

## PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/89729>

Please be advised that this information was generated on 2020-12-04 and may be subject to change.

# Nieuwe genomische markers voor diagnostiek en behandeling van voorloper-B-cel acute lymfatische leukemie bij kinderen

## Novel genomic markers for diagnostics and treatment of pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia

**Auteurs** R.P. Kuiper, P.M. Hoogerbrugge en F.N. van Leeuwen

**Trefwoorden** acute lymfatische leukemie, array comparatieve genomhybridisatie, *BTG1*, *CRLF2*, *IKAROS*, *JAK*

**Key words** acute lymphoblastic leukemia, array comparative genomic hybridisation, *BTG1*, *CRLF2*, *IKAROS*, *JAK*

### Samenvatting

Dankzij de introductie van moderne moleculair-genetische technieken is de kennis van genetische veranderingen die bijdragen aan het ontstaan en/of de progressie van acute lymfatische leukemie (ALL) bij kinderen de afgelopen jaren sterk toegenomen. Vooral het gebruik van hoge resolutie genoombrede analyses voor de detectie van deleties en duplicaties heeft geleid tot de identificatie van genen die niet eerder in verband zijn gebracht met ALL. Ook nieuw is het inzicht dat bepaalde translocaties, kenmerkend voor ALL, vaak voorkomen in specifieke combinaties met andere gendefecten. Op grond van deze kenmerken kan nu een groter aantal ALL-subtypen worden herkend, wat bijdraagt aan een sterk verbeterde diagnostiek en risicostratificatie. Omdat deze genetische profielen ons beter in staat stellen het verloop van de ziekte te voorspellen en te volgen, kan in steeds meer gevallen 'therapie op maat' worden gegeven. Hiernaast worden in hoog tempo nieuwe inzichten verkregen in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van ALL of het ontwikkelen van therapieresistentie. Deze kennis zal uiteindelijk bijdragen aan een meer rationele behandeling van therapieresistentie bij ALL.

(*Ned Tijdschr Hematol* 2010;7:307-14)

### Summary

Recent developments of modern molecular-genetic techniques have greatly improved our knowledge on genetic changes that contribute to the initiation and progression of pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL). In particular, the application of high-resolution genome-wide copy number arrays, which enable the detection of deletions and duplications of the genomic DNA, has resulted in the identification of genes that were previously unknown in relation to ALL. In addition, certain characteristic chromosomal translocations in ALL frequently occur in combination with other genetic defects. These developments allow the definition of an increased number of ALL subtypes, which may contribute to highly improved diagnostics and risk stratification strategies. Since genetic profiles of ALL allow us to better predict and follow the disease, personalized therapy starts to become reality. Furthermore, novel insights are obtained into the molecular mechanisms that underlie the initiation of ALL and development of therapy resistance. This knowledge will eventually contribute to a more rational treatment of therapy resistance in ALL.

## Inleiding

Acute lymfatische leukemie (ALL) is de meest voorkomende maligniteit bij kinderen met een incidentie in Nederland van ongeveer 110 gevallen per jaar, waarvan ~15% T-cel-ALL (T-ALL) en ~85% voorloper-B-cel-ALL. ALL is een heterogene ziekte, waarbij een heel spectrum van genetische afwijkingen, zoals translocaties, deleties en amplificaties betrokken is. De behandeling van kinderen met ALL heeft de afgelopen decennia een enorme vooruitgang geboekt, waardoor het ziektevrije overlevingspercentage momenteel rond de 80% ligt. Niettemin ontwikkelt nog meer dan 20% van de kinderen tijdens of kort na de behandeling een recidief, wat de kans op overleving aanzienlijk vermindert. Het onderzoek naar deze vorm van leukemie bij kinderen is er dan ook voornamelijk op gericht om een beter inzicht te verkrijgen in de oorzaken van therapiefalen en om nieuwe risicofactoren te identificeren die reeds bij diagnose het verkrijgen van een recidief voorspellen. Cytogenetische kenmerken van de leukemische cel spelen hierbij een cruciale rol. Reeds geruime tijd worden dergelijke kenmerken gebruikt in de risicofactoren van patiënten met ALL. Zo kan de aanwezigheid van specifieke chromosomale afwijkingen bepalend zijn voor het verdere ziekteverloop. Bij voorloper-B-cel-ALL gaat het hierbij voornamelijk om lage hypodiploidie (<45 chromosomen), 11q23-geassocieerde translocaties, waarbij het *'mixed-lineage leukemia'*-gen betrokken is, en de t(9;22)(q34;q11) translocatie (het zogenoemde philadelphiachromosoom), welke resulteert in het *BCR-ABL1*-fusiegen. De aanwezigheid van 1 van deze afwijkingen is een indicatie voor een slechte prognose en geeft dan ook aanleiding tot het instellen van een intensieve behandelstrategie. Andere (veel vaker) voorkomende chromosomale afwijkingen, waaronder hyperdiploidie (>50 chromosomen), de t(12;21)(p13;q22) *TEL-AML1*-translocatie, en de t(1;19)(q23;p13.3) *TCF3-PBX1*-translocatie, lijken over het algemeen geassocieerd te zijn met een goede prognose.<sup>1</sup> Niettemin vindt, gezien de omvang van deze 'laag-risico' cytogenetische subtypen, het grootste aantal ALL-recidieven toch plaats in deze laatstgenoemde categorie. Een betere identificatie van de hoogrisicopatiënten binnen deze groep is dus zeer wenselijk.

