

Haematopoietic development and leukaemia in Down syndrome

Irene Roberts¹ and Shai Izraeli^{2,3}

¹Paediatrics and Molecular Haematology Unit, Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, Oxford, UK;

²Childhood Leukaemia Research Unit, Department of Paediatric Haemato-Oncology, Cancer Research Centre, Sheba Medical Centre, Ramat Gan, Israel;

³Department of human molecular genetics and biochemistry, Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel

Children with constitutional trisomy 21 (cT21, Down Syndrome, DS) are at a higher risk for both myeloid and B-lymphoid leukaemias. The myeloid leukaemias are often preceded by a transient neonatal pre-leukaemic syndrome, Transient Abnormal Myelopoiesis (TAM). TAM is caused by cooperation between cT21 and acquired somatic N-terminal truncating mutations in the key haematopoietic transcription factor *GATA1*. These mutations, which are not leukaemogenic in the absence of cT21, are found in almost one-third of neonates with DS. Analysis of primary human fetal liver haematopoietic cells and of human embryonic stem cells demonstrates that cT21 itself substantially alters human fetal haematopoietic development. Consequently, many haematopoietic developmental defects are observed in neonates with DS even in the absence of TAM. Although studies in mouse models have suggested a pathogenic role of deregulated expression of several chromosome 21-encoded genes, their role in human leukaemogenesis remains unclear. As cT21 exists in all embryonic cells, the molecular basis of cT21-associated leukaemias probably reflects a complex interaction between deregulated gene expression in haematopoietic cells and the fetal haematopoietic microenvironment in DS.

Keywords: trisomy 21, Down syndrome, acute lymphoblastic leukaemia, acute megakaryoblastic leukaemia, transient abnormal myelopoiesis, *GATA1*

Children with constitutional trisomy 21 (cT21, Down syndrome, DS) have a remarkably high risk of acute leukaemia [1]. The incidence of acute myeloid leukaemia (known as ML-DS) is c. 150 times greater in young children with DS compared to children of the same age without DS while the incidence of acute B-cell lymphoblastic leukaemia (B-ALL) is c. 33 times higher [1, 2]. The unique features of DS-associated leukaemias point to the crucial role played by cT21 in their pathogenesis and provide tractable models of human leukaemogenesis [3–5]. Here we discuss recent insights into the natural history and pathogenesis of acute leukaemia in children with DS with the major emphasis on the perturbation of fetal and postnatal haematopoietic development by T21, that may render haematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) more susceptible to leukaemic transformation.

DS-associated leukaemias – an overview

As we wish to focus on the aspects of perinatal haematopoiesis that may predispose children with DS to leukaemia, we will only summarize the main features of the leukaemias of DS. Several recent reviews are recommended for more detailed description of the clinical features of these leukaemias [3, 5–9].

DS-associated acute lymphoid leukaemia

The lymphoid leukaemias of DS (DS-ALL) are almost exclusively B precursor ALLs. In a recent large series of DS-ALLs there were only five cases of T-ALL among 700 patients [9]. Also, in a

sharp contrast to the myeloid neoplasms, they almost never occur in infants. Clinically, the outcome of DS-ALL is significantly worse than the sporadic childhood B cell precursor ALLs because of intrinsic resistance to therapy and increased treatment-related mortality [5, 9].

While all known cytogenetic subgroups of childhood B ALLs can be found, the common abnormalities, *ETV6-RUNX1* fusion and hyperdiploidy, are less frequent in DS [9, 10]. Up to 60% of DS-ALLs have aberrant expression of the cytokine receptor *CRLF2* that is often associated with additional mutations activating JAK-STAT growth-promoting signalling [11–16]. The aberrant expression of this receptor is caused by genomic rearrangements consisting either of a translocation into the IgH locus control region or a micro-deletion upstream to the *CRLF2* gene, located on the pseudoautosomal part of the sex chromosomes. This deletion fuses *CRLF2* with the promoter of an upstream constitutively expressed *P2RY8* gene. Analysis of the breakpoint sequences suggest that this rearrangement is mediated by *RAG1* or *RAG2* in early B cell precursors [12].

DS-associated acute myeloid leukaemia

The myeloid leukaemias of DS were given a special world Health Organization (WHO) sub-classification (ML-DS) because of their unique clinical and biological features [17, 18]. Immunophenotypically, these are erythro-megakaryoblastic leukaemias [6, 19], are diagnosed before the age of 5 years and often present with unexplained thrombocytopenia and/or myelodysplasia. Most evidence indicates that ML-DS is always preceded by the neonatal pre-leukaemic syndrome Transient Abnormal Myelopoiesis (TAM; also known as Transient Myeloproliferative Disorder) that may, or may not, be clinically apparent. Unlike acute megakaryoblastic leukaemias (AMKL) in non-DS patients, they usually respond well to therapy with most patients being cured. The mechanism of this exquisite sensitivity to chemotherapy, particularly cytosine arabinoside (Ara-C), is unclear although many hypotheses have been suggested [20–22].

Correspondence:

Professor Irene Roberts, Department of Paediatrics and Molecular Haematology Unit, Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, Oxford OX3 9DS, UK
E-mail: irene.roberts@paediatrics.ox.ac.uk

Professor Shai Izraeli, Childhood Leukaemia Research Unit, Department of Paediatric Haemato-Oncology, Cancer Research Centre, Sheba Medical Centre, Tel Hashomer, Ramat Gan 52621, Israel
E-mail: sizraeli@sheba.health.gov.il

Genetically, ML-DS are characterized by an acquired mutation in the *GATA1* gene, which will be discussed in detail below. The mutation in *GATA1* is necessary but insufficient for development of ML-DS. Recent exome sequencing studies of ML-DS revealed a high frequency of mutations in cohesins, CCCTC-binding factor (CTCF) or other chromatin regulators [23, 24]. While the normal function of these proteins is incompletely understood, they are believed mainly to organize major areas of transcription along and between chromosomes. Why these mutations are especially common in ML-DS is unclear but they may be related to the presence of trisomy. The other type of mutations, believed to enhance growth and proliferation, are in common signalling pathways, such as RAS and the thrombopoietin receptor MPL or downstream JAK-STAT signalling [23, 24]. Importantly, genomic analysis of ML-DS confirmed that it evolves from the cells responsible for TAM.

A clinical pre-leukaemic syndrome: transient abnormal myelopoiesis

While it is clear that most childhood leukaemias arise from molecularly identifiable pre-leukaemic cells [25], in children with DS the pre-leukaemic syndrome can be clinically diagnosed. Most children who present with ML-DS have a history of overt TAM in the neonatal period [26]. Conventionally, TAM has been defined by its clinical and haematological features as a transient, clonal, neonatal myeloproliferative disorder unique to DS [3, 27]. The defining feature used in the WHO classification [18] and most studies, is the presence of increased peripheral blood blast cells [26, 28], although we now know that this definition is too non-specific because virtually all neonates with DS have in-

creased peripheral blood blast cells [29]. While a high percentage of blast cells ($> 20\%$) remains a good guide to a probable diagnosis of TAM, the most specific diagnostic parameter for TAM is the presence of an acquired mutation in exon 2 or 3 of the *GATA1* gene [3, 24, 29–33]. While in many cases, neonates with a *GATA1* mutation have clinical and haematological features consistent with classical descriptions of TAM, we have recently suggested the term 'silent TAM' for the equally common scenario of DS neonates who have a *GATA1* mutation, usually because the size of the mutant *GATA1* clone is very small [29].

Epidemiology

Estimates of the frequency of TAM vary from < 5 to 30% of neonates with DS, depending on the diagnostic criteria used and the study design. The lowest frequency (3.8%) was found in a large systematic *GATA1* mutation screen by Sanger sequencing of PCR products [34]. This low frequency probably reflects the relatively insensitive methodology, as the recent prospective study in 200 neonates with DS found a frequency of *GATA1* mutations of 8.5%, using a combination of standard Sanger sequencing with direct high performance liquid chromatography (dHPLC), which matches the 5–10% prevalence of TAM diagnosed by clinical and haematological criteria in most studies [3]. Interestingly, very sensitive next generation sequencing (NGS) methodology, which allows very small mutant *GATA1* clones to be detected ($\geq 0.3\%$), identified *GATA1* mutations in 30% of all neonates with DS, at least half of which are 'silent' [29].

Clinical features of TAM

Classical TAM has a variable clinical presentation (Table 1). Occasionally, TAM presents in fetal life, where it may lead to in-

Table 1. Clinical features of TAM*

Clinical features	Comments
Jaundice	Very common. Although present in the majority of neonates with TAM, jaundice is also seen in almost 50% of DS neonates without TAM
Hepatosplenomegaly	Common. Hepatomegaly or hepatosplenomegaly is more common than isolated splenomegaly
Rash	Uncommon. Non-specific appearance. Presence of a rash is highly suggestive of TAM although rashes also occur in DS neonates without TAM
Pleural and/or pericardial effusions, and/or ascites	Effusions are reported in up to 25% of cases of clinically overt TAM
Bleeding diathesis	Bleeding occurs in c. 10% of cases; the cause is multifactorial and includes thrombocytopenia, liver dysfunction and disseminated intravascular coagulation
Hepatic fibrosis with or without hepatic failure	Uncommon. Occasional neonates present with hepatic fibrosis despite relatively low numbers of circulating peripheral blood blasts
Renal dysfunction/renal failure	Uncommon (< 10%)
Hydrops fetalis	Although TAM is rarely reported to present as hydrops fetalis, some cases of TAM may be missed as <i>GATA1</i> mutation analysis is not always performed
Asymptomatic	c. 20% of neonates with TAM have no typical clinical features of TAM

* Clinical features seen in neonates with DS who have a *GATA1* mutation detectable by direct sequencing and/or dHPLC. These data have been compiled using data from J.Klusmann et al. [26], A.Gamis et al. [28] and I.Roberts et al. [29].

Table 2. Haematological features of TAM*

Haematological features	Comments
Leucocytosis	Common. Although present in the majority of neonates with TAM, leucocytosis is also seen in many DS neonates without TAM. Similarly, the leucocyte count is normal in at least a third of neonates with TAM
Peripheral blood blasts > 20%	Very common. Since almost all neonates with DS have peripheral blood blasts and c. 20% of neonates with TAM have $< 20\%$ blasts, the significance of the presence of blast cells on the peripheral blood film can only be determined by carrying out <i>GATA1</i> mutation analysis (see text)
Neutrophilia	Common. Neutrophilia is also found in 25% of neonates with DS who do not have a <i>GATA1</i> mutation
Eosinophilia	Uncommon (10–16%)
Thrombocytopenia	Common. Thrombocytopenia occurs at a similar frequency in TAM as in DS neonates without a <i>GATA1</i> mutation and more than one-third of neonates with TAM are not thrombocytopenic
Anaemia	Uncommon (c. 10%)

* Haematological features seen in neonates with DS who have a *GATA1* mutation detectable by direct sequencing and/or dHPLC. These data have been compiled using data from J.Klusmann et al. [26], A.Gamis et al. [28], I.Roberts et al. [29] and A.Maroz et al. [37].

trauterine or neonatal death [26, 28, 35]. More often, TAM presents in the first few days of life, where the presentation varies from asymptomatic alterations in the blood count and/or blood film to disseminated leukaemic infiltration. Clinically severe TAM (liver failure/fibrosis, ascites, pleural/pericardial effusion, renal failure and/or coagulopathy) affects 10–30% of patients with clinically diagnosed TAM [26, 28, 29, 36].

Haematological features of TAM

The most common haematological findings are a raised leucocyte count with increased peripheral blood blast cells, neutrophils, basophils and myelocytes [29] (Table 2). Some neonates with TAM also have eosinophilia [37]. There is no difference in platelet count between DS neonates with and without TAM and very few neonates with TAM are anaemic [28, 29]. Importantly, no haematological features are specific for TAM except for large numbers of circulating blasts (Fig. 1). Although there is no specific blast % threshold which reliably identifies all cases of TAM in DS neonates, we have found that the presence of blasts > 20% on a peripheral blood film is invariably associated with a *GATA1* mutation and hence a diagnosis of TAM. By contrast, the significance of blasts < 20% in a neonate with DS can only be assessed by carrying out *GATA1* mutation analysis.

Silent TAM

Around 20% of neonates with DS have *GATA1* mutations that are clinically and haematologically silent ('silent TAM'). These neonates have no features which differentiate them from DS neonates who have no *GATA1* mutations. Notably, neonates with DS have a high frequency of jaundice and thrombocytopenia even in the absence of *GATA1* mutations. Usually, but not always, the small mutant *GATA1* clones found in 'silent TAM' can only be detected using very sensitive methods, such as NGS [29].

Natural history of TAM

Retrospective clinical studies show that most cases of classical TAM spontaneously resolve within a few weeks or months of birth [26, 28]. A small proportion of babies with TAM will die from their disease, usually due to liver failure caused by hepatic fibrosis and blast cell infiltration [26, 28]. Previous studies showing a mortality rate of c. 20% in TAM are likely to have been over-estimated, as the diagnosis of TAM was based on clinical and haematological criteria and milder or asymptomatic cases were likely to have been missed. Estimates of the risk of ML-DS following TAM vary from 5% in the recent prospective study [29] to 30% in retrospective studies of clinically diagnosed TAM [26, 28, 36, 38]. No specific clinical, haematological or molecular features predict the risk of transformation to ML-DS. A fuller picture of the natural history of TAM will require prospective studies of children with DS with and without *GATA1* mutations up to the age of 5 years (beyond this age, ML-DS is exceptionally rare [39]).

Diagnosis and monitoring of neonates with TAM

Given that DS neonates with a *GATA1* mutation (both clinically overt TAM and 'silent TAM') may develop ML-DS before the age of 5 years, the best way to identify all those at risk is to screen all neonates with DS for *GATA1* mutations using a combination of standard (e.g., direct Sanger sequencing and dHPLC) and more sensitive techniques (e.g., NGS). *GATA1* mutation analysis

may also be useful in the acute setting to identify atypical cases of TAM, e.g., where the presentation is predominantly one of liver involvement with non-specific haematological features. The role of serial monitoring of the mutant *GATA1* clone in neonates with TAM is unclear and is currently being investigated.

Molecular pathogenesis of TAM

We, and others, have shown that virtually all cases of TAM and ML-DS have N-terminal truncating *GATA1* mutations [30–33, 40–42]. *GATA1* mutations are present at birth both in DS neonates with TAM and, through retrospective analysis of neonatal blood spots, also in children with ML-DS without a previous history of TAM [33]. It is not yet clear at what stage in fetal development *GATA1* mutations arise as the earliest point in gestation at

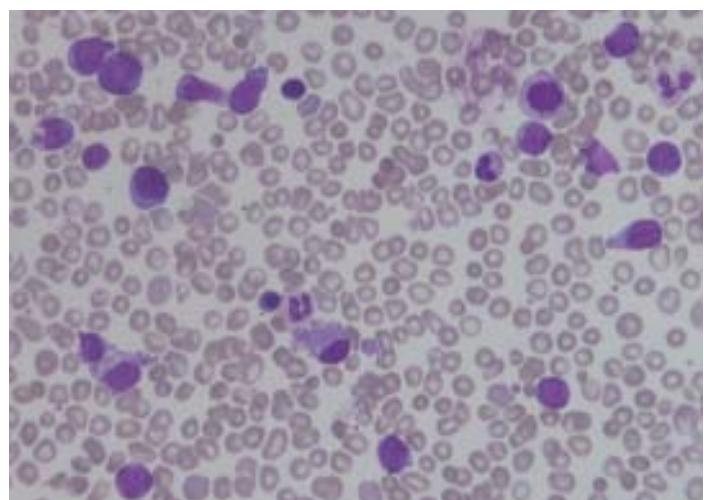


Fig. 1. Peripheral blood film from a neonate with DS and a clinical and haematological diagnosis of TAM confirmed by the presence of a mutation in exon 2 of the *GATA1* gene. The film shows large numbers of blasts as well as giant platelets and circulating megakaryocytes.

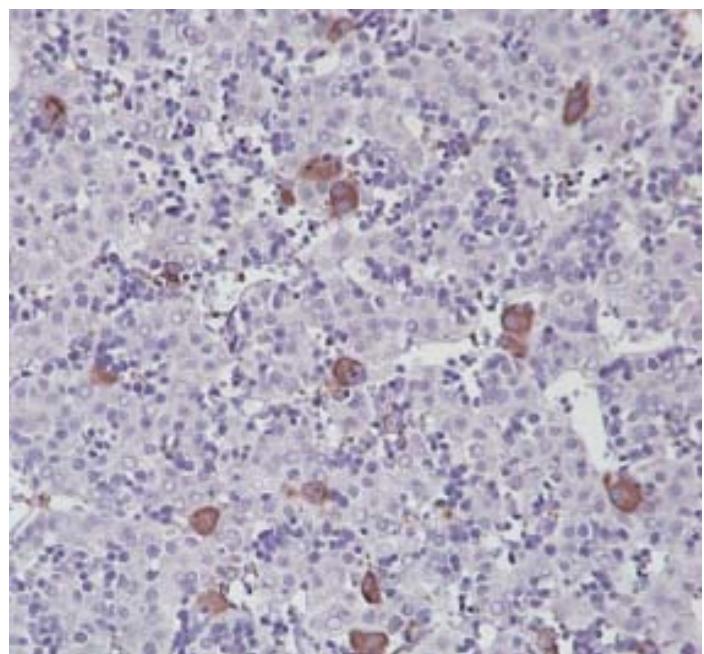


Fig. 2. Increased megakaryopoiesis in cT21 fetal liver in the absence of acquired *GATA1* mutations. Representative image from a second trimester cT21 fetal liver paraffin-embedded section stained with the megakaryocyte marker CD42b (brown).

which mutations have been identified is 21 weeks [43]. *GATA1* mutations disappear when TAM (or ML-DS) enters remission, indicating that these are acquired events [24, 33]. Given that N-terminal truncating *GATA1* mutations are not leukaemogenic in the absence of cT21 [44] and do not appear to cause leukaemia in children with DS over the age of 5 years [39], this strongly implicates unique features of cT21 fetal haematopoiesis in the transforming activity of mutant *GATA1*.

