

Łańcuch ζ jest cząsteczką o masie 16 kDa związaną z kompleksem receptorowym TCR-CD3 limfocytów T i Fc γ RIII komórek NK. Funkcjonuje jako przezbłonowa cząsteczka sygnałowa. W przebiegu różnych chorób zmienia się jej ekspresja w komórkach układu odpornościowego. Zmiany te są uwarunkowane różnymi mechanizmami. Badania immunohistochemiczne pozwalają na połączenie oceny ekspresji ζ z oceną konwencjonalnych markerów prognostycznych. Badanie ekspresji może być metodą monitorowania stanu immunologicznego chorych i odpowiedzi na leczenie choroby nowotworowej. Zależności między obrazem klinicznym, histopatologicznym i oceną ekspresji ζ w limfocytach sugerują, że niska ekspresja lub brak obecności ζ są związane z gorszą prognozą i krótszym czasem przeżycia chorych na raka.

Słowa kluczowe: limfocyty T, ekspresja łańcucha ζ , nowotwory.

Znaczenie ekspresji TCR- ζ w immunosupresji indukowanej przez nowotwór

The role of TCR- ζ expression in immunosuppression induced by tumour

Jan Sikora

Zakład Immunologii, Katedra Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp

Limfocyty T są komórkami kontrolującymi wzrost nowotworu. W większości przypadków kontrola ta jest jednak nieskuteczna, dlatego też podstawowym problemem współczesnej immunologii jest poznanie mechanizmów ucieczki nowotworu spod nadzoru układu odpornościowego. Wynika to z faktu, że nowotwór jest zdolny do manipulowania układem odpornościowym gospodarza. Nowoczesne technologie wykorzystujące tetramery czy testy ELISPOT potwierdzają, że w krążeniu chorych na raka występują nowotworowo swoiste komórki T [1, 2]. Są one zdolne do eliminowania nowotworu lub blokowania przerzutów. Fakt, że często tak nie jest, tłumaczy się ich dysfunkcją w mikrośrodowisku nowotworu. Funkcjonalne zaburzenia limfocytów naciekających guz (*tumour infiltrating lymphocytes* – TILs), jak również krążących limfocytów T obserwuje się w wielu nowotworach [3–5].

Celem pracy jest wskazanie zaburzeń receptora limfocytów T (TCR) u chorych na raka i próba oceny immunologicznych oraz klinicznych konsekwencji tego zjawiska. W wyniku defektu w zakresie przekazywania sygnału limfocyty T stają się niezdolne do aktywacji po rozpoznaniu antygeny. Fakt ten powoduje ograniczoną swoistą antygenowo odpowiedź immunologiczną i ma znaczące konsekwencje dla progresji guza, prognozy i przeżycia chorych na raka.

Charakterystyka limfocytów T w przebiegu choroby nowotworowej

Fenotypowe i czynnościowe badania limfocytów T naciekających guz i krążących u chorych na raka wykazały, że komórki te różnią się od swoich odpowiedników występujących u osób zdrowych. Limfocyty naciekające guz mają fenotyp komórek aktywowanych, tzn. wykazują ekspresję powierzchniowych markerów zwykle związanych z komórkami efektorowymi [3–5]. Utrata lub spadek zdolności TILs do wypełniania funkcji efektorowych jest indukowana przez nowotwór [6–8]. Aktywowane komórki T naciekające nie-nowotworowe zmiany zapalne są w większym stopniu zdolne do wykonywania swoich funkcji. Zaobserwowano też, że TILs w ludzkich guzach litych zawierają komórki T z uszkodzeniami DNA wiążącymi nukleotydy w reakcji TUNEL. Wskazuje to, że TILs ulegają apoptozie *in situ*, co może być związane z ekspresją FasL i innych cząsteczek indukujących apoptozę na powierzchni komórek nowotworowych. Badania immunocytochemiczne przeprowadzone na skrawkach biopsji ludzkich nowotworów wykazały, że guzy FasL+ były naciekane przez CD95+ (Fas+) TILs. Wiele spośród nich wykazywało cechy apoptozy [9, 10]. Obserwacje te dają podstawy dla hipotezy, że nowotwory „kontratakują” na drodze eliminacji TILs [11].

