



Nya genetiska upptäckter om spädbarnsleukemi

Akut lymfatisk leukemi hos spädbarn med genetiska förändringar i MLL har mycket få mutationer. Trots detta har de ofta aktiverande mutationer som sannolikt stimulerar cancer-cellernas tillväxt. **Anna Andersson**, dr med vet, avdelningen för klinisk genetik, Lunds universitet och försteförfattare till studien "The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias" redogör här för studien och dess resultat.

Studien är den hittills mest omfattande när det gäller akut lymfatisk leukemi hos spädbarn och har utförts inom ramen för barncancerprojektet "The Pediatric Cancer Genome Project" vid St. Jude Children's Research Hospital och Washington University, USA¹. Den publicerades i Nature Genetics under 2015.

Huvudansvarig för studien är Dr. James Downing, vd för St. Jude Childrens Research Hospital, Memphis, USA.

AKUT LYMFATISK LEUKEMI HOS SPÄDBARN

Leukemi (blodcancer) är resultatet av förvärvade genetiska förändringar i gener som styr viktiga cellulära processer, vilket leder till cancer. De genetiska avvikelser som påvisas vid insjuknandet används idag diagnostiskt och för att dela in leukemierna i grupper som bestämmer vilken behandling patienten skall ges. Trots att vår förståelse har ökat för hur leukemier uppkommer så är den långt ifrån komplett; vi behöver både förbättra klassificeringen av leukemier genom att identifiera genetiska markörer och identifiera gener som kan fungera som mål för nya behandlingar.

Akut leukemi är den vanligaste cancersjukdomen hos barn och 90 % av leukemifallen utgörs av akut lymfatisk leukemi (ALL). Idag är prognosen för ALL hos barn mycket god. Tack vare intensiv forskning, bättre behandling och omvårdnad botas mer än 85 % av patienterna². Det finns dock grupper av ALL där behandlingsresultaten inte är lika goda. En är ALL hos spädbarn yngre än ett år, en ovanlig sjukdom som drabbar ungefär fyra barn om året i Sverige. Majoriteten av dem som drabbas har genetiska förändringar i Mixed Lineage

Leukemia genen (MLL, även kallad KMT2A) i sina sjuka celler. Detta ger en aggressiv sjukdom där man idag lyckas bota färre än 40 %^{3,5}. Sjukdomen är vanligast under de första sex levnadsmånaderna. Ålder vid diagnos är en viktig prognostisk markör, ju yngre barnen är vid insjuknandet, desto sämre prognos⁴. Andra viktiga prognostiska markörer som är associerade med en dålig klinisk prognos är en hög halt av vita blodkroppar, pro-B immunfenotyp med avsaknad av ytmarkören CD10, samt en låg känslighet för läkemedlet prednison⁴. Det är vanligt att de leukemiska cellerna uppvisar uttryck av myeloida antigen vid ALL hos spädbarn⁶. En av anledningarna till den dåliga prognosen vid spädbarnleukemi med genetiska förändringar i MLL-genen är att de ofta får tidiga återfall av sjukdomen, vilka är mycket svårbehandlade⁷. På grund av att ALL hos spädbarn är en så ovanlig sjukdom, behandlas de med samma internationella protokoll⁴.

FUSIONSGENER MED CANCERBILDANDE EGENSKAPER

Ungefär 80 % av de som drabbas av spädbarnsleukemi har genetiska förändringar i MLL-genen i sina leukemiceller. Det kan jämföras med att genetiska förändringar i MLL-genen endast återfinns hos ca 5 % av barn över ett år med ALL^{3,4}. De genetiska förändringarna är framförallt så kallade translokationer, vilket innebär att MLL-genen sätts ihop med en gen från en annan kromosom och bilda en så kallad fusionsgen (Bild 1). Fusionsgenen bildar ett protein med canceromvandlande egenskaper. De vanligaste fusionsgenerna vid spädbarnsleukemi är t(4;11)(q21;q23) MLL-AFF1 (49 %), (11;19)(q23;p13.3) MLL-MLLT1 (22 %), t(9;11)(p22;q23) MLL-



