
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIORGIO CAVALLO, MARISA GARIGLIO, SANTO
LANDOLFO

**Inibizione della risposta cellulare
all'interferon-gamma da parte di oncogeni ras**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 82 (1988), n.3, p. 603–609.*
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1988_8_82_3_603_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1988_8_82_3_603_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Patologia. — *Inibizione della risposta cellulare all'interferon-gamma da parte di oncogeni ras.* Nota di **GIORGIO CAVALLO**, **MARISA GARIGLIO** (*) e **SANTO LANDOLFO**, presentata (**) dal Corrisp. **G. CAVALLO**.

ABSTRACT. — *Ras oncogene expression inhibits cell response to IFN- γ .* NIH-3T3 cells transformed by ras oncogenes (Ha-, Ki-, N-) lose their responsiveness to IFN-gamma as measured by antiviral and antiproliferative activity or by induction of Class I histocompatibility antigens. By contrast IFN-alpha or IFN-beta are not impaired in their biological activity when tested on ras-transformed NIH-3T3 cells. Using iodinated IFN-gamma it was observed that ras-transformed cells display a reduced number of receptors for IFN-gamma with an affinity constant significantly lower when compared to untransformed cells. Altogether these results suggest that ras oncogenes besides transform normal fibroblasts by impairing their responsiveness to cell growth regulatory factors.

KEY WORDS: Ras; IFN- γ ; Cell growth.

RIASSUNTO. — Nel presente lavoro è stata studiata l'attività biologica dell'IFN- γ in linee cellulari trasformate dagli oncogeni ras (Ha-, Ki-, N-) valutando l'attività antiproliferativa, antivirale e l'induzione degli antigeni di istocompatibilità di classe I. Come cellule di controllo sono stati usati fibroblasti murini NIH-3T3. Tutte le linee trasformate dagli oncogeni ras risultano insensibili all'attività dell'IFN- γ , rispetto alle cellule di controllo, mentre nessuna variazione è stata riscontrata per l'IFN- α o per l'IFN- β . Dagli esperimenti di binding con IFN- γ iodinato è stato visto che le cellule trasformate dagli oncogeni ras esprimono un numero inferiore di recettori per l'IFN- γ ed una costante di affinità più bassa rispetto alle NIH-3T3. Da questi risultati si può concludere che la trasformazione da parte degli oncogeni ras è in grado di bloccare l'attività biologica dell'IFN- γ e non dell'IFN- α e dell'IFN- β .

INTRODUZIONE

Il sistema interferon (IFN) è costituito da una eterogenea famiglia di proteine che in base al tipo di induttore, alle caratteristiche antigeniche ed alle cellule che le producono sono state classificate come alfa, beta e gamma (Burke, 1983). Sebbene dotati di un'attività biologica estremamente pleiomorfica, gli IFN sono stati caratterizzati soprattutto per la loro attività antivirale e antiproliferativa (Pestka, 1987). A questo proposito è stato osservato come gli IFN e specialmente l'IFN-gamma siano in grado di inibire la crescita sia di cellule normali che trasformate, sebbene rimangano

(*) Borsista dell'Associazione per la Prevenzione e la Cura dei Tumori in Piemonte.

(**) Nella seduta del 12 dicembre 1987.

ancora completamente oscuri i meccanismi molecolari alla base di tale attività (Burke, 1983). Gli oncogeni appartenenti alla famiglia ras (Ha-, Ki-, N-ras) trasformano le cellule tramite l'azione di una proteina di 21 KDA (p21), che è dotata di una alterata attività GTPasica (Barbacid, 1987). Inoltre questa proteina presenta un'elevata omologia con le proteine G di membrana che sono responsabili della transduzione del segnale dal recettore ai vari complessi enzimatici intracitoplasmatici (McGrath, 1984; Gilman, 1987). Poiché gli IFN e soprattutto l'IFN-gamma sembrano svolgere la loro azione biologica attivando una proteina di membrana con caratteristiche funzionali simili alle proteine G già note (Gariglio, 1986), nel presente lavoro, utilizzando cellule trasformate da oncogeni appartenenti alla famiglia ras, si è voluto indagare se tali oncogeni fossero in grado di bloccare l'azione biologica degli IFN.

