

PRACA POGLĄDOWA – Review Article

EWA WAŚIK-SZCZEPANEK

ZAP-70 i jego rola w nowotworach układu krwiotwórczego

Significance of ZAP-70 in hematologic malignancies

Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku UM w Lublinie
Kierownik: Prof. dr hab. Anna Dmoszyńska

STRESZCZENIE

ZAP-70 jest kinazą tyrozynową mającą prognostyczne znaczenie w odniesieniu do chorych z przewlekłą białaczką limfocytową. Pozwala na identyfikację chorych o dobrym i złym rokowaniu. W chwili obecnej niewiele jest wiadomości o roli ZAP-70 w przebiegu innych nowotworów. Jego potencjalne znaczenie jako czynnika prognostycznego w przypadku pozostałych rozrostów B-komórkowych wymaga jeszcze dalszych badań.

SŁOWA KLUCZOWE: Przewlekła białaczka limfocytowa – ZAP-70 – Czynniki prognostyczne – Nowotwory układu krwiotwórczego

SUMMARY

ZAP-70 is a tyrosine kinase with potential prognostic importance in chronic lymphocytic leukemia. Expression ZAP-70 allows identification of patients with good and poor prognosis. Little is known about ZAP-70 expression in other hematologic malignant neoplasms. Whether similar prognostic significance of ZAP-70 is possible in these cases remains to be studied.

KEY WORDS: Chronic lymphocytic leukemia – ZAP-70 – Prognostic factors – Hematologic malignancies

ZAP-70 jest niereceptorową białkową kinazą tyrozynową o ciężarze cząsteczkowym 70 kDa, kodowaną przez gen zlokalizowany na chromosomie 1. Należy do rodziny kinaz tyrozynowych Syk-ZAP-70. W warunkach prawidłowych występuje na komórkach T i NK, w których związany jest z łańcuchem zeta (ζ) CD3 kompleksu receptora T (TCR), wpływając na inicjację sygnałów w komórkach T [1, 2]. Oprócz niej istotną rolę w tym procesie odgrywają inne kinazy, takie jak: kinazy Scr-podobne (Lck i Fyn), rodzina kinaz Tec (Itk) i kinaza Csk z rodziny kinaz Csk. Kinazy te powodują fosforylację motywów ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), znajdujących się w rejonie receptora TCR i warunkujących prawidłowe przekazywanie sygnałów do cytoplazmy. Kinaza ZAP-70 aktywowana jest przez kinazę Lck z rodziny Scr-podobnych kinaz [3]. W warunkach prawidłowych nie stwierdza się ekspresji ZAP-70 na dojrzałych limfocytach B, jakkolwiek bywa on obecny na prawidłowych, aktywowanych komórkach B występujących w śledzionie i migdałkach [4]. Mutacja genu ZAP-70 powoduje u ludzi złożone zaburzenia odporności z brakiem komórek CD8 oraz upośledzenie przewodzenia sygnałów w komórkach CD4 [5]. Może powodować nawracające, oporne na leczenie zakażenia grzybicze i wirusowe [3]. U myszy, spontaniczna mutacja genu ZAP-70 wywołuje przewlekłe, autoimmunologiczne zapalenie stawów, przypominające reumatologiczne zapalenie stawów spotykane u ludzi [6]. ZAP-70 odgrywa kluczową rolę w przekazywaniu sygnałów zarówno poprzez receptor T-komórkowy jak i inne receptory obecne na komórkach T, NK, eozynofilach i mastocytach [7, 8]. Niedobór kinazy tyrozynowej ZAP-70 oraz innych z rodziny Syk powoduje całkowite zahamowanie dojrzewania komórek pro-B w komórki pre-B. Związane jest to prawdopodobnie z zahamowaniem

przewodnictwa sygnałów. Ponadto, dochodzi do zaburzenia innych ważnych procesów komórkowych [9, 10, 11].