The reason(s) for the high frequency of *GATA1* mutations in neonates with DS are not known. It is notable that *GATA1* mutations are not only found in c. 30% of all DS neonates but also that there are multiple mutant *GATA1* clones in 10–20% of these cases [29, 42]. It seems likely that the N-terminal truncated (short) GATA1 protein (*GATA1s*) confers a selective growth advantage to fetal haematopoietic cells harbouring mutant *GATA1*-containing clones. Alternatively, or in addition, trisomic cells may have a ‘mutator phenotype’ due to chromosomal instability. Evidence for a role of chromosomal instability in DS malignancies is conflicting [45, 46]. The low frequency of most types of solid tumour in DS [1] suggests that, in contrast to acquired aneuploidies, cT21 is not generally associated with a ‘mutator phenotype’ although it is possible that cT21 induces high mutation rates only at specific genomic loci (e.g., *GATA1*), as in the kataegis phenotype [47].

Most of the mutations (97%) are found in exon 2 of the *GATA1* gene, including insertions, deletions and point mutations, the remainder occurring in exon 3.1 [42]. All mutations lead to expression of a truncated *GATA1s* protein [32, 40]. The type of mutation does not predict which patients with TAM will later progress to ML-DS [42]. Indeed, whole exome/genome sequencing of paired TAM and ML-DS samples indicates that ML-DS may develop not only from major *GATA1* sub-clones present in the TAM phase of the disease but also from minor mutant *GATA1* clones [24]. This approach has also shown that TAM samples contain very few somatic mutations (mean < 2) compared to other cancers [23, 24]. Thus, cT21 and mutated *GATA1* are both necessary and sufficient for generation of TAM.

How *GATA1s* contributes to the TAM phenotype is unclear. Originally it was believed that the loss of this ‘trans-activation’ domain reduces the activity of *GATA1* in regulating the terminal differentiation of megakaryocytes, thereby leading to accumulation of poorly differentiated megakaryocytic progenitors [40]. Yet it is highly interesting that inherited mutations in the zinc fingers of *GATA1*, which cause anaemia and thrombocytopenia due to a block in megakaryocyte-erythroid differentiation, are not found in TAM or ML-DS [48]. Rare patients with inherited *GATA1s* mutations and anaemia have been recently reported. These patients do not develop leukaemia [44, 49, 50]. This suggests that both the DNA binding and protein interaction zinc finger domains, preserved in *GATA1s* and cT21 are necessary for leukaemic transformation. Furthermore, forced expression of *GATA1s* in fetal liver haematopoietic progenitors from *Gata1* wild type (wt) mice causes marked expansion of megakaryoblastic progenitors, supporting a gain of function mechanism [51, 52]. J.Klusmann et al. [53] suggested that *GATA1s* enhances fetal haematopoietic cell proliferation through relieving the suppressive effect of *GATA1* on E2F1 and collaboration with the insulin-like growth factor (IGF) signalling pathway. Supporting this hypothesis is the recent report of a mutated *GATA1* lacking just the E2F1 interaction domain in the amino terminus of *GATA1* [52].

Abnormal fetal haematopoiesis in Down syndrome

Most evidence indicates that *GATA1* mutations arise exclusively in fetal liver HSPC. TAM, where it is clinically overt, manifests with involvement of the liver rather than bone marrow [26, 28, 35, 43]. Acquisition of *GATA1* mutations selectively in fetal liver HSPC is, arguably, the most logical explanation both for the spontaneous remission of the majority of *GATA1* mutant clones within the first few months of life and for the rarity of leukaemia due to *GATA1* mutations in children with DS after their fifth birthday. Similarly, there is no good evidence that TAM can be initiated after the first few months of life, presumably because the relevant ‘susceptible’ HSPC populations, and/or supportive microenvironment, are no longer present. This correlative evidence from humans for the exclusive function of *GATA1s* mutants in the fetal liver environment is further strengthened by the analysis of *GATA1s* knock-in mice [54]. These mice display a transient wave of fetal megakaryoblastic proliferation without apparent postnatal haematological abnormalities.

Increased megakaryocyte-erythroid progenitors in DS fetal liver

It is now clear from studies in primary human fetal liver cells [55–57], human embryonic stem cells (hESC) and trisomic induced pluripotent stem cells (iPSC) [58, 59] that the presence of cT21 alters the balance of HSPC differentiation. Notably, megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP) and megakaryocytes (Fig. 2) are increased in cT21 fetal liver and exhibit enhanced proliferative properties *in vitro* compared to disomic cells [57]. These data support the contention that cT21 itself promotes abnormal megakaryocyte-erythroid expansion of fetal liver cells and that the somatic mutation of *GATA1* transforms these progenitors to generate clonal congenital transient leukaemia or TAM [60].

Increased numbers of megakaryocyte-erythroid biased HSC in DS fetal liver

To investigate whether the abnormalities in DS fetal liver are confined to committed myeloid progenitors (MEP and CMP) or extend to include the HSC and/or multipotential progenitor (MPP) compartment, we recently performed detailed immunophenotypic and functional analysis of the HSC/MPP, committed myeloid progenitor and B-lymphoid compartments of human cT21 fetal liver without *GATA1* mutations and compared these with normal human fetal liver [57]. This showed that in DS, immunophenotypically-defined HSC (CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁺) are increased in fetal liver and that *in vitro* purified HSC display an erythroidmegakaryocyte biased gene expression signature and generate much larger numbers of megakaryocyte and erythroid lineage progenitor cells than normal fetal liver HSC [57]. Whether cT21-driven proliferation of megakaryocyte-biased HSC and/or progenitor cells increases the likelihood of acquiring *GATA1* mutations or simply leads to a survival advantage of those cells that acquire such mutations is still unclear. However, all available evidence indicates that cT21-mediated perturbation of fetal liver haematopoiesis is an essential prerequisite for the leukaemogenic properties of N-terminal truncating *GATA1* mutations.

Perturbation of B cell development in DS fetal liver

There is no overall increase in the HSCP compartment in DS fetal liver, which suggested that megakaryocyte-erythroid expansion

sion might compromise the development of other lineages. Indeed, we found reduced numbers of both granulocyte-monocyte progenitors (GMP) and B-cell progenitors (BCP) in second trimester fetal liver [57]. B-lymphoid development was severely impaired with c. 10-fold reduction in pre-pro BCP as well as markedly reduced B-cell potential of HSC in tandem with reduced HSC lymphoid gene expression priming. We speculate that perturbation of fetal B-cell development in DS may underlie both the immune deficiency common in children with DS [61] and also the increased susceptibility to B-ALL [2, 9, 62]. It is possible that a peri- or post-natal compensatory drive to B-lymphopoiesis increases the likelihood of acquiring leukaemogenic mutations in young children with DS.

Studies of haematopoiesis in hESC and iPSC

G.MacLean et al. [59] recently showed that cT21 hESC and iPSC that were differentiated under fetal liver-like conditions generate increased erythroid and megakaryocyte colony-forming cells compared to isogenic disomic clones, supporting the findings in primary human fetal liver cells [57]. Interestingly, with the aim of modelling yolk sac haematopoiesis, S.Chou et al. [58] differentiated cT21 iPSC under broadly similar conditions and showed enhanced erythropoiesis but with normal megakaryocyte production and reduced myelopoiesis [58]. These data suggest that the effects of cT21 might be developmental stage-specific. Whether this has an impact on the timing of acquisition of *GATA1* mutations and their functional consequences remains to be determined.

Role of the microenvironment in abnormal fetal haematopoiesis in DS

Although, clinical and biological evidence suggests that fetal liver is likely to provide the specialized microenvironment necessary for driving and/or maintaining abnormal haematopoiesis in DS, the factors responsible for perturbing haematopoiesis in DS are not known. Similarly, it is not clear whether cT21 influences the support function of the fetal liver microenvironment. There is some evidence that altered responsiveness to IGFs might play a role. In the mouse, fetal HSC expansion is supported by IGF2, produced by unique fetal liver stromal cells, in contrast to adult bone marrow HSPC, which depend on osteoblast-derived IGF1 [63–65]. Similarly, murine fetal, but not adult, megakaryocyte progenitors are dependent for their survival and proliferation on the IGF signalling pathway, as are ML-DS and TAM cells [53]. Thus, developmentally-regulated IGF signalling mediated by cells of the fetal liver microenvironment may contribute to the HSC megakaryocyte-erythroid bias and MEP expansion in DS fetal liver, although how this is linked to cT21 is unclear.

Post-natal haematopoiesis in Down syndrome

Haematological abnormalities in neonates with DS

Retrospective studies have reported that haematological abnormalities occur more frequently in neonates with DS [66–68], raising the possibility that cT21 may continue to exert effects on haematopoiesis in post-natal life. Consistent with this, a recent prospective study in 200 neonates with DS showed that all of them had haematological abnormalities (Table 3) compared to neonates of the same gestational and post-natal age without DS

Table 3. Haematological abnormalities in neonates with DS compared to neonates without DS

Haematological abnormality
Erythropoiesis
Increased haemoglobin and haematocrit
Increased mean cell volume (MCV)
Peripheral blood erythroblastosis
Dyserythropoiesis (e.g., target cells, macrocytes, basophilic stippling)
Leucocytes
Increased leucocytes
Increased neutrophils
Increased monocytes
Increased basophils
Increased peripheral blood blasts
Reduced lymphocytes
Dysplastic neutrophils and monocytes
Platelets
Reduced platelet count
Giant platelets
Circulating megakaryocytes and/or megakaryocyte fragments

[29]. Furthermore, many of these abnormalities mirrored those seen in DS fetal liver haematopoiesis (see above) and were present even in the absence of *GATA1* mutations. Neonates with DS had higher haemoglobin concentrations, increased circulating erythroblasts and abnormal red cell morphology, including macrocytosis, target cells and basophilic stippling; median platelet counts were also lower than normal in DS, thrombocytopenia was common and, although the median mean platelet volume was similar to neonates without DS, platelet morphology was abnormal (giant platelets, circulating megakaryocytes and/or megakaryocyte fragments) in > 95% of cases [29]. Interestingly, neonates with DS had higher numbers of granulocytes and monocytes despite the reduction in GMP in fetal liver [57], perhaps reflecting greater reliance on bone marrow haematopoiesis in late gestation and after birth. The total lymphocyte count was reduced in the DS neonates, consistent with previous studies in older children with DS [69–71].

Haematological abnormalities in older children and adults with DS

In contrast to the well-defined epidemiology of acute leukaemias, which in total affect c. 3% of children with DS, little is known about the haematology of the majority of individuals with DS who do not develop leukaemia. The most commonly reported abnormalities are red cell macrocytosis [72, 73] and qualitative and quantitative abnormalities of B- and T-lymphocytes [69–71, 74–76].

The only large study, in 147 adults with DS (mean age 42.2 years; range 16–76 years), reported that these individuals had a higher mean cell volume (MCV, 99.28 fl) compared to healthy controls and that almost 50% had a MCV above the upper limit of the normal range [77]. These data, with the consistent finding of macrocytosis in all of the mouse models of DS [78–80], provide strong evidence for a role of abnormal expression of one or more genes on chromosome 21 (Hsa21) in the pathogenesis of the macrocytosis. Interestingly, of the nine patients with DS investigated by S.McLean et al. [81], two had a diagnosis of myelodysplasia, one of whom developed progressive bone marrow failure. The study by V.Prasher [77] also commented that 7/147 (4%) individuals with DS had unexplained thrombocytopenia and 29/147 (20%) had unexplained neutropenia, none of whom had undergone haematological assessment, raising the possibility that a far greater proportion of adults with DS may have undiag-

nosed myelodysplasia or bone marrow failure than hitherto appreciated.

A number of studies have shown that children with DS have a high frequency of lymphopenia with a progressive decline in B and T cell lymphocyte numbers during childhood [69, 70]. Consistent with this, children with DS have increased susceptibility to infection and to autoimmune disorders [75, 76, 82]. B and T lymphocyte function may also be abnormal as small studies reported evidence of abnormal thymic maturation, impaired lymphocyte activation and variable degrees of immunoglobulin deficiency [74, 83, 84].

In summary, the occurrence of multilineage haematological abnormalities in neonates, children and adults with DS strongly suggest that cT21 perturbs haematopoiesis throughout life. The effects of cT21 differ at different stages of development. This may reflect age-related changes in the haematopoietic microenvironment, in the HSPC themselves or both.

Molecular basis for perturbation of haematopoiesis by cT21

The direct aetiological link between cT21 and leukaemia, both in DS and in leukaemias where T21 is an acquired abnormality [85], provide a strong rationale for investigating how an additional copy of Hsa21 specifically alters HSPC development. T21 may exert its effects in several different ways. First, trisomic genes on Hsa21 may directly influence HSPC behaviour through gene dosage of one or more Hsa21 genes important for HSPC proliferation, differentiation or survival (Table 4) although a recent study makes it clear that Hsa21 potentially alters the expression of multiple genes on virtually any (or all) of the disomic chromosomes [86]. These effects of Hsa21 may be haematopoietic cell autonomous and/or they may be mediated via other cell types, for example of the microenvironment. Secondly, the physical presence of an additional chromosome (as a cellular response to aneuploidy that may or may not be a specific response to T21) may alter the chromatin environment in some way thereby perturbing gene expression. For example, widespread gene methylation changes were reported in ML-DS [87]. A recent study of mouse models and human DS-ALL revealed dramatic reduction of the repressive methylation of Histone 3 lysine 27, suggested to be at least partially related to the increased expression of the Hsa21 gene *HMGN1* [88]. Furthermore the widespread gene

expression abnormalities in disomic chromosomes in cT21 cells were shown to be arranged in specific domains, suggesting an epigenetic chromatin regulatory mechanism [86]. This phenomenon, coupled with inter-individual differences in gene expression, may mask those due to Hsa21 and complicate the challenge of identifying the molecular basis of the effects of T21 on fetal haematopoiesis and leukaemia susceptibility.

In principle, an attractive approach to investigating leukaemia susceptibility is to study rare patients with partial (segmental) trisomy of Hsa21. J.Korbel et al. [89] used high-resolution breakpoint mapping and oligonucleotide DNA tiling arrays in 30 individuals with DS due to segmental cT21 to try to identify discrete regions of Hsa21 associated with specific DS phenotypes. They identified an 8.5 Mb region on Hsa21 linked to leukaemia risk which included several genes, such as *RUNX1*, *ERG* and *ETS2*, known to be associated with acute leukaemia [89]. However, conclusions from this are limited so far by the very small number of cases of leukaemia in the study. A similar approach has been used extensively in a series of elegant transgenic mouse models containing additional copies of all, or part, of mouse chromosomal regions syntenic with Hsa21 [78, 79, 88, 90] or of human Hsa21 [80].

Using mouse models to study the impact of trisomy 21

Ts65Dn mice, which are trisomic for c. 104 genes on mouse chromosome 16 (syntenic with Hsa21), develop a myeloproliferative disorder linked to overexpression of *ERG* [91], although this manifests in adult rather than fetal or neonatal mice [78]. More recently, a double transgenic mouse model was used to show that overexpression of *ERG* caused MEP expansion (analogous to that seen in human DS fetal liver) and that this synergized *in vivo* with expression of GATA1s to cause a TAM-like syndrome, which then progressed to myeloid leukaemia [92]. *ERG* has also been shown to promote megakaryopoiesis and induce megakaryoblastic leukaemia in the absence of a T21 background [51] although it is not yet clear that *ERG* is overexpressed in human cT21 fetal liver cells [57], hESC/iPSC [58, 59] or in ML-DS [93]. *DYRK1A* has also been implicated in the pathogenesis of ML-DS. Using a refined mouse model (Ts1Rhr) trisomic for 33 Hsa21 orthologues, S.Malinge et al. [90] recently produced T21-dependent ML-DS by crossing Ts1Rhr mice with GATA1s knock-in mice and over-expressing a transforming *MPL* allele (*MPL*^{W515L}). Using this model, both shRNA and gene expression profiling and functional studies identified *DYRK1A* (and possibly *CHAF1B*, *HLCS* and *ERG*) as mediators of abnormal megakaryopoiesis and showed that *DYRK1A* functioned as a megakaryoblastic tumour-promoting gene in the setting of partial T21 and GATA1s [90]. Using a similar approach, A.Lane et al. [88] recently identified *Hmgn1* as a lymphoid leukaemia susceptibility gene in the Ts1Rhr mouse.