The ζ -chain is a 16-kDa molecule associated with the T-cell receptor TCR-CD3 complex in T lymphocytes and Fc γ RIII in NK cells. The ζ functions as a transmembrane signaling molecule. Several distinct mechanisms may be responsible for decreased/absent ζ in T cells of patients with cancer. Assessment of ζ -chain expression in the course of various diseases shows changes in expression of this molecule in immune cells. Immunohistochemical evaluation of ζ expression can link it to the conventional markers of prognosis or survival. Monitoring for ζ expression is useful for assessing immune competence in these patients and for following changes in immune competence during anticancer therapies. Correlations made between clinical findings, pathologic results, and ζ expression in immune cells suggest that low/absent ζ is predictive of poor prognosis and survival in patients with cancer.

Key words: T lymphocytes, ζ -chain expression, cancers.

W badaniach limfocytów z wysięków nowotworowych wykazano, że niska ekspresja łańcucha ζ koreluje z podatnością na apoptozę [12, 13]. Ocena ekspresji łańcucha ζ w limfocytach T przeprowadzona z zastosowaniem ilościowej cytometrii przepływowej wykazała niedobór tej cząsteczki u chorych na czerniaka, raka jajnika, sutka, jamy ustnej i nerki [14–18]. W większości przypadków obniżoną ekspresję łańcucha ζ obserwowano w TILs, w limfocytach węzłów chłonnych zajętych przez nowotwór i we krwi obwodowej, uzyskanych od osób z zaawansowaną chorobą nowotworową [19]. W badaniach przeprowadzonych na grupie chorych na czerniaka wykazano, że odsetek komórek T i NK z obniżoną ekspresją ζ jest znamienne wyższy u większości chorych w porównaniu z grupą kontrolną [20].

W grupie chorych na nowotwory głowy i szyi badano ekspresję ζ w komórkach T zdefiniowanych jako efektorowe (CD8+CD45RO-CD27-) [21]. Wykazano znamienne niższą ekspresję łańcucha ζ u chorych w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych dawców. W związku ze stwierdzoną obniżoną odpowiedzią proliferacyjną komórek CD8+ tych chorych na przeciwciała anti-CD3, autorzy sugerują zaburzenia w zakresie przekazywania sygnału w tych komórkach.

W badaniach ekspresji ζ , zdolności do proliferacji i spontanicznej apoptozy TIL i PBL w grupie chorych na raka jamy ustnej wykazano znamienne zależności między tymi parametrami. Sugeruje to, że nowotwór blokuje funkcje komórek układu immunologicznego w ich zakresie, a efekt ten jest lokalny i uogólniony. Związki między spadkiem ekspresji ζ i apoptozą w TILs i PBL sugerują, że degradacja ζ może być wykładnikiem apoptozy [10].

U chorych na raka krążące limfocyty T i naciekające guz wykazują wiele wspólnych cech. Są nimi wrażliwość na apoptozę i obecność zaburzeń sygnałowych, jak obniżona ekspresja łańcuchów ζ i ϵ w kompleksie TCR, lub kinaz tyrozynowych p56^{lck} i p59^{fyn}, niezdolność do translokacji NF- κ Bp65. Powoduje to obniżenie potencjału czynnościowego limfocytów T.

Kompleks sygnałowy związany z TCR

Łańcuch ζ występujący w obrębie kompleksu TCR-CD3 jest cząsteczką o masie 16 kDa, składającą się z bardzo krótkiego fragmentu zewnątrzkomórkowego, regionu przez błonowego i długiej części cytoplazmatycznej zawierającej 3 motywy aktywacyjne receptorów odpornościowych oparte na tyrozynie (ITAMs). Zwykle występuje jako homodimer. Fosforylacja reszt tyrozyny zawartych w tych odcinkach łańcucha polipeptydowego powoduje przewodzenie sygnału z TCR do wnętrza komórki. Zarówno receptor immunoglobulinowy na limfocytach B, jak i receptor Fc tworzą podobne kompleksy z białkami wyposażonymi w sekwencje ITAM. Po związaniu antygeny przez TCR, kinazy tyrozynowe z rodziny Src – p56^{lck} i p59^{fyn} – fosforylują łańcuch ζ . Do ufosforylowanych sekwencji ITAM łańcucha ζ przyłącza się kolejna kinaza tyrozynowa ZAP70 i Syk. Prowadzi to do aktywacji NF κ B i jego translokacji do jądra komórkowego. Ekspresja łańcucha ζ ma więc kluczowe znaczenie dla aktywacji limfocytów T [22]. Receptor limfocytów T jest kompleksem kilku cząsteczek, które uczestniczą w procesie rozpoznania i wiązania peptydu prezentowanego przez MHC na komórkach prezentujących antygen (APC). Fosforylacja wszystkich 6 sekwencji ITAM homodimeru CD3 jest warunkiem indukcji sygnału.

