



Kromosomal obalans i **neuroblastom** – molekylära aktiviteter för framtiden

Ny forskning visar på komplexiteten i de genetiska obalanserna som återfinns i neuroblastom, något som delvis kan förklara mekanismerna bakom neuroblastom-initiering. Nu står forskningsfältet inför en viktig utmaning när det gäller hur man bäst tolkar de olika kromosomala abnormiteterna, och kombinationerna av molekylära aktiveringsmekanismer och avvikande cellsignaler, speciellt i högrisk neuroblastom. Här beskriver forskarna **Marcus Borenäs, Torben Ek, Jikui Guan, Bengt Hallberg** och **Ruth Palmer**, samtliga verksamma i Göteborg, senaste nytt från detta angelägna forskningsområde.



// Bördan av behandlingen är stor med risk för komplikationer och sena biverkningar.

Neuroblastom är den vanligaste tumören hos spädbarn och medianåldern vid diagnos är 18 månader¹. Sällsynta fall uppträder även i tonåren och hos unga vuxna¹. Neuroblastom uppkommer i det primitiva sympatiska nervsystemet och tumörer kan uppkomma längs hela sympatiska gränssträngen från halsen ner till bäckenet, eller i binjurarna¹. Cirka hälften av patienterna har metastaser vid diagnos¹. Neuroblastom uppvisar mycket heterogent kliniskt förlopp, alltifrån spontan regress eller utmognad till ganglioneurom, till progressiv metastaserande sjukdom trots intensiv multimodal behandling^{1,3}.

Internationella neuroblastom-risk-gruppen (INRG) tog 2009 fram ett klassificeringssystem baserat på ålder, stadium, tumörhistologi, differentieringsgrad, MYCN-amplifiering, 11q-aberration och ploiditet för att definiera väldigt låg – (5 år Event Free Survival (EFS) >85%), låg – (5 år EFS >75% till ≤85%), intermediär-(5 år EFS ≥50% till ≤75%) och högrisk (5 år EFS <50%) grupper⁴. Högrisk-gruppen utgör den procentuellt största gruppen av patienterna (cirka 40 procent)⁴. Behandling av högrisk neuroblastom utgör den största utmaningen och man har genom sekventiella studier kommit fram till intensiv induktionskemoterapi, lokalbehandling med kirurgi och postoperativ radioterapi, konsolidering med högdoskemoterapi med autologt stamcellsstöd och underhållsbehandling med anti-GD2 och 13-cis retininsyra (Figur 1). Bördan av behandlingen är stor med risk för komplikationer och sena biverkningar⁵. Det finns alltså stor anledning att hitta mer målriktad och immunologiskt inriktad terapi än nuvarande toxiska behandlingsprotokoll. Därför är det viktigt att förstå de bakomliggande molekylära aktiveringsmekanismerna för initiering av neuroblastom.

Mycket låg – låg risk	Observation eller kirurgi			
Intermediär risk	Kemoterapi 2-8 kurer	Kirurgi		
Hög risk	Intensiv induktionskemoterapi	Stamcellsaferes Kirurgi	Högdoskemo + autologa stamceller	Immunterapi (anti GD2) + 13-cis RA

Figur 1. Behandlingsöversikt av neuroblastom.

Genetisk profil	Överlevnad 5 år efter diagnos	Andel av undersökta fall
MNA	46 %	21 % (n=93)
Partiell 11q-	48 %	22 % (n=94)
MNA och partiell 11q-	0 %	6 % (n=26)
17q+ (utan MNA eller 11q-)	66 %	12 % (n=52)
Andra segment	92 %	12 % (n=51)
Endast numerisk	95 %	27 % (n=117)

Tabell 1. Överlevnad fem år efter diagnos baserad på genetisk profil. Överblick av vanliga analyserade genetiska abnormiteter hos neuroblastom. Data är sammanställd från över 400 svenska neuroblastompatienter. Anpassad med tillåtelse från Siaw et al. och Guan et al. 2021. MNA, MYCN-amplifierad; 11q-, 11q-deletion; 17q+, 17q gain.