## Numerieke veranderingen in genomisch DNA

De cytogenetica speelt al decennia lang een belangrijke rol bij de diagnose en risicofactoren van hematologische aandoeningen, waaronder ALL.<sup>2</sup> De aanwezigheid van numerieke afwijkingen bij

leukemische cellen kan van doorslaggevend betekenissen zijn bij de prognose en behandeling van de ziekte. Sinds de voltooiing van de complete sequentie van het humane genoom, en de daaropvolgende ontwikkeling van genomische micro-arrays, is een veel gedetailleerdere analyse van kopienummerveranderingen in het DNA mogelijk geworden via array-comparatieve genoomhybridisatie. De eerste generatie succesvolle arrays maakte gebruik van de ruime beschikbaarheid van bacteriële artificiële chromosomen, waarmee een zeer betrouwbaar genoombreedprofiel van deleties en duplicaties kon worden verkregen met een uiteindelijke resolutie van ~100 kilobasen (kb).<sup>3</sup> De snelle technologische ontwikkeling op het gebied van oligonucleotide-arrays in de laatste 5 jaar heeft het vervolgens mogelijk gemaakt deze resolutie verder te verhogen tot miljoenen probes per array, waarmee kopienummerafwijkingen tot ~1 kb kunnen worden gedetecteerd. Daarnaast vonden ook de genotyperingsarrays, ofwel de 'single nucleotide polymorphism' (SNP)-arrays, hun toepassing in de detectie van numerieke afwijkingen in het DNA. Deze arrays hebben bovendien het voordeel dat ze ook informatie geven over het haplotype van het genoom, waardoor homozygote regio's kunnen worden gedetecteerd. Grote homozygote regio's in tumorcellen, vaak doordlopend tot de telomeren, zijn veelal het gevolg van verworven uniparentale disomie. Deze kan zijn ontstaan door mitotische recombinatie, gevolgd door de selectieve uitgroei van een kloon, waarin een tumorigene mutatie homozygoot is geworden. In ALL wordt dit fenomeen regelmatig aangetroffen op de korte arm van chromosoom 9, waarbij homozygote deleties worden gevonden van het tumorsuppressorgen *CDKN2A* en/of *CDKN2B*.<sup>4</sup>

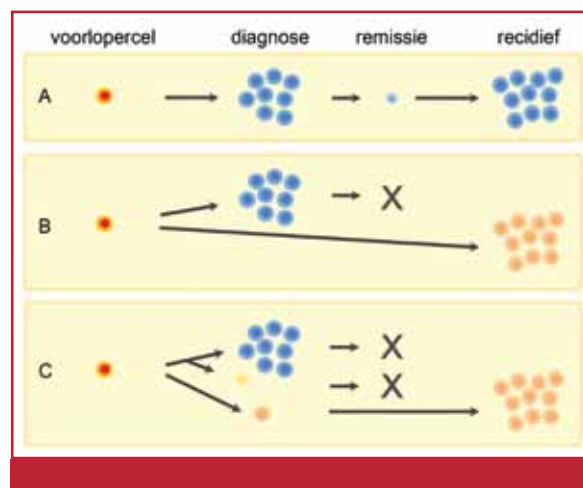
De eerste studies met hoogresolutie-SNP-arrays beschreven het spectrum van numerieke DNA-veranderingen in ALL bij kinderen, met onverwacht interessante resultaten.<sup>4,5</sup> Met name microdeleties en -duplicaties kleiner dan 1 megabase, die eerder onopgemerkt waren gebleven, bleken zeer karakteristiek voor deze vorm van leukemie. Zo werd ontdekt dat in voorloper-B-celleukemieën deleties in B-celdifferentiatiefactoren zeer algemeen zijn, waarbij ook nieuwe spelers, waaronder *EBF1*, *IKZF1* en *E2-2* (*TCF4*) werden geïdentificeerd. Daarnaast bleek het *PAX5*-gen, dat codeert voor een transcriptiefactor die laat in de ontwikkeling van de voorloper-B-cel actief is, 1 van de meest frequent aangedane genen in voorloper-B-cel-ALL te zijn, veelal als gevolg van intragene deleties. Samenvattend blijkt uiteindelijk meer dan tweederde van de voorloper-B-celleukemieën

1 of meerdere defecten in B-celdifferentiatiefactoren te bevatten. Deze bevindingen maken duidelijk dat een blokkade in de B-celontwikkeling een cruciale stap is in de ontwikkeling van voorloper-B-celleukemieën.