The Tc1 mouse model, the only mouse model which contains Human chromosome 21 genes, develops macrocytic anaemia, splenomegaly and increased megakaryopoiesis but neither leukaemia nor a true myeloproliferative disorder [80]. More recently, multiple structural rearrangements/deletions have been identified in Tc1 mice, which may help to better refine the contribution of individual genes as it is now clear that 50 of the Hsa21 genes in this model, including *RUNX1*, are disomic [94]. Further studies using the newly characterized Tc1 mice (which have a copy of c. 80% of Hsa21 genes) and other mouse models are likely to

Table 4. Genes on human chromosome 21 with known functions in haematopoietic cells

Genes implicated in haematological malignancies
<i>CSTB</i>
<i>DYRK1A</i>
<i>ERG</i>
<i>ETS2</i>
<i>OLIG2</i>
<i>RUNX1</i>
<i>TIAM</i>
Other genes relevant to haematopoiesis
<i>AIRE</i>
<i>BACH1</i>
<i>CBG</i>
<i>DNMT3L</i>
<i>GABPA</i>
<i>IFNAR1</i> , <i>IFNAR2</i> and <i>IFNG2</i>
<i>RCAN1</i>
<i>SOD1</i>

provide important insight into the function of a number of Hsa21 genes although none of these models yet fully recapitulates the human disease.

Patterns of gene expression in human trisomy 21 cells

Hsa21 has c. 240 protein-coding genes and almost 340 short and long non-coding genes (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Chromosome?r=21). The functional correlation between levels of expression of Hsa21 genes and phenotype is not yet known and, as mentioned above, to a large extent will be tissue-specific and modulated by a number of factors, including cell lineage, developmental stage, differentiation status, cell cycle status, metabolic status and inter-individual differences.

For several cell types, including primary fetal heart and adult brain tissue and various fibroblast and lymphoblastoid cell lines as well as DS leukaemias, an average 1.5-fold increased level of expression of Hsa21 genes in trisomic compared to disomic samples has been reported [14, 95–100]. However, it is already clear that the predicted 1.5-fold increase in expression of each individual Hsa21 gene does not occur in any of the cell types investigated to date, even if the average expression of all genes on Hsa21 is c. 1.5-fold higher than disomic control cells [99]. For example the tricistron that includes MIR125B2, MIR99A and MIRLET7C is expressed in ML-DS and is not expressed in DS-ALL while it is expressed in other cytogenetic subtypes of ALL disomic for Hsa21 [101, 102]. One of the strongest pieces of evidence linking the level of expression of Hsa21 genes to cellular phenotype comes from very elegant experiments in which introduction of an inducible Xist transgene into the *DYRK1A* locus on Hsa21 in DS iPSC successfully induced transcriptional silencing of the genes on that chromosome in tandem with reversal of the trisomy 21-associated *in vitro* defects of neural cell development [103]. The effects on haematopoietic differentiation were not reported in this study and might not have been so dramatic given that differentiated trisomic human iPSC appear to display subtle, or no, differences in Hsa21 gene expression compared to their disomic counterparts, despite marked differences in their haematopoietic phenotype [58, 59].

Nevertheless, Hsa21 contains a relatively large number of Hsa21 genes that are either implicated in haematological malignancies (e.g., *CSTB*, *DYRK1A*, *ERG*, *ETS2*, *OLIG2*, *RUNX1* and *TIAM1*) or encode proteins known to play an important role in haematopoiesis (*AIRE*, *BACH1*, *SERPINA6* [*CBG*], *DNMT3L*, *GABPA*, *IFNAR1*, *IFNAR2*, *IFNGR2*, *RCAN1*, *SOD1* and *SON*) [90, 92, 104–107]. There are also five microRNAs (MIRS) on Hsa21, four of which are expressed in megakaryocyte lineage cells [102, 108, 109]. *RUNX1*, for example, is a tumour suppressor in acute myeloid leukaemia (AML) in individuals without DS [110] and the three copies in cT21 are inconsistent with development of leukaemia. Indeed *RUNX1* expression is lower in ML-DS compared with non-DS AMKL [93], and is not increased in fetal liver CD34⁺ cells [57] or cT21-derived hESC or iPSC [58, 59]. Similarly, *ERG*, a potent megakaryoblastic oncogene in murine models, as discussed above, has not yet been found to be increased in human cT21 fetal haematopoietic or leukaemic cells [57, 93]. In summary, although there is no direct evidence that cT21-associated changes in expression of any of these genes in primary haematopoietic cells is able to induce leukaemic transfor-

Table 5. Proposed pre-leukaemic haematopoietic defects caused by cT21 in DS*

Myeloid compartment
Fetal liver expansion of haematopoietic stem cells and megakaryocytic-erythroid progenitors
DNA promoter hypomethylation
Increased expression of genes implicated in erythro-megakaryocytic development and transformation
Suppression of the NFAT pathway by <i>DYRK1A</i> and <i>RCAN1</i> overexpression
Lymphoid compartment
Fetal B cell developmental defect with accumulation of pro-B progenitors
Increased transformability of cT21 B cell progenitors
Increased V(D)J mediated chromosomal rearrangements (e.g., <i>CRLF2</i>) due to developmental arrest in precursor B cell stage
Decreased tri-methylation of lysine 27 of histone 3, possibly caused by increased expression of <i>HMGN1</i>
Suppression of NFAT pathway may explain the rarity of T-ALLs

NFAT – nuclear factor of activated T-cells.

* Based on somewhat speculative interpretation of studies of mouse and human models described in this review.

mation, they remain important candidate genes to investigate as their role may only be evident by looking in well-defined HSC or progenitor populations.

Summary and conclusions

Recent data from primary human fetal liver, as well as hESC and iPSC, show that T21 itself alters human fetal HSC and progenitor biology, causing multiple defects in megakaryocyte/erythroid and B lymphoid lineage development. These data provide clues to mechanisms by which T21, or aneuploidy in general, may perturb haematopoietic cell growth and differentiation and a model with which to investigate these. The molecular basis of these effects is likely to be complex, to be both tissue- and lineage-specific and to be dependent on the fetal liver, and possibly bone marrow, microenvironment.

How these abnormalities set the stage for haematological malignancies in DS is clearer for the myeloid leukaemias but less well understood for the lymphoid leukaemias (Table 5). There is good evidence that cT21-driven fetal expansion of mega-erythroid stem and progenitor cells predisposes to malignant transformation by an acquired mutated GATA1s protein. It is possible that the relative block in B cell development, together with the associated epigenetic abnormalities and enhanced sensitivity of these B cell precursors to malignant transformation, as suggested by mouse models, explains the high prevalence of lymphoid leukaemias in DS.

Acknowledgements

The authors would like to thank members of the Israeli, Roberts, Vyas and Karadimitris laboratories as well as our national and international collaborators. This work is supported by Leukaemia Lymphoma Research (IR), Children with Cancer (IR, SI), Kay Kendall Leukaemia Fund (IR) and Leuka (IR), Israel Science Foundation Legacy and iCORE programs (SI), US-Israel Bi-national Science Foundation (SI), Israel Cancer Research Foundation (SI), WLBB and Waxman Foundations (SI), Swiss Bridge Foundation (SI), German Israeli Foundation (SI) and the Shapiro Chair of haematological malignancies in Tel Aviv University (SI).

Author contributions

IR and SI wrote the paper.

References

1. Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet.* 2000;355(9199):165-9.
2. Zipursky A. Susceptibility to leukemia and resistance to solid tumors in Down syndrome. *Pediatr Res.* 2000;47(6):704.
3. Malinge S, Izraeli S, Crispino JD. Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. *Blood.* 2009;113(12): 2619-28.
4. Roy A, Roberts I, Norton A, Vyas P. Acute megakaryoblastic leukaemia (AMKL) and transient myeloproliferative disorder (TMD) in Down syndrome: a multi-step model of myeloid leukaemogenesis. *Br J Haematol.* 2009;147(1):3-12.
5. Izraeli S, Vora A, Zwaan CM, Whitlock J. How I treat ALL in Down's syndrome: pathobiology and management. *Blood.* 2014;123(1):35-40.
6. Zwaan MC, Reinhardt D, Hitzler J, Vyas P. Acute leukemias in children with Down syndrome. *Pediatr Clin North Am.* 2008;55(1):53-70.
7. Taga T, Saito AM, Kudo K, Tomizawa D, Terui K, Moritake H, et al. Clinical characteristics and outcome of refractory/relapsed myeloid leukemia in children with Down syndrome. *Blood.* 2012;120(9):1810-5.
8. O'Brien MM, Cao X, Pounds S, Dahl GV, Raimondi SC, Lacayo NJ, et al. Prognostic features in acute megakaryoblastic leukemia in children without Down syndrome: a report from the AML02 multicenter trial and the Children's Oncology Group Study POG 9421. *Leukemia.* 2013;27(3):731-4.
9. Buitenkamp TD, Izraeli S, Zimmermann M., Forestier E, Heerema NA, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. *Blood.* 2014;123(1):70-7.
10. Forestier E, Izraeli S, Beverloo B, Haas O, Pession A, Michalová K, et al. Cytogenetic features of acute lymphoblastic and myeloid leukemias in pediatric patients with Down syndrome: an iBFM-SG study. *Blood.* 2008;111(3):1575-83.
11. Bercovich D, Ganmore I, Scott LM, Wainreb G, Birger Y, Elimelech A, et al. Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *Lancet.* 2008;372(9648):1484-92.
12. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, Loudin MG, Liu W, Zhang J, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2009;41(11):1243-6.
13. Russell LJ, Capasso M, Vater I, Akasaka T, Bernard OA, Calasanz MJ, et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2009;114(13):2688-98.
14. Hertzberg L, Vendramini E, Ganmore I, Cazzaniga G, Schmitz M, Chalker J, et al. 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(5):1006-17.
15. Shochat C, Tal N, Bandapalli OR, Palmi C, Ganmore I, te Kronnie G, et al. Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *J Exp Med.* 2011;208(5):901-8.
16. Tal N, Shochat C, Geron I, Bercovich D, Izraeli S. Interleukin 7 and thymic stromal lymphopoietin: from immunity to leukemia. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(3):365-78.
17. Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, Baumann I, Bennett JM, Kerndrup G, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia.* 2003;17(2):277-82.
18. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114(5):937-51.
19. Langebrake C, Creutzig U, Reinhardt D. Immunophenotype of Down syndrome acute myeloid leukemia and transient myeloproliferative disease differs significantly from other diseases with morphologically identical or similar blasts. *Klin Pädiatr.* 2005;217(3):126-34.
20. Ge Y, Jensen TL, Stout ML, Flatley RM, Grohar PJ, Ravindranath Y, et al. The role of cytidine deaminase and GATA1 mutations in the increased cytosine arabinoside sensitivity of Down syndrome myeloblasts and leukemia cell lines. *Cancer Res.* 2004;64(2):728-35.
21. Ge Y, Stout ML, Tatman DA, Jensen TL, Buck S, Thomas RL, et al. GATA1, cytidine deaminase, and the high cure rate of Down syndrome children with acute megakaryocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(3):226-31.
22. Edwards H, Xie C, LaFiura KM, Dombkowski AA, Buck SA, Boerner JL, et al. RUNX1 regulates phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: role in chemotherapy sensitivity in acute megakaryocytic leukemia. *Blood.* 2009;114(13):2744-52.
23. Nikolaev SI, Santoni F, Vannier A, Falconnet E, Giarin E, Basso G, et al. Exome sequencing identifies putative drivers of progression of transient myeloproliferative disorder to AMKL in infants with Down syndrome. *Blood.* 2013;122(4):554-61.
24. Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, et al. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet.* 2013;45(11):1293-9.
25. Greaves M. Pre-natal origins of childhood leukemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 2003;7(3):233-45.
26. Klusmann JH, Creutzig U, Zimmermann M, Dworzak M, Jorch N, Langebrake C, et al. Treatment and prognostic impact of transient leukemia in neonates with Down syndrome. *Blood.* 2008;111(6):2991-8.
27. Zipursky A. Transient leukaemia—a benign form of leukaemia in newborn infants with trisomy 21. *Br J Haematol.* 2003;120(6):930-8.
28. Gamis AS, Alonso TA, Gerbing RB, Hilden JM, Sorrell AD, Sharma M, et al. Natural history of transient myeloproliferative disorder clinically diagnosed in Down syndrome neonates: a report from the Children's Oncology Group Study A2971. *Blood.* 2011;118(26):6752-9.
29. Roberts I, Alford K, Hall G, Juban G, Richmond H, Norton A, et al. GATA1-mutant clones are frequent and often unsuspected in babies with Down syndrome: identification of a population at risk of leukemia. *Blood.* 2013;122(24): 3908-17.
30. Groet J, McElwaine S, Spinelli M, Rinaldi A, Burtscher I, Mulligan C, et al. Acquired mutations in GATA1 in neonates with Down's syndrome with transient myeloid disorder. *Lancet.* 2003;361(9369):1617-20.
31. Hitzler JK, Cheung J, Li Y, Scherer SW, Zipursky A. GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood.* 2003;101(11):4301-4.
32. Rainis L, Bercovich D, Strehl S, Teigler-Schlegel A, Stark B, Trka J, et al. Mutations in exon 2 of GATA1 are early events in megakaryocytic malignancies associated with trisomy 21. *Blood.* 2003;102(3):981-6.
33. Ahmed M, Sternberg A, Hall G, Thomas A, Smith O, O'Meara A, et al. Natural history of GATA1 mutations in Down syndrome. *Blood.* 2004;103(7):2480-9.
34. Pine SR, Guo Q, Yin C, Jayabose S, Druschel CM, Sandoval C. Incidence and clinical implications of GATA1 mutations in newborns with Down syndrome. *Blood.* 2007;110(6):2128-31.
35. Heald B, Hilden JM, Zbuk K, Norton A, Vyas P, Theil KS, Eng C. Severe TMD/AMKL with GATA1 mutation in a stillborn fetus with Down syndrome. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007;4(7):433-8.
36. Massey GV, Zipursky A, Chang MN, Doyle JJ, Nasim S, Taub JW, et al. A prospective study of the natural history of transient leukemia (TL) in neonates with Down syndrome (DS): Children's Oncology Group (COG) study POG-9481. *Blood.* 2006;107(12):4606-13.
37. Maroz A, Stachorski L, Emmrich S, Reinhardt K, Xu J, Shao Z, et al. GATA1s induces hyperproliferation of eosinophil precursors in Down syndrome transient leukemia. *Leukemia.* 2014;28(6):1259-70.
38. Lange BJ, Kobrinsky N, Barnard DR, Arthur DC, Buckley JD, Howells WB, et al. Distinctive demography, biology, and outcome of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down syndrome: Children's Cancer Group Studies 2861 and 2891. *Blood.* 1998;91(2):608-15.

