

Prognostyczne i terapeutyczne implikacje zaburzeń genetycznych w dziecięcej ostrej białaczce limfoblastycznej

Prognostic and therapeutic implications of genetic aberrations in childhood acute lymphoblastic leukemia

Agata Pastorczak¹, Wojciech Młynarski¹, Tomasz Szczepański²

¹Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

²Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej, Śląski Uniwersytet Medyczny, Zabrze

Streszczenie

Do transformacji nowotworowej w ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL) dochodzi wskutek co najmniej dwóch następujących po sobie mutacji, które wspólnie inicjują i promują leukemogenezę. Spektrum zaburzeń struktury zmutowanych genów obejmuje zarówno mutacje punktowe, jak i pęknięcia dwuniciowego DNA, prowadzące do translokacji, delecji, inwersji lub duplikacji regionu kodującego. Niektóre spośród odkrytych zaburzeń w genomie limfoblastów mają niezależne znaczenie prognostyczne stratyfikujące ryzyko niepowodzenia terapii w dziecięcej ALL. W niniejszej pracy omówiono je wraz ze wskazaniem potencjalnych implikacji terapeutycznych opartych na mechanizmach molekularnych.

Słowa kluczowe: ostro białaczka limfoblastyczna, zaburzenia genetyczne, leczenie

Hematologia 2011; 2, 1: 43–50

Abstract

The process of malignant transformation in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) requires at least two subsequent mutations which initiate and promote leukemogenesis. These genetic aberrations include point-mutations as well as double-strand DNA breaks leading to various types of chromosomal rearrangements of the coding regions. Some of the genetic lesions are independent prognostic factors, which effectively stratify the risk of treatment outcome. In this review we summarize the most common genetic aberrations in childhood ALL which may provide potential molecular target for novel therapies.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, genetic aberrations, treatment

Hematologia 2011; 2, 1: 43–50

Wprowadzenie

Ostatnie lata badań nad genomem limfoblastów białaczkowych technikami wysokiej rozdzielczości znacznie poszerzyły wiedzę dotyczącą genetycznej

heterogenności dziecięcej ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL, *acute lymphoblastic leukemia*) oraz złożonej biologii tego nowotworu, w kontekście współlistnienia zaburzeń funkcji wielu genów. Jedynolity pozostał model transformacji nowotworowej

Adres do korespondencji: Agata Pastorczak, Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii, Uniwersytet Medyczny, ul. Sporna 36/50, 91–738 Łódź, tel.: 42 617 77 69, faks: 42 617 77 98, e-mail: ciel@tlen.pl

w ALL, do której dochodzi wskutek dwóch następujących po sobie mutacji, wspólnie inicjujących i promujących leukemogenezę. Spektrum zaburzeń struktury zmutowanych genów obejmuje zarówno mutacje punktowe, jak i pęknięcia dwuniciowe DNA prowadzące do translokacji, delecji, inwersji lub duplikacji regionu kodującego [1]. Wyjątek stanowi ALL z rearanżacją genu *MLL* (*mixed lineage leukemia*) do wielu odmiennych *loci*, ponieważ anomalie te są zmianami onkogennymi niewymagającymi dodatkowych zdarzeń genomowych, a proces nowotworzenia zależy od zmian epigenetycznych [2].

Wnioski płynące z analizy genomu limfoblastów ALL w ostatnich latach pozwoliły również na wyodrębnienie zaburzeń chromosomalnych, które są kluczowe w powstawaniu białaczki z poszczególnych linii limfoidalnych oraz mutacji wtórnych uczestniczących w progresji rozrostu klonalnego [1]. Ponadto wiarygodna walidacja kliniczna niektórych spośród nowo odkrytych mutacji udowodniła ich charakter prognostyczny w dziecięcej ALL, co w przyszłości może umożliwić bardziej adekwatną stratyfikację ryzyka niepowodzenia terapii [3, 4]. Jednocześnie wykorzystanie wiedzy o patogenie molekularnej ALL pozwoliło na poszukiwanie nowych punktów uchwytu dla leków przeciwnowotworowych.

ALL z komórek B (B-ALL)

Zaburzenia genetyczne w postaci aneuploidii (wysokiej hiperdiploidii i hipodiploidii) oraz rearanżacji chromosomalnych, które dysregulują procesy różnicowania i dojrzewania linii limfoidalnej, dotyczą ponad 75% przypadków dziecięcej B-ALL [1]. Szczegółowe scharakteryzowanie tego nowotworu na poziomie cytogenetycznym umożliwiło identyfikację markerów genetycznych zarówno zwiększających ryzyko niepowodzenia terapeutycznego, jak i korzystnych rokowniczo (tab. 1). Charakterystyczne dla dziecięcej B-ALL jest częste występowanie markerów genetycznych związanych z pomyślnym rokowaniem, tj. wysokiej hiperdiploidii (51–65 chromosomów) oraz translokacji t(12;21)(p13;q22) z fuzją *ETV6-RUNX* (*TEL-AML1*) [5].