Mechanizmy odpowiedzialne za zaburzenia łańcucha ζ w nowotworach

Mechanizmy odpowiedzialne za utratę czy spadek ekspresji ζ nie są do końca wyjaśnione. Niską ekspresję łańcucha ζ lub jej brak obserwuje się nie tylko w przebiegu chorób nowotworowych, ale też w przebiegu fizjologicznej odpowiedzi na przewlekłe infekcje, takie jak trąd i AIDS [23, 24], a także w chorobach autoimmunizacyjnych związanych z krążącymi kompleksami immunologicznymi, jak SLE [25]. Łańcuch ζ jest też docelowym dla wirusa SIV Nef, który wiąże się z nim w 2 miejscach części cytoplazmatycznej. Mechanizm degradacji łańcucha ζ w przebiegu infekcji wirusowych może jednak róż-

nić się od funkcjonującego w przebiegu nowotworu [26]. W badaniach klonów ludzkich limfocytów T swoistych dla peptydów toksoidu tężca wykazano internalizację i lizosomalną degradację łańcuchów TCR, w tym łańcucha ζ [27]. Lizosomalna degradacja może nie być jedynym mechanizmem komórkowej degradacji łańcucha ζ . Przewlekła stymulacja antygenowa przez TCR może prowadzić do obniżenia ekspresji ζ i do częściowej lub całkowitej anergii limfocytów T. W pierwszych badaniach dotyczących niskiej ekspresji łańcucha ζ w splenocytach myszy z nowotworem równocześnie wykazano obniżoną ekspresję cząsteczek sygnałowych p56^{lck} i p59^{lyn} [28]. Stwierdzono, że kompleks TCR w limfocytach zwierząt obciążonych nowotworem był niezdolny do przekazywania sygnału w optymalnym zakresie. Podobnie, niska ekspresja ζ była obserwowana wśród limfocytów naciekających guz i w krążących limfocytach T chorych z różnymi typami raków [29, 30]. Autorzy tych prac różnią się w ocenie ekspresji tej cząsteczki. Te różnice w uzyskiwanych wynikach mogą być spowodowane przez stosowanie różnych metod oceny. Początkowo stosowano Western blot i immunoprecypitację. W badaniach wykorzystujących te techniki ekspresja ζ w TILs była niższa niż w PBL. Na ich podstawie wnioskowano, że zaburzenia sygnałowe są indukowane przez nowotwór i są większe w środowisku guza niż na obwodzie.

W badaniach limfocytów naciekających guz i limfocytów krwi obwodowej chorych na różne nowotwory wykazano, że spadek ekspresji TCR- ζ był związany z zaburzeniami funkcji tych komórek, takich jak spadek aktywności kinazy tyrozynowej, zaburzenia profilu cytokinowego w TALs i TILs, głównie znamienne spadek IL-2 i INF- γ na poziomie RNA i białka, wzrost podatności na spontaniczną apoptozę. Inkubacja świeżo wyizolowanych komórek nowotworowych z alogenicznymi limfocytami T powoduje redukcję ekspresji TCR- ζ . Preinkubacja limfocytów T z inhibitorami lizosomalnych lub proteasomalnych peptydaz chroni przed degradacją łańcucha ζ w tych komórkach po inkubacji z komórkami nowotworowymi. Sugeruje to, że nowotwór indukuje aktywację wewnątrzkomórkowych peptydaz w komórkach T, co prowadzi do uszkodzeń białek, w tym TCR- ζ , przy zachowaniu normalnego poziomu mRNA dla łańcucha ζ w TILs i TALs [31]. Sugeruje to możliwość istnienia potranslacyjnych modyfikacji cząsteczek sygnałowych w tych komórkach.

Innym możliwym mechanizmem indukowanych przez nowotwór zaburzeń łańcucha ζ może być produkcja czynników rozpuszczalnych, takich jak białko blokujące ζ (ZIP, ζ inhibitory protein) wyizolowane z wysięku chorej na raka jajnika. Białko to, o masie cząsteczkowej 14 kDa, wybiórczo uszkadza TCR- ζ , nie wpływając na *lck* lub ZAP-70 w komórkach T [32].