Hur neuroblastom uppkommer är till stor del inte känt, hitintills har endast ett fåtal cancerdrivande gener identifierats. Däremot visar hög-risk neuroblastom fler genetiska avvikelser som till exempel amplifiering av proto-onkogenen MYCN eller aberration av 11q⁴ och fem års överlevnad för båda dessa grupper är under 50 procent (Tabell 1)^{2,6}. Det finns dock många andra genetiska avvikelser, både hos hög-risk och icke-högrisk neuroblastom, som skulle kunna ha betydelse för framtida behandlingsformer. När Cohn et al. tog fram klassificeringssystemet för neuroblastom 2009 var den totala överlevnaden (overall survival) för 1p aberrationer 100 procent samtidigt som det endast fanns data för 17q status från mindre än fem procent av deltagarna, varför 1p och 17q-status exkluderades från kriterierna för klassificeringen av neuroblastom⁴.

Här presenterar vi nya rön med fokus på framför allt MYCN-amplifiering (MNA) och 11q-aberrationer, som avslöjar molekylära mekanismer som sannolikt bidrar till hög-risk neuroblastom.

MYCN-AMPLIFIERING

I en nyligen publicerad studie fann man när man undersökte över 400 neuroblastom-patienter i Sverige att ungefär 20 procent av neuroblastomfallen hade MNA vilket är associerat med låg femårsöverlevnad efter diagnos (Tabell 1)⁶. Amplifiering av MYCN-onkogenen var en av de första upptäckta genetiska förändringarna i neuroblastom som visade sig vara en viktig prognostisk indikator⁷.

Högrisk neuroblastom med MNA uppvisar vanligen förlust av heterozygositet på kromosom 1p och är associerad med deletion av 1p36 i runt 70 procent av fallen^{8,9}. I två nyligen, oberoende av varandra, publicerade studier omvärderade man inverkan av förlust av 1p heterozygositet på utvecklingen av MYCN-driven neuroblastom^{8,10}. I den ena studien, Garcia-Lopez et al., tog man på genetisk väg bort motsvarande 1p36 i neuralistceller från möss för att efterlikna 1p36 heterozygositet förlust/MNA neuroblastom⁸. Borttagandet av 1p36, som innehöll tumorsuppressorgenerna Arid1a och Chd5, resulterade i ökad tillväxt och migration samt defekter i differentieringen in vitro. De observerade att förlust av 1p36 inte påverkar tumörpenetransen tillsammans med överuttryckt MYCN, dock minskade tiden

för initiering av tumörbildningen tillsammans med överuttryckt MYCN in vivo⁸. Man observerade även att 1p36 deletion i kombination med överuttryckt MYCN resulterade i mindre differentierad tumör när man jämförde med endast överuttryckt MYCN in vivo. Analyser av möjliga 1p36 tumorsuppressorgener identifierade Arid1a-genen som den gen med den starkaste korrelation mellan uttrycksnivå och tumörstart. Denna studie har ökat den molekylära förståelsen av 1p36 heterozygositet i MYCN-driven neuroblastom och identifierat SWI/SNF kromatinremodelleringskomplexets subenhet Arid1a som en MYCN-kollaboratör som påskyndar tumörbildandet hos neuroblastom⁸.

Den andra studien av ARID1A i zebrafisk resulterade i liknande slutsatser¹⁰. Här påvisade man att deletion av ARID1A-homologen i en zebrafiskmodell påskyndade initieringen av tumörbildning men även ökade penetransen i MYCN-driven neuroblastom¹⁰. Vidare undersöktes ARID1As roll i humana neuroblastomceller och där visade experimentet att förlust av genen ARID1A inte påverkar tillväxt men främjar invasivitet och migration. Intressanta RNA-analyser från dessa celler visar också att avsaknad av ARID1A medför en adrenerg-till-mesenkymal cell status övergång¹⁰. Mesenkymala celler upptäcks mer i post-terapi och återfalls-neuroblastomtumörer, och dessa celler har ett mer odifferentierat tillstånd. Däremot representerar celler av adrenerg-typ ett mer differentierat tillstånd, med likheter med adrenerga-celler som kromaffina-celler i binjuren.