39. Hasle H, Abrahamsson J, Arola M, Karow A, O'Mearaigh A, Reinhardt D, et al. Myeloid leukemia in children 4 years or older with Down syndrome often lacks GATA1 mutation and cytogenetics and risk of relapse are more akin to sporadic AML. *Leukemia*. 2008;22(7):1428-30.
40. Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, Anastasi J, Karp JE, Le Beau MM, et al. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet*. 2002;32(1):148-52.
41. Xu G, Nagano M, Kanezaki R, Toki T, Hayashi Y, Taketani T, et al. Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. *Blood*. 2003;102(8):2960-8.
42. Alford KA, Reinhardt K, Garnett C, Norton A, Böhmer K, von Neuhoff C, et al. Analysis of GATA1 mutations in Down syndrome transient myeloproliferative disorder and myeloid leukemia. *Blood*. 2011;118(8):2222-38.
43. Taub JW, Mundschau G, Ge Y, Poulik JM, Qureshi F, Jensen T, et al. Prenatal origin of GATA1 mutations may be an initiating step in the development of megakaryocytic leukemia in Down syndrome. *Blood*. 2004;104(5):1588-9.
44. Holland LM, Lima CS, Cunha AF, Albuquerque DM, Vassallo J, Ozelo MC, et al. An inherited mutation leading to production of only the short isoform of GATA-1 is associated with impaired erythropoiesis. *Nat Genet*. 2006;38(7):807-12.
45. Ganmore I, Smooha G, Izraeli S. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition. *Hum Mol Genet*. 2009;18(R1):R84-93.
46. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, Greenman CD, Raine K, et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell*. 2012;149(5):179-93.
47. Nižetić D, Groet J. Tumorigenesis in Down syndrome: big lessons from a small chromosome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(10):721-32.
48. Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, White JG, Orkin SH, Maris JM, et al. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet*. 2000;24(3):266-70.
49. Sankaran VG, Ghazvinian R, Do R, Thiru P, Vergilio JA, Beggs AH, et al. Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest*. 2012;122(7):2439-43.
50. Klar J, Khalfallah A, Arzoo PS, Gazda HT, Dahl N. Recurrent GATA1 mutations in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2014;166(6):949-51.
51. Salek-Ardakan S, Smooha G, de Boer J, Sebire NJ, Morrow M, Rainis L, et al. ERG is a megakaryocytic oncogene. *Cancer Res*. 2009;69(11):4665-73.
52. Toki T, Kanezaki R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, et al. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood*. 2013;121(16):3181-4.
53. Klusmann JH, Godinho FJ, Heitmann K, Maroz A, Koch ML, Reinhardt D, et al. Developmental stage-specific interplay of GATA1 and IGF signaling in fetal megakaryopoiesis and leukemogenesis. *Genes Dev*. 2010;24(15):1659-72.
54. Li Z, Godinho FJ, Klusmann JH, Garriga-Canut M, Yu C, Orkin SH. Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1. *Nat Genet*. 2005;37(6):613-9.
55. Chou ST, Opalinska JB, Yao Y, Fernandes MA, Kalota A, Brooks JS, et al. Trisomy 21 enhances human fetal erythro-megakaryocytic development. *Blood*. 2008;112(12):4503-6.
56. Tunstall-Pedoe O, Roy A, Karadimitris A, de la Fuente J, Fisk NM, Bennett P, et al. Abnormalities in the myeloid progenitor compartment in Down syndrome fetal liver precede acquisition of GATA1 mutations. *Blood*. 2008;112(12):4507-11.
57. Roy A, Cowan G, Mead AJ, Filippi S, Bohn G, Chaidos A, et al. Perturbation of fetal liver hematopoietic stem and progenitor cell development by trisomy 21. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(43):17579-84.
58. Chou ST, Byrska-Bishop M, Tober JM, Yao Y, Vandorn D, Opalinska JB, et al. Trisomy 21-associated defects in human primitive hematopoiesis revealed through induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(43):17573-8.
59. Izraeli S. Trisomy 21 tilts the balance. *Blood*. 2008;112(12):4361-2.
60. MacLean GA, Menne TF, Guo G, Sanchez DJ, Park IH, Daley GQ, et al. Altered hematopoiesis in trisomy 21 as revealed through in vitro differentiation of isogenic induced pluripotent cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(43):17567-72.
61. Kusters MA, Versteegen RH, Gemen EF, de Vries E. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(2):189-93.
62. Whitlock JA, Sather HN, Gaynon P, Robison LL, Wells RJ, Trigg M, et al. Clinical characteristics and outcome of children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood*. 2005;106(13):4043-9.
63. Zhang CC, Lodish HF. Insulin-like growth factor 2 expressed in a novel fetal liver population is a growth factor for hematopoietic stem cells. *Blood*. 2004;103(7):2513-21.
64. Garrett RW, Emerson SG. The role of parathyroid hormone and insulin-like growth factors in hematopoietic niches: physiology and pharmacology. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;288(1-2):6-10.
65. Chou S, Lodish HF. Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(17):7799-804.
66. Starc TJ. Erythrocyte macrocytosis in infants and children with Down syndrome. *J Pediatr*. 1992;121(4):578-81.
67. Kivivuori SM, Rajantie J, Siimes MA. Peripheral blood cell counts in infants with Down's syndrome. *Clin Genet*. 1996;49(1):15-9.
68. Henry E, Walker D, Wiedmeier SE, Christensen RD. Hematological abnormalities during the first week of life among neonates with Down syndrome: data from a multihospital healthcare system. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(1):42-50.
69. Douglas SD. Down syndrome: immunologic and epidemiologic associations-enigmas remain. *J Pediatr*. 2005;147(6):723-5.
70. de Hingh YC, van der Vossen PW, Gemen EF, Mulder AB, Hop WC, Brus F, et al. Intrinsic abnormalities of lymphocyte counts in children with down syndrome. *J Pediatr*. 2005;147(6):744-7.
71. Versteegen RH, Kusters MA, Gemen EF, De Vries E. Down syndrome B-lymphocyte subpopulations: intrinsic defect or decreased T-lymphocyte help. *Pediatr Res*. 2010;67(5):563-9.
72. Roizen NJ, Amarose AP. Hematologic abnormalities in children with Down syndrome. *Am J Med Genet*. 1993;46(5):510-2.
73. David O, Fiorucci GC, Tosi MT, Altare F, Valori A, Saracco P, et al. Hematological studies in children with Down syndrome. *Pediatr Hematol Oncol*. 1996;13(3):271-5.
74. Lin SJ, Wang JY, Klickstein LB, Chuang KP, Chen JY, Lee JF, et al. Lack of age-associated LFA-1 up-regulation and impaired ICAM-1 binding in lymphocytes from patients with Down syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2001;126(1):54-63.
75. Garrison MM, Jeffries H, Christakis DA. () Risk of death for children with Down syndrome and sepsis. *J Pediatr*. 2005;147(6):748-52.
76. Gillespie KM, Dix RJ, Williams AJ, Newton R, Robinson ZF, Bingley PJ, et al. Islet autoimmunity in children with Down's syndrome. *Diabetes*. 2006;55(11):3185-8.
77. Prasher VP. Screening of medical problems in adults with Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract*. 1994;2:59-66.
78. Kirsammer G, Jilani S, Liu H, Davis E, Gurbuxani S, Le Beau MM, et al. Highly penetrant myeloproliferative disease in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Blood*. 2008;111(2):767-75.
79. Carmichael CL, Majewski IJ, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Hewitt CA, et al. Hematopoietic defects in the Ts1Cje mouse model of Down syndrome. *Blood*. 2009;113(9):1929-37.
80. Alford KA, Slender A, Vanes L, Li Z, Fisher EM, Nizetic D, et al. Perturbed hematopoiesis in the Tc1 mouse model of Down syndrome. *Blood*. 2010;115(14):2928-37.
81. McLean S, McHale C, Enright H. Hematological abnormalities in adult patients with Down's syndrome. *Ir J Med Sci*. 2009;178(1):35-8.

82. Karlsson B, Gustafsson J, Hedov G, Ivarsson SA, Annerén G. Thyroid dysfunction in Down's syndrome: relation to age and thyroid autoimmunity. *Arch Dis Child.* 1998;79(3):242-5.
83. Loh RK, Harth SC, Thong YH, Ferrante A. Immunoglobulin G subclass deficiency and predisposition to infection in Down's syndrome. *Pediatr Infect Dis J.* 1990;9(8):547-51.
84. Murphy M, Epstein LB. Down syndrome (trisomy 21) thymuses have a decreased proportion of cells expressing high levels of TCR alpha, beta and CD3. A possible mechanism for diminished T cell function in Down syndrome. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990;55(3):453-67.
85. Izraeli S. Chromosome copy number and leukemia-lessons from Down's syndrome. *Hematology.* 2005;10(Suppl. 1):164-6.
86. Letourneau A, Santoni FA, Bonilla X, Sailani MR, Gonzalez D, Kind J, et al. Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down's syndrome. *Nature.* 2014;508(7496):345-50.
87. Malinge S, Chlon T, Doré LC, Ketterling RP, Tallman MS, Paietta E, et al. Development of acute megakaryoblastic leukemia in Down syndrome is associated with sequential epigenetic changes. *Blood.* 2013;122(14):e33-43.
88. Lane AA, Chapuy B, Lin CY, Tivey T, Li H, Townsend EC, et al. Triplication of a 21q22 region contributes to B cell transformation through HMGN1 overexpression and loss of histone H3 Lys27 trimethylation. *Nat Genet.* 2014;46(6):618-23.
89. Korbel JO, Tirosh-Wagner T, Urban AE, Chen XN, Kasowski M, Dai L, et al. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(29):12031-6.
90. Malinge S, Bliss-Moreau M, Kirsammer G, Diebold L, Chlon T, Gurbuxani S, et al. Increased dosage of the chromosome 21 ortholog Dyrk1a promotes megakaryoblastic leukemia in a murine model of Down syndrome. *J Clin Invest.* 2012;122(3):948-62.
91. Ng AP, Hyland CD, Metcalf D, Carmichael CL, Loughran SJ, Di Rago L, et al. Trisomy of Erg is required for myeloproliferation in a mouse model of Down syndrome. *Blood.* 2010;115(19):3966-9.
92. Birger Y, Goldber L, Chlon TM, Goldenson B, Muler I, Schiby G, et al. Perturbation of fetal hematopoiesis in a mouse model of Down syndrome's transient myeloproliferative disorder. *Blood.* 2013;122(6):988-98.
93. Bourquin JP, Subramanian A, Langebrake C, Reinhardt D, Bernard O, Ballerini P, et al. Identification of distinct molecular phenotypes in acute megakaryoblastic leukemia by gene expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(9):3339-44.
94. Gribble SM, Wiseman FK, Clayton S, Prigmore E, Langley E, Yang F, et al. Massively parallel sequencing reveals the complex structure of an irradiated human chromosome on a mouse background in the Tc1 model of Down syndrome. *PLoS One.* 2013;8(4):e60482.
95. Dauphinot L, Lyle R, Rivals I, Dang MT, Moldrich RX, Golfier G, et al. The cerebellar transcriptome during postnatal development of the Ts1Cje mouse, a segmental trisomy model for Down syndrome. *Hum Mol Genet.* 2005;14(3):373-84.
96. Aït-Yahya-Graison E, Aubert J, Dauphinot L, Rivals I, Prieur M, Golfier G, et al. Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down syndrome: impact on disease phenotypes. *Am J Hum Genet.* 2007;81(3):475-91.
97. Conti A, Fabbrini F, D'Agostino P, Negri R, Greco D, Genesio R, et al. Altered expression of mitochondrial and extracellular matrix genes in the heart of human fetuses with chromosome 21 trisomy. *BMC Genomics.* 2007;8:268.
98. Hertzberg L, Betts DR, Raimondi SC, Schäfer BW, Notterman DA, Domany E, et al. Prediction of chromosomal aneuploidy from gene expression data. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007;46(1):75-86.
99. Prandini P, Deutsch S, Lyle R, Gagnebin M, Delucinge Vivier C, Delorenzi M, et al. Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance. *Am J Hum Genet.* 2007;81(2):252-63.
100. Lockstone HE, Harris LW, Swatton JE, Wayland MT, Holland AJ, Bahn S. Gene expression profiling in the adult Down syndrome brain. *Genomics.* 2007;90(6):647-60.
101. Gefen N, Binder V, Zaliova M, Linka Y, Morrow M, Novosel A, et al. Hsa-mir-125b-2 is highly expressed in childhood ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) leukemias and confers survival advantage to growth inhibitory signals independent of p53. *Leukemia.* 2010;24(1):89-96.
102. Emmrich S, Rasche M, Schöning J, Reimer C, Keihani S, Maroz A, et al. miR-99a/100~125b tricistrons regulate hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis by shifting the balance between TGF β and Wnt signaling. *Genes Dev.* 2014;28(8):858-74.
103. Jiang J, Jing Y, Cost GJ, Chiang JC, Kolpa HJ, Cotton AM, et al. Translating dosage compensation to trisomy 21. *Nature.* 2014;500(7462):296-300.
104. Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood.* 2003;101(11):4333-41.
105. Rainis L, Toki T, Pimanda JE, Rosenthal E, Machol K, Strehl S, et al. The proto-oncogene ERG in megakaryoblastic leukemias. *Cancer Res.* 2005;65(17):7596-602.
106. Xu G, Kanezaki R, Toki T, Watanabe S, Takahashi Y, Terui K, et al. Physical association of the patient-specific GATA1 mutants with RUNX1 in acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. *Leukemia.* 2006;20(6):1002-8.
107. Yu S, Cui K, Jothi R, Zhao DM, Jing X, Zhao K, et al. GABP controls a critical transcription regulatory module that is essential for maintenance and differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood.* 2011;117(7):2166-78.
108. Garzon R, Pichiorri RF, Palumbo T, Iuliano R, Cimmino A, Aqeilan R, et al. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(13):5078-83.
109. Klusmann JH, Li Z, Böhmer K, Maroz A, Koch ML, Emmrich S, et al. miR-125b-2 is a potential oncomiR on human chromosome 21 in megakaryoblastic leukemia. *Gen Dev.* 2010;24(5):478-90.
110. Schnittger S, Dicker F, Kern W, Wendland N, Sundermann J, Alpermann T, et al. RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with non-complex karyotype and confer an unfavorable prognosis. *Blood.* 2011;117(8):2348-57.

Гемопоэз и лейкозы у пациентов с синдромом Дауна*

I.Roberts¹, S.Izraeli^{2,3}

¹Paediatrics and Molecular Haematology Unit, Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, Оксфорд, Великобритания;

²Childhood Leukaemia Research Unit, Department of Paediatric Haemato-Oncology, Cancer Research Centre, Sheba Medical Centre, Рамат-Ган, Израиль;

³Department of human molecular genetics and biochemistry, Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Тель-Авив, Израиль

Дети с трисомией 21-й хромосомы (синдром Дауна – СД) имеют высокий риск развития как миелоидных, так и В-клеточного лимфобластного лейкозов. Миелоидным лейкозам часто предшествует транзиторный неонатальный предлейкемический синдром – транзиторный аномальный миелопоэз (ТАМ). Последний является результатом одновременного наличия трисомии 21-й хромосомы и приобретенных соматических «усекающих» N-терминальный конец белка мутаций ключевого гемопоэтического транскрипционного фактора – гена *GATA1*. Эти мутации, которые не являются лейкемогенными при отсутствии трисомии 21-й хромосомы, обнаруживаются у $\frac{1}{3}$ новорожденных с СД. Анализ гемопоэтических клеток печени плода и эмбриональных стволовых клеток человека показывает, что трисомия 21-й хромосомы сама по себе существенно меняет гемопоэз плода. Следовательно, у детей с СД наблюдаются многочисленные дефекты гемопоэза даже при отсутствии ТАМ. Хотя исследования на моделях мышей показали роль нерегулируемой экспрессии некоторых генов, расположенных на 21-й хромосоме, в развитии лейкоза, участие этих генов в лейкемогенезе человека остается неизученным. Поскольку трисомия 21-й хромосомы обнаруживается во всех эмбриональных клетках, в основе патогенеза лейкозов, ассоциированных с СД, лежит комплексное взаимодействие между нерегулируемой экспрессией генов в гемопоэтических клетках и их микроокружением у плода.

Ключевые слова: трисомия 21-й хромосомы, синдром Дауна, острый лимфобластный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, транзиторный аномальный миелопоэз, ген *GATA1*

Дети с конституциональной трисомией 21-й хромосомы (синдром Дауна – СД) имеют аномально высокий риск развития острых лейкозов [1]. У маленьких детей с СД частота острого миелоидного лейкоза (известного как ОМЛ-СД) в 150 раз больше, чем у детей того же возраста без СД, а частота острого В-клеточного лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ) – в 33 раза больше [1, 2]. Уникальные свойства лейкозов, ассоциированных с СД, указывают на ключевую роль трисомии 21-й хромосомы в их патогенезе, а сами лейкозы являются отличной моделью лейкемогенеза у человека [3–5]. В этом обзоре мы обсуждаем недавно полученные данные о естественном течении и патогенезе острого лейкоза у детей с СД, при этом особый акцент делается на особенности нарушений фетального и постнатального гемопоэза при трисомии 21-й хромосомы, которые могут определять повышенную склонность гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и клеток-предшественников к злокачественной трансформации.

Лейкозы, ассоциированные с СД

Желая сфокусироваться на аспектах перинатального гемопоэза, которые могут предрасполагать к развитию лейкозов у детей с СД, мы лишь кратко суммируем основные отличительные черты этих лейкозов. С более детальным описанием клинических особенностей этих лейкозов можно ознакомиться в нескольких недавно опубликованных обзорах [3, 5–9].

Острый лимфобластный лейкоз, ассоциированный с СД

Острые лимфобластные лейкозы у пациентов с СД (СД-ОЛЛ) представлены практически исключительно вариантами из В-клеток-предшественников. В недавно описанной когорте среди 700 пациентов с СД-ОЛЛ лишь у 5 был диагностирован Т-ОЛЛ [9]. Кроме того, в отличие от ОМЛ, ОЛЛ при СД практически никогда не встречаются у детей первого года жизни. Прогноз при СД-ОЛЛ значительно хуже, чем при спорадических случаях ОЛЛ из В-клеток-предшественников вследствие резистентности к химиотерапии и повышенной летальности от ее осложнений [5, 9].

Хотя у пациентов с СД описаны все цитогенетические варианты В-ОЛЛ, самые частые аномалии, присущие спорадическим случаям В-ОЛЛ у детей – транслокация t(12;21) с образованием химерного гена *ETV6-RUNX1* и гипердиплоидия, при СД встречаются реже [9, 10]. В 60% случаев СД-ОЛЛ выявляют аберрантную экспрессию цитокинового рецептора *CRLF2*, которая часто сочетается с дополнительными активирующими мутациями JAK-STAT сигнального пути [11–16]. Аберрантная экспрессия этого рецептора обусловлена реарранжировками генов, представленными либо транслокацией в IgH-локус, либо микроделецией «выше» гена *CRLF2*, локализованного на псевдоаутосомной части половых хромосом. Результатом этой делеции является слияние гена *CRLF2* с промотором расположенного выше конституционально экспрессируемого гена *P2RY8*. Анализ

*Перевод доктора мед. наук, проф. А.А.Масчана.

