

## Ruolo della citometria a flusso nello studio della zeta-associated protein (ZAP-70) in linfociti circolanti i pazienti con carcinoma laringeo\*

Bruno Brando<sup>1</sup>, Vanna Chigorno<sup>2</sup>, Massimiliano M. Corsi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Immunoematologia e Trasfusione (SIMIT), Ospedale di Legnano

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

<sup>3</sup>Istituto di Patologia Generale, Laboratorio di Patologia Clinica, Università degli Studi di Milano

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

### RIASSUNTO

Nei pazienti oncologici la misurazione dell'espressione della zeta-associated protein 70 (ZAP-70) in linfociti T circolanti può consentire una valutazione dell'interazione tra il sistema immunitario dell'ospite e la neoplasia. Abbiamo esplorato le possibilità offerte dalla citofluorimetria a flusso di fornire indicazione a tale riguardo. Sono stati analizzati campioni provenienti da 31 pazienti affetti da carcinoma squamocellulare primitivo laringeo e da 13 soggetti sani, con tecnica citofluorimetrica a flusso a due lunghezze d'onda, con due anticorpi coniugati a due differenti fluorocromi, capaci di riconoscere, rispettivamente, i linfociti CD3+ e la ZAP-70. I risultati, espressi quantitativamente, hanno evidenziato una significativa riduzione della espressione della ZAP-70 nei linfociti T nei portatori di carcinoma laringeo rispetto ai controlli. Tali risultati sono discussi in relazione al loro significato biologico ed alle possibili implicazioni cliniche.

### ABSTRACT

#### Role of flow cytometry in the study of zeta associated protein (ZAP-70) expression in peripheral blood lymphocytes from laryngeal carcinoma patients

In patients with tumor the assay of the zeta associated protein-70 (ZAP-70) in peripheral blood lymphocytes could help in evaluating interaction between host's immune system and cancer. We have explored the possibilities of cytometric applications in this field. We analyzed 31 patients with laryngeal squamous cell carcinoma and 13 controls, data were carried out on a analytical flow cytometer, setting the instrument with two wave length, and two monoclonal antibodies conjugated with phycoerythrin for CD3+ lymphocytes and with Alexa 488 (green) for ZAP-70, respectively. Results, expressed by quantitative analysis, showed a significant reduction in ZAP-70 expression in T lymphocytes from cancer patients respect to controls. These results are discussed in relation to their biological meanings and their clinical implications.

### INTRODUZIONE

In una rassegna pubblicata recentemente (1) sono state discusse con un certo dettaglio alcune caratteristiche principali dei linfociti T, con particolare riferimento al loro apparato recettoriale e della l'interazione tra il sistema immunitario dell'ospite portatore di neoplasia e la neoplasia medesima.

Gli sviluppi tecnologici della immuno-citofluorimetria a flusso hanno messo a disposizione uno strumento potente, abbastanza facilmente applicabile a numerosi campioni, in grado di fornire rapidamente dati quantitativi sull'assetto immunologico dei linfociti T circolanti, passibili di utilizzo clinico in termini diagnostico/prognostici. Al fine di sottoporre a verifica sperimentale questa possibilità, abbiamo misurato, mediante citofluorimetria a flusso, l'espressione della *zeta-associated protein* (ZAP-70) in linfociti T circolanti provenienti da un gruppo di pazienti portatori di carcinoma laringeo, confrontati con un gruppo di soggetti normali.

### MATERIALI E METODI

#### Casistica

Sono stati inseriti nello studio 31 pazienti affetti da carcinoma squamocellulare primitivo laringeo e sottoposti a trattamento chirurgico. I criteri di inclusione erano una storia negativa per pregresse neoplasie maligne, l'assenza di precedenti trattamenti radio- o chemioterapici e la non assunzione, nelle due settimane precedenti la chirurgia, di farmaci antinfiammatori. Tutti i pazienti erano stati esposti fattori di rischio voluttuari quali il fumo di tabacco ed il consumo di alcool. Come gruppo di controllo si sono utilizzati 13 soggetti sani.