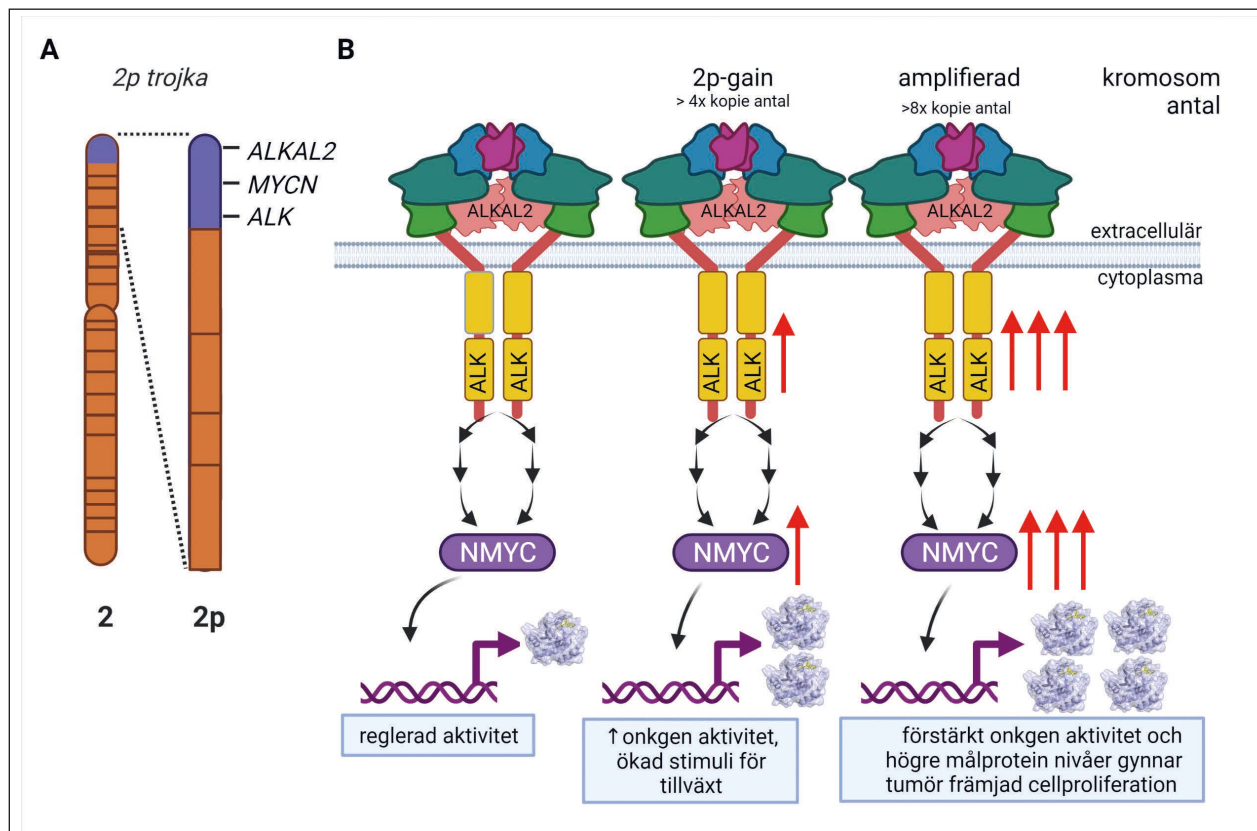
Sammanfattningsvis stöder och antyder dessa rapporter en viktig roll för 1p36-lokuset och ARID1A i tumörutvecklingen hos neuroblastom, där förlust av ARID1A modulerar tumörstart, invasivitet och inducerar en mesenkymal (odifferentierad) fenotyp som skulle kunna öka resistansen mot kemoterapi. Således ansluter sig nu ARID1A-genen till listan av möjliga tumorsuppressorgener lokaliserade till 1p36 som kan ha potential att påverka neuroblastom-initiering och -progression.