Z wiekiem zwiększa się częstość występowania związanej z gorszym rokowaniem translokacji t(9;22)(q34;q11.1), powodującej powstanie genu fuzyjnego *BCR-ABL1*, kodującego aktywną kinazę tyrozynową [6]. Zgodnie z obowiązującym protokołem leczenia dziecięcej B-ALL obecność tej translokacji stratyfikuje pacjenta do grupy wysokiego ryzyka niepowodzenia terapii. Podobnie niekorzystnym czynnikiem prognostycznym jest obecność translokacji t(4;11)(q21;23) z fuzją *MLL-AF4* [7]. Dla

tych dzieci, a także dla pacjentów z translokacją t(9;22) często jedynym skutecznym rozwiązaniem terapeutycznym jest allogeniczne przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych (allo-HSCT, *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*) [8]. Rearanżacje genu *MLL* są niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w niemowlęcej B-ALL [7]. Jak dotąd, nie ustalono jednoznacznie wartości prognostycznej innych rearanżacji genu *MLL* u dzieci powyżej 1. roku życia [7]. Do aberracji liczbowych, również kwalifikujących do grupy wysokiego ryzyka niepowodzenia terapii, należy bliska haploidia (24–29 chromosomów) i niska hipodiploidia (31–39 chromosomów) wykrywana w niewielkim odsetku przypadków dziecięcej ALL (< 1% przypadków) [9].

Podobnie rzadką anomalią, pierwotnie opisywaną jako niekorzystna prognostycznie, jest wewnątrzchromosomalna amplifikacja chromosomu 21 (iAMP21), obejmująca między innymi region genu *RUNX*, i z tego względu wykrywana jako dodatkowy sygnał *RUNX* w trakcie rutynowego poszukiwania fuzji *ETV6-RUNX* metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* [10]. Obecnie uważa się, że wyniki leczenia pacjentów B-ALL iAMP21-pozytywnych zależą od rodzaju stosowanego protokołu. Anomalia ta traci na znaczeniu prognostycznym w przypadku bardziej zintensyfikowanej terapii, na przykład według protokołu leczenia grupy BFM (*Berlin–Frankfurt–Munster*), obowiązującego także w Polsce [11]. Podobną zależność udokumentowano wcześniej dla translokacji t(1;19)(*TCF3-PBX1*), będącej również czynnikiem niekorzystnym prognostycznie. Obecnie wiadomo, że dzięki zastosowaniu obowiązujących protokołów leczniczych 5-letnie przeżycie wolne od niekorzystnych zdarzeń (EFS, *event-free survival*) wynosi 84% u pacjentów z B-ALL t(1;19)-pozytywnych. Jednocześnie pacjenci są obciążeni podwyższonym ryzykiem izolowanej wznowy w ośrodkowym układzie nerwowym [12].

Z uwagi na fakt, że wymienione markery genetyczne wysokiego ryzyka niepowodzenia terapii można zidentyfikować w zaledwie 10% wszystkich przypadków dziecięcej B-ALL, nie tłumaczą one w pełni genetycznego podłoża wznowy białaczki obserwowanej u około 20% pacjentów [13], tym bardziej że niekorzystne zdarzenia są również odnotowywane u pacjentów z B-ALL bez zaburzeń na poziomie cytogenetycznym.

Dokładniejszy wgląd w anomalie submikroskopowe, kluczowe w transformacji nowotworowej i proliferacji B-ALL o agresywnym przebiegu klinicznym, został urzeczywistniony dzięki całościowej analizie genomu komórek blastycznych metodą mikromacierzy polimorfizmów pojedynczego nukle-

Tabela 1. Zaburzenia genetyczne w dziecięcej ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL) z komórek B

Table 1. Genetic aberrations of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL)

| | Częstość występowania | Zmiana funkcjonalna | Wartość prognostyczna |
|--|--|--|---|
| t(9;22)(q34;q11.1) <i>BCR-ABL1</i> | 2–3% | Nasilona transdukcja sygnału mitogennego, ograniczenie tempa apoptozy, zmniejszona adhezja komórek | Niekorzystne rokowanie EFS < 30% |
| Rearanżacje genu <i>MLL</i> | 5–8% (ok. 70% niemowląt; ok. 2% dzieci > 1. rz.) | Zmiana ekspresji genów <i>HOX</i> | Niekorzystne rokowanie w niemowlęcej ALL; t(4;11) — niekorzystne rokowanie we wszystkich grupach wiekowych |
| iAMP21 (wewnątrz-chromosomalna amplifikacja chromosomu 21) | 2–3% | Nieznana | Niekorzystne rokowanie w przypadku standardowej terapii |
| Delekcje, mutacje inaktywujące gen <i>IKZF1</i> | 10% | Zahamowanie różnicowania linii limfoidalnej, nasilona proliferacja | Wysokie ryzyko wznowy |
| Rearanżacje genu <i>CRLF2</i> (translokacje <i>CRLF2-IGHα</i> , <i>CRLF2-P2RY8</i>) | 7% | Nadekspresja <i>CRLF2</i> | Wysokie ryzyko wznowy |
| Mutacje aktywujące w genach dla kinaz <i>JAK2</i> , <i>JAK1</i> i <i>JAK3</i> | 1% (10% w HR-ALL) | Aktywacja mitogennego szlaku metabolicznego JAK–STAT | Niekorzystne rokowanie przy współistnieniu rearanżacji <i>CRLF2</i> lub mutacji <i>IKZF1</i> |
| Hipodiploidia ≤ 44 chromosomów | 1% | Nieznana | Niekorzystne rokowanie |
| Hiperdiploidia ≥ 51–60 chromosomów | 20–30% | Nieznana | Korzystne rokowanie (zwłaszcza przy trisomii chromosomów 4, 10, 14) |
| t(12;21)(p13;q22)- <i>-ETV6-RUNX1</i> | 20–25% | Zmiana ekspresji genów <i>HOX</i> podczas limfopoezy | Korzystne rokowanie |
| t(1;19)(q23;p13.3)- <i>-TCF3-PBX1</i> | 5–6% | Zahamowane różnicowanie linii limfoidalnej z komórek hematopoetycznych | Korzystne rokowanie przy zintensyfikowanym leczeniu |
| Translokacje <i>IGHα</i> i genów rodziny <i>CEBP</i> | 2–3% | Nadekspresja genów rodziny <i>CEBP</i> | Niezidentyfikowana wartość rokownicza |

