

A CLL molekuláris patológiája

Szepesi Ágota

SE I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

Az utóbbi néhány év kutatási eredményei jelentősen megváltoztatták a krónikus limfocitás leukémia (CLL) biológiájára vonatkozó elképzeléseinket. Mára megdőlt az a több évtizeden keresztül uralkodó nézet, mely szerint a CD5-pozitív leukémiás sejtek immunológiailag éretlen, naiv B sejtekből származnak, amelyek akkumulációja elsősorban megnövekedett életidejüknek köszönhető. 1999-ben két munkacsoport eredményei is azt bizonyították, hogy az immunglobulin nehézlánc gének (IgH) szomatikus mutációs státusa alapján, a morfológiai szinten egységes, azonban klinikailag heterogén lefolyású betegség két, alapvetően eltérő prognózisú csoportra osztható. A legújabb elképzelések szerint mind a két csoport érett, antigénszelekción átesett sejtekből alakul ki. Ezt a feltételezést egyrészt a génexpressziós vizsgálatok által mutatott egységes, memóriasejtekre jellemző mintázat, valamint a lezajlott antigénszelekciót bizonyító specifikus B-sejt-receptor (BCR) struktúra igazol. A klinikailag eltérő viselkedés hátterében az antigénstimulációt követő, BCR által közvetített jelátviteli folyamatok eltérése állhat, amelyben központi szerepe lehet a TCR zéta láncával asszociált tirozinkináz fehérjének (ZAP-70), mivel az emelkedett ZAP-70-expresszió a CLL kedvezőtlen prognózisára utal. A ZAP-70 fehérje expressziója diagnosztikai célú kimutatásának fontos szerepe van a terápia megtervezésében. *Magyar Onkológia* 49:327–330, 2005

Recently, major advances have occurred in our understanding of the biology of chronic lymphocytic leukemia (CLL). CD5-positive CLL cells were once assumed to originate from immature, immunologically incompetent B lymphocytes, and to passively accumulate due to increased life time. In 1999, two research groups demonstrated that CLL, which is a morphologically uniform but clinically heterogenous disease, can be classified into two major subgroups on the basis of the mutational status of the immunglobulin heavy chain (IgH) genes. It was also suggested that these two groups both originate from mature cells that have passed the antigen selection process. This hypothesis was confirmed by gene expression studies indicating a uniform pattern characteristic to memory cells, as well as specific B-cell receptor (BCR) structures supporting the existence of a functional antigen selection. The differences in the BCR signal transduction mechanisms may underlie the different clinical behavior in which zeta-associated tyrosine kinase (ZAP-70) may play a pivotal role, since elevated ZAP-70 expression is likely to be an unfavorable prognostic factor in CLL. The diagnostic testing for ZAP-70 expression plays an important role in the therapeutic decisions. *Szepesi Á. Molecular biology of CLL. Hungarian Oncology* 49:327–330, 2005



A krónikus limfocitás leukémia (CLL) általában lappangó (indolens) lefolyású, Európában és az USA-ban a leggyakoribb felnőttkori leukémia. A perifériás vérben, a csontvelőben és a nyirokcsomókban felhalmozódó érett, kis monoklonális B-sejtekre a CD19, a CD5 és a CD23 sejtfelszíni antigének párhuzamos expressziója mellett alacsony sejtfelszíni IgM- és IgD-expresszió jellem-

ző. Az utóbbi néhány év kutatási eredményei azt bizonyítják, hogy a korábban egységesnek gondolt megbetegedés hasonló morfológiai megjelenése ellenére eltérő biológiai viselkedésű altípusokat foglal magába. A következőkben a nemzetközi irodalom legfrissebb eredményei alapján összegezzük azokat a sejteredet-, fenotípus-, illetve genotípusbeli különbségeket, amelyek feltehetőleg fontos szerepet játszanak a betegség eltérő kimenetelének meghatározásában.

A CLL-kutatás mérföldkövének tekinthető az 1999-es év, amikor először közölte két munkacsoport párhuzamosan, hogy az immunglobulin nehézlánc gének (IgH) szomatikus mutációs mintázata összefügg a betegség prognózisával (3, 9).

Közlésre érkezett: 2005. március 1.
Elfogadva: 2005. június 3.