Zainteresowanie ZAP-70 znacząco wzrosło od kiedy poprzez określenie profilu ekspresji genów wykazano, iż występuje w niektórych przypadkach przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej (PBL-B). Gen ZAP-70 znajdował się w niewielkiej grupie ok. 240 genów wykazujących różnice w ekspresji pomiędzy dwoma grupami chorych z PBL-B, zróżnicowanych na podstawie stanu mutacji genu IgVH. Potwierdzenie tej zależności również na poziomie białka ZAP-70 stanowiło podstawę do założenia, iż może stanowić swoisty „ekwiwalent” stanu mutacji genu IgVH [12]. Jakkolwiek dają one wiele cennych informacji dotyczących przebiegu choroby, to jednak obserwuje się pewną niezgodność pomiędzy tymi dwoma parametrami. Jej zakres jest zróżnicowany w zależności od źródła. Na podstawie badań Crespo i wsp. oraz Orcharda i wsp. jej poziom wynosi 5–6% [12, 13], natomiast wg Rassenti i wsp. osiąga 23% [14]. Występowanie rozbieżności w tym zakresie może świadczyć o tym, iż oba te zjawiska występują niezależnie. Fernandez i wsp. w grupie chorych z PBL-B, u których występowały rozbieżne wyniki badań oceniające stan mutacji genu IgVH i poziom ekspresji ZAP-70 (ZAP-70–, UMIgVH), stwierdzili częstsze występowanie delekcji TP53 oraz 11q, dwóch aberracji genetycznych o niekorzystnym rokowaniu [15]. Zjawisko to znalazło potwierdzenie w obserwacjach innych autorów [16]. Jednocześnie wykazano, iż w grupie chorych z niską ekspresją ZAP-70, delekcja 13q występowała w 59%, trisomia 12 w 18%, natomiast delekcja 11q w 3% przypadków. U chorych ZAP-70+ najczęściej obserwowaną aberracją genetyczną była trisomia 12 (38%), a w dalszej kolejności delekcja 11q, która występowała z podobną częstotliwością jak przypadki stwierdzenia braku zaburzeń (21%) [17]. Wyniki te są zbieżne z tymi, jakie uzyskali inni autorzy [18, 19]. Jednocześnie zdaniem Rassenti i wsp. ZAP-70 stanowi bardziej znaczący niż brak mutacji genu IgVH, czynnik prognostyczny określający konieczność szybszego rozpoczęcia leczenia chorych z PBL-B [14]. Wykazano, że wysoka ekspresja ZAP-70 wiąże się ze zwiększoną fosforylacją tyrozyny oraz ze wzmożonym przekazywaniem sygnałów przez receptor komórki B (BCR), a to z kolei może oddziaływać na proliferację i czas przeżycia białaczkowych komórek [20]. Przez długi okres czasu uważano, że ZAP-70 jest stabilnym markerem białaczkowych limfocytów B [21], w odróżnieniu do ekspresji CD38, która może zmieniać się w pewnych okresach choroby [22]. Utrzymywanie się ekspresji ZAP-70 w komórkach białaczkowych na stałym poziomie, jest często podnoszonym argumentem wskazującym na jego znaczenie jako rzeczywistego czynnika rokowniczego. Potwierdzały to badania Del Principe i wsp. na grupie 32 chorych z PBL-B, u których w większości przypadków wykazano stały poziom ZAP-70 w kolejnych próbkach krwi, pobieranych w określonych odstępach czasowych [23]. Jednakże Deaglio i wsp. w swej pracy wykazali możliwość zmiany ekspresji ZAP-70 pod wpływem IL-2 w związku z czym postawili hipotezę, że ZAP-70 podobnie jak CD38 może zmieniać się w trakcie trwania choroby, a ich poziom w dużej mierze zależy od wpływu mikrośrodowiska, które z kolei wynika z miejsca lokalizacji [24]. Boelens i wsp. wskazywali na wyższą ekspresję ZAP-70 na komórkach w obrębie węzłów chłonnych w porównaniu z krwią obwodową [25]. W badaniach Poulaina i wsp. wykazano u 4 z 33 chorych z PBL-B zmianę ekspresji ZAP-70 z ujemnej na dodatnią, co było związane z progresją choroby. Natomiast odwrotną sytuację stwierdzono u 2 z 27 badanych, uprzednio ZAP-70+. U jednego z nich tłumaczono to faktem zastosowania kortykosteroidów [26].