Naast defecten in genen die B-celdifferentiatie sturen, worden ook veel genetische veranderingen aangetroffen in genen betrokken bij regulatie van de celcyclus, waaronder *CDKN2A/B* en *RBI*.<sup>4</sup> Het *CDKN2A/B*-locus op 9p21.3 codeert voor 3 tumorsuppressorgenen die in veel vormen van kanker geïnactiveerd zijn. Deleties in dit gebied zijn veelal bi-allelisch en komen in ongeveer een kwart van alle voorloper-B-celleukemieën voor, maar zijn veel frequenter bij recidiverende voorloper-B-cel-ALL-patiënten en bij patiënten met T-ALL.<sup>4-7</sup> Een derde frequent aangedane signaleringsroute is die van geprogrammeerde celdood (apoptose). Een belangrijk voorbeeld vormen deleties in het *BTG1*-gen (zie hieronder). *BTG1*-deleties komen voor in ~8% van voorloper-B-cel-ALL en vertonen een opmerkelijke clustering van de breukpunten, wat leidt tot de expressie van een verkorte variant van het BTG1-eiwit (ongepubliceerde gegevens). Samenvattend hebben de studies met hoogresolutie-SNP-arrays geleid tot nieuwe inzichten in de pathogenese van voorloper-B-cel-ALL bij kinderen en bieden zij veel nieuwe mogelijkheden voor verder onderzoek. Veel van de gevonden afwijkingen komen bovendien met vergelijkbare frequenties bij volwassen-ALL voor, waardoor deze nieuwe inzichten in een veel breder kader te plaatsen zijn.<sup>8</sup>

### Identificatie van nieuwe prognostische markers

Om de behandeling van kinderen met therapieresistente ALL verder te kunnen verbeteren, is het van groot belang om hoogrisicopatiënten in een zo vroeg mogelijk stadium van de ziekte te identificeren, zodat op tijd met een intensieve en gerichte behandeling kan worden begonnen. Veel van de hierboven beschreven genetische afwijkingen, die bij diagnose kunnen worden aangetoond, lijken een cruciale rol te spelen bij de ontwikkeling van voorloper-B-cel-ALL. Het is dan ook waarschijnlijk dat dergelijke afwijkingen van klinisch belang kunnen zijn voor de risicofraticatie van patiënten. Verschillende studies hebben nu aangetoond dat dit inderdaad het geval is. De genetische basis van recidievorming bij voorloper-B-cel-ALL is in meerdere studies en in de context van meerdere behandelprotocollen onderzocht, door het gedetailleerd vergelijken van genomische afwijkingen die aanwezig zijn op het tijdstip van diagnose



**Figuur 1.** Schematische weergave van de klonale verhouding tussen diagnose en recidief in voorloper-B-cel acute lymfatische leukemie bij kinderen volgens 3 mogelijke modellen. In het eerste model (model A) ontstaan recidieven direct vanuit de dominante kloon aanwezig bij diagnose (weergegeven in blauw), terwijl in de modellen B en C de recidieven ontstaan uit therapieresistente vroege voorlopercellen (model B) of uit subklonen die in kleine hoeveelheden tijdens diagnose aanwezig waren (model C). Op basis van de verschillen in genomische afwijkingen in de leukemische cellen bij diagnose en recidief blijken de modellen B en C in de meeste gevallen van toepassing.

en in het recidief. Op basis van kleine verschillen tussen de monsters op beide tijdstippen, kon ondermeer worden vastgesteld dat de meerderheid van de recidieven niet direct is afgeleid van de dominante leukemische kloon bij diagnose, maar dat deze onafhankelijk is ontstaan uit een vroege voorloper hiervan (zie *Figuur 1*).<sup>6,7,9</sup> In onze studie, waarbij 34 recidiverende Nederlandse patiënten werden geïncludeerd, viel bovendien op dat frequent voorkomende afwijkingen bij diagnose, zoals deleties in *PAX5*, *EBF1* en *CDKN2A*, in een aantal gevallen niet langer aanwezig waren in de recidiverende kloon. Dit geeft aan dat deze afwijkingen weliswaar een rol hebben gespeeld bij de ontwikkeling van de leukemie in de betreffende patiënt, maar kennelijk niet bij de persistentie van de recidiverende subkloon tijdens de therapie. Andere veel voorkomende afwijkingen daarentegen werden, indien aanwezig bij diagnose, onveranderd teruggevonden in de recidiverende kloon. Naast bekende chromosomale translocaties, bleken deleties en mutaties in *Ikaros* (*IKZF1*) daarvan het meest pregnant.<sup>7</sup> Deze afwijkingen treden al vroeg in de ontwikkeling van de leukemie op, maar spelen mogelijk ook een rol bij het ontstaan van

therapieresistentie. Vanzelfsprekend zijn dergelijke bevindingen sterk afhankelijk van de gebruikte therapie. Hoe verlies van *IKZF1* precies bijdraagt aan het ontstaan therapieresistentie is op dit moment nog grotendeels onbekend. Gebleken is evenwel dat het verlies van *IKZF1*-functie aanleiding geeft tot opregulatie van genexpressieprogramma's die kenmerkend zijn voor hematopoëtische stamcellen. Het herverkrijgen van stamceileigenschappen, zoals medicijnresistentie en een oneindige delingscapaciteit, zouden aldus een bijdrage kunnen leveren aan het overleven van maligne klonen in het beenmerg tijdens de therapie.