Статья опубликована в "British Journal of Haematology": Roberts I, Izraeli S. Haematopoietic development and leukaemia in Down syndrome. Br J Haematol. 2014;167(5):587-99.

последовательностей области разрыва указывает на то, что эта реарранжировка опосредована геном *RAG1* или *RAG2* в ранних В-клетках-предшественниках [12].

ОМЛ, ассоциированный с СД

Вследствие своих уникальных клинико-биологических признаков ОМЛ-СД получили отдельное место в новой субклассификации ВОЗ [17, 18]. Иммунофенотипически они представляют собой эритро-мегакариобластные лейкозы [6, 19], которые диагностируются в возрасте до 5 лет; их типичной презентацией является необъяснимая тромбоцитопения и/или миелодисплазия. Имеются все доказательства того, что ОМЛ-СД всегда предшествует неонатальный предлейкемический синдром транзиторного аномального миелопоэза (ТАМ), также известный как транзиторное миелопролиферативное заболевание, который может проявляться как клинически, так и протекать в субклинической форме. В отличие от пациентов с острым мегакариобластным лейкозом без СД пациенты с ОМЛ-СД хорошо отзываются на терапию и большинство из них полностью излечиваются. Хотя выдвинулось множество гипотез, механизм такой эксклюзивной чувствительности к химиотерапии, особенно к цитозин-арabinозиду (Ara-C), остается неясным [20–22].

Генетически ОМЛ-СД характеризуются приобретенной мутацией гена *GATA1*, наличие которой необходимо, но недостаточно для развития лейкоза. Недавно проведенные исследования ОМЛ-СД с использованием полноэкзонного секвенирования показали наличие высокой частоты мутаций когезинов, фактора, связывающегося с CCCTC (CTCF), или других регуляторов хроматина [23, 24]. Хотя нормальная функция этих протеинов окончательно не установлена, им приписываю роль в организации крупных областей транскрипции как вдоль одной хромосомы, так и между хромосомами. Почему данные мутации особенно часто встречаются при ОМЛ-СД неясно, однако они могут быть непосредственно связаны с наличием трисомии 21-й хромосомы. Мутации второго типа, которые активируют пролиферацию, происходят главным образом в генах общих сигнальных путей, таких как RAS и рецептор тромбопоэтина MPL, или сигнального пути JAK-STAT [23, 24]. Очень важно, что геномный анализ подтвердил, что ОМЛ-СД происходит из клеток, являющихся субстратом ТАМ.

Клинически явный предлейкемический синдром: ТАМ

Хотя очевидно, что большинство лейкозов у детей эволюционирует из молекулярно идентифицируемого предлейкемического клона [25], именно у детей с СД предлейкемический синдром может быть диагностирован клинически. У большинства детей с ОМЛ-СД наблюдается ТАМ в неонатальном периоде [26]. Согласно клиническим и гематологическим признакам ТАМ определяют как транзиторный, клональный миелопролиферативный синдром, характерный только для СД [3, 27]. Определяющим признаком ТАМ, использующимся в классификации ВОЗ [18] и большинстве исследований, является повышенное количество бластных клеток в периферической крови [26, 28], хотя теперь мы знаем, что это определение слишком неспецифично, поскольку практически у всех новорожденных с СД наблюдается повышенное количество

blastных клеток в периферической крови [29]. Хотя количество бластных клеток более 20% является хорошим маркером вероятного диагноза ТАМ, наиболее специфичным диагностическим признаком ТАМ является наличие приобретенной мутации в экзонах 2 или 3 гена *GATA1* [3, 24, 29–33]. Несмотря на то, что у многих новорожденных с СД и мутацией гена *GATA1* наблюдаются клинические и гематологические признаки, соответствующие классическому описанию ТАМ, мы недавно предложили термин «молчащий» ТАМ для не менее частого сценария, при котором имеется клон с мутацией гена *GATA1*, но размеры его слишком малы [29].

Эпидемиология

Частота ТАМ у новорожденных с СД варьирует от менее 5 до 30% и зависит от используемых диагностических критериев и дизайна исследования. Самая низкая частота (3,8%) была выявлена при систематическом скрининге мутаций гена *GATA1* путем секвенирования по Сэнгеру амплифицированных с помощью полимеразной цепной реакции участков ДНК [34]. Такая низкая частота, возможно, является отражением относительно низкой чувствительности метода, поскольку в недавно проведенном проспективном исследовании, включавшем 200 новорожденных с СД, частота мутаций гена *GATA1*, обнаруженных комбинированным методом (стандартное секвенирование по Сэнгеру и высокоэффективная жидкостная хроматография – ВЭЖХ), составила 8,5%, что укладывается в диапазон 5–10% распространенности ТАМ, полученной во многих исследованиях на основании оценки клинических и гематологических критериев [3]. Интерес представляет тот факт, что использование очень чувствительного метода секвенирования нового поколения (СНП), дающего возможность выявлять очень малые клонны с мутацией гена *GATA1* (0,3% и более), позволило выявить мутации гена *GATA1* у 30% всех новорожденных с СД, и, по крайней мере, половина этих мутаций клинически являются «молчащими» [29].

Клинические проявления ТАМ

При классическом ТАМ могут быть различные клинические симптомы (табл. 1). Иногда ТАМ проявляется внутриутробно и может стать причиной внутриутробной гибели плода или смерти в периоде новорожденности [26, 28, 35]. Гораздо чаще ТАМ развивается в первые дни жизни и его проявления могут варьировать от бессимптомных изменений в общем анализе крови до диссеминированной лейкемической инфильтрации. Клинически выраженный ТАМ (печеночная недостаточность/фиброз, асцит, плевральный/перикардиальный выпот, почечная недостаточность и/или коагулопатия) развивается у 10–30% пациентов с клинически диагностированным ТАМ [26, 28, 29, 36].

Гематологические признаки ТАМ

Наиболее типичными гематологическими признаками ТАМ являются лейкоцитоз с повышенным количеством бластных клеток, нейтрофилов, базофилов и миелоцитов [29] (табл. 2). У некоторых новорожденных с ТАМ также выявляют эозинофилию [37]. Число тромбоцитов у новорожденных с СД и ТАМ не отличается от такового при отсутствии ТАМ, и лишь у немногих новорожденных с ТАМ выявляют анемию [28, 29]. Важно, что за исключением повышен-

Таблица 1. Клинические признаки ТАМ*

Симптом	Комментарий
Желтуха	Наблюдается очень часто. Хотя желтуха наблюдается у большинства новорожденных с ТАМ, она также встречается у 50% новорожденных с СД без ТАМ
Гепатосplenомегалия	Наблюдается часто. Гепатомегалия и гепатосplenомегалия наблюдаются чаще, чем изолированная спленомегалия
Сыпь	Наблюдается нечасто. Неспецифичная. Наличие сыпи свидетельствует в пользу ТАМ, однако сыпь встречается у новорожденных с СД без ТАМ
Выпот плевральный и/или перикардиальный, и/или асцит	Выпоты регистрируются у 25% пациентов при клинически проявляющемся ТАМ
Кровоточивость	Наблюдается примерно у 10% пациентов с ТАМ, причинами могут быть тромбоцитопения, нарушение функции печени и диссеминированное внутрисосудистое свертывание
Печеночный фиброз с печеночной недостаточностью или без нее	Наблюдается нечасто. Иногда у новорожденных может быть фиброз печени при небольшом проценте бластных клеток в периферической крови
Нарушение функции почек/почечная недостаточность	Редко (менее чем у 10% пациентов)
Водянка плода	Хотя ТАМ редко проявляется в виде водянки плода, в некоторых случаях ТАМ может быть пропущен, поскольку не всегда проводят исследование на предмет выявления мутаций в гене GATA1
Бессимптомное течение	Около 20% новорожденных с ТАМ не имеют клинических симптомов

*Клинические признаки у новорожденных с СД, у которых мутация в гене GATA1 выявлена с помощью стандартного секвенирования и/или ВЭЖХ. Таблица составлена по данным J.Klusmann и соавт. [26], A.Gamis и соавт. [28] и I.Roberts и соавт. [29].

Таблица 2. Гематологические признаки ТАМ*

Признак	Комментарий
Лейкоцитоз	Наблюдается часто. Хотя лейкоцитоз наблюдается у большинства новорожденных с ТАМ, он также присущ многим новорожденным с СД без ТАМ. Кроме того, у 1/3 новорожденных с ТАМ количество лейкоцитов нормальное
Количество бластных клеток в периферической крови более 20%	Наблюдается очень часто. Поскольку практически у всех новорожденных с СД имеются бластные клетки в периферической крови, а у приблизительно 20% новорожденных с ТАМ количество бластных клеток в периферической крови составляет менее 20%, значение наличия бластных клеток в периферической крови может быть оценено только при исследовании мутаций гена GATA1
Нейтрофилез	Наблюдается часто. Регистрируется примерно у 25% новорожденных с СД без мутаций гена GATA1
Эозинофilia	Наблюдается нечасто (у 10–16% пациентов)
Тромбоцитопения	Наблюдается часто, однако частота тромбоцитопении у пациентов с ТАМ и у новорожденных с СД без мутаций гена GATA1 одинакова и около 1/3 пациентов с ТАМ не имеют тромбоцитопении
Анемия	Наблюдается нечасто (примерно у 10% пациентов)

*Гематологические признаки у новорожденных с СД, у которых мутация в гене GATA1 выявлена с помощью стандартного секвенирования и/или ВЭЖХ. Таблица составлена по данным J.Klusmann и соавт. [26], A.Gamis и соавт. [28], I.Roberts и соавт. [29] и A.Maroz и соавт. [37].

ногого количества циркулирующих бластных клеток нет других гематологических признаков, специфичных для ТАМ (рис. 1). Хотя специфического порога процентного содержания бластных клеток, который бы позволил выявить все случаи ТАМ у новорожденных с СД, не существует, мы обнаружили, что количество бластных клеток в периферической крови более 20% однозначно коррелирует с мутацией гена GATA1 и, следовательно, с диагнозом ТАМ. Наоборот, значение количества бластных клеток в периферической крови менее 20% у новорожденного с СД может быть определено только после анализа на наличие мутаций гена GATA1.

«Молчащий» ТАМ

У около 20% новорожденных с СД выявляют мутации гена GATA1, которые не проявляются ни клинически, ни гематологически («молчащий» ТАМ), и эти новорожденные ничем не отличаются от новорожденных с СД без мутаций гена GATA1. Следует отметить, что у новорожденных с СД высока частота желтухи и тромбоцитопении, даже при отсутствии мутации гена GATA1. Обычно, хотя и не всегда, небольшие клонны с мутациями гена GATA1, выявляемые при «молчащем» ТАМ, могут быть обнаружены только с использованием очень чувствительных методов, таких как СНП [29].

Естественное течение ТАМ

Ретроспективные клинические исследования показывают, что в большинстве случаев классический ТАМ спонтанно разрешается в течение нескольких недель или месяцев после рождения [26, 28]. Небольшая часть детей с ТАМ умирают, главным образом от печеночной недостаточности, обуслов-

ленной фиброзом и бластной инфильтрацией печени [26, 28]. Предшествующие исследования показали, что летальность от ТАМ достигает порядка 20%, однако эта цифра, вероятно, является завышенной, поскольку диагноз ТАМ основывался только на клинических и гематологических критериях, в то время как легкие и субклинические случаи, по всей вероятности, были пропущены. Риск развития ОМЛ-СД после ТАМ варьирует от 5%, по данным недавно проведенного проспективного исследования [29], до 30%, по данным ретроспективных исследований у пациентов с клинически диагностированным ТАМ [26, 28, 36, 38]. Специфических клинических, гематологических или молекулярных признаков, позволяющих прогнозировать трансформацию ТАМ в ОМЛ, не идентифицировано. Более полная информация о естественном течении ТАМ может быть получена только в результате проспективных исследований у детей с СД и мутациями гена GATA1 и без них вплоть до 5-летнего возраста (после этого возраста ОМЛ-СД встречается крайне редко) [39].

Диагностика и наблюдение новорожденных с ТАМ

Вследствие того, что у новорожденных с СД и мутациями гена GATA1 (как с клиническими проявлениями, так и с «молчащим» ТАМ) может развиться ОМЛ-СД до 5-летнего возраста, наилучшим способом выявления всех пациентов группы риска является скрининг всех новорожденных с СД на наличие мутаций гена GATA1 с помощью как стандартных (секвенирование по Сэнгеру и ВЭЖХ), так и более чувствительных методов (СНП). Анализ на предмет выявления мутаций гена GATA1 может быть полезен для диагностики атипичных случаев ТАМ с преимущественным вовлечением

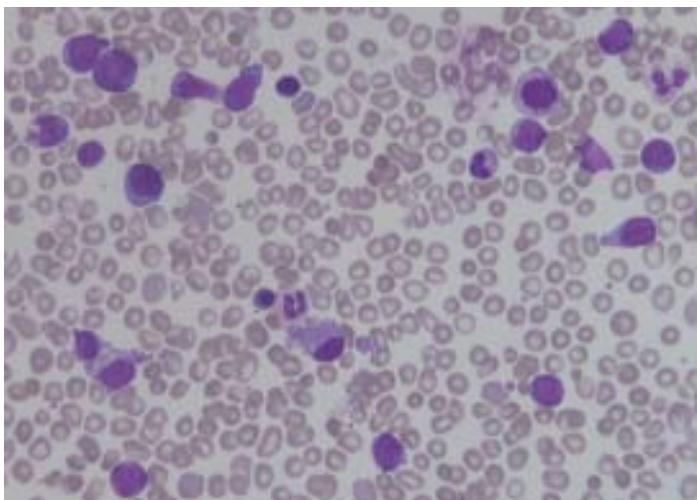


Рис. 1. Мазок периферической крови новорожденного с СД и клиническим и гематологическим диагнозом ТАМ, подтвержденным наличием мутации в экзоне 2 гена GATA1. В мазке видны большое количество бластных клеток, а также гигантские тромбоциты и мегакариоциты.

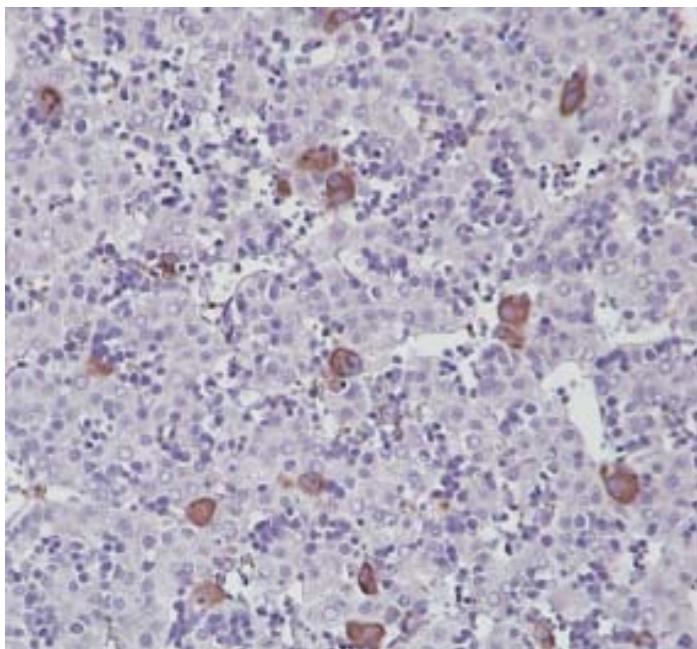


Рис. 2. Повышенный мегакариоцитопоз в клетках печени плода (II триместр беременности) с трисомией 21-й хромосомы при отсутствии приобретенной мутации гена GATA1. Парафиновый срез, окрашенный мегакариоцитарным маркером CD42b (коричневый).

печени без характерных изменений гематологических показателей. Значение регулярного мониторинга мутантного клона гена GATA1 у новорожденных с ТАМ неизвестно и в настоящее время изучается.

Молекулярный патогенез ТАМ

Нами и другими исследователями было показано, что практически во всех случаях ТАМ и ОМЛ-СД выявляется «усекающая» N-терминальный конец белка мутация гена GATA1 [30–33, 40–42]. Мутации гена GATA1 обнаруживаются при рождении как у детей с СД и ТАМ, так и, как показали ретроспективные исследования пятен крови (тест Гатри), у детей с ОМЛ-СД без предшествующего ТАМ [33]. Пока еще не совсем ясно, на какой стадии внутриутробного развития про-

исходят мутации гена GATA1 – самые ранние мутации обнаруживали на 21-й неделе гестации [43]. Мутации гена GATA1 исчезают при разрешении ТАМ или после достижения ремиссии ОМЛ-СД, что указывает на то, что они являются приобретенными, т.е. негерминальными [24, 33]. С учетом того, что «усекающие» N-терминальный конец белка мутации гена GATA1 не являются лейкемогенными в отсутствии трипломии 21-й хромосомы [44] и не приводят к развитию ОМЛ у детей с СД старше 5 лет [39], очевидно, что уникальные черты фетального гемопоэза у детей с трисомией 21-й хромосомы необходимы для реализации трансформирующего потенциала мутаций гена GATA1.