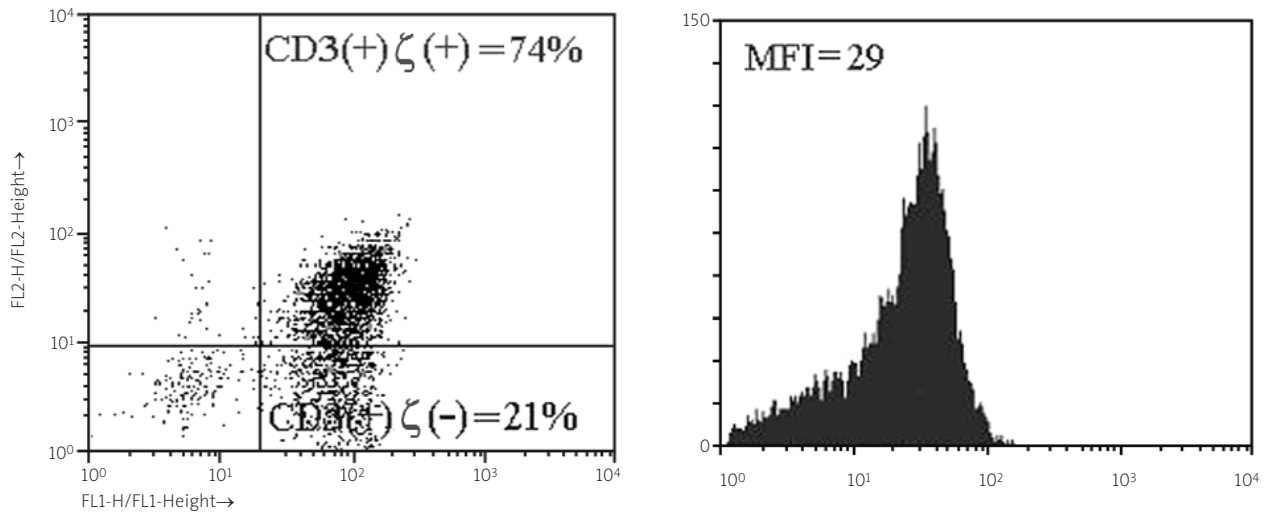
Wzrost guza stanowi źródło wielu antygenów, które są prezentowane komórkom T przez komórki dendrytyczne (DCs). W środowisku nowotworu funkcje DCs są zaburzone [33, 34]. Dysfunkcje komórek dendrytycznych, takie jak zaburzenia dojrzewania czy apoptoza, wywołują szereg konsekwencji w zakresie prezentacji antygenów i aktywacji limfocytów T [35]. Być może prostszym wytłumaczeniem zaburzeń łańcucha ζ w komórkach T chorych na raka jest stan przewlekłej stymulacji antygenowej rozwijającej się w wyniku progresji guza. Stan ten prowadzi do zjawiska wyczerpania immunologicznego.

Innym czynnikiem włączonym w zaburzenia ekspresji łańcucha ζ są reaktywne pochodne tlenu (ROIs), uwalniane przez aktywowane monocyty lub granulocyty w mikrośrodkowisku nowotworu. Makrofagi towarzyszące guzom (*tumour associated macrophages* – TAMs) lub makrofagi aktywowane *in vitro* indukują spadek ekspresji łańcucha ζ . Efekt ten jest całkowicie eliminowany przez zmiatacz H₂O₂, – katalazę [36].

Komórki nowotworowe w hodowlach i w warunkach naturalnych wykazują obecność cząsteczki FasL. Limfocyty naciekające w mikrośrodkowisku nowotworu lub aktywowane Fas+ limfocyty T hodowane z komórkami nowotworowymi zawierają aktywowane kaspazy i wykazują obecność pęknięć DNA, możliwych do zidentyfikowania za pomocą testów TUNEL i JAM [37]. Genetycznie zmodyfikowane linie komórkowe ludzkich nowotworów produkujące rozpuszczalny FasL indukują apoptozę aktywowanych limfocytów T w czasie krótkoterminowych koinkubacji. Te apoptotyczne limfocyty T lub limfocyty T, w których wyindukowano apoptozę, stosując przeciwciała CH-11, wykazują słabą ekspresję lub brak ekspresji łańcucha ζ . Wykazano, że degradacja łańcucha ζ jest związana ze spontaniczną apoptozą tych komórek lub apoptozą indukowaną przez szlak Fas-FasL. Analiza sekwencji aminokwasów łańcucha ζ wykazała istnienie miejsc wrażliwych na kaspazę 3 i 7. Sugeruje to, że degradacja łańcucha ζ jest zależna od kaspaz [38]. Aktywacja kaspaz indukowana przez nowotwór i apoptoza są odpowiedzią na niską ekspresję ζ lub jej brak w limfocytach T w mikrośrodkowisku nowotworu. Związki między niską ekspresją ζ i spontaniczną apoptozą limfocytów T u chorych z różnymi typami nowotworów były wielokrotnie opisywane [39, 40].