Een tweede belangrijke doelstelling van de genomische analyse van recidiverende patiënten betreft de identificatie van nieuwe prognostische markers die hoog-risicopatiënten bij diagnose kunnen herkennen. Recidieven komen namelijk ook nadrukkelijk in laagrisicogroepen voor, wat aangeeft dat de huidige stratificatiemarkers ontoereikend zijn. Een aantal recente studies heeft aangetoond dat afwijkingen in *IKZF1* en *CDKN2A* bij diagnose verrijkt zijn bij patiënten die een recidief ontwikkelen ten opzichte van patiënten die in remissie blijven.<sup>7,9,10</sup> Ook werd er een zeer significante associatie gevonden tussen het voorkomen van *IKZF1*-afwijkingen en het voorkomen van een recidief.<sup>7,9</sup> Collega's van het St. Jude Children's Hospital zagen in een cohort van 221 voorgeselecteerde hoogrisico-voorloper-B-cel-ALL-patiënten zonder *BCR-ABL1*-translocatie of hypodiploidie, een recidiefincidentie na 5 jaar van 73,4% bij de patiënten met *IKZF1*-afwijkingen ten opzichte van 25% bij wildtypepatiënten. Wij hebben de relatie tussen *IKZF1*-afwijkingen en recidief onderzocht in een cohort van 131 patiënten uit de Stichting Kinderoncologie Nederland ALL9-studie, waarin alle kinderen met ALL in Nederland in de periode van 1997 tot 2004 werden geïncludeerd. De verdeling van risicogroepen binnen dit cohort was zeer vergelijkbaar met de volledige ALL9-studie. In deze analyse werd een recidiefincidentie van 61% gevonden bij patiënten met een *IKZF1*-afwijking (n=17) ten opzichte van 9% bij de patiënten zonder *IKZF1*-afwijking (n=114). Bovendien werd ook in de patiëntengroep die binnen ALL9 als niet-hoog-risico was gestratificeerd, een hoge significante associatie gevonden tussen *IKZF1*-afwijkingen bij diagnose en het optreden van een recidief. Op grond van de aanwezigheid van deleties of sequentiemutaties in *IKZF1* konden derhalve retrospectief meer dan de helft van de recidieven bij diagnose worden herkend met een specificiteit van 89%. Deze bevindingen illustreren dat het vaststellen van *IKZF1*-afwijkingen bij diagnose een

belangrijke nieuwe aanvulling kan vormen op de huidige risicostratificatie van kinderen met ALL.

### **B-cel translocatiegen 1 en glucocorticoïd-resistentie**

Zoals reeds genoemd, is met de toepassing van SNP-arrays voor de analyse van numerieke afwijkingen een groot aantal genen geïdentificeerd die nog niet eerder met ALL in verband gebracht waren. Een voorbeeld hiervan is het *B-cel translocatiegen 1 (BTG1)*, een gen dat reeds 20 jaar geleden ontdekt werd als translocatiepartner van het *c-Myc*-oncogen bij een patiënt met chronische B-celleukemie.<sup>11</sup> Deleties in *BTG1* komen voor bij ongeveer 8% van alle voorloper-B-cel-ALL-patiënten. In veruit de meeste gevallen betreft het hier het verlies van slechts 1 genkopie, terwijl het andere allel geen mutaties bevat.<sup>12</sup> Het lijkt er dan ook op dat, net als bij de B-celtranscriptiefactoren EBF1 en PAX5, reductie van *BTG1*-expressie het ontstaan van ALL in de hand werkt, bijvoorbeeld door effecten op de ontwikkeling of groei van voorloper-B-cellen.

*BTG1* behoort tot een familie van zogenoemde 'anti-proliferatie'-genen, waartoe ook *BTG2*, *BTG3*, *TOB* en *TOB2* behoren. Expressie van eiwitten behorend tot deze familie leidt in de meeste gevallen tot verstoorde differentiatie, inhibitie van groei en de inductie van apoptose.<sup>13</sup> Zo remt overexpressie van *BTG1* de groei en ontwikkeling van hematopoëtische voorlopercellen tijdens erytroïde ontwikkeling.<sup>14</sup> Daarnaast stimuleert *BTG1* de activiteit van nucleaire receptoren.<sup>15</sup> Deze, door steroidhormonen gereguleerde transcriptiefactoren, spelen een cruciale rol in de regulatie van celgroei en -differentiatie en vormen een effectief doelwit in de behandeling van kanker. De meest aansprekende voorbeelden hiervan zijn anti-oestrogeen-therapie bij borstkanker en de behandeling met glucocorticoïden (GC) bij ALL. Zo spelen de synthetische glucocorticoïden dexamethason en prednisolon een centrale rol in de behandeling van ALL. Deze synthetische hormonen binden aan de glucocorticoïdreceptor (GR) en zetten deze aan tot sterk verhoogde transcriptionele activiteit in lymfocyten en leukemische blasten. Als gevolg van deze hyperstimulatie gaan leukemische blasten massaal in apoptose. Resistentie tegen glucocorticoïden tijdens de behandeling van ALL is een groot klinisch probleem en is gecorreleerd met een slechte prognose.<sup>16</sup> De moleculaire mechanismen die verantwoordelijk zijn voor deze vorm van therapieresistentie zijn helaas nog grotendeels onbekend. In verschillende in-vitro-

modellen is aangetoond dat mutaties in het *GR*-gen of een verlies van *GR*-expressie aanleiding geven tot het ontstaan van GC-resistentie. Bij de patiënt komen mutaties in de *GR* evenwel maar weinig voor en verder ontbreekt er een duidelijke relatie tussen *GR*-expressie en de therapierespons.<sup>17,18</sup> Overigens gaat bij veel patiënten GC-resistentie gepaard met resistentie tegen andere middelen, wat zou kunnen wijzen op 'defecten' in een gemeenschappelijk apoptosepad.