Причины столь высокой частоты мутаций гена GATA1 у новорожденных с СД неизвестны. Важно, что помимо того, что мутации гена GATA1 встречаются примерно у 30% всех новорожденных с СД, у 10–20% из них существуют несколько мутантных клонов гена GATA1 [29, 42]. Вероятно, что белки с «усеченным» N-терминальным концом («короткие»), образующиеся в результате мутации гена GATA1 (белки GATA1), придают фетальным клонам с мутациями гена GATA1 селективное пролиферативное преимущество, или/и гемопоэтические клетки с трисомией 21-й хромосомы имеют повышенную частоту мутаций (так называемый «мутационный фенотип») вследствие хромосомной нестабильности. Роль последней в онкогенезе у пациентов с СД противоречива [45, 46] – низкая частота большинства типов солидных опухолей у пациентов с СД [1] указывает на то, что в отличие от приобретенных анеуплоидий трисомия 21-й хромосомы не ассоциирована с «мутационным фенотипом», хотя возможно, что трисомия 21-й хромосомы индуцирует высокую частоту мутаций только в определенных локусах, в частности гене GATA1, – так называемый «локализованный гипермутационный фенотип» («*kataegis phenotype*») [47].

Подавляющее большинство (97%) мутаций, включая инсерции, делеции и точечные мутации, обнаруживается во 2-м экзоне гена GATA1, остальные – в экзоне 3.1 [42]. Все мутации приводят к синтезу укороченного белка GATA1 [32, 40]. Тип мутации не позволяет предсказать, у каких пациентов с ТАМ в дальнейшем произойдет прогрессия в ОМЛ-СД [42]. Действительно, при полноэкзомном секвенировании образцов, полученных от одних и тех же пациентов с ТАМ и ОМЛ-СД, показано, что ОМЛ-СД может развиваться не только из доминирующего (присутствующего на этапе ТАМ), но и из минорных субклонов с мутацией гена GATA1 [24]. Этот метод (полноэкзомного секвенирования) также позволил продемонстрировать, что при ТАМ обнаруживается гораздо меньше соматических мутаций (в среднем менее 2), чем при других злокачественных новообразованиях [23, 24], что доказывает необходимость и достаточность комбинации трисомии 21-й хромосомы и мутации гена GATA1 для развития ТАМ.

Каким образом белки GATA1 определяют фенотип ТАМ не до конца ясно. Поначалу предполагалось, что потеря трансактивационного домена снижает регуляторную активность белка GATA1 в отношении терминальной дифференцировки мегакариоцитов, тем самым приводя к накоплению малодифференцированных клеток-предшественников мегакариоцитов [40]. Интерес представляет тот факт, что при врожденных мутациях гена GATA1, приводящих к изменениям цинкосодержащих пальцевидных доменов белка, наблю-

даются анемия и тромбоцитопения вследствие блока эритро-мегакариоцитарной дифференцировки, которые практически не встречаются при ТАМ и ОМЛ-СД [48]. Описаны и единичные пациенты с врожденной анемией, обусловленной мутацией гена *GATA1*, однако у этих пациентов развития лейкоза не наблюдалось [44, 49, 50]. Все это указывает на то, что для лейкемической трансформации необходимы и трисомия 21-й хромосомы, и сохранная функция пальцевидных цинкосодержащих доменов белков *GATA1* для связывания с ДНК и взаимодействия с белками. Более того, повышенная экспрессия белков *GATA1* в гемопоэтических клетках-предшественниках печени плода у мышей с геном *Gata1* дикого типа (*wild type – wt*) вызывает выраженную экспансию мегакариоцитарных клеток-предшественников, подтверждая наличие механизма «приобретения функции» [51, 52]. J.Klusman и соавт. [53] предположили, что белки *GATA1* усиливают пролиферацию фетальных гемопоэтических клеток путем уменьшения супрессивного эффекта белка *GATA1* на фактор транскрипции *E2F1*, а также путем взаимодействия с сигнальным путем инсулиноподобного фактора роста (ИФР). Недавно опубликованное сообщение о развитии ТАМ при наличии мутации гена *GATA1*, приводящей к нарушению взаимодействия с фактором транскрипции *E2F1*, подтверждает данную гипотезу [52].

Аномальный фетальный гемопоэз при СД

Есть все доказательства того, что мутации гена *GATA1* происходят только в ГСК печени плода. Клинически выраженный ТАМ проявляется поражением печени, а не костного мозга [26, 28, 35, 43], и селективное возникновение мутаций гена *GATA1* именно в ГСК печени плода служит, вероятно, наиболее логичным объяснением как спонтанного исчезновения большинства мутантных клонов в течение первых нескольких месяцев жизни, так и редкости лейкозов с мутациями гена *GATA1* у детей с СД старше 5 лет. Аналогично, ТАМ не развивается после первых месяцев жизни, предположительно вследствие исчезновения «чувствительной» популяции ГСК и/или соответствующего микроокружения. Доказательства эксклюзивной функции белков *GATA1* именно в печени плода получены на модели *GATA1*-нокаутированных мышей [54], у которых наблюдалась транзиторная фетальная пролиферация мегакариобластов без каких-либо гематологических изменений в постнатальном периоде.

Повышенное количество эритро-мегакариоцитарных клеток-предшественников в печени плода при СД

Исследования клеток печени плода [55–57], человеческих эмбриональных стволовых клеток (чЭСК) и индуцированных плuriпотентных стволовых клеток (иПСК) с трисомией 21-й хромосомы [58, 59] показали, что наличие трисомии 21-й хромосомы нарушает баланс дифференцировки ГСК. В частности, количество эритро-мегакариоцитарных клеток-предшественников и мегакариоцитов в печени плода с трисомией 21-й хромосомыено (рис. 2), и эти клетки-предшественники обладают повышенным пролиферативным потенциалом *in vitro* по сравнению с дисомными клетками [57]. Эти данные подтверждают, что трисомия 21-й хромосомы сама по себе стимулирует экспансию эритро-мегакариоци-

тарных клеток-предшественников в печени плода, в то время как мутации гена *GATA1* трансформируют эти клетки-предшественники с генерацией клонов врожденного транзиторного лейкоза или ТАМ [60].

Повышенное количество ГСК эритро-мегакариоцитарной направленности в печени плода при СД

С целью изучения того, ограничиваются ли нарушения гемопоэза в печени плода при СД только коммитированными миелоидными клетками-предшественниками или распространяются и на компартмент ГСК и/или мультипотентных клеток-предшественников, мы недавно провели расширенное иммунофенотипирование и анализ функциональной активности последних, а также коммитированных миелоидных клеток-предшественников и В-лимфоцитов печени плода с трисомией 21-й хромосомы без мутаций гена *GATA1* и сравнили полученные данные с аналогичными показателями здорового плода [57]. Мы показали, что при СД количество иммунофенотипически определяемых ГСК (*CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺, CD45RA⁺*) в печениено и что выделенные ГСК демонстрируют экспрессию генов, характерную для эритро-мегакариоцитарной дифференцировки, и генерируют значительно большие количества мегакариоцитарных и эритроидных клеток-предшественников, чем ГСК печени здорового плода [57]. Повышает ли обусловленная трисомией 21-й хромосомы пролиферация клеток-предшественников мегакариоцитарной линии дифференцировки вероятность возникновения мутаций гена *GATA1* или она просто придает преимущество в выживании клеткам, приобретающим такие мутации, пока неясно. Тем не менее, все имеющиеся факты указывают на то, что обусловленные трисомией 21-й хромосомы нарушения гемопоэза в печени плода являются необходимыми предпосылками для реализации лейкемогенного потенциала «укорачивающих» N-терминальных конец белка мутаций гена *GATA1*.

Нарушения развития В-лимфоцитов в печени плода при СД

В печени плода при СД не происходит увеличения общего количества ГСК, что позволяет предположить, что экспансия эритро-мегакариоцитарных клеток-предшественников может нарушать функционирование других гемопоэтических линий. Действительно, мы обнаружили сниженное количество гранулоцитарно-моноцитарных клеток-предшественников и В-клеток-предшественников в печени плода с СД во II триместре беременности [57] с 10-кратным уменьшением количества пре-про-В-клеток-предшественников наряду со значительно сниженным потенциалом ГСК В-лимфоидной направленности и сниженной экспрессией генов лимфоидной дифференцировки. Мы предполагаем, что нарушения созревания В-лимфоцитов в печени плода при СД могут лежать в основе как иммунодефицита, присущего пациентам с СД [61], так и повышенной предрасположенности к развитию В-ОЛЛ [2, 9, 62]. Возможно,peri- и постнатальное компенсаторное усиление В-лимфопоэза при СД повышает вероятность приобретения лейкемогенных мутаций в раннем детском возрасте.

Исследования гемопоэза чЭСК и иПСК

G.MacLean и соавт. [59] недавно показали, что чЭСК и иПСК пациентов с трисомией 21-й хромосомы, которые диф-

Таблица 3. Гематологические нарушения у новорожденных с СД в сравнении с новорожденными без СД**Эритропоэз:**

- концентрация гемоглобина и гематокрит повышенны;
- MCV повышен;
- эритробластоз в периферической крови;
- дизэритропоз (мишеневидные эритроциты, макроцитоз, базофильная зернистость эритроцитов)

Лейкоциты:

- лейкоцитоз;
- нейтрофилез;
- моноцитоз;
- количество базофилов повышенено;
- количество бластных клеток в периферической крови повышенено;
- лимфопения;
- дисплазия моноцитов и гранулоцитов

Тромбоциты:

- тромбоцитопения;
- гигантские тромбоциты;
- циркулирующие мегакариоциты и их фрагменты

ференцировались в условиях, аналогичных условиям печени плода, генерировали повышенное количество эритроидных и мегакариоцитарных колоний по сравнению с изогенными дисомными клонами, что подтвердило данные, полученные при изучении клеток печени плода человека [57]. С целью моделирования гемопоэза в желточном мешке S.Chou и соавт. [58] дифференцировали iПСК с трисомией 21-й хромосомы и показали, что в условиях, аналогичных кроветворению в желточном мешке, был повышен эритропоэз при нормальном мегакариоцитопозе и сниженном миелопоэзе [58]. Это указывает на то, что эффект трисомии 21-й хромосомы может быть специфичным для каждой стадии развития гемопоэза. Влияет ли это на время приобретения мутаций гена *GATA1*, еще предстоит выяснить.

Роль микроокружения в аномальном гемопоэзе плода при СД

Хотя клинические и биологические данные заставляют предполагать, что печень плода, вероятно, обеспечивает специализированное микроокружение, необходимое для инициации и поддержания аномального гемопоэза при СД, конкретные факторы, приводящие к нарушению гемопоэза при СД, неизвестны. Равным образом неясно, влияет ли трисомия 21-й хромосомы на поддерживающую гемопоэз функцию микроокружения печени плода. Есть некоторые свидетельства в пользу того, что определенную роль может играть нарушенный ответ на ИФР. У мышей экспансия фетальных ГСК поддерживается ИФР-2, продуцируемым уникальными стромальными клетками печени, в отличие от костномозговых ГСК взрослых животных, зависящих от производимого остеобластами ИФР-1 [63–65]. Кроме того, выживаемость и пролиферация мегакариоцитарных клеток-предшественников у плода, но не у взрослых мышей, зависит от сигнального пути ИФР, аналогично тому, как это происходит при ОМЛ-СД и ТАМ [53]. Таким образом, стадийно-специфичный сигнальный путь ИФР, опосредуемый клетками микроокружения печени плода, может вносить существенный вклад в доминирующую эритро-мегакариоцитарную направленность дифференцировки ГСК и экспансию эритро-мегакариоцитарных клеток-предшественников при СД, однако каким образом это связано с трисомией 21-й хромосомы остается неясным.

Постнатальный гемопоэз при СД**Гематологические нарушения у новорожденных с СД**

В ретроспективных исследованиях показано, что у новорожденных с СД гематологические нарушения встречаются чаще, чем у здоровых новорожденных [66–68], что заставляет предполагать влияние трисомии 21-й хромосомы и на постнатальный гемопоэз. В соответствии с этим предположением в недавно проведенном проспективном исследовании, включавшем 200 новорожденных с СД, было показано, что гематологические нарушения выявляются у всех новорожденных с СД (табл. 3) по сравнению с новорожденными того же гестационного срока и постнатального возраста, но без СД [29]. Более того, многие из этих нарушений аналогичны тем, которые наблюдаются в печени плода при СД (см. выше), и обнаруживаются даже при отсутствии мутаций гена *GATA1*. У новорожденных с СД регистрируются более высокая концентрация гемоглобина, повышенное количество циркулирующих эритробластов и изменения морфологии эритроцитов, включая макроцитоз, наличие мишеневидных эритроцитов и базофильную зернистость эритроцитов; количество тромбоцитов при СД меньше, чем в норме, с частым развитием тромбоцитопении, и, несмотря на такой же средний объем тромбоцита, как и у здоровых детей, у более чем 95% новорожденных с СД наблюдаются изменения морфологии тромбоцитов (встречаются гигантские тромбоциты, циркулирующие мегакариоциты и их фрагменты) [29]. Интерес представляет тот факт, что, несмотря на сниженное количество гранулоцитарно-моноцитарных клеток-предшественников в печени плода, у новорожденных с СД количество гранулоцитов и моноцитов в периферической крови повышенено [57], вероятно, вследствие преобладания костномозгового кроветворения на поздних сроках гестации и после рождения. Количество лимфоцитов у новорожденных с СД в данном исследовании было снижено, что соответствовало данным, полученным в предшествующих исследованиях у более старших детей с СД [69–71].

Гематологические нарушения у старших детей и взрослых с СД

В отличие от хорошо изученной эпидемиологии острых лейкозов, которые развиваются у около 3% детей с СД, об изменениях гематологических показателей у остальных пациентов с СД известно относительно немного. Наиболее частыми аномалиями являются макроцитоз [72, 73], количественные и качественные изменения Т- и В-лимфоцитов [69–71, 74–76]. Единственное крупное исследование у 147 взрослых с СД (средний возраст 42,2 года, разброс 16–76 лет) показало, что у этих пациентов повышен средний объем эритроцита (MCV 99,28 фл), и что у около 50% пациентов MCV больше верхней границы нормы [77]. Эти данные в сочетании с макроцитозом, обнаруживаемым на всех мышиных моделях СД [78–80], являются сильным аргументом в пользу влияния аномальной экспрессии одного или более генов, локализованных на 21-й хромосоме, на патогенез макроцитоза. Интерес представляет тот факт, что 2 из 9 пациентов, обследованных S.McLean и соавт. [81], был поставлен диагноз миелодисплазии, и у одного из них развилась прогрессирующая костномозговая недостаточность. V.Prasher [77] также отметил, что у 7 (4%) из 147 пациентов с СД была необъяснимая тромбоцитопения, а у 29 (20%) пациен-

тов – необъяснимая нейтропения. Ни у одного из этих пациентов до этого не проводили гематологическое обследование, что заставляет думать, что у гораздо большего числа взрослых с СД миелодисплазия и костномозговая недостаточность могут оставатьсяundiагностированными, и частота этих состояний значительно больше, чем указанная.

В ряде исследований показано, что у детей с СД часто наблюдается лимфопения с прогрессивным снижением количества Т- и В-лимфоцитов [69, 70]. В соответствии с этим дети с СД имеют повышенную склонность к инфекциям и аутоиммунным заболеваниям [75, 76, 82]. Функция Т- и В-лимфоцитов также может быть нарушена, поскольку в ходе небольших исследований выявлены аномалии тимического созревания, нарушения активации лимфоцитов и дефицит иммуноглобулинов различной степени [74, 83, 84].

В целом можно констатировать, что выявляемые мультилинейные аномалии гемопоэза у новорожденных, детей и взрослых с СД заставляют с большой вероятностью предположить, что трисомия 21-й хромосомы нарушает гемопоэз на протяжении всей жизни, при этом эффекты трисомии 21-й хромосомы различаются на разных этапах индивидуального развития. Это может являться отражением возрастных изменений ГСК и/или их микроокружения.