ANAPLASTISKT LYMFOM KINAS (ALK)

En av de få onkogener på mutationskartan i neuroblastom är aktiverande mutationer i Anaplastiskt Lymfom Kinas (ALK), en Receptor Tyrosin Kinas (RTK), både hos sporadiska och familjära fall och det är uppskattat att aktiverande

mutationer i ALK utgör cirka tio procent av primärfallen^{1,2}. Guan et al. presenterade nyligen ett kliniskt fall av neuroblastom där patienten inte tolererade den konventionella terapin på grund av en underliggande Fanconi-anemi¹¹. Genetiska analyser påvisade en ny ALK-mutation. Efter flera molekylära analyser behandlades patienten med ceritinib, en andra generationens tyrosinkinasinhibitor mot ALK, och uppvisade total remission efter 21 månaders behandling¹¹. I slutet av 2021 presenterades en fas 1-studie på ceritinib till barn med ALK-positiv malignitet och här observerade man en respons och sjukdomsstabilitet på över 50 procent av neuroblastom-kohorten¹². Utvecklingen av ALK-tyrosinkinasinhibitorer har från 2007 gagnat behandlingen av ALK-positiva cancerpatienter, framförallt ALK-positiva lungcancerpatienter. En rundfrågning bland svenska barnonkologer angående behandling av enstaka patientfall med ALK-muterade neuroblastom och svikt av konventionella behandlingsprotokoll, visar att enstaka patientfall har en god respons på behandling med tredje generationens ALK-inhibitor lorlatinib¹³. I den nu pågående europeiska behandlingsstudien för högrisk neuroblastom (NCT04221035) har man tillsammans med USA öppnat en substudie med tillägg av lorlatinib i den övriga behandlingen för högrisk neuroblastom¹³, det vill säga de som har en ALK-amplifiering eller ALK-mutation (NCT03107988). Det finns ingen ALK-inhibitor som har indikationen neuroblastom, så behovet av mer data är stort.

Idag är det allmänt accepterat att ALK och MYCN samarbetar i att driva neuroblastom. MYCN, ALK och en av liganderna till ALK, ALKAL2, är lokaliserade till ett område på kromosom 2p (Figur 2A). Nyligen rapporterade Javanmaride et al. att ungefär 30 procent av 365 neuroblastompatienter uppvisar en kromosomal ”2p-gain” eller amplifiering i detta område som visar sig ha en dålig ”event free survival”¹⁴. Vad händer när trojkan bestående av ALKAL2, ALK och MYCN är lite eller mycket överuttryckta/aktiverade (Figur 2B)? Svaret kom delvis från Borenäs et al. som visade att ALK-liganden ALKAL2 samarbetar med MYCN till en snabb, aggressiv och penetrativ neuroblastomtillväxt och märk väl i frånvaro av ALK-mutation¹⁵. Dessa uppkomna tumörer uppvisade en RNA-signatur likt den hos ALK-mutant/MYCN-driven neuroblastom samtidigt som ALKAL2/MYCN-tumörer är känsliga för tyrosinkinasinhibitor (TKI)-behandling¹⁵. I samma spår rapporterades det nyligen om en patient med refraktär metastasering och uttömda terapeutiska alternativ men med kända kromosomala förändring tillsammans med en 2p-gain fenotyp med en mutation i liganden ALKAL2¹⁶. Molekylära prekliniska tumöranalyser från patienten visade en tydlig aktivering av vildtypsreceptorerna ALK/TRKA. Patienten svarade positivt på entrectinib, vilket är en hämmare både för ALK och TRKA, och har idag ett stabilt kliniskt tillstånd. Denna patient är det första rapporterade neuroblastomfallet med en 2p-gain variant med preklinisk



Figur 2. A) Lokalisation av ALKAL2, MYCN och ALK på kromosom 2p. ALKAL2, MYCN och ALK ligger på kromosom 2p25-3, 2p24.3 och 2p23.2, respektive. B) 2p-regionen med normalt kopia nummer (till vänster), 2p-gain (mitten) och amplifierad (till höger) vilket medför allt från normal reglering av nedströms gener och dess aktivitet till amplifierad och överuttryckta målproteiner som skapar en proteinobalans vilket gynnar tumörtillväxt.

påvisad ALK-aktivitet som behandlats med ALK-inhibitor¹⁶. Dessa fynd visar att trojkan, ALKAL2, ALK och MYCN hos patienter med 2p-gain kan generera en oreglerad ALK-signalering och därför finns det goda skäl att överväga ALK TKI-behandling även i denna grupp, i första hand inom ramen för kliniska studier.