Er zijn sterke aanwijzingen dat *BTG1* een rol speelt in de regulatie van GC-gereguleerde genexpressie en ermee samenhangend de inductie van apoptose. Zo blijkt uit patiëntenstudies dat *BTG1*-mRNA-expressie omhoog gaat in klinische isolaten van ALL-patiënten na behandeling met synthetische glucocorticoiden. Omgekeerd leidt het verlies van *BTG1*-expressie in voorloper-B-cel-ALL-cellijnen tot een verlies van GC-gereguleerde genexpressie, wat deze cellen compleet ongevoelig maakt voor synthetische glucocorticoiden.<sup>12</sup> Hoewel deze studies laten zien dat een verlies van *BTG1*-functie aanleiding kan geven tot GC-resistentie, is nog onduidelijk wat dit betekent voor de patiënt. Vooralsnog zijn er geen overtuigende aanwijzingen dat verlies van slechts één kopie van het *BTG1*-gen, zoals wordt gevonden bij ALL-patiënten, voldoende is voor het ontstaan van therapieresistentie. Ook is het nog onbekend of, en in welke mate, ook andere leden van de *BTG/TOB*-familie betrokken zijn bij deze effecten en of deze in bepaalde gevallen het verlies van *BTG1* kunnen compenseren. Desalniettemin vormt deze genfamilie een potentieel interessant nieuw therapeutisch doelwit in de behandeling van GC-resistente leukemie.

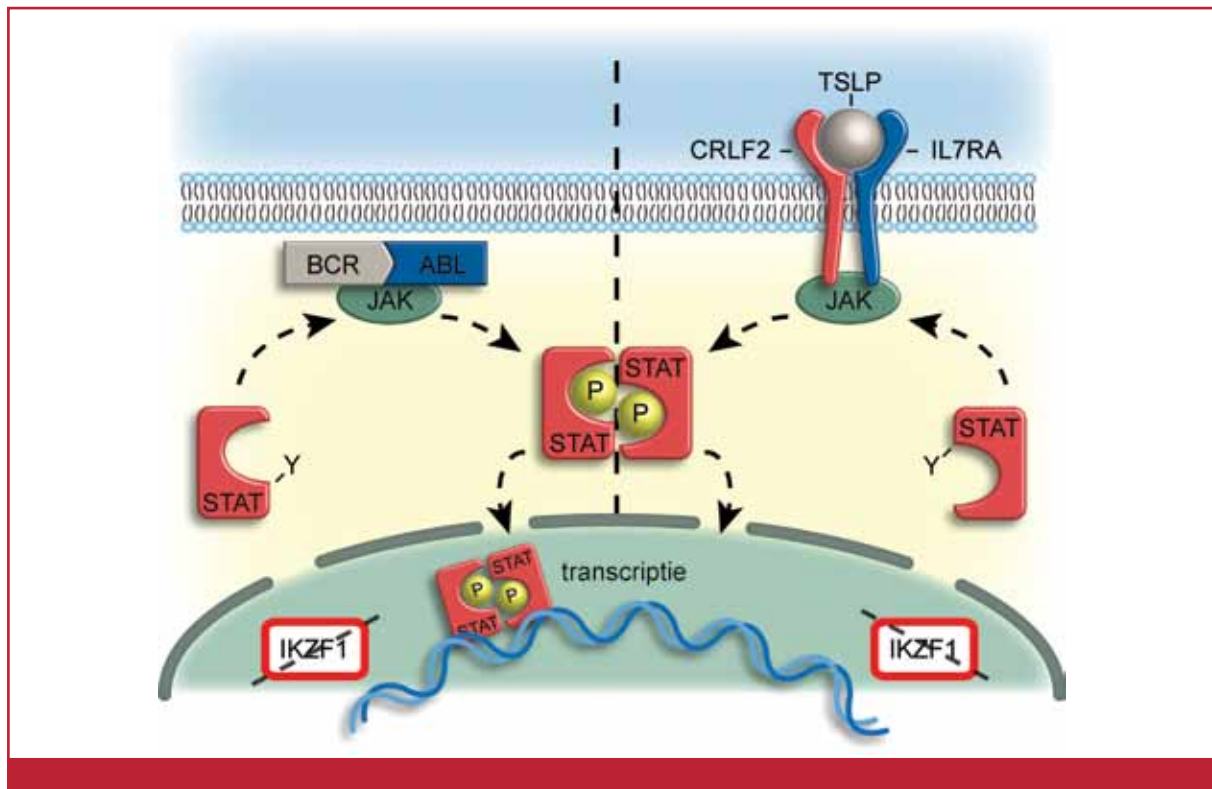
### Moleculaire analyse van hoogrisico-ALL op basis van mRNA-expressieprofielen