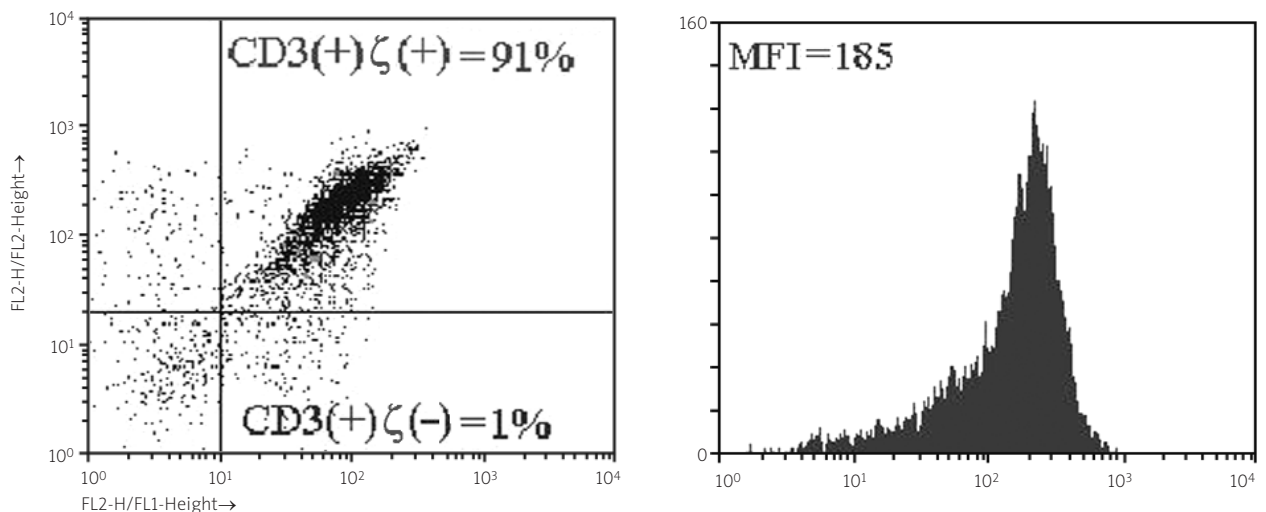
Mechanizmy odpowiedzialne za spontaniczną apoptozę krążących limfocytów T w krwi chorych na nowotwór nie są jasne. Może być związana z obecnością FasL na komórkach nowotworowych i drogą Fas/FasL indukcji apoptozy. Ekspresja cząsteczki Fas na większości krążących limfocytów T chorych na raka nie do końca jednak tłumaczy zjawisko spontanicznej apoptozy. Stężenie sFasL nie jest zwiększone, a raczej zmniejszone w surowicy chorych [41]; sFasL nie jest zdolny do efektywnego wiązania krzyżowego i blokowania receptora na krążących limfocytach T [42]. Mechanizm odpowiedzialny za apoptozę krążących limfocytów T i jego związki z utratą ζ próbowano wyjaśnić istnieniem w surowicy chorych na raka, w przeciwieństwie do zdrowych dawców, błonowych mikropęcherzyków zawierających FasL. Mikropęcherzyki te pochodziły z błony powierzchniowej komórek nowotworowych i były obecne w surowicy chorych na raka jajnika, czerniaka i nowotwory głowy i szyi. Były biologicznie aktywne i zdolne do indukowania mediowanej przez Fas apoptozy, a także do degradowania łańcucha ζ w aktywowanych limfocytach T lub komórkach Jurkat [43].

Istnienie wielu mechanizmów degradacji łańcucha ζ w limfocytach krążących i naciekających nowotwór podkreśla znaczenie tej cząsteczki sygnałowej w odpowiedzi immunologicznej. Jej zaburzenia stanowią jeden z istotnych mechanizmów ucieczki nowotworu spod nadzoru immunologicznego.