EFS (*event-free survival*) — przeżycie wolne od niekorzystnych zdarzeń; JAK — kinaza z rodziny Janus; HR-ALL (*high-risk acute lymphoblastic leukemia*) — ostra białaczka limfoblastyczna wysokiego ryzyka

otydu. Wyniki badań wykonywanych tą metodyką wykazały, że komórki ALL charakteryzuje stosunkowo niewielka liczba współistniejących zaburzeń genetycznych — 6–8 na jeden przypadek białaczki [1]. Ponad połowa mutacji w B-ALL dotyczy czynników transkrypcyjnych regulujących wzrost i różnicowanie linii limfoidalnej, do których zalicza się delekcje, mutacje punktowe i translokacje genu *PAX5*, delekcje oraz, rzadziej, mutacje punktowe genu *IKZF1* (*IKAROS*) i delekcje genu *EBF1* [1]. Wymienione aberracje dotyczą zwykle tylko jednej

kopii genu, powodując utratę jego funkcji *in vitro* i przyspieszenie pojawienia się ALL w modelu *in vitro* [14]. Występowanie w białaczce mutacji jednocześnie kilku spośród wymienionych czynników regulatorowych dla różnicowania linii limfoidalnej powoduje nasilenie niekorzystnego efektu rokowniczego, co może świadczyć o tym, że stopień, w jakim następuje zablokowanie dojrzewania limfoblastów, ma znaczenie nie tylko dla transformacji nowotworowej, ale również dla odpowiedzi na stosowane leczenie.

Inne anomalie obserwowane w B-ALL o nieustalonym lub nieistotnym charakterze prognostycznym dotyczą regulatorów cyklu komórkowego i genów supresorowych (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *RBI* i *PTEN*), genów uczestniczących w limfoidalnej transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego (*CD200*, *BTLA* i *BLNK*) oraz genów zaangażowanych w odpowiedź na cytostatyki (*NR3C1*) [1, 15].

Genetyczny profil B-ALL wysokiego ryzyka *BCR-ABL1-like*

Identyfikowanie submikroskopowych anomalii w genomie limfoblastów B-ALL o agresywnym przebiegu klinicznym doprowadziło w ostatnich latach do zmiany pojęcia białaczki wysokiego ryzyka. Obecnie główne znaczenie, niekorzystne rokowniczo, przypisuje się mutacjom w obrębie genu *IKZF1* (*IKAROS*), które pojawiają się we wszystkich podtypach białaczki, zarówno *BCR-ABL1*-pozytywnych, jak i w nowym podtypie B-ALL *BCR-ABL1-like* [3]. Jest to podtyp B-ALL o profilu ekspresji genów podobnym do reprezentowanego przez białaczki *BCR-ABL1*-pozytywne, w których jednak nie wykrywa się translokacji t(9;22), często obecne są natomiast zaburzenia funkcji genów uczestniczących w transdukcji sygnału z receptorów dla cytokin, tj. mutacje aktywujące kinazy z rodziny Janus (*JAK*) oraz rearanżacje genu *CRLF2* (*cytokine-receptor-like factor 2*) [16].

Gen *IKZF1* koduje czynnik transkrypcyjny *IKAROS* — niezbędny regulator transkrypcji w procesie różnicowania wszystkich linii limfoidalnych oraz modelowania chromatyny [17]. Delecje i mutacje punktowe tego genu zidentyfikowano w około 80% przypadków dziecięcej B-ALL *BCR-ABL1*-pozytywnych i w około 30% B-ALL u dzieci z grupy wysokiego ryzyka, u których nie występowała rearanżacja *BCR-ABL1* [3]. Mullighan i wsp. [3] przeanalizowali występowanie niekorzystnych zdarzeń w grupie 221 dzieci z rozpoznaną B-ALL wysokiego ryzyka *BCR-ABL1*-negatywną i stwierdzili istotnie wyższe ryzyko wznowy w grupie pacjentów z mutacjami *IKZF1*. Podobne obserwacje kliniczne potwierdzono w badaniach przeprowadzonych w Holandii [18]. W cytowanej pracy wykazano również istotną asocjacje między obecnością zaburzeń struktury genu *IKZF1* i podwyższonym poziomem minimalnej choroby resztkowej (MRD, *minimal residual disease*) w 29. dniu leczenia. Ponadto przeanalizowany we wspomnianym wyżej badaniu profil ekspresji genów w grupie chorych z B-ALL *BCR-ABL1*-negatywnych i *IKZF1*-pozytywnych wykazywał podobieństwo do profilu B-ALL