Pochodzenie komórek ZAP-70+ w PBL-B budzi wiele kontrowersji. Jedną z hipotez próbującą wyjaśnić to zjawisko jest sugestia, iż mogą się wywodzić z populacji niedojrzałych komórek B CD19+, CD10+, czyli z komórek które wykazują ekspresję ZAP-70 podczas prawidłowo przebiegającego procesu różnicowania. Inna proponowana teoria wskazuje na możliwość wywodzenia się ich z nielicznej populacji dojrzałych limfocytów B ZAP-70+, powołując się przy tym na badania Nolz i wsp., którzy odkryli je w warunkach prawidłowych w migdałkach i śledzionie [4]. Alternatywą dla tych spekulacji jest stwierdzenie zaburzonej, związanej z procesem nowotworowym nieprawidłowej metylacji genu ZAP-70 [27]. Jest coraz więcej dowodów na to, iż mechanizm regulujący ekspresję genów podczas prawidłowo przebiegającego procesu różnicowania limfocytów związany jest ze zmianami w struktu-

rze chromatyny, zróżnicowanym oddzielaniem się aktywnych i nieaktywnych genów w jądrze komórkowym oraz prawdopodobnie poprzez metylację CpG [28]. Nieprawidłowa metylacja jest często spotykana w przebiegu różnych nowotworów. Hypermetylacja ognisk CpG w obrębie genu promotora powoduje „wyciszenie” genu, natomiast hypometylacja może wywołać niestabilność genomu lub też nadekspresję genu [29]. Zarówno ogniskowa hypermetylacja CpG jak i hypometylacja mogą występować równocześnie nawet w przebiegu tego samego nowotworu. Uzyskane dane wskazują na ścisły związek pomiędzy ekspresją ZAP-70, metylacją genu oraz stanem mutacji genu IgVH u chorych z PBL-B. Średni czas przeżycia chorych u których stwierdzono metylację lub jej brak wynosił odpowiednio 210 i 85 miesięcy. W większości przypadków wykazujących wysoką ekspresję ZAP-70 stwierdzono brak metylacji w pierwszym intronie i drugim exonie genu ZAP-70, a także brak mutacji genu IgVH. W tym samym regionie nie wykazano metylacji w krążących komórkach T ZAP-70+, natomiast była ona obecna w limfocytach B ZAP-70- zdrowych dawców. Istnieją różne hipotezy próbujące wyjaśnić przyczyny zróżnicowanej metylacji genu ZAP-70 u chorych z PBL-B. Jedna z nich mówi, iż fakt ten może odzwierciedlać obraz prawidłowo przebiegającej metylacji w czasie dojrzewania komórek B [27].

Stwierdzono ścisłą korelację ekspresji ZAP-70 z ekspresją CD38, co dotyczyło jednak głównie chorych bez mutacji genu IgVH [23]. Znalazło to potwierdzenie w wielu badaniach, jakkolwiek mechanizm tego wzajemnego związku nadal pozostaje nieznany [12, 14]. W badaniach Del Principe i wsp. poddano szczegółowej analizie grupę chorych, u których stwierdzono rozbieżność w ekspresji ZAP-70 i CD38. Znaczna większość (82%) wykazywała fenotyp ZAP-70+/CD38-, sugerując tym samym wyższą znaczenia klinicznego ekspresji ZAP-70. Przeprowadzono jednocześnie dalsze analizy w celu określenia stanu mutacji genu IgVH [23]. Interesujące, iż w 64.5% przypadków stwierdzono obecność mutacji, co jednak nie znalazło potwierdzenia w badaniach Schroersa i wsp. (wyższy odsetek chorych bez mutacji genu IgVH) [30]. Oceniono chorych, u których stwierdzono rozbieżności pomiędzy ekspresją ZAP-70, CD38 stanem mutacji genu IgVH. Dokonano podziału na dwie niewielkie grupy: ZAP-70-CD38+, ZAP-70- UM IgVH o korzystniejszym rokowaniu w porównaniu do grupy ZAP-70+CD38-, ZAP-70+M IgVH. Wyniki badań wydają się wskazywać na decydującą rolę rokowniczą ekspresji ZAP-70, jakkolwiek obserwacje te zdaniem autorów wymagają potwierdzenia na większej liczbie chorych. Ekspresja ZAP-70 była również rozpatrywana w aspekcie stosowanego leczenia. W przypadku chorych ZAP-70+ znacząca większość chorych otrzymywała je już w chwili ustalenia rozpoznania. U chorych leczonych fludarabiną stwierdzono wysoki odsetek całkowitych remisji, sięgający 46%, dotyczyło to jednak tej grupy, która należała do niskiego lub pośredniego stopnia zaawansowania klinicznego. Nieco wyższy odsetek CR (o ok. 15–20%) uzyskali inni badacze [31]. Jednoznacznie wykazano, iż poziom całkowitych remisji uzyskanych fludarabiną jako terapii pierwszoliniowej, korelował ze stopniem ekspresji ZAP-70 oraz CD38. Stanowiło to podstawę do sugestii o możliwości zastosowania tych markerów jako ewentualnych wyznaczników chemowrażliwości u chorych z PBL-B. Potwierdzając znaczenie prognostyczne aberracji genetycznych (dłuższy czas wolny od progresji u chorych z prawidłowym kariotypem i del 13q, w porównaniu z niekorzystnymi rokowniczo aberracjami takimi jak trisomia 12, 11q i 17p) [18, 32] wykazano jednocześnie, iż u chorych z prawidłowym kariotypem wysoka ekspresja ZAP-70 wpływa na istotne skrócenie czasu całkowitego przeżycia i czasu wolnego od progresji. Przeprowadzone badania sugerują jednoznacznie nadrzędną prognostyczną rolę ekspresji ZAP-70 w stosunku do ekspresji CD38 oraz stanu mutacji genu IgVH [23].

