

Akut myeloisk leukemi (AML) inrymmer en hög grad av klonal och funktionell heterogenitet, med konsekvenser för grundläggande leukemibiologi och framtida behandlingsstrategier. Det skriver **Carl Sandén** vid Lunds universitet i en sammanfattning av en ny studie där man med omfattande sekvensering har upptäckt nya nivåer av klonal komplexitet och kartlagt hur klonernas dynamik formar AML över tid.

NYA NIVÅER AV KLONAL

De senaste årens forskning har visat att tumörer inte är de enhetliga populationer av cancerceller som vi tidigare antagit.^{1,2} Den snabba utvecklingen inom sekvenseringsteknologi har möjliggjort detaljerad genetisk karakterisering inte bara av fler patienter utan också av olika delar av samma tumör. Resultaten visar att många cancrar rymmer en slående heterogenitet där kloner med olika uppsättningar cancermutationer konkurrerar över tid och rum. Genom att jämföra mutationsfrekvenser från tumör-områden med olika klonsammansätt-

ningar har man kunnat kartlägga klonernas släktskap och rekonstruera förloppet från den första gemensamma mutationen till släkträdets olika förgreningar av påföljande mutationer. Leukemier kan inte studeras på samma sätt eftersom klonerna inte hålls åtskilda så som i solida tumörer. Studier av AML har därför begränsats till djupsekvensering av enskilda prover eller matchade prover från diagnos och recidiv, vilket gjort det svårt att upptäcka sällsynta kloner och avgöra klonernas släktskap. Vi har således fortfarande ingen tydlig bild av den klonala dyna-

miken i AML, varken vilken heterogenitet som finns vid diagnos eller hur de olika klonerna konkurrerar över tid.

KUNDE FÖLJA KLONDYNAMIKEN

För att modellera klonal dynamik in vivo genererade vi så kallade patient-derived xenografts (PDX) genom seriell transplantation av celler från AML-patienter till immundefekta möss. Celler från patienter med ett brett spektrum av de vanligaste mutationerna i AML transplanterades till primära och därefter vidare till sekundära recipienter och i varje steg analy-



KOMPLEXITET I AML

serades den klonala sammansättningen genom helexomsekvensering.³ På så sätt kunde vi följa klondynamiken för 23 patienter i 84 xenografter över två generationer och mycket lång tid. Vi kunde då se att en klar majoritet av patienterna bar på flera kloner med olika uppsättningar drivermutationer redan vid diagnos men att många av dessa kloner var så sällsynta att de inte gick att detektera. Det som gjorde det möjligt för oss att hitta de här klonerna var att de expanderade in vivo, och när vi såg samma klon i två oberoende möss kunde vi dra slutsatsen att den måste ha

/// Vi kunde se att en klar majoritet av patienterna bar på flera kloner med olika uppsättningar drivermutationer redan vid diagnos men att många av dessa kloner var så sällsynta att de inte gick att detektera.

funnits redan vid diagnos. På så vis kunde vi identifiera kloner med monosomi(7), loss of heterozygocity för TET2 och mutationer i NF1, PTPN11 och SMC3, som alla hade för låga frek-

venser för att upptäckas vid diagnos. I andra fall såg vi att sent uppkomna mutationer gick förlorade in vivo och på så sätt blottade existensen av föräldrakloner utan dessa mutationer som mås-

••• akut myeloisk leukemi

te ha funnits på odeketerbara nivåer vid diagnos. Med denna modell kunde vi påvisa multipla kloner i 18/23 (78%) av de undersökta fallen. Detta är betydligt högre än vad tidigare studier visat genom helgenomsekvensering av diagnostiska prov (27/50; 54%)⁴ eller helexomsekvensering av matchade prover från diagnos och recidiv (23/50; 46%)⁵. Baserat på våra resultat är det alltså troligt att AML rymmer mer klonal heterogenitet än vad man tidigare trott. Det är också möjligt att kloner som ser ut att dyka upp vid återfall i själva verket finns i mycket låga cellantal redan vid diagnos.

Baserat på våra resultat är det alltså troligt att AML rymmer mer klonal heterogenitet än vad man tidigare trott. Det är också möjligt att kloner som ser ut att dyka upp vid återfall i själva verket finns i mycket låga cellantal redan vid diagnos.