Levelezési cím: Szepesi Ágota, SE I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, 1085 Budapest, Üllői út 26.,
Telefon: 06-20-825-0262, Fax: 317-1074,
E-mail: agota.korb1.sote.hu

A klinikailag heterogén CLL-esetek mintegy 60%-ában az immunoglobulin gének szomatikus mutációkat hordoznak, és a betegek átlagos túlélési ideje szignifikánsan meghaladja a mutációkat nem hordozó esetekét. A szomatikus mutációk kialakulásának fiziológiás helye a germinatív centrum, így sejteredetüket tekintve a szomatikus mutációkkal rendelkező esetekben a daganatsejtek egyértelműen antigénszelekción átesett, posztgerminális érett B-sejtekből származnak. Ezzel szemben a szomatikus mutáció szempontjából negatív esetekben a daganatsejtek prekursorai inkább a pregerminális, naiv B-sejtek lehetnek.

Eredetét és lefolyását tekintve tehát két eltérő betegségről lenne szó?

Ezt a kérdést vizsgálva, nagy esetszámon végzett génexpressziós vizsgálatok során az immunoglobulin gének mutációs státusában mutatkozó eltérésekkel szemben egységes, leginkább a normális memóriasejtekre jellemző mintázatot észleltek. Fenotípus tekintetében az aktivációs markerek, azaz a CD23, a CD69, a CD71, valamint a memóriasejtekre jellemző CD27 szintén a posztgerminális eredetet valószínűsítik mindkét csoportban. Egységesen antigénszelekcióra utal a specifikus BCR struktúra. A CLL-klónokban leggyakrabban előforduló nehézlánc gének, a VH1-69, VH3-07, VH4-34 előfordulási gyakorisága jóval magasabb, mint ami véletlenszerűen várható lenne. Tehát sejteredet szempontjából a CLL-sejtek a legújabb kutatási eredmények alapján egységesek, mégpedig érett, antigénszelekción átesett B-sejtekből keletkező populációnak tekinthetők (5, 8, 12).

A CLL-sejteket más daganatoktól eltérően nem jellemzi specifikus genetikai eltérés, ugyanakkor a széleskörű variabilitást mutató mutációk mellett a deléciók viszonylag gyakoriak, míg a transzlokációk ritkábbak (8). A mutációs státusában és prognózisában eltérő két csoportban a kromoszómaeltérések előfordulási gyakorisága is szignifikáns különbséget mutat. Az indolens lefolyású esetekre elsősorban a normális kromoszómakép (kariotípus) és a 13q deléció jellemző, míg a progresszív lefolyás komplex kromoszómaeltérésekkel, illetve a 17p és 11q kromoszómaregiókat érintő deléciókkal mutat szoros összefüggést (5). Az, hogy a deléciók esetén pontosan mely target gének vezetnek a betegség progressziójához, csupán a két utóbbi kromoszómaeltérés hátterében ismert. A 17p13 génszakasz deléciója a p53, a 11q22 pedig az ATM tumorsuppresszor gének elvesztését okozza (15). A genetikai eltérések nem specifikus jellege és időbeli változása alapján megállapítható, hogy a betegséget általános genetikai instabilitás jellemzi.

Milyen tényezők állhatnak a kromoszómaeltérések kialakulásához vezető genetikai instabilitás hátterében?

Az utóbbi években intenzív kutatásokat folytatnak újabb prognosztikai markerek meghatározá-

sára, amelyek közül az aktiváció által indukált citidin-deamináz (AID) aktivitása, valamint a kromoszómák megrövidült telomérhossza feltehetően a genetikai instabilitás fokozásán keresztül fejtik ki hatásukat. Az AID a nyiroktüszők germinális centrumában levő B-sejtekben expresszáldó, a szomatikus mutációk létrejöttéért felelős enzim. Jelenleg számos kutatás foglalkozik az enzimmutációk keletkezését elősegítő, a limfómagenezisben játszott szerepével. Fiziológiás körülmények között az AID expressziója a memória B-sejtekben nem éri el a kimutathatóság határát, bizonyos CLL esetekben azonban mérhető és szignifikáns összefüggést mutat az IgH mutációs státusával és a prognózissal (11). A kedvező prognózisú, mutációra pozitív esetekben az AID-expresszió általában nem éri el a kimutathatóság határát, azonban a rossz prognózisú, gyakran kromoszómaeltéréseket hordozó esetekben kimutatható.