MATERIALI E METODI

Cellule. Le linee cellulari utilizzate nel presente studio sono elencate nella Tabella 1.

Interferoni. Interferon-gamma ricombinante murino (MuIFN-gamma) (attività specifica: 2×10^7 U/mg), gentilmente fornito dal Dr. E. Adolf, Boehringer Ing. (Vienna, Austria).

Interferon-alfa/beta (MuIFN-alfa/beta) (attività specifica: 1×10^6 U/mg) gentilmente fornito dal Dr. F. Belardelli, Ist. Superiore di Sanità, Roma.

Induzione dello stato antivirale. Le linee cellulari normali o trasformate furono incubate con 500U/ml dei vari IFN in medium DMEM contenente 2% siero bovino (SB) a 37°C in 5% CO₂. Dopo 18 ore, le cellule furono lavate $3 \times$ con DMEM senza SB ed infettate a 37°C con il virus della Stomatite Vesicolare (2×10^8 P.F.U./ml) ad una molteplicità di infezione (MOI) di 0.1 P.F.U./cellula. Le cellule infettate furono quindi lavate $3 \times$ con DMEM ed incubate a 37°C in DMEM contenente 2% SB. Dopo 24 ore, le colture cellulari furono congelate a -80°C fino al momento della titolazione della resa virale che fu valutata per l'attività citopatica del virus su cellule umane WISH. Differenze di due log₁₀ sono considerate significative con un P 0.001.

Tabella 1. - *Linee cellulari trasformate da differenti oncogeni.*

Linee cellulari	Oncogene trasformante
NIH-3T3	—
226-4-1	c-Ki-ras *
E13-1-1	c-Ki-ras *
115/14	c-Ha-ras **
B77-3T3	v-src
AN.1	v-abl

* Mutazione puntiforme

** Amplificazione genetica

Incorporazione di timidina tritiata. Le cellule normali o trasformate (1×10^5 /pozzetto) furono coltivate in DMEM contenente 0.5% SB in presenza di IFN (1.000U/ml) in micropiastre da coltura a 96 pozzetti. Dopo 18 ore le cellule furono lavate per rimuovere gli IFN ed incubate in DMEM contenente 5% SB. Dopo 32 ore a ciascun pozzetto di coltura fu aggiunta timidina tritiata (1 μ Ci/pozzetto). Dopo un'ulteriore incubazione di 16 ore, la radioattività incorporata fu valutata nel materiale precipitabile con TCA come descritto precedentemente.

Induzione di antigeni di istocompatibilità di Classe I. Fibroblasti normali (NIH-3T3) o trasformati (226) (1×10^6 /capsula Petri) furono coltivate in DMEM contenente 2% SB in presenza o meno di IFN (1.000U/ml). Dopo 48 ore le cellule furono staccate dalle capsule con EDTA (5mM), marcate con ^{51}Cr per 90 min ed utilizzate in saggio di citotossicità anticorpale complemento dipendente. Gli anticorpi utilizzati nel presente studio consistevano in un antisiero murino policlonale monospecifico anti H-2D^s gentilmente fornito dal Dr. Forni (Torino). Il complemento era costituito da siero di coniglio precedentemente saggiato per bassi livelli di citotossicità verso cellule murine. La lisi cellulare veniva evidenziata tramite rilascio di ^{51}Cr .

Marcatura con ^{125}I dell'IFN-gamma e analisi del legame di membrana.

La marcatura dell'IFN-gamma con ^{125}I fu eseguita con il reagente di Bolton-Hunter come precedentemente descritto da Cofano e coll. (1986).

Esperimenti di saturazione di legame furono eseguiti aggiungendo dosi crescenti di ^{125}I -IFN-gamma alle cellule bersaglio (1×10^6 /capsula) in 2 ml di DMEM con 0.2% di BSA. Il legame non specifico fu determinato dalla contemporanea aggiunta di un eccesso di IFN-gamma non radiomarcato. Dopo 120 min a 23°, le cellule furono lavate $3 \times$ e fu misurata la radioattività legata alla membrana. La costante di dissociazione ed il numero di recettori furono calcolati con il programma LIGAND gentilmente fornito dal Dr. J. Lozzio, N.C.I., Frederick, U.S.A.