Behalve aan de hand van genetische kenmerken, kunnen verschillende ALL-subtypen ook worden onderverdeeld op basis van mRNA-profielen. Gebruik makend van een andere micro-array-technologie, waarin de expressie van tienduizenden genen tegelijk kan worden bepaald, kunnen met een betrouwbaarheid van ten minste 90% de verschillende genetische ALL-subtypen worden onderscheiden. Uit dit soort analyses is onder meer gebleken dat er een cytogenetisch moeilijk te classificeren groep voorloper-B-cel-ALL-patiënten bestaat, waarvan het expressieprofiel sterke overeenkomst vertoont met de subgroep van *BCR-ABL1*-positieve voorloper-B-cel-ALL, en die, net als laatstgenoemde groep, een slechte prognose hebben (gemiddelde 5-jaarsoverleving +/- 60%).<sup>9,19</sup> Uit deze

resultaten kan worden afgeleid dat er overeenkomsten zijn in de biologie van *BCR-ABL1*-positieve leukemie met deze hoogrisicogroep, die 15-20% van alle voorloper-B-cel-ALL-patiënten omvat. Een verdere moleculair genetische karakterisering van deze '*BCR-ABL1*-achtige leukemie' toont aan dat het specifieke mRNA-expressiepatroon in deze leukemieën verband houdt met ongereguleerde activatie van de *JAK-STAT*-route en/of van meer stroomopwaarts gelegen tyrosinekinases.<sup>20-22</sup> Omdat deze 'kinase signature'-groep een belangrijk gedeelte van de hoogrisico-ALL omvat en gezien de klinische implicaties van deze bevindingen, zullen genetische veranderingen die deze signaaltransductieroute beïnvloeden hier in detail worden beschreven.

### Identificatie van *JAK*-mutaties

In 2005 werd door een aantal laboratoria vrijwel gelijktijdig aangetoond dat een specifieke mutatie van codon 617 van het *JAK2*-gen (*V617F*) aanleiding geeft tot constitutieve activatie van het kinasedomein bij verschillende myeloproliferatieve aandoeningen, zoals polycythaemia vera, trombocytemie en myelofibrose met myeloïde metaplasie.<sup>23</sup> Uit preklinische (muizen-)studies blijkt dat orale toediening van een *JAK1/2*-remmer effectief is in de behandeling van deze myeloproliferatieve aandoeningen.<sup>24,25</sup> Zeer voorlopige preklinische resultaten bij de mens lijken dit te bevestigen, waarbij interessant genoeg de gebruikte remmer even effectief lijkt te zijn bij *JAK2V617F*-positieve als bij *JAK2V617F*-negatieve patiënten.<sup>24</sup> Recentelijk is aangetoond dat activerende *JAK*-mutaties ook voorkomen bij ALL. Op de eerste plaats worden mutaties in *JAK1* aangetroffen bij ongeveer 18% van de volwassenen met T-ALL.<sup>26</sup> Daarnaast komen mutaties in *JAK2* opvallend vaak voor in voorloper-B-cel-ALL van patiënten met downsyndroom (DS).<sup>27,28</sup> Bercovich en collega's toonden in een groot cohort van DS-ALL-patiënten aan dat een activerende somatische mutatie in *JAK2* (*R683*) voorkwam bij 16 van de 88 onderzochte gevallen. Het feit dat het hier een andere, zeer specifieke mutatie betreft die afwijkt van de eerder genoemde (*V617F*) mutatie, suggereert dat deze verschillende mutaties op de een of andere manier bepalend zijn voor het type kanker dat erdoor ontstaat. Het feit dat het ook bij DS-ALL om een activerende mutatie gaat, is van groot belang voor de kliniek. Kinderen met DS zijn vaak overgevoelig voor de toxische effecten van chemotherapie. Een moleculaire therapie gericht op specifieke remming van het



**Figuur 2.** Constitutieve activatie van de JAK-STAT-route draagt bij aan de ontwikkeling van hoog risico acute lymfatische leukemie (ALL). De signaaltransductie van veel cytokinereceptoren verloopt via de JAK/STAT-route. In normale cellen vindt activatie van cytokinereceptoren alleen plaats na binding van cytokineliganden aan deze receptoren. Receptoractivatie leidt tot fosforylering en activatie van janus-kinases (JAKs). Deze kinases op hun beurt zorgen voor fosforylering en activatie van STAT-transcriptiefactoren. STATs activeren expressie van genen betrokken bij proliferatie en overleving. Op deze manier leidt dus cytokinereceptoractivatie tot proliferatie en bescherming tegen apoptose. Bij een aanzienlijk gedeelte van de ALL-patiënten worden mutaties gevonden die aanleiding geven tot constitutieve (niet-gereguleerde) activatie van deze signaaltransductieroute. Voorbeelden hiervan zijn de *BCR-ABL1*-translocatie, mutaties in *JAK1*, *JAK2* of *JAK3* en overexpressie van de cytokinereceptor CRLF2. Het laatstgenoemde eiwit vormt, als heterodimeer met de interleukine 7-receptor- $\alpha$ -subunit (IL7RA), de receptor voor het 'cytokine thymic stromal lymphopoietin' (TSLP). Constitutieve activatie van JAK-STAT-signalering blijkt sterk geassocieerd met een functieverlies van de tumorsuppressor IKZF1, wat suggereert dat beiden bijdragen aan therapiefalen in deze patiëntengroep. Het gebruik van specifieke JAK-remmers zou dan ook een gunstig effect kunnen hebben op de therapierespons in deze groep hoogrisicopatiënten.