A kromoszómaevégeken levő ismétlődő, nem kódoló, TTAGGG szekvenciákat tartalmazó régió fontos szerepet játszik a kromoszómafúzió, -degradáció megakadályozásában. Az említett telomerikus régió minden sejtciklus alkalmával rövidül, így hossza egy adott sejt múltbeli proliferációs aktivitásának indikátora is. A telomeráz enzim a telomerikus régió rövidülésével szemben hat normális és transzformált sejtekben egyaránt.

A rövid telomerikus régió fiziológiás körülmények között kedvez az apoptózis beindulásának, illetve a proliferációgátlás kialakulásának, de emellett genetikai instabilitást is okozhat. Az eltérő prognózisú CLL esetekben szignifikáns különbséget észleltek a telomerikus régió hosszúsága, valamint a telomerázaktivitás tekintetében. A kedvező prognózisú, mutáció-pozitív esetekben változó telomérhossz mellett alacsony telomerázaktivitást találtak, míg a rossz prognózisú, mutáció-negatív CLL klónoknál rövid telomerikus régió és magas telomerázaktivitás volt megfigyelhető. A rövid telomerikus régió a mutáció-negatív leukémiás prekursor sejtek intenzív proliferációs aktivitását bizonyítja, és hozzájárulhat a gyakran észlelt komplex genetikai eltérések kialakulásához (4, 7).

Milyen hatása lehet a fokozott genetikai instabilitásnak a betegség lefolyására?

A halmazott genetikai eltérések kialakulása nagyobb proliferációs aktivitással rendelkező szubklónok megjelenéséhez, majd expanziójához vezet, vagyis a daganat klonális evolúción megy keresztül. Az intenzívebb proliferációt a progresszív esetekben mért rövidebb limfocita-kettőződési idő jellemzi.

A sejtek kicserélődési sebessége (turnover) jóval nagyobb, mint korábban gondolták. Miután az esetek többségében a daganatos sejttömeg növekedése kisebb mértékű a proliferációs aktivitásnál, feltételezhető, hogy a sejthalál, az apoptózis folyamata is intenzívebb a korábban becsülténél (12).

Mi jellemzi a CLL sejtekben az apoptózis jelátviteli útjait és milyen tényezők befolyásolják a sejtek proliferációs aktivitását?

A betegség korai stádiumában a daganatos sejtek felszaporodását elsősorban nem a tumoros klón fokozott proliferációja, hanem inkább a daganatos sejtek megnyúlt életideje okozza, amelyet az apoptózis folyamatának defektusa hoz létre. A pontos mechanizmusért elsősorban a bcl2 fehérjecsald kórosan szabályozott expresszióját teszik felelőssé, azonban más tényezők is felmerülnek (8). Ide tartozik a CXCR4 funkcionális kemokinreceptor CLL-sejteken észlelt fokozott expressziója is, amely specifikus, mikrokörnyezet-függő sejttúlélést, vagyis apoptózisgátlást hoz létre. A csontvelőben a strómasejtek által termelt faktor (SDF1) a CLL-sejtek CXCR4 receptorához kötődve túlélési szignált közvetít, elősegítve a csontvelő daganatos infiltrációját. Ezzel szemben a periférián jelentős sejtpusztulás zajlik, amely biztosítja azt a gyorsabb sejt-kicserélődést, amely a proliferációs előnyt élvező szubklónok relatív felszaporodásához vezet. A proliferációs gének alacsony expressziója a proliferációs mechanizmusok általános gátlására utal. Az alacsony BCR-expresszió anergiás állapotot jelez, a BCR csak bizonyos esetekben stimulálható. Ezzel szemben a specifikus BCR struktúra antigénselekción bonyolítja. A betegség patogenezisében egyre inkább bizonyítást nyer a folyamatos antigénstimuláció jelentősége és a BCR-on keresztüli sejtaktiváció (5, 12, 16). A proliferációs választ az antigén kötődését követően a BCR-on keresztüli jelátviteli folyamat intenzitása is meghatározza. Újabb kutatások azt bizonyítják, hogy ezt nagymértékben befolyásolja egy citoplazmatikus tirozinkináz, a zéta-asszociált protein (ZAP-70) expressziója (1). A ZAP-70 fiziológiásan T- és NK-sejtekben expresszálódik, és a T-sejt receptorkomplex zetaláncához kapcsolódva vesz részt a jelátviteli folyamatban. A ZAP-70 a mutációt nem tartalmazó IgH génekkel rendelkező CLL-sejtekben általában a T-sejtekhez hasonló mértékben expresszálódik, míg a mutációt tartalmazó IgH génekkel rendelkező CLL-sejtekben nem mutatható ki (2, 14). A ZAP-70 jelenleg az egyik legfontosabb prognosztikai faktornak tekinthető, miután a betegség lefolyásával talán még szorosabb összefüggést mutat, mint a mutációs státus (6, 12). Funkcionális jelentőségét bizonyítja, hogy IgM keresztbekötést követően a ZAP-70-pozitív sejtekben fokozott tirozinfoszforiláció mutatható ki (1). A legújabb eredmények azt mutatják, hogy ez az enzim normális lépből és tonsillából izolált, aktivált fenotípussal rendelkező B-sejtekben is megtalálható (13). A betegség progressziója során észlelhető fokozott proliferációs aktivitás hátterében egy másik sejtfelszíni fehérjének, a CD38-nak is fontos szerepe lehet. Expressziója a rosszabb lefolyású esetekre jellemző, sejtfelszíni elhelyezkedése révén egyszerűen és pontosan mérhető, azonban jelentőségét csökkenti az a tény, hogy kifejeződése a betegség lefolyása során változhat.