BCR-ABL1-pozytywnych. Nasiloną ekspresją dotyczyła genów ulegających silnej ekspresji w komórkach progenitorowych, przy jednoczesnym braku ekspresji genów związanych z dojrzewaniem limfocytów B. Prawdopodobnie mutacje genu *IKZF1*, poprzez zahamowanie różnicowania linii limfoidalnej, czynią komórki bardziej opornymi na chemioterapię, czego — jak dotąd — nie zweryfikowano doświadczalnie. Za tą hipotezą przemawia fakt, że mutacje *IKZF1* pojawiają się także jako nowe aberracje w momencie wznowy białaczki.

Dalsze poszerzenie wiedzy dotyczącej genetyki *BCR-ABL1-like* B-ALL nastąpiło dzięki ponownemu sekwencjonowaniu wybranych genów B-ALL wysokiego ryzyka w grupie 187 dzieci, wcześniej opisywanej przez Mullighana i wsp. [19] w kontekście zaburzeń funkcji genu *IKZF1*. We wspomnianej grupie zidentyfikowano w sumie 20 mutacji somatycznych w genach *JAK*, w tym *JAK1*, *JAK2* i *JAK3*. Najczęściej obserwowano mutacje punktowe R683 w obrębie domeny pseudokinazowej i kinazowej *JAK2* oraz w pseudokinazowej domenie *JAK1*. Chociaż nie znaleziono homozygotycznej mutacji V617F w genie *JAK2*, charakterystycznej dla przewlekłych nowotworów mieloproliferacyjnych, zidentyfikowano mutację homologiczną do niej V687F w genie *JAK1*. Mutacje genów dla kinaz *JAK* istotnie współistniały z zaburzeniami struktury genu *IKZF1* oraz z profilem ekspresji genów *BCR-ABL1-like* oraz zwiększonym ryzykiem niekorzystnych zdarzeń. Anomalię R683 w obrębie pseudokinazowej domeny *JAK2* opisywano wcześniej w 25% przypadków B-ALL w przebiegu zespołu Downa (DS-ALL, *Down syndrome-ALL*) [20].

Kinazy *JAK* są mediatorami transdukcji sygnału z receptorów cytokinowych w komórkach hematopoetycznych szlakiem metabolicznym *JAK-STAT* [21]. Znaczenie zaburzeń funkcji tych białek w procesie leukemogenezy zweryfikowano poprzez wprowadzenie do komórek mysiej linii pro-B z ekspresją receptora erytropoetyny (Ba/F3-Epo-R) opisywanych mutacji w genach *JAK1* i *JAK2*. Interwencja ta spowodowała transformację *in vitro* komórek Ba/F3-Epo-R oraz niezależną od cytokin proliferację komórek białaczkowych połączoną z konstytutywną aktywacją szlaku *JAK-STAT* [19].

Opisywane wyżej genetyczne profilowanie chorych z B-ALL wysokiego ryzyka umożliwiło zaobserwowanie kolejnego zjawiska, jakim jest współistnienie mutacji kinaz *JAK* z zaburzeniami liczby kopii DNA, najczęściej w postaci interstycjalnych delecji w zgrupowaniu genów hematopoetycznych receptorów cytokinowych. Zauważono również, że anomalie te są zlokalizowane w regionie pseudoau-

tosomalnym 1 (PAR1) na chromosomie X lub Y i obejmują gen *IL3RA* dla receptora interleukiny 3 alfa oraz *CSF2RA* dla receptora granulocytarno-makrofagowego czynnika wzrostu, który sąsiaduje z genem *CRLF2*, a delecjom w regionie PAR1 towarzyszy nadekspresja *CRLF2* [22].