Молекулярные основы нарушений гемопоэза при трисомии 21-й хромосомы

Прямая этиологическая связь между трисомией 21-й хромосомы, будь то СД или приобретенная трисомия 21-й хромосомы, и развитием лейкоза [85] указывает на очевидную необходимость исследования того, как дополнительная копия 21-й хромосомы специфически нарушает развитие ГСК. Трисомия 21-й хромосомы может оказывать влияние несколькими путями. Во-первых, гены, расположенные на дополнительной 21-й хромосоме, могут непосредственно влиять на поведение ГСК через эффект «дозировки гена» одного или более генов, важных для пролиферации, дифференцировки и выживания ГСК (табл. 4), хотя недавно проведенные исследования показали, что дополнительная 21-я хромосома потенциально может влиять на экспрессию множества генов, расположенных на практически всех хромосомах [86]. Эти эффекты 21-й хромосомы могут быть как направленными непосредственно на ГСК, так и проявляться опосредованно через другие типы клеток, в частности клетки микроокружения. Вторым механизмом действия дополнительной 21-й хромосомы является клеточный ответ на анеуплоидию, при котором нарушается окружающая среда хроматина с соответствующим нарушением экспрессии генов, хотя этот ответ может и не быть специфичным для трисомии 21-хромосомы. Так, при ОМЛ-СД было продемонстрировано нарушение метилирования множества генов [87]. В недавно проведенных исследованиях на модели мыши с СД и клетках СД-ОЛЛ человека было выявлено резкое снижение репрессивного метилирования лизина в положении 27 в гистоне 3, которое, как предполагают, по крайней мере частично связано с повышенной экспрессией гена *HMGN1*, расположенного на 21-й хромосоме [88]. Кроме того, показано, что аномалии экспрессии генов в дисомных хромосомах клеток с трисомией 21-й хромосомы расположены в специфических областях, что указывает на

Таблица 4. Гены с известной гемопоэтической функцией, локализованные на 21-й хромосоме

Гены, связанные с онкогематологическими заболеваниями:

CSTB
DYRK1A
ERG
ETS2
OLIG2
RUNX1

Другие важные для гемопоэза гены:

AIRE
BACH1
CBG
DNMT3L
GABRA
IFNAR1, IFNAR2 и IFNG2
RCAN1
SOD1
SON

эпигенетические механизмы регуляции хроматина [86]. Этот феномен вместе с индивидуальными различиями в экспрессии генов может маскировать эффекты собственно трисомии 21-й хромосомы и мешать раскрытию истинных молекулярных основ влияния трисомии 21-й хромосомы на гемопоэз плода и предрасположенности к развитию лейкозов.

Одним из привлекательных подходов к изучению предрасположенности к лейкозам является изучение редких пациентов с парциальной (сегментарной) трисомией 21-й хромосомы. J.Korbel и соавт. [89] использовали картирование точек разрыва и олигонуклеотидное «черепичное» секвенирование ДНК у 30 пациентов с СД, обусловленным сегментарной трисомией 21-й хромосомы, с целью идентификации скрытых регионов на 21-й хромосоме, ассоциированных со специфическим фенотипом, присущим СД. Авторы идентифицировали на 21-й хромосоме регион длиной 8,5 мегабаз, содержащий такие гены как *RUNX1*, *ERG* и *ETS2*, связанные с развитием острого лейкоза [89]. Однако достоверность выводов, сделанных на основании этого исследования, ограничена очень малым числом случаев лейкоза. Аналогичный методический подход применяли в серии элегантных экспериментов на моделях трансгенных мышей, содержащих дополнительные копии всех или части хромосомных регионов, синтетических (т.е. содержащих аналогичные гены, организованные в аналогичном порядке) 21-й хромосоме человека [78, 79, 88, 90], или саму 21-ю хромосому человека [80].

Использование моделей мышей для изучения роли 21-й хромосомы

У мышей линии Ts65Dn, которые характеризуются трисомией по 104 генам на 16-й хромосоме (синтетической 21-й хромосоме человека), возникает миелопролиферативный синдром, связанный с гиперэкспрессией гена *ERG* [91], хотя это происходит во взрослом возрасте, а не у плода и новорожденных мышат [78]. Недавно была создана двойная трансгенная модель с целью демонстрации того, что гиперэкспрессия гена *ERG* вызывает экспансию эритро-мегакариоцитарных клеток-предшественников (аналогично тому, что происходит в печени плода при СД), и это соответствует экспрессии белков GATA1, которые вызывают ТАМ-подобный синдром, который в дальнейшем прогрессирует в ОМЛ [92]. Также было показано, что ген *ERG* стимулирует мегакарицитопоэз и индуцирует развитие мегакариобластного лейкоза и в отсутствии

трисомии 21-й хромосомы [51], хотя до сих пор неясно, выявляется ли гиперэкспрессия гена *ERG* при трисомии 21-й хромосомы в клетках печени плода [57], в чЭСК/иПСК [58, 59], а также при ОМЛ-СД [93]. Ген *DYRK1A* также вовлечен в патогенез ОМЛ-СД. Используя линию мышей *Ts1Rhr* (с трисомией по 33 ортологам 21-й хромосомы человека), S.Malinge и соавт. [90] недавно создали зависимую от трисомии 21-й хромосомы модель ОМЛ-СД путем скрещивания животных данной линии с мышами с трансфекцированным геном *GATA1* и с гиперэкспрессией трансформирующего аллеля гена *MPL* (*MPL^{w515L}*). На этой модели подавление экспрессии генов путем РНК-интерференции и функциональные исследования позволили идентифицировать ген *DYRK1A* (и, возможно, гены *CHAF1B*, *HLCS* и *ERG*) как медиатор аномального мегакариоцитопозза и показали, что ген *DYRK1A* функционирует как ген-промотор мегакариобластной опухолевой прогрессии в условиях парциальной трисомии 21-й хромосомы и экспрессии гена *GATA1* [90]. Используя ту же модель, A.Lane и соавт. [88] недавно идентифицировали *Hmgm1* как ген, предрасполагающий к развитию ОЛП у мышей линии *Ts1Rhr*.

У мышей линии *Tc1*, единственной модели мыши, содержащей гены 21-й хромосомы человека, развиваются макроцитарная анемия, спленомегалия и усиленный мегакариоцитопозз, но не развиваются лейкозы и истинные миелопролиферативные заболевания [80]. Недавно у мышей линии *Tc1* были обнаружены множественные хромосомные реаранжировки/делеции, анализ которых может способствовать выяснению роли отдельных генов, поскольку в настоящее время показано, что 50 генов 21-й хромосомы человека в этой модели, включая ген *RUNX1*, находятся в дисомном состоянии [94]. Дальнейшие исследования с использованием новой линии мышей *Tc1*, у которых представлены копии примерно 80% генов 21-й хромосомы человека, и других моделей, вероятно, дадут важную информацию о функции множества генов, локализованных на 21-й хромосоме человека, хотя ни одна модель до настоящего времени не соответствует полностью заболеванию человека.

Паттерны экспрессии генов в клетках человека с трисомией 21-й хромосомы

На 21-й хромосоме находятся около 240 генов, кодирующих белки, и почти 340 коротких и длинных некодирующих генов (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Chromosome?r=21). Корреляция между экспрессией генов, локализованных на 21-й хромосоме, и фенотипом не установлена, и, как отмечено выше, экспрессия генов в большой степени является тканеспецифичной и модулируемой большим количеством факторов, включая линию клеток, стадию развития, стадию дифференцировки, фазу клеточного цикла, метаболический статус и межиндивидуальные вариации.

Показано, что в клетках с трисомией 21-й хромосомы, включая клетки сердца плода, клетки головного мозга взрослого, различные фибробластные и лимфобластоидные клеточные линии, а также лейкемические клетки, экспрессия генов, расположенных на 21-й хромосоме, в среднем в 1,5 раза выше, чем в дисомных клетках [14, 95–100]. Однако ясно, что это полугорячкое увеличение экспрессии каждого из отдельных генов, локализованных на дополнительной 21-й хромосоме, не происходит ни в одном из типов до сих пор исследованных клеток, даже если в целом экспрессия этих генов в 1,5 раза

выше, чем в дисомных клетках [99]. Например, трицистрон, включающий MIR125B2, MIR99A и MIRLET7C, экспрессируется при ОМЛ-СД, но не при СД-ОЛП, в то же время он экспрессируется при других цитогенетических подтипах ОЛП, при которых клетки являются дисомными по 21-й хромосоме [101, 102]. Одно из самых убедительных доказательств связи экспрессии генов дополнительной 21-й хромосомы с клеточным фенотипом получено в весьма элегантных экспериментах, в которых внедрение индуцируемого *Xist* трансгена в локус гена *DYRK1A*, расположенного на 21-й хромосоме, в иПСК СД успешно индуцировало блок транскрипции генов, расположенных на 21-й хромосоме, с реверсией ассоциированных с трисомией 21-й хромосомы *in vitro* дефектов развития нервных клеток [103]. В этом исследовании не сообщалось об эффектах в отношении дифференцировки ГСК, однако по сравнению с нервными клетками они могут быть менее драматичными с учетом того, что иПСК человека с трисомией 21-й хромосомы лишь минимально, если вообще, отличаются по экспрессии генов 21-й хромосомы от дисомных аналогов, несмотря на значительные различия в гемопоэтическом фенотипе [58, 59].

Тем не менее на 21-й хромосоме локализовано множество генов, либо вовлеченных в патогенез онкогематологических заболеваний (в частности, гены *CSTB*, *DYRK1A*, *ERG*, *ETS2*, *OLIG2*, *RUNX1* и *TIAM1*), либо кодирующих белки, играющие важную роль в гемопоэзе (ген *AIRE*, *BACH1*, *SERPINA6* [*CBG*], *DNMT3L*, *GABPA*, *IFNAR1*, *IFNAR2*, *IFNGR2*, *RCAN1*, *SOD1* и *SON*) [90, 92, 104–107]. Кроме того, здесь расположены гены 5 микроРНК, 4 из которых экспрессируются в клетках мегакариоцитарной линии дифференцировки [102, 108, 109]. Например, ген *RUNX1* является опухолевым супрессором при ОМЛ у пациентов без СД [110], и наличие трех копий при трисомии 21-й хромосомы противоречит его роли в развитии ОМЛ. Действительно, экспрессия гена *RUNX1* при ОМЛ-СД ниже, чем при остром мегакариобластном лейкозе без СД [93], и не повышена в CD34⁺-клетках печени плода [57] или чЭСК/иПСК, полученных от пациентов с трисомией 21-й хромосомы [58, 59]. Аналогично экспрессия гена *ERG*, являющегося мощным мегакариобластным онкогеном на моделях мышей, не повышена в гемопоэтических и лейкемических клетках плода с СД [57, 93]. В целом, хотя прямые доказательства того, что ассоциированные с трисомией 21-й хромосомы изменения экспрессии вышеуказанных генов в гемопоэтических клетках способны индуцировать лейкемическую трансформацию отсутствуют, эти гены подлежат дальнейшему исследованию, поскольку их роль может стать очевидной только при исследовании на чистых популяциях ГСК или клеток-предшественников.

Заключение

Данные, полученные при изучении клеток печени плода, чЭСК и иПСК, показывают, что сама по себе трисомия 21-й хромосомы обуславливает нарушения биологии ГСК и клеток-предшественников, приводя к множественным дефектам эритро-мегакариоцитарной и В-лимфоидной линий развития. Эти данные дают ключ к пониманию механизмов нарушения роста и дифференцировки ГСК при трисомии 21-й хромосомы в частности и анеуплоидии вообще, а также формируют исследовательские модели. Молекулярная основа этих эффектов сложна, является ткане- и клеточноспеци-

Таблица 5. Предполагаемые предлейкемические гемопоэтические дефекты, обусловленные трисомией 21-й хромосомы при СД

Миелоидный компартмент:

- экспансия ГСК и эритро-мегакариоцитарных клеток-предшественников в печени плода;
- гипометилирование промоторов;
- повышенная экспрессия генов, вовлеченных в эритро-мегакариоцитарную дифференцировку и трансформацию;
- подавление сигнального пути ядерного фактора активированных Т-клеток вследствие гиперэкспрессии генов *DYRK1A* и *RCAN1*

Лимфоидный компартмент:

- фетальный дефект развития В-лимфоцитов с накоплением про-В-предшественников;
- повышенная трансформируемость В-клеток-предшественников при трисомии 21-й хромосомы;
- повышенная реаранжировка хромосом, опосредуемая V(D)J (в частности, ген *CRLF2*), вследствие ареста дифференцировки В-клеток-предшественников;
- сниженное trimetилирование лизина в положении 27 в гистоне 3, возможно, вследствие повышенной экспрессии гена *HMGN1*;
- подавление сигнального пути ядерного фактора активированных Т-клеток может объяснять редкость Т-ОЛЛ

личной и зависит от микроокружения печени плода и, возможно, костного мозга.

То, как эти аномалии определяют стадии злокачественной трансформации, является более ясным в отношении миелоидных, нежели лимфоидных лейкозов (табл. 5). Есть множество доказательств того, что определяемая трисомией 21-й хромосомы экспансия эритро-мегакариоцитарных клеток-предшественников предрасполагает последние к злокачественной трансформации вследствие приобретенной мутации гена *GATA1*. Также возможно, что относительная задержка в развитии В-лимфоцитов, в сочетании с эпигенетическими нарушениями и повышенной склонностью В-клеток-предшественников к злокачественной трансформации, как это продемонстрировано на моделях мышей, и объясняет высокую частоту ОЛЛ при СД.

Литература

1. Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. Lancet. 2000;355(9199):165-9.
2. Zipursky A. Susceptibility to leukemia and resistance to solid tumors in Down syndrome. Pediatr Res. 2000;47(6):704.
3. Malinge S, Israeli S, Crispino JD. Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. Blood. 2009;113(12):2619-28.
4. Roy A, Roberts I, Norton A, Vyas P. Acute megakaryoblastic leukaemia (AMKL) and transient myeloproliferative disorder (TMD) in Down syndrome: a multi-step model of myeloid leukaemogenesis. Br J Haematol. 2009;147(1):3-12.
5. Israeli S, Vora A, Zwaan CM, Whitlock J. How I treat ALL in Down's syndrome: pathobiology and management. Blood. 2014;123(1):35-40.
6. Zwaan MC, Reinhardt D, Hitzler J, Vyas P. Acute leukemias in children with Down syndrome. Pediatr Clin North Am. 2008;55(1):53-70.
7. Taga T, Saito AM, Kudo K, Tomizawa D, Terui K, Moritake H, et al. Clinical characteristics and outcome of refractory/relapsed myeloid leukemia in children with Down syndrome. Blood. 2012;120(9):1810-5.
8. O'Brien MM, Cao X, Pounds S, Dahl GV, Raimondi SC, Lacayo NJ, et al. Prognostic features in acute megakaryoblastic leukemia in children without Down syndrome: a report from the AML02 multicenter trial and the Children's Oncology Group Study POG 9421. Leukemia. 2013;27(3):731-4.
9. Buitenkamp TD, Israeli S, Zimmermann M., Forestier E, Heerema NA, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. Blood. 2014;123(1):70-7.
10. Forestier E, Israeli S, Beverloo B, Haas O, Pession A, Michalová K, et al. Cytogenetic features of acute lymphoblastic and myeloid leukemias in pediatric patients with Down syndrome: an iBFM-SG study. Blood. 2008;111(3):1575-83.
11. Bercovich D, Ganmore I, Scott LM, Wainreb G, Birger Y, Elimelech A, et al. Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. Lancet. 2008;372(9648):1484-92.
12. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, Loudin MG, Liu W, Zhang J, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet. 2009;41(11):1243-6.
13. Russell LJ, Capasso M, Vater I, Akasaka T, Bernard OA, Calasanz MJ, et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2009;114(13):2688-98.
14. Hertzberg L, Vendramini E, Ganmore I, Cazzaniga G, Schmitz M, Chalker J, et al. 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(5):1006-17.
15. Shochat C, Tal N, Bandapalli OR, Palmi C, Ganmore I, te Kronnie G, et al. Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. J Exp Med. 2011;208(5):901-8.
16. Tal N, Shochat C, Geron I, Bercovich D, Israeli S. Interleukin 7 and thymic stromal lymphopoietin: from immunity to leukemia. Cell Mol Life Sci. 2014;71(3):365-78.
17. Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, Baumann I, Bennett JM, Kerndrup G, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. Leukemia. 2003;17(2):277-82.
18. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009;114(5):937-51.
19. Langebrake C, Creutzig U, Reinhardt D. Immunophenotype of Down syndrome acute myeloid leukemia and transient myeloproliferative disease differs significantly from other diseases with morphologically identical or similar blasts. Klin Pädiatr. 2005;217(3):126-34.
20. Ge Y, Jensen TL, Stout ML, Flatley RM, Grohar PJ, Ravindranath Y, et al. The role of cytidine deaminase and GATA1 mutations in the increased cytosine arabinoside sensitivity of Down syndrome myeloblasts and leukemia cell lines. Cancer Res. 2004;64(2):728-35.
21. Ge Y, Stout ML, Tatman DA, Jensen TL, Buck S, Thomas RL, et al. GATA1, cytidine deaminase, and the high cure rate of Down syndrome children with acute megakaryocytic leukemia. J Natl Cancer Inst. 2005;97(3):226-31.
22. Edwards H, Xie C, LaFlura KM, Dombkowski AA, Buck SA, Boerner JL, et al. RUNX1 regulates phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: role in chemotherapy sensitivity in acute megakaryocytic leukemia. Blood. 2009;114(13):2744-52.
23. Nikolaev SI, Santoni F, Vannier A, Falconet E, Giarin E, Basso G, et al. Exome sequencing identifies putative drivers of progression of transient myeloproliferative disorder to AMKL in infants with Down syndrome. Blood. 2013;122(4):554-61.
24. Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shirashi Y, Sato-Otsubo A, et al. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. Nat Genet. 2013;45(11):1293-9.
25. Greaves M. Pre-natal origins of childhood leukemia. Rev Clin Exp Hematol. 2003;7(3):233-45.
26. Klusmann JH, Creutzig U, Zimmermann M, Dworzak M, Jorch N, Langebrake C, et al. Treatment and prognostic impact of transient leukemia in neonates with Down syndrome. Blood. 2008;111(6):2991-8.
27. Zipursky A. Transient leukaemia—a benign form of leukaemia in newborn infants with trisomy 21. Br J Haematol. 2003;120(6):930-8.
28. Gamis AS, Alonso TA, Gerbing RB, Hilden JM, Sorrell AD, Sharma M, et al. Natural history of transient myeloproliferative disorder clinically diagnosed in Down syndrome neonates: a report from the Children's Oncology Group Study A2971. Blood. 2011;118(26):6752-9.