11Q-AVVIKELSER

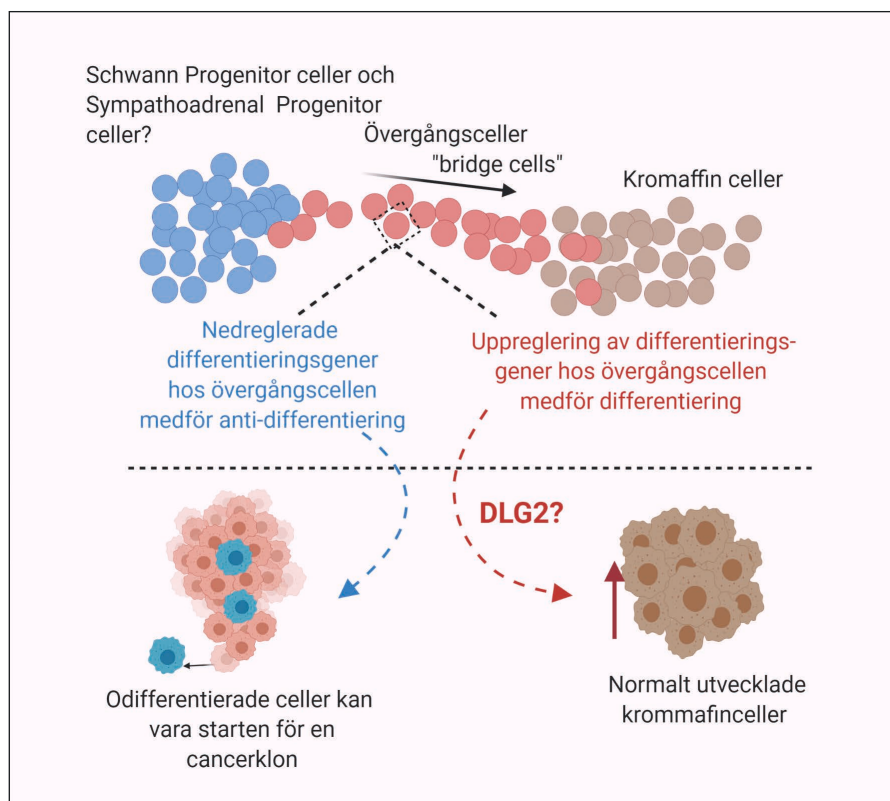
I den nyligen publicerade studien av Siaw et al. uppgick andelen av patienterna med partiell kromosomal 11q-förlust till ungefär 20 procent av andelen undersökta neuroblastomfall (Tabell 1)⁶.

Från genetiska studier av 11q-deleterade patienter har ett antal kandidatgener föreslagits vara av en onkogen eller tumörsuppressorgen karaktär men inga mekanistiska analyser kan förklara sambandet mellan 11q och neuroblastom¹⁷. Två nyutkomna artiklar har skänkt nytt ljus på 11q-deletions roll i neuroblastom från olika vinklar^{6,18}. Keane et al. använde sig av offentligt tillgängligt mikroarraydata och kunde påvisa att högre DLG2 uttryck, belägen till kromosom 11q14, hade en positiv korrelation med bättre prognos¹⁸. Därtill visade man att cellinjer med 11q-deletion uppvisade minskad celltillväxt när DLG2 överuttrycktes¹⁸. Det är tidigare känt att DLG-genen i Drosophila har tumörsuppressor-aktivitet. Siaw et al. identifierade även DLG2 som en tumörsuppressorgen genetiskt och kunde korrelera DLG2-genens betydelse under utveckling av neuralistceller med prognos hos neuroblastom⁶. Siaw et al.'s tillvägagångssätt byggde på fynd från Furlan et al.¹⁹ och hypotiserade att gener inkluderande i den transkriptoriska transitionssignaturen, som hittas hos en intermediär progenitorcelltyp kallad för "bridge cell"