RISULTATI E DISCUSSIONE

È stato dimostrato da tempo che gli IFN sono in grado di indurre uno stato di resistenza antivirale in cellule di differente origine istologica.

Al fine di valutare se gli IFN siano in grado di inibire la replicazione virale in cellule trasformate da differenti oncogeni, fibroblasti normali (NIH-3T3) o trasformati da oncogeni c-/v-ras, v-src o v-abl sono stati incubati in vitro per 18 ore con IFN-alfa/beta (1.000U/ml) o con IFN-gamma (1.000U/ml) e quindi infettati con il virus della stomatite vescicolare (P.F.U. 0.1/cellula). Dopo 24 ore dall'infezione, si è valutato l'effetto citopatico. Come si può osservare nella Tab. 2, fibroblasti normali o trasformati dai 3 oncogeni analizzati sono completamente protetti dall'infezione del VSV quando preincubati con IFN-alfa/beta. Quando le stesse linee cellulari sono incubate con IFN-gamma, solo le cellule NTH-3T3 o le cellule trasformate degli oncogeni v-src e v-abl sono protette dalla susseguente infezione virale. Al contrario le

Tabella 2. - *Replicazione del VSV in cellule trasformate da oncogeni ras, src o abl e trattate con IFN.*

Cellule	Oncogene	IFN *		
		-	γ	α/β
NIH-3T3	-	5.4 **	2.5	2.1
226-4-1	c-Ki-ras	5.2	5.0	2.8
E13-1-1	c-Ki-ras	5.5	4.9	3.0
115/14	c-Ha-ras	5.2	5.0	2.8
B77-3T3	v-src	5.1	2.5	2.5
AN.1	v-abl	5.1	2.4	2.4

* Mille U/ml.

** Log_{10} P.F.U./ml.

linee cellulari trasformate da oncogeni ras, mutati o amplificati, sono resistenti all'attività antivirale dell'IFN-gamma e quindi permissive alla crescita del VSV.

Sebbene scoperti per la loro attività antivirale, gli IFN hanno in seguito dimostrato una potente attività antiproliferativa verso svariate linee cellulari. Allo scopo di valutare se la trasformazione da differenti oncogeni potesse rendere le cellule insensibili all'attività antiproliferativa degli IFN, cellule NIH-3T3 normali o trasformate da oncogeni ras, src o abl sono state incubate in vitro con IFN-alfa/beta (1.000U/ml) o con IFN-gamma (1.000U/ml). Dopo 48 ore si è misurata la sintesi di DNA tramite l'incorporazione di timidina tritiata. Come dimostra la Tab. 3, tutte le linee cellulari, indipendentemente dall'oncogene espresso, si sono dimostrate sensibili, sebbene in misura differente, all'attività antiproliferativa dell'IFN-alfa/beta. Quando incubate con IFN-gamma, solo le cellule NIH-3T3 (fibroblasti normali), le B77-3T3 (v-src) e le AN.1 (v-abl) sono inibite in modo significativo nella loro sintesi di DNA. Al contrario tutte le linee cellulari trasformate da oncogeni ras (mutati o

Tabella 3. - *Proliferazione di cellule trasformate da oncogeni ras src o abl e trattate con IFN.*

Cellule	Oncogene	IFN *		
		-	g	a/b
NIH-3T3	-	60.5 \pm 3.4	28.4 \pm 3.9	31.5 \pm 5.2
226-4-1	c-Ki-ras	81.9 \pm 8.1	84.3 \pm 7.7	35.9 \pm 4.1
E13-1-1	c-Ki-ras	77.6 \pm 6.9	75.2 \pm 6.4	23.8 \pm 3.2
115/14	c-Ki-ras	56.8 \pm 7.5	54.2 \pm 4.3	39.9 \pm 1.8
B77-3T3	v-src	95.3 \pm 8.6	41.4 \pm 5.9	38.7 \pm 4.5
AN.1	v-abl	88.7 \pm 8.9	33.5 \pm 3.1	38.6 \pm 5.3

* Mille U/ml.

** Cpm $\times 10^3$ + S.D.

amplificati), si dimostrano completamente insensibili all'attività antiproliferativa dell'IFN-gamma.