Figur 1. Bilden visar kromosomerna från en cell från en patient med t(10;11)(p12;q23). Med hjälp av tekniken "Fluorescence in situ hybridisering (FISH)" har de två kopiorna av kromosom 10 märkts in med en så kallad prob vilken är kopplad till en fluorescerande färg (blå). Genen MLL har märkts in med två stycken andra prober, en röd och en grön vilka tillsammans ger en gul signal för den normala kopian av MLL-genen. Vid ett rearrangemang av MLL kommer en av de gula signalerna att brytas och en grön och en röd signal bildas. I bilden har en liten bit av kromosom 10 (blå) flyttat till kromosom 11 och där ses även en grön signal från MLL-genen. Den andra delen av MLL-genen har flyttat till kromosom 10 (röd signal). Det har således skett en translokation mellan kromosom 10 och 11, och denna har lett till att fusionsgenen MLL-MLLT10 har bildats.

MLLT3 (17 %) och t(10;11)(p12;q23) MLL-MLLT10 (5 %)⁸. Den vanligaste fusionsgenen vid ALL hos spädbarn är således den som ger upphov till fusionsgenen MLL-AFF1. Denna fusionsgen är även den som har sämst prognos, och den återfinns framförallt hos de yngre spädbarnen⁹.

Tvillingstudier och analys av arkiverade blodprov tagna i samband med barnets födelse visar att MLL-rearrangerad (MLL-R) leukemi hos spädbarn uppstår i fosterstadiet och att utvecklingen till klinisk manifesterbar sjukdom går mycket snabbt⁹. Hos genetiskt identiska tvillingar som delat samma moderkaka är konkordansen för ALL nära 100 %¹⁰. Leukemin uppstår alltså i den ena tvillingen och sprids därefter via blodcirkulationen till den andra tvillingen. Sammantaget tyder dessa data på att det, förutom MLL-translokationen, behövs få eller inga ytterligare genetiska förändringar än den i MLL-genen för att ge upphov till leukemi hos spädbarn. Det är sannolikt så att ALL hos spädbarn är en distinkt biologisk sjukdom som skiljer sig från ALL hos äldre barn.

SPÄDBARNLEUKEMI HAR FÅ MUTATIONER

För att öka förståelsen för hur leukemi hos spädbarn uppkommer och bäst kan behandlas studerade vi det genetiska landskapet hos 65 spädbarn med ALL, varav 47 hade genetiska förändringar i MLL-genen. Då genetiska förändringar i MLL-genen även förekommer hos barn över ett år, studerades även 20 äldre barn med MLL-R leukemi¹¹. Med hjälp av bland annat helgenomsekvensering kunde vi undersöka hela genomet och därmed kartlägga samtliga genetiska förändringar i leukemicellerna. Studien gav en unik inblick i en mycket aggressiv sjukdom och visade att spädbarn med MLL-R ALL har få

ytterligare mutationer i sina leukemiceller. Utav de cancertyper som idag har sekvenserats är spädbarnsleukemi en av dem med lägst antal mutationer. I genomsnitt hade varje patient endast 2,2 somatiska mutationer med en effekt på proteinnivå och endast i genomsnitt 1,3 av dessa återfanns i den domineranta leukemiklonen, det vill säga i alla patientens leukemiceller.

HÖG FREKVENNS AV AKTIVERANDE MUTATIONER

Trots den generella avsaknaden av mutationer hade nära hälften av de undersökta patienterna aktiverande mutationer i gener som kodar för kinaser eller i gener som ingår i PI3K-RAS-signalvägarna. De aktiverande mutationerna verkar sannolikt stimulerande på cancercellernas tillväxt. Majoriteten av dessa mutationer återfanns endast i en liten andel av leukemicellerna, vilket var förvånande, eftersom de har en stark koppling till cancer och celler med sådana mutationer borde ha en selektiv fördel.