Jakkolwiek ZAP-70 w przypadku przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej wydaje się mieć już ugruntowane znaczenie to jego rola w odniesieniu do innych typów chłoniaków oraz ostrych białaczek pozostaje nadal nie do końca ustalona. Sup i wsp. wśród grupy 446 przypadków klasycznego chłoniaka Hodgkina, chłoniaków niezaiarniczych oraz ostrych białaczek określali metodą immunohistochemiczną ekspresję ZAP-70. Zgodnie z oczekiwaniami, największą liczbę chłoniaków z wysoką ekspresją ZAP-70 stanowiły chłoniaki T-komórkowe. Uważa się, iż rola ZAP-70 w tych nowotworach jest zbliżona do tej jaką odgrywa w prawidłowych limfocytach T. W przypadku proliferacji wywodzących

się z komórek B niewielki odsetek chłoniaków wywodzących się z dużych komórek B (DLBCL), chłoniaków strefy płaszczu (MCL) oraz pojedyncze przypadki klasycznego chłoniaka Hodgkina (na komórkach Reed-Sternberga) wykazywały ekspresję ZAP-70, a jej znaczenie kliniczne nie zostało jeszcze określone [33]. Nieco więcej uwagi poświęcono przypadkom MCL. Związane to było z faktem stwierdzenia w pewnej ich części mutacji genu IgVH [34]. Jednakże okazało się, iż nie wykazuje ona ścisłego związku z ekspresją ZAP-70 [35]. Chiaretti i wsp. w swej pracy oceniali ekspresję ZAP-70 na komórkach białaczkowych u 128 chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL), w chwili ustalenia rozpoznania. Była ona znacznie silniej wyrażona wśród chorych z T-ALL w porównaniu z chorymi z B-komórkową postacią białaczki (B-ALL). W przypadku B-ALL dotyczyła ona 40–50% przypadków. Najczęściej spotykana była w typie pro-B, pre-B i common ALL, zarówno na poziomie mRNA jak i białka ZAP-70. Stanowiła znaczący czynnik prognostyczny wskazujący na skrócenie czasu wolnego od progresji po osiągnięciu remisji całkowitej [36, 37].