Un terzo aspetto dell'azione biologica degli IFN è rappresentato dalla loro capacità di indurre un aumento degli antigeni di istocompatibilità di Classe I nelle cellule bersaglio. Sulla base dei risultati precedenti si è quindi ritenuto importante valutare se la trasformazione da oncogeni ras potesse alterare anche l'aumento di espressione di questi antigeni da parte dell'IFN-gamma. A questo scopo fibroblasti normali (NIH-3T3) o trasformati da un oncogene ras mutato (226) sono stati incubati con IFN-gamma (1.000U/ml) e dopo 48 ore si è valutata l'espressione degli antigeni murini di Classe I (K^a,D^b) con un test di citotossicità anticorpale complemento-dipendente. Come dimostra la fig. 1, le cellule NIH-3T3 dopo 48 ore di incubazione con IFN-gamma esprimono un aumento di antigeni di istocompatibilità che è pari a circa il 100% (dal 32% di citotossicità al 65%). Le cellule trasformate 226, sebbene esprimano una quantità di antigeni di Classe I più elevata già in condizioni basali, non vengono stimulate ulteriormente nell'espressione di tali antigeni dopo incubazione con IFN-gamma (dal 44% al 47%).

Nel loro insieme tutti questi risultati indicano che gli oncogeni ras trasformano la cellula rendendola incapace di rispondere ad alcuni fattori di regolazione della crescita quali l'IFN-gamma.

Il primo evento durante l'interazione IFN-gamma/cellula bersaglio è costituito dal legame dell'IFN-gamma al recettore specifico di membrana. La perdita di risposta all'attività biologica dell'IFN-gamma da parte delle cellule trasformate da ras potreb-

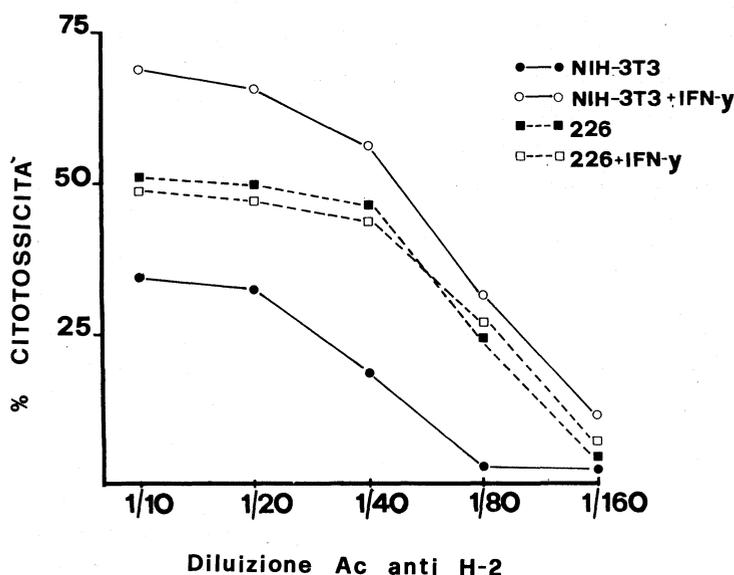


Fig. 1. - Espressione di antigeni H-2 in cellule NIH-3T3 o 226-4-1 dopo trattamento con IFN-gamma. I livelli di antigeni H-2 sono stati valutati in un saggio di citotossicità anticorpale complemento-dipendente misurando il rilascio di ⁵¹Cr da cellule incubate nella prima fase con anticorpi anti-H-2 e quindi con complemento di coniglio.

be quindi essere conseguenza di una diminuita capacità della cellula di legare l'IFN-gamma tramite il recettore specifico. A questo riguardo è noto che la proteina codificata dall'oncogene ras (p21), localizzata sulla superficie intracitoplasmatica della membrana citoplasmatica è in grado di legare il guanosintrifosfato (GTP) ed ha un'attività simile alle proteine G di membrana. Le suddette proteine sarebbero infatti responsabili della trasmissione del segnale da vari tipi di recettore di membrana all'interno della cellula con conseguente attivazione di complessi enzimatici quali l'adenilato ciclasi, la fosfolipasi C. Nelle cellule trasformate da oncogeni ras la p21 altera sia la capacità dei recettori specifici di membrana di legare ormoni di varia natura sia la capacità dei recettori stessi di trasmettere il segnale all'interno della cellula. Allo scopo di verificare a quale livello la trasformazione da oncogeni ras inducesse la perdita di risposta all'IFN, IFN-gamma murino è stato iodinato con il reagente di Bolton-Hunter e quindi utilizzato in esperimenti di cinetica di legame in un sistema cellulare costituito o da cellule normali NIH-3T3 o da cellule trasformate da c-ras amplificato (115) o mutato (226). Come si può osservare nella Tab. 4, le cellule