1. táblázat. Az immunoglobulin nehézlánc gének mutációs státusa alapján meghatározott kedvező illetve kedvezőtlen lefolyású CLL-csoportok fenotípusos és molekuláris jellemzői

	Prognózis	
	Kedvező	Kedvezőtlen
IgH gén-homológia a csírasejtszekvenciához viszonyítva	>2%	<2%
CD38-expresszió (pozitivitás a daganatsejtekben)	<30%	>30%
ZAP-70-expresszió (pozitivitás a daganatsejtekben)	<20%	>20%
Kromoszómaeltérések	normális kariotípus, vagy 13q-deleció	17p-, 11q-deleció
Telomérhossz	eltérő	csökkent
Telomerázaktivitás	alacsony	magas
AID-expresszió	nincs/alacsony	magas
LDT	<12 hónap	>12 hónap
BCR-jelátvitel	nem stimulálható	megtartott

A betegség lefolyásában betöltött biológiai szerepe jelenleg még nem ismert (3, 10).

Összefoglalás

Eredetét tekintve tehát a CLL esetében továbbra is állítható, hogy egy betegségről van szó, amelyben számos biológiai faktor befolyásolja a betegség kimenetelét, progrediáló vagy stagnáló lefolyását (12) (1. táblázat). Végül melyek tehát azok a prognosztikai faktorok, amelyek jelenleg a klinikai adatok mellett, a rutin gyakorlat számára is elérhetőek, és a diagnózis idejében segítséget nyújtanak a prognózis meghatározásában és a betegek kezelési tervének felállításában? A jelen ismereteink alapján a korszerű kezelési terv felállításához ma már elengedhetetlen minden esetben a kromoszómaeltérések meghatározása citogenetikai és célzott FISH-vizsgálatokkal, és a fehérje markerek, a ZAP-70 és a CD38 áramlási citometriai mérése. A ZAP-70 citoplazmatikus fehérje, azonban jelenleg máig létezik direkt jelöléssel alkalmazható antitest, amely sejtporoszabilizálást követően a sejtfelszíni markerekhez hasonlóan pontos meghatározást tesz lehetővé (14).

Irodalom

- Chen L, Windhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:4609-4610, 2002
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 348:1764-1775, 2003
- Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 6:1840-1847, 1999
- Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive

- replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* 103:375-382, 2004
5. Dighiero G. Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia* 17:2385-2391, 2003
6. Dürig J, Nückel N, Cremer M, et al. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 17:2426-2434, 2003
7. Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K, et al. Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood* 105:4807-4812, 2005
8. Guipaud O, Deriano L, Salin H, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a polymorphic family unified by genomic features. *Lancet Oncol* 4:506-514, 2003
9. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated immunoglobulin VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1848-1854, 1999
10. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 99:1023-1029, 2002
11. Heintzel D, Kroemer E, Kienle D, et al. High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGVH gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 18: 756-762, 2004
12. Keating MJ, Chiorazzi N, Messmer B, et al. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *ASH Annual meeting*, 2003
13. Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, et al. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia* 19:1018-1024, 2005
14. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 363:105-111, 2004
15. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, et al. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and VH gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 16:993-1007, 2002
16. Wiestner A. More ZAP-70 for chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 105:1839-40, 2005