#### Procedimento

Campioni di sangue venoso periferico prelevati al momento del trattamento chirurgico sono stati centrifugati a 3000 giri per 15 minuti alla temperatura di 4° C, indi il

sopranatante è stato raccolto e conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino all'esecuzione della indagine citofluorimetrica.

La preparazione all'indagine citofluorimetria prevede come primo passaggio la sospensione di  $500 \times 10^5$  cellule in PBS; si aggiunge a questo punto il primo anticorpo, anti CD3 (coniugato con ficoeritrina) mediante incubazione a freddo per 20 minuti e successivamente si procede ad un duplice ciclo di lavaggio con PBS e centrifugazione. Si procede poi alla permeabilizzazione cellulare, mediante Fix & Perm, onde permettere al secondo anticorpo, anti ZAP-70 (mouse anti-human/mouse ZAP-70, Alexa 488), di penetrare all'interno della cellula. Si ripetono a questo punto due cicli di lavaggio e centrifugazione prima dell'indagine strumentale.

L'analisi citofluorimetrica a due colori è stata infine condotta su un apparecchio FACScan (Becton Dickinson) equipaggiato con un singolo laser ad Argon con una lunghezza d'onda di 488 nm. Sono stati raccolti almeno 10.000 eventi per ogni campione. Eccitato dal laser, l'anticorpo anti CD3-PE, coniugato con ficoeritrina, si colora in rosso, mentre l'anticorpo anti ZAP-70 si colora in verde. L'espressione proteica è infine misurata in mean fluorescence intensity (MFI).

## RSULTATI E DISCUSSIONE

Abbiamo investigato l'espressione della proteina ZAP-70 nei linfociti T circolanti appartenenti ad un gruppo selezionato di pazienti affetti da carcinoma squamocellulare della laringe, confrontandola con quella di un gruppo di controlli sani. È stata osservata (vedi figura 1) una riduzione statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) nella espressione di ZAP-70 nei pazienti affetti da carcinoma rispetto ai controlli sani (MFI 4.384 vs MFI 15.216), in linea con i dati della letteratura (2).

Il rationale di questo studio, come precedentemente

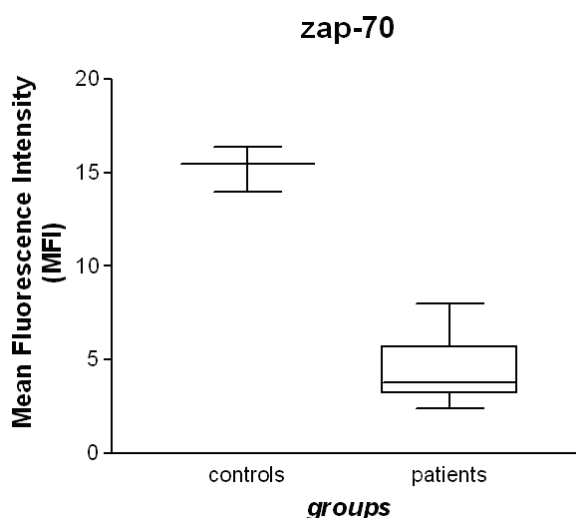
esposto, si basa sul ruolo centrale di ZAP-70 nella trasduzione di segnali intracellulari e nell'induzione di attività biochimiche.

Questo riscontro, espressione di una parziale o completa perdita di funzione immunitaria dei linfociti T, potrebbe in ultima analisi spiegare la progressione neoplastica: la ridotta espressione di ZAP-70 è stata infatti correlata ad una diminuzione od assente mobilitazione di ioni calcio, ad un decremento della attività tirosin-chinasica cellulare e ad una alterazione del profilo citochinico, con ridotta produzione di interleuchina 2 e di interferone.

Dall'analisi dei dati della letteratura si evince come negli anni passati i risultati fossero particolarmente esigui e difficilmente confrontabili a causa della loro estrema variabilità, dato che l'unica metodica applicabile era il Western Blot. L'avvento di una nuova tecnica quantitativa quale la citofluorimetria a flusso ha permesso di superare queste limitazioni fornendo risultati confrontabili.

