with metastatic melanoma receiving chemioimmunotherapy. *J Clin Oncol* 1996; 14:1690-1696.
 51. Maccalli C, Pisarra P, Vegetti C, Sensi M, Permiani G and Anichini A. Differential loss of T cell signaling molecules in metastatic melanoma patients' T lymphocyte subsets expressing distinct TRC variable regions. *J Immunol* 1999; 163:6912-6923.
 52. Corsi MM, Chigorno V. Difetti di "signaling" in linfociti T di

- pazienti con neoplasie: ruolo delle colture cellulari in biologia molecolare diagnostica. *Biochimica Clinica* 2002; 26:5-8.
53. Zea AH, Cutri BD, Longo DL, Alvord WG, Strobl SL, Mizoguchi H, Creekmore SP, O'Shea JJ, Powers GC, Urba WJ and Ochoa AC. Alteration in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1995; 1:1327.
 54. Finke JH, Zea AH, Stanley J, Longo DL, Mizoguchi H, Tubbs RR, Wiltout RH, O'Shea JJ, Kudoh S, Klein E. Loss of T-cell receptor ζ chain and p56^{lck} in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53:5613.
 55. Kurt RA, Urba WJ, Smith JW and Schoof DD. Peripheral T lymphocytes from women with breast cancer exhibit abnormal protein expression of several signalling molecules. *Int J Cancer* 1998; 78:16.
 56. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM and Oscier DG. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004; 363:105-111.
 57. Reichert TE, Strass L, Wagner EM, Gooding W and Whiteside TL. Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8:3137-3145.
 58. Shanmugaratnam K. Epidemiological studies of cancer in Singapore. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 1964; 20:758-762.
 59. Rabinowich H, Reichert TE, Kashii Y, Bell MC and Whiteside TL. Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand-expressing ovarian cancer cells: implication for altered expression of TCR in tumor-associated lymphocytes. *J Clin Invest* 1998; 101:2579-2588.
 60. Finke JH, Rayman P, Alexander J, Edinger M, Tubbs RR, Connely R, Pontes E and Bukowski R. Characterization of the cytolytic activity of CD4+ and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2001; 7:940S-946S.