(övergångsceller), skulle vara viktiga för differentieringen av Schwanncell prekursor till kromaffina-celler⁶ (Figur 3). I "bridge-signaturen" är faktiskt DLG2 uppreglerad i det slutgiltiga differentieringssteget från Schwanncell prekursor till kromaffina celler^{6,19}. Dessutom visade Siaw et al. att överuttryck av DLG2 i neuroblastomcellinjer minskade tillväxten och leder till uttryck av binjurespecifika gener vilket främjar differentiering till mer kromaffinlika celler⁶. Därtill kunde de även visa, intressant nog, att ALK-baserad signalering dämpade DLG2-transkription vilket tyder på att onkogen ALK-signalering blockerar transkription av differentieringsgener⁶. Denna förklaring av DLG2s roll som en suppressorgen åtföljdes av en omfattande genetisk analys av 120 partiell 11q-deletion fall som identifierade DLG2 som den mest proximala genen i den kortaste regionen av genetiskt överlapp i patientmaterial där även DLG2 var störd i alla 11q-deletionfallen som undersöktes⁶. Dessa observationer fick Siaw et al. att konkludera att DLG2 agerar som en tumörsuppressorgen i kromosom 11q-deleterade neuroblastom och spelar en avgörande roll i differentieringen av celler härstammande från neuralisten⁶.

SLUTORD

Sammantaget skänker dessa nyligen publicerade arbeten ljus åt komplexiteten av de genetiska obalanserna som återfinns i neuroblastom och förklarar delvis bakomliggande mekanismer för neuroblastom-initiering. Hur man bäst tolkar de olika kromosomala abnormiteterna och kombinationerna av molekylära aktiveringsmekanismer och avvikande cell-signalering, speciellt i högrisk neuroblastom, är en viktig utmaning för forskningsfältet de kommande åren. Emel-



Figur 3. Både Schwann och sympato-adrenal progenitor cells differentierar till kromaffinceller. Om differentiering inte sker behåller cellen sin odifferentierade fenotyp och kan övergå till en cancerklon.

lertid skänker ökad mekanistisk förståelse genom identifiering av felaktig signalering och utvecklingsskeenden, i kombination med avancerad teknik och nya terapialternativ, hopp om framtiden.