Białko *CRLF2* tworzy heterodimerski receptor z cząsteczką *ILR7A*, czyli receptorem dla interleukiny 7 alfa oraz stromalną limfopoetyną grasiczą, biorąc udział w transdukcji sygnału w procesie dojrzewania komórek dendrytycznych, w zapaleniu alergicznym oraz promując proliferację limfocytów B przy jednocześnie niewielkim wpływie na ich różnicowanie [23]. Russell i wsp. udowodnili, że nadekspresja *CRLF2* powstaje w mechanizmie rearanżacji całego regionu kodującego ten gen do *locus* genu dla łańcucha ciężkiego immunoglobulin (*IGH-CRLF2*) bądź do pierwszego niekodującego egzonu *P2RY8*, powodując powstanie nowego transkryptu fuzyjnego *CRLF2-P2RY8* [24]. Opisane powyżej translokacje, rzadziej mutacje punktowe *CRLF2*, występują w 7% przypadków dziecięcej B-ALL [25]. Interesujący wydaje się jednak fakt, że zaburzenia funkcji *CRLF2* odnotowano w 50% przypadków DS-ALL — białaczkach, które charakteryzuje nieobecność innych markerów genetycznych typowych dla dziecięcej B-ALL [25]. W ponad połowie przypadków ALL bez zespołu Downa oraz w DS-ALL z rearanżacjami *CRLF2* współistnieją mutacje *JAK1* i *JAK2*, a niemal wszystkie przypadki B-ALL z zaburzeniami w obrębie genów *JAK* wykazują anomalie w obrębie struktury genu *CRLF2*, co świadczy o kooperowaniu tych zaburzeń w procesie leukemogenezy [20, 24, 25]. U dzieci bez zespołu Downa rearanżacje *CRLF2* i mutacje *JAK* występują istotnie częściej z mutacjami genu *IKZF1*, co ma szczególnie niekorzystne znaczenie rokownicze potwierdzone we wszystkich badanych kohortach [25].

ALL z komórek T (T-ALL)

W około 40% przypadków molekularna patogenezą T-ALL wiąże się przyczynowo z aktywacją onkogenu translokowanego do *locus* receptora T-komórkowego (TCR, *T-cell receptor*), a rokowniczy wynik tej aberracji jest determinowany rodzajem przeniesionego onkogenu [26]. Z tego powodu w nowej klasyfikacji T-ALL uwzględniono nie tylko immunofenotyp komórek nowotworowych, ale także strukturalne i dodatkowo funkcjonalne zmiany w ich genomie.

W przypadku braku translokacji chromosomalnych rokowanie może być definiowane na podsta-

wie profilu ekspresji genów. Wyniki badań z użyciem mikromacierzy oligonukleotydowych ujawniły, że specyficzny charakter ekspresji onkogennych czynników transkrypcyjnych *TAL1*, *LYL1*, *HOX11* i *HOX11L2* jest związany z 3 odrębnymi profilami ekspresji genów w dziecięcej T-ALL, będącymi wyrazem zatrzymania dojrzewania prawidłowych limfocytów na specyficznym etapie, w tym *LYL1+* (*pre-T*), *HOX11+* (*early-cortical thymocyte*) i *TAL1+* (*late-cortical thymocyte*) [27].

Najbardziej opornym na konwencjonalną chemioterapię i niekorzystnym rokowniczo podtypem jest T-ALL z wczesnych komórek prekursorowych limfocytów T (ETP, *early T-cell precursors*) [28]. Są to komórki migrujące ze szpiku do grasicy o niedojrzałym fenotypie (CD8–, CD1a–, CD5 słabo dodatni), wykazujące na swej powierzchni ekspresję markerów typowych dla komórek pnia i antygenów mieloidalnych. Swoisty profil ekspresji genów tego podtypu białaczki, określane jako *LYL1+*, determinuje jej agresywny charakter [28]. Natomiast w najczęstszym podtypie T-ALL *common thymocyte* (CD1a+) na podstawie profilu ekspresji wyróżnia się dwie grupy prognostyczne. Pierwsza dotyczy 3% dziecięcych T-ALL i charakteryzuje się rokowniczo korzystną nadekspresją *TLX1/HOX11* będącą wynikiem translokacji t(10;14)(q24;q11) [29, 30]. W rozwoju embrionalnym *HOX11* jest regulatorem transkrypcyjnym, kluczowym między innymi dla powstania śledziony [29]. Do transformacji nowotworowej przyczynia się prawdopodobnie poprzez zablokowanie dojrzewania limfocytów T i deregulację cyklu komórkowego w wyniku zablokowania aktywności fosfatazy PP1/PP2A [30]. W przeciwieństwie do *TLX1/HOX11* obecność translokacji t(5;14)(q35;q32) prowadzącej do nadekspresji innego genu *TLX3/HOX11L2* zwiększa ryzyko wznowy u około 25% dzieci z T-ALL [31]. Najwnikliwiej scharakteryzowaną rearanżacją, obserwowaną zwykle w T-ALL z dojrzałej subpopulacji komórek, jest submikroskopowa delecja krótkiego ramienia chromosomu 1, powodująca nadekspresję genu *TAL1* oraz powstanie genu fuzyjnego *SIL-TAL1*, wykrywanego u 60% dzieci [29, 31]. Leukemogeneza w białaczkach *TAL1+* jest spowodowana inhibicją czynnika transkrypcyjnego E2A przez domenę wiążącą DNA białka *TAL1* [29]. Białaczki wykazujące tę aberrację dobrze odpowiadają na leczenie [29].