PIŚMIENNICTWO

1. Chan AC, Iwashima M, Turck CW et al. ZAP-70: a 70kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 1992; **71**: 649-62.
2. Isakow N, Wange RL, Burgess WH et al. ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J Exp Med*. 1995; **181**: 375-80.
3. Kozar K, Zagożdżan R. Aktywacja limfocytów w Immunologia Red. J. Gołąb, M. Jakóbiak i W. Lasek, PWN, Warszawa 2002; 176-197.
4. 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* 2005; **19**: 1018-1024.
5. Elder ME, Hope TJ, Parslow TG et al. Severe combined immunodeficiency with absence of peripheral blood CD8+ T cells due to ZAP-70 deficiency. *Cell Immunol* 1995; **165**: 110-7.
6. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 2003; **426**: 454-60.
7. Chan AC, Irwing BA, Fraser JD et al. The z chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 9166-70.
8. Ticchioni M, Charvet C, Noraz N et al. ZAP-70 is required for CXCL12 mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* 2002; **99**: 3111-8.
9. Schweighoffer E, Vanes L, Mathiot A, et al. Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity*. 2003; **18**: 523-533.
10. Cheng AM, Rowley B, Pao W et al. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature*. 1995; **378**: 303-306.
11. Turner M, Mee PJ, Costello PS, et al. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature*. 1995; **378**: 298-302.
12. Crespo M, Bosch F, Villamor N et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2003; **348**: 1764-75.
13. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z et al. ZAP-70 and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 2004; **363**: 105-111.
14. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2004; **351**: 893-90
15. Fernández V, Jares P, Salaverria I et al. Gene expression profile and genomic changes in disease progression of early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2008; **93**: 132-36.
16. Krober A, Bloehdorn J, Hafner S et al. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2006; **24**: 969-976.
17. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003; **101**: 4944-4951.
18. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P et al. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia*. 2002; **16**: 993-1007.

19. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*. 2002; **100**: 117-1184.
20. Chen L, Widhopf G, Huynh L et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; **100**: 4609-4614.
21. Hamblin AD, Hamblin TJ. Functional and prognostic role of ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Ther Targets*. 2005; **9**: 1165-1178.
22. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutation are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002; **99**: 1023-1029.
23. Del Principe MI, Del Poeta G, Buccisano F et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; **108**: 853-61.
24. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood*. 2007; **110**: 4012-4021
25. Boelens J, Philippe J, Offner F. B-CLL cells from lymph nodes express higher ZAP-70 levels than B cells from peripheral blood. *Leuk Res*. 2007; **31**: 719-720.
26. Poulain S, Benard C, Daudignon A et al. Is ZAP-70 expression stable over time in B chronic lymphocytic leukemia? *Leuk Lymphoma*. 2007; **48**: 1219-1221.
27. Corcoran M, Parker A, Orchard J et al. ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2005; **90**(8): 1078-88.
28. Mostoslavsky R, Alt FW, Bassing CH. Chromatin dynamics and locus accessibility in the immune system. *Nature Immunology* 2003; **4**: 603-6.
29. Herman JG, Bylin SB. Gene silencing in cancer in association with promotor hypermethylation *N Engl J Med*. 2003; **349**: 2042-54.
30. Schroers R, Griesinger F, Trümper L et al. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005; **19**: 750-58.
31. Keating MJ, O'Brien S, Lemer S et al. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood* 1998; **92**: 1165-1171.
32. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; **343**: 1910-16.
33. Sup SJ, Domiati-Saad R, Kelley TW et al. ZAP-70 Expression in B-Cell Hematologic Malignancy Is Not Limited to CLL/SLL. *Am J Clin Pathol* 2004; **122**: 582-587
34. Camacho FI, Algara P, Rodriguez A, et al. Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific *VH* genes and the frequency of somatic mutations. *Blood*. 2003; **101**: 4042-4046.
35. Kienle D, Krober A, Katzenberger T, et al. *VH* mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*. 2003; **102**: 3003-3009.
36. Chiaretti S, Li X, Gentleman R, et al. Gene expression profiles of B-lineage adult acute lymphocytic leukemia reveal genetic patterns that identify lineage derivation and distinct mechanisms of transformation. *Clin Cancer Res*. 2005; **11**: 7208-7219.
37. Chiaretti S, Guarini A, Stefania De Propris M, et al. ZAP-70 expression in acute lymphoblastic leukemia: association with the E2A/PBX1 rearrangement and the pre-B stage of differentiation and prognostic implications. *Blood* 2006; **107**: 197-204.

Praca wpłynęła do Redakcji 21.04.2010 r. i została zakwalifikowana do druku 21.04.2010 r.

Adres Autora:

Ewa Wasik-Szczepanek
Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku UM w Lublinie
Ul. Staszica 11
20-081 Lublin