Ryc. 1. Pomiar odsetka komórek T wykazujących obecność łańcucha ζ i ekspresji tej cząsteczki w limfocytach z wysięku nowotworowego

Fig. 1. Assessment of percentage of T cell expressing ζ chain and expression of this molecule on lymphocytes from malignant pleural effusion



Ryc. 2. Pomiar odsetka komórek T wykazujących obecność łańcucha ζ i ekspresji tej cząsteczki w limfocytach z wysięku nienowotworowego

Fig. 2. Assessment of percentage of T cell expressing ζ chain and expression of this molecule on lymphocytes from non-malignant pleural effusion

Pomiar ekspresji łańcucha ζ w limfocytach

Do oceny ekspresji łańcucha ζ wykorzystuje się kilka różnych technik. Wydaje się, że najbardziej przydatna jest metoda cytometrii przepływowej. Półilościowy test cytometryczny został wprowadzony, gdy komercyjnie dostępne stało się znakowane fluorochromem przeciwciało monoklonalne przeciw łańcuchowi ζ (anti-CD247 mAbs). Procedura obejmuje barwienie antygenów powierzchniowych limfocytów, a następnie permeabilizację błon komórkowych

w celu umożliwienia związania przez mAb wewnątrzcytoplazmatycznej części łańcucha ζ . Permeabilizacja błon ma podstawowe znaczenie i musi być wykonana w optymalnych warunkach. Pomiar ekspresji łańcucha ζ prowadzi się na podstawie wartości średniej intensywności fluorescencji (*mean fluorescence intensity* – MFI). Analizę wykonuje się po wybramkowaniu limfocytów (FSC/SSC). Stosowanie odpowiednio znakowanych przeciwciał umożliwia oznaczenie ekspresji ζ w różnych populacjach limfocytów. W uzu-

pełnieniu wartości MFI, odsetek komórek ζ -negatywnych może być oznaczony w oparciu o punkt odcięcia określony na podstawie MFI kontroli izotypowej (ryc. 1., 2.).

Bardziej precyzyjną ocenę ilościową umożliwią zastosowanie kulek kalibracyjnych związanych z fluorochromem. W tkankach ekspresja ζ w limfocytach T jest oznaczana za pomocą technik immunofluorescencyjnych z wykorzystaniem materiału biopsyjnego zatopionego w medium OCT (*ornithine carbamoyltransferase*). Możliwe jest także wykorzystanie skrawków parafinowych, ale tylko po stwierdzeniu, że przeciwciała anti- ζ są zdolne do związania się ze zdenaturowanym białkiem ζ .

Znaczenie prognostyczne ekspresji łańcucha ζ u chorych na raka

W związku z kluczową rolą, jaką kompleks TCR-CD3 odgrywa w procesie przekazywania sygnału, można spodziewać się istotnych biologicznych konsekwencji zmian ekspresji łańcucha ζ . W zakresie odpowiedzi przeciwnowotworowej dotyczyć one mogą jej ograniczenia, gorszej prognozy, skrócenia czasu przeżycia. W badaniach 138 chorych operowanych z powodu raka jamy ustnej, brak lub niską ekspresję ζ w TILs obserwowano u 32% badanych. Była ona znamienne związane z dużym stopniem zaawansowania (T3 lub T4), a także z zajęciem węzłów chłonnych. W grupie tej 5-letnie przeżycia obserwowano u chorych z normalną ekspresją łańcucha ζ . W badaniach tych po raz pierwszy wykazano, że ekspresja ζ jest niezależnym czynnikiem prognostycznym w przebiegu raka jamy ustnej [44]. Wykazano również, że liczba naciekających nowotwór komórek dendrytycznych jest istotnym czynnikiem prognostycznym w raku jamy ustnej. Nieobecność lub niewielka liczba komórek dendrytycznych były znamienne związane z zaburzeniami ekspresji łańcucha ζ w TILs i krótszymi czasami przeżycia u chorych na raka jamy ustnej [44]. W badaniach chorych z przerzutami czerniaka złośliwego u 43% badanych stwierdzono spadek ekspresji ζ w krążących limfocytach T. Przeżycie tych chorych było znamienne krótsze w porównaniu z badanymi, u których stwierdzono normalną ekspresję ζ [45].

Znaczenie oceny ekspresji łańcucha ζ w monitorowaniu leczenia choroby nowotworowej

Wyniki wstępnych badań sugerują, że łańcuch ζ może być markerem odpowiedzi na leczenie nowotworu. W badaniach chorych na raka jajnika leczonych przez dootrzewnowe podawanie interleukiny 2 (IL-2) osoby, które odpowiedziały na tę formę immunoterapii, przed terapią wykazywały normalną ekspresję ζ w krążących limfocytach T. U chorych, które nie zareagowały na leczenie, stwierdzono niską ekspresję tej cząsteczki [46]. Sugeruje to, że ζ może być markerem stanu immunologicznego chorych kierowanych do immunoterapii. Potwierdzają to dane uzyskane w badaniach *in vitro*. Limfocyty naciekające nowotwór wyizolowane z czerniaka, hodowane w obecności IL-2, odzyskiwały pełną ekspresję ζ w ciągu 48 godz. [47]. Inne badania przeprowadzone z udziałem grupy chorych z zaawansowanymi nowotworami nie potwierdzają wzrostu ekspresji ζ po leczeniu IL-2 [48].