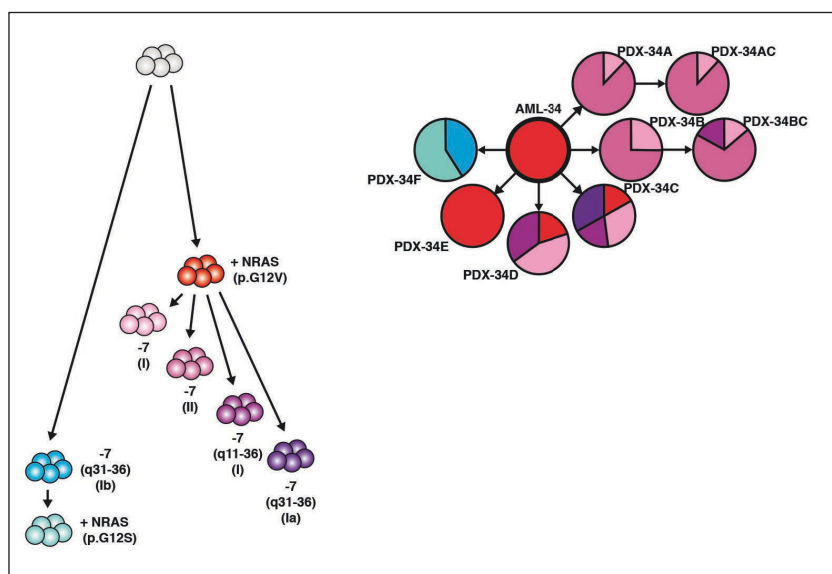
ANALYS AV MUTATIONSORDNING

De stora förändringarna i klonsammansättning från patientprover till xenografter möjliggjorde inte bara detektion av nya kloner utan också analys av

NRAS eller WT1 utan att dessa mutationer tillhörde distinkta systerkloner. Denna komplexitet är relevant för att förstå hur mutationer samverkar och kompletterar varandra, men också för

målinriktad behandling där det är av största vikt att veta vilka mutationer som finns i samtliga kloner och om de olika genetiska avvikelserna finns i samma celler.

De evolutionära släkträderna var särskilt informativa i ett fall (Figur 1). I AML-34 hittades vid diagnos en enda klon med mutationer i *DNMT3A*, *CEBPA*, *IDH1* och *NRAS*. I sju av åtta xenografter kunde vi dock även detektera monosomi(7) i det stora flertalet av cellerna. En närmare inspektion visade att det rörde sig om inte mindre än fyra separata förluster av olika delar och alleler av kromosom 7. Intressant nog saknade en av xenografterna den tidigare upptäckta *NRAS*-mutationen p.G12V. Istället hade den klonen den snarlika *NRAS*-mutationen p.G12S. Samtidigt hade den också monosomi(7), men med skillnaden att förlusten av kromosom 7 i det här fall måste ha uppstått före *NRAS*-mutationen snarare än efter, som i de andra klonerna. I den här patienten har det alltså oberoende av varandra uppstått två helt parallella utvecklingsspår med kombinationen *NRAS*-mutation och monosomi(7). Utöver det har den ena *NRAS*-klonen genererat minst fyra olika varianter av deletionen på kromosom 7. Denna parallella evolution visar på ett starkt evolutionärt tryck på att få fram just den här kombinationen. Det faktum att de två genetiska händelserna uppstått i omvänd ordning i de olika klonerna indikerar att den ena avvikelsen förmodligen inte underlättar själva uppkomsten av den andra, utan att de snarare samverkar på ett sätt som ger kloner med kombinationen en stor selektionsfördel när den väl uppstår. Detta antyder att det uppstår många drivermutationer som vi aldrig ser vid diagnos eftersom de inte ger någon selektionsfördel i just den kontexten, men att förändrade betingelser såsom kraftfull cytostatikabehandling kan selektera fram kloner som tidigare selekterats bort och att detta kan vara en betydande förklaring till de genetiska skillnaderna mellan diagnos till återfall.