JAK2-eiwit zou een belangrijk nieuw middel in de behandeling van deze groep patiënten kunnen opleveren. Inmiddels is gebleken dat mutaties in *JAK2* niet beperkt zijn tot DS-ALL, maar ook verrijkt voorkomen in een geselecteerde groep van hoogrisico-ALL. In dit cohort van 187 patiënten, werd in 10,7% van de gevallen een mutatie in *JAK1*, *JAK2* of *JAK3* gevonden. In meer dan de helft van deze gevallen betrof het de *JAK2* (R683)-mutatie.<sup>20</sup>

### De cytokine 'receptor-like'-factor 2

Een andere component uit de JAK-STAT-route betrokken bij de ontwikkeling en progressie van voor-

loper-B-cel-ALL is de cytokine 'receptor-like'-factor 2 (CRLF2), ook bekend als 'thymic stromal lymphopoietin receptor' (TSLPR). Deze receptor functioneert als heterodimeer met de interleukine-7-receptor- $\alpha$ -keten en bindt het cytokine TSLP.<sup>29</sup> Russel en collega's hebben door gedetailleerde genomische analyses van voorloper-B-cel-ALL laten zien dat genetische afwijkingen op de pseudoautosomale regio PAR1, gelegen op beide sexchromosomen, aanleiding geven tot verhoogde expressie en activiteit van CRLF2 bij ongeveer 5% van alle ALL-patiënten.<sup>30</sup> Net als voor *JAK*-mutaties, wordt overexpressie van *CRLF2* met sterk verhoogde incidentie (52%) gevonden bij DS-ALL-patiënten. Bij de meerderheid van deze patiënten

## Aanwijzingen voor de praktijk

1. Mutaties in *IKZF1* en *CRLF2* zijn sterk geassocieerd met het voorkomen van recidieven bij patiënten met voorloper-B-cel acute lymfatische leukemie (ALL). Het gebruik van deze nieuwe markers kan leiden tot een verbeterde risicostratificatie van ALL.
2. Bij een belangrijk deel van de voorloper-B-cel-ALL-patiënten die een recidief ontwikkelen, speelt de activatie van JAK-kinases een voorname rol. Moleculaire therapieën gericht op het specifiek remmen van deze signaaltransductieroutes worden op dit moment reeds onderzocht in pre-klinische studies.

komen ook mutaties in *JAK2* (R683) voor, wat co-operatie tussen deze 2 oncogenen suggereert. Soortgelijke bevindingen zijn gerapporteerd door Mullighan en collega's.<sup>31</sup> In beide studies wordt verder aangetoond dat verhoogde expressie van het CRLF2-eiwit leidt tot activatie van de JAK-STAT-route en ermee samenhangend een toename in de groei en groeifactor-onafhankelijkheid van pre-B-ALL-cellijnen of primaire B-voorlopercellen. In weer een andere studie is aangetoond dat CRLF2 verhoogd tot expressie komt bij zowel ongeveer 12,5% van volwassen B-ALLs, als in een geselecteerde groep van hoogrisico-voorloper-B-cel-ALL-gevallen bij kinderen.<sup>32</sup>

Net als mutaties in *IKZF1*, kan de aanwezigheid van genomische *CRLF2*-afwijkingen gebruikt worden voor een verdere risicostratificatie. Zo geeft vooral de aanwezigheid van een specifieke *P2RY8-CRLF2*-deletie, waarbij expressie van het *CRLF2*-gen onder controle is gekomen van het nabij gelegen gen *P2RY8* (een lid van de purinerge receptorfamilie) een sterk verhoogde kans op het krijgen van een recidief.<sup>21,22</sup> Verder blijken afwijkingen in het *CRLF2*-gen sterk geassocieerd met mutaties in de JAK-kinases. De overeenkomst met *BCR-ABL1* positieve ALL, met een vergelijkbaar slechte prognose, is opvallend. Het lijkt er dan ook sterk op dat activatie van JAK-kinases (ofwel ten gevolge van de *BCR-ABL1*-translocatie, dan wel door activatie van CRLF2) verantwoordelijk is voor de meerderheid van de recidieven in voorloper-B-cel-ALL (zie *Figuur 2*). Activatie van deze tyrosinekinaseroute in de leukemie is verder sterk geassocieerd met een functieverlies van het tumorsuppressorgen *IKZF1*.<sup>22</sup> Het is dan ook van het grootste belang te onderzoeken hoe *IKZF1* of andere leden van deze belangrijke genfamilie gereguleerd worden door deze tyrosinekinaseroutes. Deze nieuwe inzichten hebben ertoe geleid dat JAK-kinaseremmers op dit moment al worden getest in pre-klinische studies op hun bruikbaarheid in de behandeling van therapieresistente ALL.