Podsumowanie

W przebiegu choroby nowotworowej spadek lub brak ekspresji łańcucha ζ kompleksu TCR-CD3 zarówno w TILs, jak i w limfocytach T krążących jest dobrze udokumentowany. Mechanizmy odpowiedzialne za to zjawisko są różne, mogą być odpowiedzią na obecność zmian nowotworowych lub być związane ze stopniem zróżnicowania limfocytów T. Zmiany te, będące konsekwencją choroby lub związane z zastosowaną terapią, mogą być ilościowo określone. Mogą być wykorzystywane do badania stanu immunologicznego chorych przed leczeniem nowotworu i po nim, mają też wartość prognostyczną.

Piśmiennictwo

- Hoffman TK, Donnenberg AD, Finkelstein SD, et al. Frequencies of tetramer+ T cells specific for the wild-type sequence p53₂₆₄₋₂₇₂ peptide in the circulations of patients with head and neck cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 3521-9.
- Letsch A, Keilholz U, Schadendorf D, Nagorsen D, Schmittel A, Thiel E, Scheibenbogen C. High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+ T cells in patients with advanced melanoma. *Int J Cancer* 2000; 87: 659-64.
- Whiteside TL. Tumor-infiltrating lymphocytes in human solid tumors. *Immunol Ser* 1994; 61: 137-48.
- Whiteside TL, Parmiani G. Tumor-infiltrating lymphocytes: their phenotype, function and clinical use. *Cancer Immunol Immunother* 1994; 39: 15-21.
- Saito T, Dworacki G, Gooding W, Lotze MT, Whiteside TL. Spontaneous apoptosis of CD8+ T lymphocytes in peripheral blood of patients with advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1351-64.
- Whiteside TL, Rabinowich H. The role of Fas/FasL in immunosuppression induced by human tumors. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 46: 175-84.
- Uzzo RG, Clark PE, Rayman P, Bloom T, Rybicki L, Novick AC, Bukowski RM, Finke JH. Alterations in NF κ B activation in T lymphocytes of patients with renal cell carcinoma. *JNCI* 1999; 91: 718-21.
- Whiteside TL. Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 43-50.
- Gastman BR, Atarashi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Rabinowich H, Whiteside TL. Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res* 1999; 59: 5356-64.
- Reichert TE, Strauss L, Wagner EM, Gooding W, Whiteside TL. Signaling abnormalities and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3137-45.
- O'Connell J, O'Sullivan GD, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 1996; 184: 1075-82.
- Sikora JJ, Dworacki GT, Kaczmarek MT, Jenek RE, Zeromski JO. Immunosuppressive mechanisms in the microenvironment of malignant pleural effusions. *Cancer Detect Prev* 2004; 28: 325-30.
- Sikora J, Dworacki G, Giersz R, Zeromski J. The role of monocytes/macrophages in TCR-zeta chain downregulation and apoptosis in malignant pleural effusions. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18: 26-32.
- 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.
- Finke JH, Zea AH, Stanley J, et al. Loss of T-cell receptor chain and p56^{lck} in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 5613-6.