La validità della citofluorimetria a flusso per lo studio dell'espressione di ZAP-70 nei linfociti T umani è stata recentemente confermata da diversi autori, sia in campioni prelevati a fresco che in campioni crio-conservati (3). L'impiego in contemporanea di più sostanze fluorescenti con la separazione delle diverse emissioni di colore attraverso un sistema di filtri ottici in modo da poter analizzare contemporaneamente tutte le diverse fluorescenze, ha permesso di identificare l'espressione di ZAP-70 in sottopopolazioni definite di linfociti T, contribuendo ulteriormente ad incrementare la specificità della metodica.

Oggi valutando la "mean fluorescence intensity" (MFI), ovvero l'intensità media della fluorescenza delle cellule T marcate con specifici anticorpi, si è in grado di quantificare significative differenze tra le cellule T di pazienti affetti da neoplasia rispetto a quelle dei controlli sani (4). È stato così possibile dimostrare che variazioni di segnale nei linfociti T, indice di un'alterazione della funzione del TCR,



**Figura 1**

Rappresentazione della espressione di ZAP-70 in linfociti periferici di pazienti con carcinoma laringeo e soggetti controllo. L'espressione di ZAP-70 è quantificata come intensità media di fluorescenza (MFI). Il grafico è tipo "box and whiskers plot", che raffigura l'intervallo ed i quartili. Il box si estende dal 25° percentile al 75° percentile, con una linea nel mezzo che rappresenta il 50° percentile. Le barre si estendono sopra e sotto i box a mostrare il valore più alto e quello più basso

sono presenti nelle cellule immunologiche infiltranti il tumore (5); benché i meccanismi all'origine di tali difetti possano variare in relazione al tipo di microambiente tumorale, l'effetto finale è l'accrescimento della neoplasia in assenza di una efficace risposta da parte dei linfociti T.

Dati più recenti hanno inoltre dimostrato alterazioni di segnale TCR-indotto e fenomeni di apoptosi spontanea anche in linfociti T presenti in circolo, suggerendo che l'effetto immunosoppressivo del tumore si estenda ben oltre il proprio microambiente e che la simultanea presenza di un deficit funzionale delle cellule T infiltranti il tumore e circolanti possa caratterizzare neoplasie più aggressive e quindi a prognosi peggiore (6).

Riguardo ad un possibile ruolo prognostico della proteina ZAP-70 si riporta unicamente un dato per pazienti con leucemia linfoblastica cronica, mentre dall'analisi della letteratura a nostra conoscenza non si riscontrano lavori su neoplasie della testa e del collo.

I nostri dati evidenziano come i pazienti con carcinoma della laringe presentano livelli di ZAP-70 ridotti rispetto al gruppo controllo. Questa osservazione potrebbe essere riferibile a diversi meccanismi:

1. l'attivazione, tumore-indotta, di enzimi endocellulari (5,7) analogamente a quanto dimostrato, anche per le neoplasie della testa e del collo (8). È possibile ritenere infatti che la riduzione dell'espressione di ZAP-70 possa essere dovuta all'attivazione di peptidasi intracellulari del linfocita T, che conducono ad un clivaggio proteino-mediato della molecola.

2. la stimolazione antigenica cronica conseguente allo sviluppo della neoplasia, che comporta una degradazione lisosomiale di CD3e, e potenzialmente anche di ZAP-70, non seguita da un riciclo sufficientemente rapido per ristabilire una espressione adeguata.

Se questi dati biologici venissero confermati su casistiche più ampie e corredate da adeguato follow-up, si potrebbero caratterizzare sottogruppi di pazienti a prognosi potenzialmente peggiore da sottoporre a follow-up più

ristretti e, per le caratteristiche immunologiche, a trattamenti complementari allo scopo di stimolare una risposta immunologica antineoplastica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Brando B, Chigorno V, Corsi MM. Lo studio del recettore dei linfociti T (TCR) in medicina molecolare: l'importanza della catena e di zeta-associated protein 7° (ZAP-70) nella diagnostica oncologica. *Bioch Clin* 2005;XX:ZZZ-ZZZ.,
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Shanmugaratnam K. Epidemiological studies of cancer in Singapore. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 1964; 20:758-762.
7. 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.
8. 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.