## Conclusies

De toepassing van hoge resolutie genoombreed onderzoek heeft geleid tot een enorme toename in de kennis van genetische factoren die bijdragen aan de ontwikkeling en progressie van ALL bij kinderen. Een aantal van deze genetische factoren, waaronder *IKZF1* en *CRLF2*, is sterk geassocieerd met een slechte prognose. De introductie van deze genetische markers in de moleculaire diagnostiek van ALL zal naar verwachting bijdragen aan een sterk verbeterde risicostratificatie. Verder biedt de ontdekking van een aantal van deze leukemiegenen belangrijke nieuwe inzichten in het ontstaan van therapieresistentie. Een gedetailleerd inzicht in de betrokkenheid van deze genen bij het ontstaan van therapieresistentie kan nieuwe aanknopingspunten bieden voor de gerichte behandeling van refractaire ALL, zowel bij kinderen als bij volwassenen. Het onderzoek de komende jaren zal zich dan ook richten op het verder doorgronden van de moleculaire mechanismen die bijdragen aan het ontstaan van therapieresistentie.

## Referenties

1. Pui CH, et al. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008;371:1030-43.
2. Rowley JD. Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood* 2008;112:2183-9.
3. Vissers LE, et al. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Hum Mol Genet* 2005;14:R215-23.
4. Kuiper RP, et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia* 2007;21:1258-66.
5. Mullighan CG, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007;446:758-64.
6. Mullighan CG, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2008;322:1377-80.
7. Kuiper RP, et al. *IKZF1* deletions predict relapse in uniformly



- treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia* 2010;24:1258-64.
8. Paulsson K, et al. Microdeletions are a general feature of adult and adolescent acute lymphoblastic leukemia: Unexpected similarities with pediatric disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:6708-13.
9. Mullighan CG, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2009;360:470-80.
10. Yang JJ, et al. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2008;112:4178-83.
11. Rimokh R, et al. A chromosome 12 coding region is juxtaposed to the MYC protooncogene locus in a t(8;12)(q24;q22) translocation in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1991;3:24-36.
12. Van Galen JC, et al. BTG1 regulates glucocorticoid receptor autoinduction in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 115:4810-9.
13. Matsuda S, et al. In search of a function for the TIS21/PC3/BTG1/TOB family. *FEBS Lett* 2001;497:67-72.
14. Bakker WJ, et al. FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J Cell Biol* 2004;164:175-84.
15. Busson M, et al. Coactivation of nuclear receptors and myogenic factors induces the major BTG1 influence on muscle differentiation. *Oncogene* 2005;24:1698-710.
16. Tissing WJ, et al. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003;17:17-25.
17. Schmidt S, et al. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ* 2004;11:545-55.
18. Tissing WJ, et al. Glucocorticoid-induced glucocorticoid-receptor expression and promoter usage is not linked to glucocorticoid resistance in childhood ALL. *Blood* 2006;108:1045-9.
19. Den Boer ML, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol* 2009;10:125-34.
20. Mullighan CG, et al. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:9414-8.
21. Cario G, et al. Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Blood* 2010;115:5393-7.
22. Harvey RC, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010;115:5312-21.
23. Levine RL, et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 2007;7:673-83.
24. Quintas-Cardama A, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 115:3109-17.
25. Tyner JW, et al. CYT387, a novel JAK2 inhibitor, induces hematologic responses and normalizes inflammatory cytokines in murine myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2010;115:5232-40.
26. Flex E, et al. Somatic acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 2008;205:751-8.
27. Bercovich D, et al. Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *Lancet* 2008;372:1484-92.
28. Malinge S, et al. Novel activating JAK2 mutation in a patient with Down syndrome and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007;109:2202-4.
29. Ziegler SF, et al. Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. *Nat Immunol* 2006;7:709-14.
30. Russell LJ, et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009;114:2688-98.
31. Mullighan CG, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2009;41:1243-6.
32. Yoda A, et al. Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:252-7.

Ontvangen 27 juni 2010, geaccepteerd 4 november 2010.

## Correspondentieadres

**Dhr. dr. R.P. Kuiper, groepsleider Cancer Genomics**  
 Universitair Medisch Centrum St Radboud  
 Afdeling Antropogenetica  
 Geert Grooteplein 10  
 6525 GA Nijmegen  
 Tel.: 024 361 08 68  
 E-mailadres: r.kuiper@antrg.umcn.nl

**Dhr. prof. dr. P.M. Hoogerbrugge, hoofd subafdeling Kinderoncologie**  
**Dhr. dr. F. N. van Leeuwen, hoofd Laboratorium Kinderoncologie**

Afdeling Hemato-Oncologie

*Correspondentie graag richten aan de eerste auteur.*

Belangenconflict: geen gemeld.  
 Financiële ondersteuning: dit werk is mede mogelijk gemaakt door financiële ondersteuning van het Koningin Wilhelmina Fonds, de stichting Kinderen Kankervrij en de stichting Quality of Life.