W T-ALL stosunkowo rzadziej niż w B-ALL obserwuje się powstawanie genów chimerycznych. Jednym z nich jest obecna u 10% pacjentów niekorzystna rokowniczo translokacja t(10;11)(p12;q14), powodująca fuzję *PICALM-MLLT10* [32]. Nato-

Tabela 2. Zaburzenia genetyczne w dziecięcej ostrej białaczce limfoblastycznej z komórek T**Table 2.** Genetic aberrations of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia

| | Częstość występowania | Zmiana funkcjonalna | Wartość prognostyczna |
|--|-----------------------|---|---|
| Translokacje onkogenów (<i>TLX1</i> , <i>TLX3</i> , <i>LMO1</i> , <i>LMO2</i> , <i>HOXA</i>) do <i>locus</i> genu <i>TCR</i> | 40–50% | Nadekspresja odpowiedniego onkogeny, zaburzone różnicowanie linii limfoidalnej | Korzystne rokowanie dla t(10;14) z nadekspresją <i>TLX1</i> , niekorzystne rokowanie dla nadekspresji <i>TLX3</i> |
| del(1)(p32) z fuzją <i>SIL-TAL1</i> | 20–30% | Nadekspresja <i>TAL1</i> , zaburzone różnicowanie linii limfoidalnej | Bez wartości rokowniczej |
| t(10;11)(p12;q14) z fuzją <i>PICALM-MLLT10</i> | 10% | Zaburzone różnicowanie linii limfoidalnej | Niekorzystne rokowanie |
| Rearanżacje genu <i>MLL</i> | 5–10% | Zmiana ekspresji genów <i>HOX</i> , zaburzone różnicowanie linii limfoidalnej | Bez wartości rokowniczej |
| <i>NUP214-ABL1</i> translokacja episomalna | 5–6% | Aktywność konstytutywna kinazy tyrozynowej: proliferacja i zwiększone przeżycie komórek nowotworowych | Bez wartości rokowniczej |
| Mutacje aktywujące <i>NOTCH1</i> | 40–50% | Zwiększona zdolność do samoodnawiania komórek nowotworowych | Korzystne rokowanie po zastosowaniu niektórych protokołów |
| Delekcje <i>CDKN2A</i> | 60–70% | Brak kontroli proliferacji, zwiększone przeżycie komórek nowotworowych | Bez wartości rokowniczej |

miast rearanżacje *MLL* odnotowuje się u niewielkiego odsetka dzieci z T-ALL (5–10%), a ich znaczenie prognostyczne pozostaje niezdefiniowane [33]. Ciekawą, nowo zidentyfikowaną w T-ALL aberracją jest episomalna amplifikacja *locus* 9p34, prowadząca do powstania genu fuzyjnego *NUP213-ABL1* o aktywności kinazy tyrozynowej, analogicznej do kinazy powstałej na drodze fuzji *BCR-ABL1*, rzadko stwierdzanej w białaczce o immunofenotypie T-komórkowym [34]. Rearanżacja ta dotyczy przypadków przebiegających z nadekspresją czynników transkrypcyjnych *HOX11* i *HOX11L2* i może stanowić potencjalny punkt uchwytu dla leków [34].

Do najczęstszych zaburzeń genetycznych o niepotwierdzonej jednoznacznie pozytywnej wartości prognostycznej należą mutacje aktywujące w genie *NOTCH1* [35], obserwowane we wszystkich podtypach dziecięcej T-ALL. Ekspresja białka *NOTCH1* jest niezbędna w prawidłowym dojrzewaniu komórek pnia oraz limfocytów T [36]. Interesujący z punktu widzenia farmakoterapii jest proces proteolizy heterodimerskiego, powierzchniowego białka *NOTCH1* przy udziale γ -sekreazy, która — odcinając domenę wewnątrzkomórkową *NOTCH1* — umożliwia jej translokację do jądra komórkowego i podjęcie funkcji regulatora transkrypcji genów [37]. Jak dotąd, nie poznano ostatecznie mechanizmu pro-

mujującego T-komórkową leukemogenezę w ALL z mutacją *NOTCH1*, jednak zastosowanie inhibitorów γ -sekreazy w stosunku do linii T-ALL z mutacją *NOTCH1* powodowało zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 [35]. Fakt ten stanowi pośredni dowód, że sygnał zależny od *NOTCH1* jest istotny dla wzrostu i przyczynia się do powstania T-ALL przez promowanie progresji cyklu komórkowego.

Deregulacja cyklu komórkowego w T-ALL także jest spowodowana mutacją genów supresorowych *CDKN2A-2B* w wyniku delekcji krótkiego ramienia chromosomu 9p21, obejmującego *loci* *p16/INK4A/p14ARF* i *p15INK4B*, lub wyciszenia tych genów poprzez hipermetylację promotora [38]. Jakkolwiek wyżej wspomniane zaburzenia dotyczą ponad 60% dzieci z T-ALL, przyczyniając się do nadmiernej proliferacji patologicznego klonu, ich obecność pozostaje bez znaczenia rokowniczego (tab. 2).

Zmiany onkogenne jako cel farmakoterapii

Współcześnie stosowane protokoły terapeutyczne w dziecięcej ALL charakteryzuje wysoka efektywność I linii leczenia na poziomie około 80% 5-letniego EFS [13]. Niemniej jednak co 5. dziecko z ALL umiera lub doświadcza wznowy białaczki,

której terapia jest niejednokrotnie wyzwaniem z powodu lekooporności oraz zmniejszonej tolerancji pacjenta na ponowne leczenie z zastosowaniem intensywnej chemioterapii. Wydaje się, że dalszy postęp w leczeniu dziecięcej ALL nie może się dokonać na drodze zwiększania dawek cytostatyków lub mnożenia połączeń lekowych w cyklach polichemioterapii, ale poprzez ulepszenie procesu stratyfikacji pacjentów do grup ryzyka, z wykorzystaniem nowych markerów genetycznych, oraz poprzez wprowadzenie do schematów terapeutycznych leków ingerujących w procesy molekularne leukemogenezy.