Tabella 4. - *Caratteristiche di legame dell'IFN-gamma iodinato a fibroblasti normali o trasformati da oncogeni ras, src o abl.*

Cellule	Oncogene	N. Recettori/cellula	K_d^*
NIH-3T3	—	6.500	5.3
226-4-1	c-Ki-ras	1.200	0.1
115/14	c-Ki-ras	950	0.2
B77-3T3	v-src	4.900	4.1
AN.1	v-abl	5.100	3.9

* Costante di dissociazione $\times 10^{-10}M$.

NIH-3T3 dimostrano all'equilibrio un numero di recettori pari a 6.500 siti di legame con una costante di dissociazione (K_d) di circa $5,3 \times 10^{-10}M$, simile a quella osservata per altre linee cellulari. Al contrario sia la linea cellulare 115 che la 226, esprimenti c-ras amplificato o mutato, rispettivamente, dimostrano un numero di recettori diminuito (950 e 1.200 rispettivamente) ma soprattutto una significativa diminuzione nella K_d come risulta dall'analisi di Scatchard ($0,2 \times 10^{-10}M$ per le cellule 115, $0,1 \times 10^{-10}M$ per le cellule 226). Questi risultati pertanto dimostrano che la perdita di risposta delle cellule trasformate da oncogeni della famiglia ras sia da attribuire ad un'alterazione nella struttura del recettore specifico di membrana con conseguente diminuita capacità di legare l'IFN-gamma. Nel nostro sistema cellulare quindi l'IFN-gamma non sarebbe in grado di attivare funzionalmente la molecola del recettore e di trasmettere il segnale all'interno della cellula in quanto l'espressione della proteina p21 codificata dall'oncogene ras altererebbe la struttura del recettore stesso con meccanismi finora non chiariti.

In accordo con i nostri risultati recentemente è stato osservato che anche nel ca-

so di recettori di membrana per altri ormoni peptidici quali il platelet derived growth factor (PDGF) (Parries, 1987), l'espressione di oncogeni della famiglia ras indurrebbe una perdita di risposta all'attività biologica dei suddetti ormoni peptidici per una significativa diminuzione del grado di affinità per il ligante da parte del recettore.

BIBLIOGRAFIA

- BARBACID M. (1987) - *ras genes*. «Ann. Rev. Biochem.», 56, 779-827.
- BURKE D.C. and MORRIS A.G. (1983) - *Interferons: from molecular biology to clinical application*. Cambridge University Press, London.
- COFANO F., FASSIO A., CAVALLO G. and LANDOLFO S. (1986) - *Binding of murine (125)I-labeled natural interferon-gamma to murine cell receptors*. «J. Gen. Virol.» 67, 1205-1211.
- GARIGLIO M., CAVALLO G. and LANDOLFO S. (1986) - *Modulazione della risposta all'IFN- da parte delle proteine G*. «Giorn. Batt. Virol. Immun.» 779, 200-205.
- GILMAN G.A. (1987) - *G proteins: transducers of receptor-generated signals*. «Ann. Rev. Biochem.» 56, 615-649.
- MARSHALL C.J. (1987) - *Oncogenes and growth control 1987*. «Cell», 49, 723-725.
- MCGRATH J.P., CAPON D.J., GOEDDEL D.V. and LEVINSON A.D. (1983) - *Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein*. «Nature», 310, 644-649.
- PARRIES G., HOEBEL R. and RACKER E. (1987) - *Opposing effects of a ras oncogenes on growth factor-stimulated phosphoinositide hydrolysis: Desensitization to platelet-derived growth factor and enhanced sensitivity to bradykinin*. «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 84, 2648-2652.
- PESTKA S. and LANGER J.A. (1987) - *Interferons and their actions*. «Ann. Rev. Biochem.» 56, 727-777.