REFERENSER

1. Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, et al. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16078.
2. Guan J, Hallberg B, Palmer RH. Chromosome Imbalances in Neuroblastoma-Recent Molecular Insight into Chromosome 1p-deletion, 2p-gain, and 11q-deletion Identifies New Friends and Foes for the Future. *Cancers (Basel)*. 2021;13(23).
3. Takita J. Molecular Basis and Clinical Features of Neuroblastoma. *JMA J*. 2021;4(4):321-31.
4. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009;27(2):289-97.
5. Friedman DN, Henderson TO. Late Effects and Survivorship Issues in Patients with Neuroblastoma. *Children (Basel)*. 2018;5(8).
6. Siaw JT, Javanmardi N, Van den Eynden J, Lind DE, Fransson S, Martinez-Monleon A, et al. 11q Deletion or ALK Activity Curbs DLG2 Expression to Maintain an Undifferentiated State in Neuroblastoma. *Cell Rep*. 2020;32(12):108171.
7. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 1984;224(4653):1121-4.
8. Garcia-Lopez J, Wallace K, Otero JH, Olsen R, Wang YD, Finkelshteyn D, et al. Large 1p36 Deletions Affecting Arid1a Locus Facilitate Mycn-Driven Oncogenesis in Neuroblastoma. *Cell Rep*. 2020;30(2):454-64 e5.
9. Maris JM, Guo C, Blake D, White PS, Hogarty MD, Thompson PM, et al. Comprehensive analysis of chromosome 1p deletions in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 2001;36(1):32-6.
10. Shi H, Tao T, Abraham BJ, Durbin AD, Zimmerman MW, Kadoch C, et al. ARID1A loss in neuroblastoma promotes the adrenergic-to-mesenchymal transition by regulating enhancer-mediated gene expression. *Sci Adv*. 2020;6(29):eaaz3440.
11. Guan J, Fransson S, Siaw JT, Treis D, Van den Eynden J, Chand D, et al. Clinical response of the novel activating ALK-I1171T mutation in neuroblastoma to the ALK inhibitor ceritinib. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2018;4(4).
12. Fischer M, Moreno L, Ziegler DS, Marshall LV, Zwaan CM, Irwin MS, et al. Ceritinib in paediatric patients with anaplastic lymphoma kinase-positive malignancies: an open-label, multicentre, phase 1, dose-escalation and dose-expansion study. *Lancet Oncol*. 2021;22(12):1764-76.
13. Ek T. Personligt meddelande ed2022.
14. Javanmardi N, Fransson S, Djos A, Umapathy G, Ostensson M, Milosevic J, et al. Analysis of ALK, MYCN, and the ALK ligand ALKAL2 (FAM150B/AUGalpha) in neuroblastoma patient samples with chromosome arm 2p rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019.
15. Borenas M, Umapathy G, Lai WY, Lind DE, Witek B, Guan J, et al. ALK ligand ALKAL2 potentiates MYCN-driven neuroblastoma in the absence of ALK mutation. *EMBO J*. 2021;40(3):e105784.
16. Treis D, Umapathy G, Fransson S, Guan J, Mendoza-García P, Siaw JT, et al. Sustained Response to Entrectinib in an Infant With a Germline ALKAL2 Variant and Refractory Metastatic Neuroblastoma With Chromosomal 2p Gain and Anaplastic Lymphoma Kinase and Tropomyosin Receptor Kinase Activation. *JCO Precision Oncology*. 2022(6):e2100271.
17. Mlakar V, Jurkovic Mlakar S, Lopez G, Maris JM, Ansari M, Gumy-Pause F. 11q deletion in neuroblastoma: a review of biological and clinical implications. *Molecular cancer*. 2017;16(1):114.
18. Keane S, Ameen S, Lindlof A, Ejekkar K. Low DLG2 gene expression, a link between 11q-deleted and MYCN-amplified neuroblastoma, causes forced cell cycle progression, and predicts poor patient survival. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):65.
19. Furlan A, Dyachuk V, Kastri ME, Calvo-Enrique L, Abdo H, Haddaj S, et al. Multipotent peripheral glial cells generate neuroendocrine cells of the adrenal medulla. *Science*. 2017;357(6346).

TORBEN EK, BARNCANCERCENTRUM I VÄSTRA SVERIGE,
DROTTNING SILVIAS BARN OCH UNGDOMSSJUKHUS

MARCUS BORENÄS, AVDELNINGEN FÖR MEDICINSK KEMI
OCH CELLBIOLOGI, INST. FÖR BIOMEDICIN,
SAHLGRENSKA AKADEMIN, GÖTEBORGS UNIVERSITET

BENGT HALLBERG, AVDELNINGEN FÖR MEDICINSK KEMI
OCH CELLBIOLOGI, INST. FÖR BIOMEDICIN,
SAHLGRENSKA AKADEMIN, GÖTEBORGS UNIVERSITET

JIKUI GUAN, AVDELNINGEN FÖR MEDICINSK KEMI OCH
CELLBIOLOGI, INST. FÖR BIOMEDICIN, SAHLGRENSKA
AKADEMIN, GÖTEBORGS UNIVERSITET

RUTH PALMER, AVDELNINGEN FÖR MEDICINSK KEMI OCH
CELLBIOLOGI, INST. FÖR BIOMEDICIN,
SAHLGRENSKA AKADEMIN, GÖTEBORGS UNIVERSITET