Od wielu lat znanym środkiem farmakologicznym o molekularnym mechanizmie działania jest imatynib (IM) — inhibitor kinazy tyrozynowej (TKI, *tyrosine kinase inhibitor*) *BCR-ABL1*, powstałej na skutek translokacji t(9;22)(q34;q11.1) [39]. Choć allo-HSCT to nadal postępowanie z wyboru w dziecięcej B-ALL *BCR-ABL1*-pozytywnej, to jednak wyniki badań klinicznych przeprowadzonych w małych grupach pacjentów dowodzą, że podanie IM poprawia jakość remisji przed transplantacją [40]. Wyniki badania AALL0031 grupy COG (*Children's Oncology Group*), mającego na celu określenie efektywności jednoczesnego zastosowania intensywnej chemioterapii z IM u dzieci z B-ALL *BCR-ABL1*-pozytywnych, wykazały, że postępowanie to umożliwia uzyskanie 3-letniego EFS na poziomie 80% [41]. Inhibitory kinaz tyrozynowych II generacji (nilotynib, dazatynib) w Polsce nie są zarejestrowane do leczenia dziecięcej B-ALL. Trzeba jednak pamiętać o zaletach działania molekularnego tych leków — zwłaszcza dazatynibu, którego efektywność *in vitro* jest 325 razy większa niż efektywność IM i którego spektrum działania inhibicyjnego obejmuje także kinazy z rodziny Src [42]. Obecnie otwarte pytanie dotyczy potencjalnego działania mniej specyficznych TKI w wyselekcjonowanych przypadkach B-ALL *BCR-ABL1-like*.

W aspekcie celowanej terapii molekularnej bardzo interesujące wydaje się zastosowanie inhibitorów kinaz JAK w B-ALL wysokiego ryzyka, z mutacjami tych enzymów lub wykorzystanie innego punktu uchwytu na szlaku JAK–STAT w celu zablokowania transdukcji sygnału do proliferacji komórek B-ALL z rearanżacjami *CRLF2* bez mutacji w genach białek z rodziny Janus. Wyniki badań przedklinicznych na tym polu są bardzo zachęcające, ponieważ transformacja i proliferacja komórek Ba/F3-Epo-R z mutacją *JAK* i *CRLF2* zostaje z powodzeniem zablokowana inhibitorem JAK lub po zastosowaniu miRNA hamującego ekspresję *CRLF2* [19].

Równie obiecującym obszarem poszukiwań pozostaje molekularna terapia celowana w T-ALL.

Trwają badania kliniczne służące ocenie efektywności leczenia za pomocą γ -sekreazy pacjentów z T-ALL i mutacjami w genie *NOTCH1*. Innym potencjalnym punktem uchwytu farmakoterapii może być w przyszłości zastosowanie TKI powstałych wskutek fuzji *NUP214-ABL* [43]. Ponadto w ostatnich pracach Guitierrez i wsp. [44] potwierdzono obecność zaburzeń transdukcji sygnału w szlaku PTEN–PI3K–AKT w około 50% przypadków T-ALL oraz silnie niekorzystny charakter prognostyczny mutacji genu *PTEN*. Z tego względu szlak PTEN–PI3K–AKT powinien się stać kolejnym przedmiotem badań nad możliwościami molekularnej interwencji w leukemogenezę T-ALL.

Podsumowanie

W ostatnich latach dokonał się ogromny postęp w zakresie wiedzy dotyczącej molekularnej patogenezy ALL. Dzięki zastosowaniu nowoczesnych technologii genetycznych o wysokiej rozdzielczości udało się zidentyfikować, a następnie potwierdzić klinicznie wartość rokowniczą nieznanych dotąd mutacji, kluczowych w procesie leukemogenezy. Część z nich, stanowiąc niezależny czynnik prognostyczny, umożliwi w przyszłości bardziej precyzyjną kwalifikację pacjentów do grup ryzyka niepowodzenia terapii i może być punktem wyjścia do poszukiwań nowych sposobów farmakoterapii opartych na mechanizmach molekularnych.