För att ytterligare studera betydelsen av de aktiverande mutationerna, undersöktes prov från sjukdomsåterfallet från sju patienter. Av de fem som hade en diagnostisk RAS-mutation så återfanns samma mutation i återfallet hos två patienter, minskade i frekvens hos en patient och försvann hos två patienter. Dessa fynd tyder på att de aktiverande mutationerna har störst betydelse vid initieringen av leukemin och avsaknaden av mutationerna vid sjukdomsåterfallet tyder på att patienterna sannolikt inte skulle vara behjälpta av mediciner som specifikt riktar sig mot dessa mutationer. Sammantaget talar den vanliga förekomsten av aktiverande mutationer vid spädbarnsleukemi på att de samverkar med MLL-fusionsgenen till leukemiuppkomst. Flera djurmodeller av MLL-R leukemi stärker denna slutsats då RAS-mutationer samverkar med MLL-fusionsgenen i dessa modeller och ger ett snabbare sjukdomsförlopp^{12,13}.

SPÄDBARNLEUKEMI ÄR SANNOLIKT EN GENETISKT HETEROGEN SJUKDOM

Mutationer i RAS-signaleringsvägen är förknippad med en sämre prognos vid MLL-R ALL hos spädbarn^{11,14}. I vår studie, kunde vi även visa att de spädbarn med fusionsgenen MLL-AFF1 som dessutom hade en aktiverande mutation, i genomsnitt var yngre än de som saknade en sådan mutation. Detta innebär att en aktiverande mutation förmodligen minskar tiden till klinisk manifesterbar sjukdom och att de därmed ger cancercellerna en tillväxtfördel.

Som nämnts ovan fanns flertalet av de funna mutationerna inte i alla leukemicellerna, vilket talar för att spädbarnsleukemi är en genetiskt heterogen sjukdom^{11,15}. Denna heterogenitet skulle kunna ha direkt betydelse för den dåliga prognosen hos spädbarn med MLL-R ALL, genom att nuvarande behandlingsmetoder inte helt och fullt kan eliminera alla leukemikloner. Detta möjliggör att sjukdomen kan komma tillbaka från en liten leukemiklon som fanns redan vid diagnos-tillfället. En ökad kunskap om genetisk heterogenitet och huruvida de spädbarn med en sämre prognos också har en mer genetisk heterogen sjukdom skulle ge värdefull biologisk kunskap om spädbarnsleukemi och hur den bäst kan behandlas.

MLL-R leukemi drabbar även barn över ett år, vilka har en bättre klinisk prognos. Denna patientgrupp hade betydligt fler mutationer jämfört med MLL-R ALL hos spädbarn (6.5 mutationer/barn jämfört med 1.3 mutationer/barn). Hos nära hälften av de äldre barnen identifierade vi mutationer i gener som kodar för epigenetiska kontrollgener, vilka är en typ av gener som styr aktiveringen av andra gener. Motsvarande mutationer saknades vid MLL-R ALL hos spädbarn (förutom MLL, vilken också är en epigenetisk kontrollgen och vilken är muterad i samtliga fall). Upptäckten tyder på att det sannolikt är en annan celltyp som omvandlas till leukemiceller hos spädbarn jämfört med hos äldre barn. Vi tror att hos spädbarn så sker den genetiska förändringen i MLL-genen i en omogen hematopoietisk cell, vilken kräver få ytterligare mutationer för att omvandlas till en leukemicell. Denna cell befinner sig sannolikt i ett unikt epigenetiskt stadium vilket gör den mer mottaglig för transformation av MLL-translokationen. Förmodligen finns denna celltyp endast vid ett speciellt utvecklingsstadium under fosterlivet och befinner sig i en miljö vilken främjar dess tillväxt¹⁶. Hos de äldre barnen krävs däremot fler mutationer och endast en förändring i MLL-genen är inte tillräcklig.