16. Healy CG, Simons JW, Carducci MA, DeWeese TL, Bartkowski M, Tong KP, Bolton WE. Impaired expression and function of signal-transducing zeta chains in peripheral T cells and natural killer cells in patients with prostate cancer. *Cytometry* 1998; 32: 109-19.
17. Zea AH, Curti DB, Longo DL, et al. Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1327-35.
18. Kuss I, Saito T, Johnson JT, Whiteside TL. Clinical significance of decreased zeta chain expression in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 329-34.
19. Whiteside TL. Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48: 346-52.
20. Dworacki G, Meidenbauer N, Kuss I, Hoffmann TK, Gooding MS, Lotze M, Whiteside TL. Decrease zeta-chain expression and apoptosis in CD3+ peripheral blood T lymphocytes of patient with melanoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 947-57.
21. Kuss I, Donnenberg A, Gooding W, Whiteside TL. Effector CD8+CD45RO-CD27- T cells have signaling defects in patients with head and neck cancer. *Br J Cancer* 2003; 88: 223-30.
22. Kersh EN, Shaw AS, Allen PM. Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science* 1998; 281: 572-5.
23. Stefanová I, Saville MW, Peters C, et al. HIV infection-induced posttranslational modification of T cell signaling molecules associated with disease progression. *J Clin Invest* 1996; 98: 1290-7.
24. Zea AH, Ochoa MT, Ghosh P, et al. Changes in expression of signal transduction proteins in T lymphocytes of patients with leprosy. *Infect Immun* 1998; 66: 499.
25. Liossis SN, Ding XZ, Dennis GJ, Tsokos GC. Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosylphosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J Clin Invest* 1998; 101: 1448-57.
26. Schaeffer TM, Bell I, Fallert BA, Reinhart TA. The T-cell receptor zeta contains two homologous domains with which similar immunodeficiency virus Nef interacts and mediates down-modulation. *J Virol* 2000; 74: 3273-83.
27. Valitutti S, Muller S, Salio M, Lanzavecchia A. Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med* 1997; 185: 1859-64.
28. 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: 1795-8.
29. Nakagomi H, Petersson M, Magnusson I, et al. Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 5610-2.
30. Matsuda M, Petersson M, Lenke R, Taupin JL, Magnusson I, Mellstedt H, Anderson P, Kiessling R. Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease. *Int J Cancer* 1995; 61: 765-72.
31. 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.
32. Taylor DD, Bender DP, Gerçel-Taylor C, Stanson J, Whiteside TL. Modulation of TcR/CD3-zeta chain expression by a circulating factor derived from ovarian cancer patients. *Br J Cancer* 2001; 84: 1624-9.
33. Shurin GV, Shurin MR, Lotze MT, Barksdale EM. Gangliosides mediate neuroblastoma-induced inhibition of dendritic cell generation. *Cancer Res* 2001; 61: 363-9.
34. Esche C, Lokshin A, Shurin G, Gastman BR, Rabinowich H, Lotze MT, Shurin MR. Tumors' other immune targets: dendritic cells. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 336-44.
35. Shurin MR, Gabrilovich DI. Regulation of dendritic cell system by tumor. *Cancer Res Ther Control* 2001; 11: 65-78.
36. Kono K, Salazar-Onfray F, Petersson M, et al. Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 1996; 26: 1308.
37. Atarashi Y, Kanaya H, Whiteside TL. A modified JAM assay detects apoptosis induced in activated lymphocytes by FasL+ human adherent tumor cells. *J Immunol Methods* 2000; 233: 179-83.
38. Gastman BR, Johnson DE, Whiteside TL, Rabinowich J. Caspase-mediated degradation of T-cell receptor zeta-chain. *Cancer Res* 1999; 59: 1422-7.
39. Whiteside TL. Apoptosis of immune cells in the tumor microenvironment and peripheral circulation of patients with cancer: implications for immunotherapy. *Vaccine* 2002; 20 (suppl 4): A46-51.
40. Reichert TE, Day R, Wagner EM, Whiteside TL. Absent or low expression of the zeta chain in T cells at the tumor site correlates with poor survival in patients with oral carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 5344-7.
41. Hoffmann TK, Dworacki G, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2553-62.
42. Schneider P, Holler N, Bodmer J, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschoep J. Conversion of membrane-bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 1998; 187: 1205-13.
43. Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, Reichert TE, Whiteside TL. FasL-containing microvesicles in the circulation of patients with cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *J Immunother* 2003; 26: 44.
44. Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside TL. The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 2136-47.
45. Zea AH, Curti DB, Longo DL, et al. Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1995; 11: 1327-35.
46. Kuss I, Rabinowich H, Gooding W, Edwards R, Whiteside TL. Expression of zeta in T cells prior to IL-2 therapy as a predictor of response and survival in patients with ovarian carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm* 2002; 17: 631-40.
47. 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: 1263-74.
48. Farace F, Angevin E, Vanderplancke J, Escudier B, Triebel F. The decreased expression of CD3 zeta chains in cancer patients is not reversed by IL-2 administration. *Int J Cancer* 1994; 59: 752-5.

Adres do korespondencji

dr hab. med. **Jan Sikora**
 Zakład Immunologii
 Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
 ul. Rokietnicka 5D
 60-806 Poznań
 tel. +48 61 854 71 74
 faks +48 61 854 71 73
 e-mail: jan-sikora@wp.pl