Piśmiennictwo

- Mullighan C., Goorha S., Radtke I. i wsp. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *Nature* 2007; 446: 758–764.
- Li Z., Liu D., Liang C. New insight into the molecular mechanisms of MLL-associated leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 183–190.
- Mullighan C., Su X., Zhang J. i wsp. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2009; 29: 470–480.
- Cario G., Zimmermann M., Romey R. i wsp. 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; 19: 5393–5397.
- Harrison C. Cytogenetics in paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukemia. *Br. J. Hematol.* 2009; 144: 147–156.
- Arico M., Valsecchi M., Camitta B. i wsp. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342: 998–1006.
- Pui C., Gaynon P., Boyett J. i wsp. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2000; 359: 1909–1915.
- Balduzzi A., Valsecchi M., Uderzo C. i wsp. Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute

- lymphoblastic leukemia in first complete remission: comparison by genetic randomization in an international prospective study. *Lancet* 2005; 366: 635–642.
9. Harrison C., Moorman A., Broadfield Z. i wsp. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukemia. *Br. J. Haematol.* 2004; 125: 552–559.
 10. Soulier J., Trakhtenbrot L., Najfeld V. i wsp. Amplification of band q22 of chromosome 21, including AML1, in older children with acute lymphoblastic leukemia: an emerging molecular cytogenetic subgroup. *Leukemia* 2003; 17: 1679–1682.
 11. Heerema N.A., Carroll A.J., Borowitz M.J. i wsp. Amplification of AML1 does not impact early outcome of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) treated with risk-directed chemotherapy: a report from the Children's Oncology Group (COG). *Blood* 2009; 114: abstrakt 1019.
 12. Jeha S., Pei D., Raimondi S. i wsp. Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. *Leukemia* 2009; 23: 1406–1409.
 13. Moricke A., Zimmermann M., Reiter A. i wsp. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 2009; 24: 265–284.
 14. Miller C., Mullighan C., Su X. i wsp. PAX5 haploinsufficiency cooperates with BCR-ABL1 to induce acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2008; 112: abstrakt 293.
 15. Kawamata N., Ogawa S., Zimmermann M., Kato M. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemia by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood* 2008; 111: 776–784.
 16. Den Boer M., van Slechtenhorst M., De Menezes R. i wsp. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 125–134.
 17. Georgopoulos K., Bigby M., Wang J.H. i wsp. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 1994; 79: 143–156.
 18. Kuiper R., Waanders E., van der Velden V. i wsp. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia* 2010; 24: 1258–1264.
 19. Mullighan C., Zhang J., Harvey R., Collins-Undrewood J. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009; 106: 9414–9418.
 20. Mullighan C., Collins-Undrewood J., Phillips L., Zhang J. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 2009; 41: 1243–1246.
 21. Steelman L., Pohnert S., Shelton J., Franklin R. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004; 18: 189–218.
 22. Harvey R., Mullighan C., Chen I., Wharton W. 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: 5312–5321.
 23. Ray R., Furlonger C., Williams D., Paige C. Characterization of thymic stromal derived lymphopoietin (TLSP) in murine B cell development *in vitro*. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 10–16.
 24. Russell L., Capasso M., Akasaka T., Bernard O. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009; 114: 2688–2698.
 25. Hertzberg L., Vendramini E., Ganmore I., Cazzaniga G. Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM study group. *Blood* 2010; 115: 1006–1017.
 26. Graux C., Cools J., Michaux L. i wsp. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia* 2006; 20: 1496–1510.
 27. Ferrando A., Neuberg D., Staunton J. i wsp. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2002; 1: 75–87.
 28. Coustan-Smith E., Mullighan C., Onciu M. i wsp. Early T cell precursor leukemia: a subtype of a very high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 147–156.
 29. Cave H., Suci S., Preuhomme C. i wsp. Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX 11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood* 2004; 103: 442–450.
 30. Riz I., Hawley R. G1/S transcriptional networks modulated by the HOX11/TLX1 oncogene of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* 2005; 24: 5561–5575.
 31. Van Grotel M., Meijerink J.P., van Wering E.R. i wsp. Prognostic significance of molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL is not explained by immunophenotypic differences. *Leukemia* 2008; 22: 124–131.
 32. Dreyling M., Martinez-Climent J., Zheng M. i wsp. The t(10;11)(p13;q14) in the u937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 4804–4809.
 33. Ferrando A., Armstrong S., Neuberg D. i wsp. Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor cell acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* 2003; 102: 262–268.
 34. Graux C., Cools J., Melotte C. i wsp. Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 2004; 36: 1084–1089.
 35. Weng A., Ferrando A., Lee W. i wsp. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004; 306: 269–271.
 36. Pear W., Radtke F. Notch signaling in lymphopoiesis. *Semin. Immunol.* 2003; 15: 69–79.
 37. Grabher C., von Boehmer H., Look A. Notch activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6: 347–359.
 38. Cayuela J., Madani A., Sanhes L. i wsp. Multiple tumor-suppressor gene 1 inactivation is the most frequent genetic alteration in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996; 87: 2180–2186.
 39. Shah N., Sawyers C. Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene* 2003; 22: 7389–7395.
 40. De Labarthe A., Rousselot P., Hugué-Rigal F. i wsp. Imatinib combined with induction or consolidation chemotherapy in patients with de novo Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: results of the GRAAPH-2003 study. *Blood* 2007; 109: 1408–1413.
 41. Schultz K., Bowman W., Aledo A. i wsp. Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group Study *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 5175–5181.
 42. Weisberg E., Manley P., Breitenstein W., Bruggen J. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* 2005; 7: 129–141.
 43. Pui C., Jeha S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2007; 6: 149–165.
 44. Guitierrez A., Sanda T., Grebliunaite R. i wsp. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Lancet Oncol.* 2009; 114: 647–650.