29. Roberts I, Alford K, Hall G, Juban G, Richmond H, Norton A, et al. GATA1-mutant clones are frequent and often unsuspected in babies with Down syndrome: identification of a population at risk of leukemia. *Blood*. 2013;122(24):3908-17.
30. Groet J, McElwaine S, Spinelli M, Rinaldi A, Burtscher I, Mulligan C, et al. Acquired mutations in GATA1 in neonates with Down's syndrome with transient myeloid disorder. *Lancet*. 2003;361(9369):1617-20.
31. Hitzler JK, Cheung J, Li Y, Scherer SW, Zipursky A. GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood*. 2003;101(11):4301-4.
32. Rainis L, Bercovich D, Strehl S, Teigler-Schlegel A, Stark B, Trka J, et al. Mutations in exon 2 of GATA1 are early events in megakaryocytic malignancies associated with trisomy 21. *Blood*. 2003;102(3):981-6.
33. Ahmed M, Sternberg A, Hall G, Thomas A, Smith O, O'Mearaigh A, et al. Natural history of GATA1 mutations in Down syndrome. *Blood*. 2004;103(7):2480-9.
34. Pine SR, Guo Q, Yin C, Jayabose S, Druschel CM, Sandoval C. Incidence and clinical implications of GATA1 mutations in newborns with Down syndrome. *Blood*. 2007;110(6):2128-31.
35. Heald B, Hilden JM, Zbuk K, Norton A, Vyas P, Theil KS, Eng C. Severe TMD/AMKL with GATA1 mutation in a stillborn fetus with Down syndrome. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007;4(7):433-8.
36. Massey GV, Zipursky A, Chang MN, Doyle JJ, Nasim S, Taub JW, et al. A prospective study of the natural history of transient leukemia (TL) in neonates with Down syndrome (DS): Children's Oncology Group (COG) study POG-9481. *Blood*. 2006;107(12):4606-13.
37. Maroz A, Stachorski L, Emmrich S, Reinhardt K, Xu J, Shao Z, et al. GATA1 induces hyperproliferation of eosinophil precursors in Down syndrome transient leukemia. *Leukemia*. 2014;28(6):1259-70.
38. Lange BJ, Kobrinsky N, Barnard DR, Arthur DC, Buckley JD, Howells WB, et al. Distinctive demography, biology, and outcome of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down syndrome: Children's Cancer Group Studies 2861 and 2891. *Blood*. 1998;91(2):608-15.
39. Hasle H, Abrahamsson J, Arola M, Karow A, O'Mearaigh A, Reinhardt D, et al. Myeloid leukemia in children 4 years or older with Down syndrome often lacks GATA1 mutation and cytogenetics and risk of relapse are more akin to sporadic AML. *Leukemia*. 2008;22(7):1428-30.
40. Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, Anastasi J, Karp JE, Le Beau MM, et al. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet*. 2002;32(1):148-52.
41. Xu G, Nagano M, Kaneko R, Toki T, Hayashi Y, Taketani T, et al. Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. *Blood*. 2003;102(8):2960-8.
42. Alford KA, Reinhardt K, Garnett C, Norton A, Böhmer K, von Neuhoff C, et al. Analysis of GATA1 mutations in Down syndrome transient myeloproliferative disorder and myeloid leukemia. *Blood*. 2011;118(8):2222-38.
43. Taub JW, Mundschau G, Ge Y, Poulik JM, Qureshi F, Jensen T, et al. Prenatal origin of GATA1 mutations may be an initiating step in the development of megakaryocytic leukemia in Down syndrome. *Blood*. 2004;104(5):1588-9.
44. Hollanda LM, Lima CS, Cunha AF, Albuquerque DM, Vassallo J, Ozelo MC, et al. An inherited mutation leading to production of only the short isoform of GATA-1 is associated with impaired erythropoiesis. *Nat Genet*. 2006;38(7):807-12.
45. Ganmore I, Smooha G, Izraeli S. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition. *Hum Mol Genet*. 2009;18(R1):R84-93.
46. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, Greenman CD, Raine K, et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell*. 2012;149(5):179-93.
47. Nižetić D, Groet J. Tumorigenesis in Down syndrome: big lessons from a small chromosome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(10):721-32.
48. Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, White JG, Orkin SH, Maris JM, et al. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet*. 2000;24(3):266-70.
49. Sankaran VG, Ghazvinian R, Do R, Thiru P, Vergilio JA, Beggs AH, et al. Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest*. 2012;122(7):2439-43.
50. Klar J, Khalfallah A, Arzoo PS, Gazda HT, Dahl N. Recurrent GATA1 mutations in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2014;166(6):949-51.
51. Salek-Ardakani S, Smooha G, de Boer J, Sebire NJ, Morrow M, Rainis L, et al. ERG is a megakaryocytic oncogene. *Cancer Res*. 2009;69(11):4665-73.
52. Toki T, Kaneko R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, et al. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood*. 2013;121(16):3181-4.
53. Klusmann JH, Godinho FJ, Heitmann K, Maroz A, Koch ML, Reinhardt D, et al. Developmental stage-specific interplay of GATA1 and IGF signaling in fetal megakaryopoiesis and leukemogenesis. *Genes Dev*. 2010;24(15):1659-72.
54. Li Z, Godinho FJ, Klusmann JH, Garriga-Canut M, Yu C, Orkin SH. Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1. *Nat Genet*. 2005;37(6):613-9.
55. Chou ST, Opalinska JB, Yao Y, Fernandes MA, Kalota A, Brooks JS, et al. Trisomy 21 enhances human fetal erythro-megakaryocytic development. *Blood*. 2008;112(12):4503-6.
56. Tunstall-Pedoe O, Roy A, Karadimitris A, de la Fuente J, Fisk NM, Bennett P, et al. Abnormalities in the myeloid progenitor compartment in Down syndrome fetal liver precede acquisition of GATA1 mutations. *Blood*. 2008;112(12):4507-11.
57. Roy A, Cowan G, Mead AJ, Filippi S, Bohn G, Chaidos A, et al. Perturbation of fetal liver hematopoietic stem and progenitor cell development by trisomy 21. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(43):17579-84.
58. Chou ST, Byrska-Bishop M, Tober JM, Yao Y, Vandorn D, Opalinska JB, et al. Trisomy 21-associated defects in human primitive hematopoiesis revealed through induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(43):17573-8.
59. Izraeli S. Trisomy 21 tilts the balance. *Blood*. 2008;112(12):4361-2.
60. MacLean GA, Menne TF, Guo G, Sanchez DJ, Park IH, Daley GQ, et al. Altered hematopoiesis in trisomy 21 as revealed through in vitro differentiation of isogenic induced pluripotent cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(43):17567-72.
61. Kusters MA, Versteegen RH, Gemen EF, de Vries E. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(2):189-93.
62. Whitlock JA, Sather HN, Gaynon P, Robison LL, Wells RJ, Trigg M, et al. Clinical characteristics and outcome of children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood*. 2005;106(13):4043-9.
63. Zhang CC, Lodish HF. Insulin-like growth factor 2 expressed in a novel fetal liver population is a growth factor for hematopoietic stem cells. *Blood*. 2004;103(7):2513-21.
64. Garrett RW, Emerson SG. The role of parathyroid hormone and insulin-like growth factors in hematopoietic niches: physiology and pharmacology. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;288(1-2):6-10.
65. Chou S, Lodish HF. Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(17):7799-804.
66. Starc TJ. Erythrocyte macrocytosis in infants and children with Down syndrome. *J Pediatr*. 1992;121(4):578-81.
67. Kivivuori SM, Rajantie J, Siimes MA. Peripheral blood cell counts in infants with Down's syndrome. *Clin Genet*. 1996;49(1):15-9.
68. Henry E, Walker D, Wiedmeier SE, Christensen RD. Hematological abnormalities during the first week of life among neonates with Down syndrome: data from a multihospital healthcare system. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(1):42-50.
69. Douglas SD. Down syndrome: immunologic and epidemiologic associations-enigmas remain. *J Pediatr*. 2005;147(6):723-5.
70. de Hingh YC, van der Vossen PW, Gemen EF, Mulder AB, Hop WC, Brus F, et al. Intrinsic abnormalities of lymphocyte counts in children with down syndrome. *J Pediatr*. 2005;147(6):744-7.

71. Versteegen RH, Kusters MA, Gemen EF, De Vries E. Down syndrome B-lymphocyte subpopulations: intrinsic defect or decreased T-lymphocyte help. *Pediatr Res.* 2010;67(5):563-9.
72. Roizen NJ, Amarose AP. Hematologic abnormalities in children with Down syndrome. *Am J Med Genet.* 1993;46(5):510-2.
73. David O, Fiorucci GC, Tosi MT, Altare F, Valori A, Saracco P, et al. Hematological studies in children with Down syndrome. *Pediatr Hematol Oncol.* 1996;13(3):271-5.
74. Lin SJ, Wang JY, Klickstein LB, Chuang KP, Chen JY, Lee JF, et al. Lack of age-associated LFA-1 up-regulation and impaired ICAM-1 binding in lymphocytes from patients with Down syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2001;126(1):54-63.
75. Garrison MM, Jeffries H, Christakis DA. () Risk of death for children with Down syndrome and sepsis. *J Pediatr.* 2005;147(6):748-52.
76. Gillespie KM, Dix RJ, Williams AJ, Newton R, Robinson ZF, Bingley PJ, et al. Islet autoimmunity in children with Down's syndrome. *Diabetes.* 2006;55(11):3185-8.
77. Prasher VP. Screening of medical problems in adults with Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract.* 1994;2:59-66.
78. Kirsammer G, Jilani S, Liu H, Davis E, Gurbuxani S, Le Beau MM, et al. Highly penetrant myeloproliferative disease in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Blood.* 2008;111(2):767-75.
79. Carmichael CL, Majewski IJ, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Hewitt CA, et al. Hematopoietic defects in the Ts1Cje mouse model of Down syndrome. *Blood.* 2009;113(9):1929-37.
80. Alford KA, Slender A, Vanes L, Li Z, Fisher EM, Nizetic D, et al. Perturbed hematopoiesis in the Tc1 mouse model of Down syndrome. *Blood.* 2010;115(14):2928-37.
81. McLean S, McHale C, Enright H. Hematological abnormalities in adult patients with Down's syndrome. *Ir J Med Sci.* 2009;178(1):35-8.
82. Karlsson B, Gustafsson J, Hedov G, Ivarsson SA, Annerén G. Thyroid dysfunction in Down's syndrome: relation to age and thyroid autoimmunity. *Arch Dis Child.* 1998;79(3):242-5.
83. Loh RK, Harth SC, Thong YH, Ferrante A. Immunoglobulin G subclass deficiency and predisposition to infection in Down's syndrome. *Pediatr Infect Dis J.* 1990;9(8):547-51.
84. Murphy M, Epstein LB. Down syndrome (trisomy 21) thymuses have a decreased proportion of cells expressing high levels of TCR alpha, beta and CD3. A possible mechanism for diminished T cell function in Down syndrome. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990;55(3):453-67.
85. Izraeli S. Chromosome copy number and leukemia-lessons from Down's syndrome. *Hematology.* 2005;10(Suppl. 1):164-6.
86. Letourneau A, Santoni FA, Bonilla X, Sailani MR, Gonzalez D, Kind J, et al. Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down's syndrome. *Nature.* 2014;508(7496):345-50.
87. Malinge S, Chlon T, Doré LC, Ketterling RP, Tallman MS, Paietta E, et al. Development of acute megakaryoblastic leukemia in Down syndrome is associated with sequential epigenetic changes. *Blood.* 2013;122(14):e33-43.
88. Lane AA, Chapuy B, Lin CY, Tivey T, Li H, Townsend EC, et al. Triplication of a 21q22 region contributes to B cell transformation through HMGN1 overexpression and loss of histone H3 Lys27 trimethylation. *Nat Genet.* 2014;46(6):618-23.
89. Korbel JO, Tirosh-Wagner T, Urban AE, Chen XN, Kasowski M, Dai L, et al. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(29):12031-6.
90. Malinge S, Bliss-Moreau M, Kirsammer G, Diebold L, Chlon T, Gurbuxani S, et al. Increased dosage of the chromosome 21 ortholog Dyrk1a promotes megakaryoblastic leukemia in a murine model of Down syndrome. *J Clin Invest.* 2012;122(3):948-62.
91. Ng AP, Hyland CD, Metcalf D, Carmichael CL, Loughran SJ, Di Rago L, et al. Trisomy of Erg is required for myeloproliferation in a mouse model of Down syndrome. *Blood.* 2010;115(19):3966-9.
92. Birger Y, Goldber L, Chlon TM, Goldenson B, Muler I, Schiby G, et al. Perturbation of fetal hematopoiesis in a mouse model of Down syndrome's transient myeloproliferative disorder. *Blood.* 2013;122(6):988-98.
93. Bourquin JP, Subramanian A, Langebrake C, Reinhardt D, Bernard O, Ballerini P, et al. Identification of distinct molecular phenotypes in acute megakaryoblastic leukemia by gene expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(9): 3339-44.
94. Gribble SM, Wiseman FK, Clayton S, Prigmore E, Langley E, Yang F, et al. Massively parallel sequencing reveals the complex structure of an irradiated human chromosome on a mouse background in the Tc1 model of Down syndrome. *PLoS One.* 2013;8(4):e60482.
95. Dauphinot L, Lyle R, Rivals I, Dang MT, Moldrich RX, Golfriger G, et al. The cerebellar transcriptome during postnatal development of the Ts1Cje mouse, a segmental trisomy model for Down syndrome. *Hum Mol Genet.* 2005;14(3):373-84.
96. Aït-Yahya-Graison E, Aubert J, Dauphinot L, Rivals I, Prieur M, Golfriger G, et al. Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down syndrome: impact on disease phenotypes. *Am J Hum Genet.* 2007;81(3):475-91.
97. Conti A, Fabbrini F, D'Agostino P, Negri R, Greco D, Genesio R, et al. Altered expression of mitochondrial and extracellular matrix genes in the heart of human fetuses with chromosome 21 trisomy. *BMC Genomics.* 2007;8:268.
98. Hertzberg L, Betts DR, Raimondi SC, Schäfer BW, Notterman DA, Domany E, et al. Prediction of chromosomal aneuploidy from gene expression data. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007;46(1):75-86.
99. Prandini P, Deutsch S, Lyle R, Gagnepain M, Delucinge Vivier C, Delorenzi M, et al. Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance. *Am J Hum Genet.* 2007;81(2):252-63.
100. Lockstone HE, Harris LW, Swatton JE, Wayland MT, Holland AJ, Bahn S. Gene expression profiling in the adult Down syndrome brain. *Genomics.* 2007;90(6):647-60.
101. Gefen N, Binder V, Zaliova M, Linka Y, Morrow M, Novosel A, et al. Hsa-mir-125b-2 is highly expressed in childhood ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) leukemias and confers survival advantage to growth inhibitory signals independent of p53. *Leukemia.* 2010;24(1):89-96.
102. Emmrich S, Rasche M, Schöning J, Reimer C, Keihani S, Maroz A, et al. miR-99a/100~125b tricistrons regulate hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis by shifting the balance between TGF β and Wnt signaling. *Genes Dev.* 2014;28(8):858-74.
103. Jiang J, Jing Y, Cost GJ, Chiang JC, Kolpa HJ, Cotton AM, et al. Translating dosage compensation to trisomy 21. *Nature.* 2014;500(7462):296-300.
104. Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood.* 2003;101(11):4333-41.
105. Rainis L, Toki T, Pimanda JE, Rosenthal E, Machol K, Strehl S, et al. The proto-oncogene ERG in megakaryoblastic leukemias. *Cancer Res.* 2005;65(17):7596-602.
106. Xu G, Kanezaki R, Toki T, Watanabe S, Takahashi Y, Terui K, et al. Physical association of the patient-specific GATA1 mutants with RUNX1 in acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. *Leukemia.* 2006;20(6):1002-8.
107. Yu S, Cui K, Jothi R, Zhao DM, Jing X, Zhao K, et al. GAPP controls a critical transcription regulatory module that is essential for maintenance and differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood.* 2011;117(7):2166-78.
108. Garzon R, Pichiorri RF, Palumbo T, Iuliano R, Cimmino A, Aqeilan R, et al. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(13):5078-83.
109. Klusmann JH, Li Z, Böhmer K, Maroz A, Koch ML, Emmrich S, et al. miR-125b-2 is a potential oncomiR on human chromosome 21 in megakaryoblastic leukemia. *Gen Dev.* 2010;24(5):478-90.
110. Schnittger S, Dicker F, Kern W, Wendland N, Sundermann J, Alpermann T, et al. RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with non-complex karyotype and confer an unfavorable prognosis. *Blood.* 2011;117(8):2348-57.