UNIK AGGRESSIV SJUKDOM MED STORT BEHOV AV NYA BEHANDLINGSLTERNATIV

MLL-R ALL hos spädbarn är en aggressiv sjukdom som karakteriseras av ett tyst genom och mycket få mutationer utöver den primära MLL-translokationen. Det är därför möjligt att nya behandlingar bör inrikta sig just på den specifika kromosomförändringen. Sannolikt uppstår sjukdomen i en unik cell i ett unikt epigenetiskt stadium som under sin expansion får mycket få ytterligare genetiska förändringar. Trots den generella avsaknaden av mutationer visar den höga frekvensen av aktiverande mutationer på att dessa samverkar med MLL-fusionen i leukemiutvecklingen¹⁷. Att så många av de aktiverande mutationerna återfinns i subkloner skulle kunna tyda på att de kan påverka andra leukemiceller genom interklonal samverkan och att denna samverkan är en viktig biologisk mekanism vilken bidrar till leukemiutveckling. En ökad kunskap om hur leukemikloner samverkar och om de mekanismer som leder till att så många spädbarn med MLL-R ALL får tillbaka sin sjukdom skulle i framtiden kunna leda till nya förbättrade möjligheter att behandla spädbarnsleukemi.

REFERENSER

- Downing, J.R., Wilson, R.K., Zhang, J., Mardis, E.R., Pui, C.H., Ding, L., Ley, T.J. & Evans, W.E. The Pediatric Cancer Genome Project. *Nat Genet* 44, 619-622 (2012).
- Pui, C.H., Campana, D., Pei, D., Bowman, W.P., Sandlund, J.T. et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med* 360, 2730-2741 (2009).

- Biondi, A., Cimino, G., Pieters, R. & Pui, C.H. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 96, 24-33 (2000).
- Pieters, R., Schrappe, M., De Lorenzo, P., Hann, I., De Rossi, G. et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet* 370, 240-250 (2007).
- Pui, C.H., Chessells, J.M., Camitta, B., Baruchel, A., Biondi, A. et al. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia* 17, 700-706 (2003).
- Basso, G., Rondelli, R., Covezzoli, A. & Putti, M. The role of immunophenotype in acute lymphoblastic leukemia of infant age. *Leuk Lymphoma* 15, 51-60 (1994).
- Sanjuan-Pla, A., Bueno, C., Prieto, C., Acha, P., Stam, R.W., Marschalek, R. & Menendez, P. Revisiting the biology of infant t(4;11)/MLL-AF4+ B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* (2015).
- Meyer, C., Hofmann, J., Burmeister, T., Groger, D., Park, T.S. et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* 27, 2165-2176 (2013).
- Ford, A.M., Ridge, S.A., Cabrera, M.E., Mahmoud, H., Steel, C.M., Chan, L.C. & Greaves, M. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature* 363, 358-360 (1993).
- Greaves, M.F., Maia, A.T., Wiemels, J.L. & Ford, A.M. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* 102, 2321-2333 (2003).
- Andersson, A.K., Ma, J., Wang, J., Chen, X., Gedman, A.L. et al. The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat Genet* 47, 330-337 (2015).
- Ono, R., Kumagai, H., Nakajima, H., Hishiya, A., Taki, T. et al. Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation. *Leukemia* 23, 2197-2209 (2009).
- Tamai, H., Miyake, K., Takatori, M., Miyake, N., Yamaguchi, H., Dan, K., Shimada, T. & Inokuchi, K. Activated K-Ras protein accelerates human MLL/AF4-induced leukemo-lymphomogenicity in a transgenic mouse model. *Leukemia* 25, 888-891 (2011).
- Driessen, E.M., van Roon, E.H., Spijkers-Hagelstein, J.A., Schneider, P., de Lorenzo, P., Valsecchi, M.G., Pieters, R. & Stam, R.W. Frequencies and prognostic impact of RAS mutations in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants. *Haematologica* 98, 937-944 (2013).
- Bardini, M., Woll, P.S., Corral, L., Luc, S., Wittmann, L. et al. Clonal variegation and dynamic competition of leukemia-initiating cells in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangement. *Leukemia* (2014).
- Greaves, M. When one mutation is all it takes. *Cancer Cell* 27, 433-434 (2015).
- Prelle, C., Bursen, A., Dingermann, T. & Marschalek, R. Secondary mutations in t(4;11) leukemia patients. *Leukemia* 27, 1425-1427 (2013).