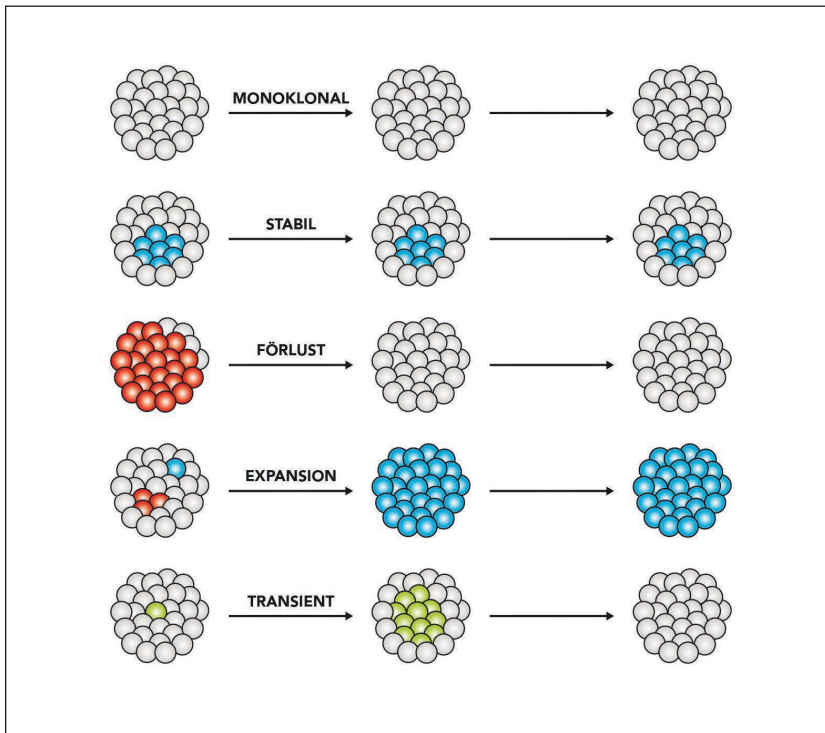


Figur 1. Ett fall uppvisade flera kloner som förvärvat samma genetiska förändringar men som var för sällsynta för att detekteras vid diagnos och endast gick att identifiera efter xenotransplantation.

FEM ÅTERKOMMANDE MÖNSTER

En sammanställning av klondynamiken för respektive patient i vår kohort

••• akut myeloisk leukemi



Figur 2. Helexomsekvensering av patientceller vid diagnos och efter transplantation till primära och sekundära möss kartlade sammansättningen av kloner med olika AML-mutationer vid respektive tidpunkt och identifierade fem mönster för klondynamik in vivo.

visade på fem återkommande mönster: Monoklonal, Stabil, Förlust, Expansion och Transient (Figur 2). Av våra 23 fall uppvisade bara sex patienter det monoklonala mönstret med en och samma klon vid diagnos och i xenograferna, och en enda patient följde det stabila mönstret med en subklon som behöll sin frekvens över två generationer. För de övriga 16 av 23 fallen (70 %) förändrades klonsammansättningen markant över tid. Fyra patienter tappade kända drivermutationer in vivo när en subklon förlorades till förmån för en föräldraklon utan en eller flera av subklons mutationer. Flera av dessa var RAS-mutationer, vilket speglar en vanlig klinisk utveckling från diagnos till återfall. I samtliga fall var det omöjligt att på förhand förutspå att patienterna bar på multipla kloner eftersom subklonerna var så dominerande att deras mutationer uppvisade lika höga allelfrekvenser som föräldraklonernas. Xenograferna synliggjorde alltså inte bara mu-

tationsordningen utan också det faktum att tidigare kloner fortfarande fanns kvar i väldigt små andelar och kunde expandera under gynnsamma omständigheter. Det vanligaste mönstret vi observerade var att en mindre subklon i patientprovet expanderade in vivo på bekostnad av samtliga övriga kloner. Dessa subkloner hade en genomsnittlig allelfrekvens på bara 5 procent vid diagnos och var som tidigare beskrivits odetekterbara i flera fall. I ytterligare två fall expanderade kloner transient i första generationen xenografer för att sedan försvinna efter vidare transplantation till sekundära möss. Det här är den första beskrivningen av detta fenomen i AML-xenografer och visar hur mutationer såsom dessa i *SMC3* och *PTPN11* kan stimulera initial expansion på bekostnad av leukemistamcellernas långsiktiga självförnyelse. Vi tyckte också det var intressant att klondynamiken korrelerade med riskklassificeringen för AML en-

ligt ELN 2017.⁶ Expanderande subkloner hittades bara i 3 av 11 fall (27 %) med god prognos men i 4 av 6 fall (67 %) med intermediär prognos och i 6 av 6 fall (100 %) med sämre prognos. En tänkbar förklaring är att en bred flora av kloner ökar de heterogena leukemiernas möjligheter att producera en klon som kan överleva behandling och orsaka återfall, vilket skulle kunna bidra till den dåliga prognosen. Sammanfattningsvis visar vi att AML rymmer komplexa och dynamiska klonstrukturer, vilket måste tas i beaktande vid studier av den underliggande biologin och utveckling av framtida behandlingsstrategier.

REFERENSER

- 1 Dagogo-Jack, I. & Shaw, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature reviews. Clinical oncology* 15, 81-94, doi:10.1038/nrclinonc.2017.166 (2018).
- 2 McGranahan, N. & Swanton, C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* 168, 613-628, doi:10.1016/j.cell.2017.01.018 (2017).
- 3 Sanden, C. et al. Clonal competition within complex evolutionary hierarchies shapes AML over time. *Nature communications* 11, 579, doi:10.1038/s41467-019-14106-0 (2020).
- 4 Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 368, 2059-2074, doi:10.1056/NEJMoa1301689 (2013).
- 5 Greif, P. A. et al. Evolution of Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia During Therapy and Relapse: An Exome Sequencing Study of 50 Patients. *Clin Cancer Res* 24, 1716-1726, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2344 (2018).
- 6 Dohner, H. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 129, 424-447, doi:10.1182/blood-2016-08-733196 (2017).

CARL SANDÉN, PH D, BITRÄDANDE FORSKARE VID AVDELNINGEN FÖR KLINISK GENETIK, LUNDS UNIVERSITET, CARL.SANDEN@MED.LU.SE

