

การศึกษา TEL-AML1 ในเชลล์มะเริงเม็ดโลหิตขาวในเด็ก และบทบาทของยีนต่อการ  
แสดงออกของยีนเป้าหมาย

นางสาวทัศวรรณ สิงห์ศิลารักษ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
อุดมศักดิ์เพื่อพัฒนาคุณภาพชีวิต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาภาษาศาสตร์ภาษาแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-3508-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**TEL-AML1 TRANSLOCATION IN PEDIATRIC ACUTE LYMPHOBLASTIC  
LEUKEMIA: A STUDY OF TARGET GENE ACTIVATION**

Miss Tasawan Singhsilarak

ศูนย์วิทยาการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Medical Science

Faculty of Medicine  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2003  
ISBN 974-17-3508-1

Thesis Title      *TEL-AML1 TRANSLOCATION IN PEDIATRIC ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: A STUDY OF TARGET GENE ACTIVATION*

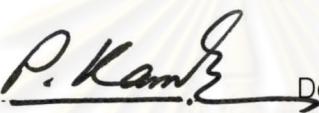
By                  Miss Tasawan Singhilarak

Field of study     Medical Science

Thesis Advisor    Associate Professor Issarang Nuchprayoon

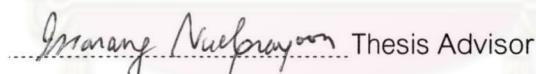
---

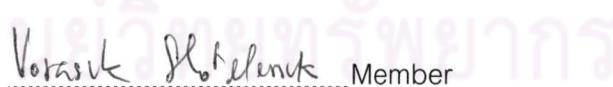
Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master Degree

  
\_\_\_\_\_  
Dean of the Faculty of Medicine  
(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

Thesis Committee

  
\_\_\_\_\_  
Chairman  
(Associate Professor Apiwat Mutirangura, M.D. Ph.D.)

  
\_\_\_\_\_  
Thesis Advisor  
(Associate Professor Issarang Nuchprayoon, M.D. Ph.D.)

  
\_\_\_\_\_  
Member

(Associate Professor Vorasuk Shotelersuk, M.D.)

  
\_\_\_\_\_  
Member

(Lieutenant Colonel Rachata Lumkul, M.D.)

ทัศวรรณ สิงห์ศิลารักษ์ : บทบาทของยีน TEL-AML1 และยีนเป้าหมายในเซลล์มะเร็งเม็ดโลหิตขาวในเด็ก (TEL-AML1 TRANSLOCATION IN PEDIATRIC ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA : A STUDY OF TARGET GENE ACTIVATION) อ.ที่ปรึกษา : รศ.นพ.อิศรางค์ นุชประยูร, 74 หน้า ISBN 974-17-3508-1

มะเร็งเม็ดโลหิตขาวเป็นมะเร็งที่พบบ่อยในเด็ก ประมาณ 70% ของผู้ป่วยสามารถรักษาให้หายได้ จากการศึกษาพบว่าสาเหตุหนึ่งคือมีความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์มะเร็งเม็ดโลหิตขาว การสลับตำแหน่งของโครโมโซมเป็นสาเหตุที่พบบ่อย และเป็นปัจจัยสำคัญที่ใช้ในการติดตามการรักษาโรค การสลับตำแหน่งของโครโมโซม t(12;21)(p13;q22) พบในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดโลหิตขาวชนิด B-precursor cell และมีความสำคัญในการพยากรณ์ถึงผลของการรักษาโรคที่อาจไม่มีการกลับมาเป็นโรคซ้ำอีก อัตราการเกิดการสลับตำแหน่งของยีน TEL และ AML1 ในผู้ป่วยเด็กที่เป็นมะเร็งเม็ดโลหิตขาวในประเทศไทย ยังไม่มีการศึกษา การสลับตำแหน่งของโครโมโซมดังกล่าวเกิดจากยีน TEL (12p13) และยีน AML1 (21q22) การเชื่อมต่อ กันของยีน TEL และ AML1 ก่อให้เกิดเป็นโปรตีน TEL-AML1 ซึ่งโปรตีนนี้รับળุน การถอดรหัสพันธุกรรมที่ตำแหน่ง promoter หรือ enhancer ในหลายยีน การศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษา อัตราการเกิด TEL-AML1 ในเด็กไทย และเพื่อศึกษาถึงการแสดงออกของยีนบางยีน เปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มที่มี TEL-AML1 และกลุ่มที่ไม่มี TEL-AML1 ไขกระดูกผู้ป่วยมะเร็งเม็ดโลหิตขาวชนิดเฉียบพลัน 39 รายที่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเม็ดโลหิตขาวชนิด B-precursor ALL ด้วยวิธี Immunophenotype นำไปศึกษาการแสดงออกของยีน TEL-AML1 และการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ผลการศึกษาพบผู้ป่วยมี การแสดงออกของ TEL-AML1 9 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 39 ราย ในกลุ่ม B-precursor ในเด็กไทยคิดเป็น ร้อยละ 23 เลือกเฉพาะเซลล์ที่เป็น B-precursor เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยการทำ Immunomagnetic isolation และตรวจหาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-PCR จากการศึกษาพบว่า การแสดงออกของยีนเป้าหมายไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p>0.05$ ) ระหว่างกลุ่มที่มีการแสดงออกของ TEL-AML1 และไม่มีการแสดงออกของ TEL-AML1 (Fisher's exact tests) ยีนเป้าหมาย ได้แก่ IL-3 ( $p=0.30$ ), TCRγ ( $p=1.00$ ), CR1 ( $p=0.71$ ), PKC ( $p=1.00$ ), และ RAG1 และจากการทดสอบความสัมพันธ์กันระหว่างยีนเป้าหมายในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดโลหิตขาวชนิดเฉียบพลันพบว่า IL-3 กับ CR1 ( $p=0.08$ ) ในกลุ่มที่มี TEL-AML1 และ IL-3 กับ PKC ( $p=0.07$ ) ในกลุ่มที่ไม่มี TEL-AML1 มีแนวโน้มที่จะมีความสัมพันธ์กัน อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาการแสดงออกของยีนเป้าหมายกับอาการของ โรคต้องมีการติดตามผลในระยะยาว

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์  
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต..ทัศวรรณ สิงห์ศิลารักษ์.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา...ฉลอง พูลวรลักษณ์  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาawan -

## 447 52235 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS ; CHROMOSOME TRANSLOCATION / TEL-AML1 FUSION GENE / CHILDHOOD ALL

TASAWAN SINGHSILARAK : TEL-AML1 TRANSLOCATION IN PEDIATRIC ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: A STUDY OF TARGET GENE ACTIVATION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ISSARANG NUCHPRAYOON, M.D. Ph.D., 74 pp. ISBN 974-17-3508-1

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common cancer in childhood. Approximately 70% of these children are curable. Chromosomal translocations are important prognostic factors. Among B-precursor ALL, the cryptic translocation t(12;21)(p13;q22) is common and is associated with a favorable outcome. The prevalence TEL-AML1 translocation in Thai children with ALL was previously unknown. The translocation results in fusion of the two genes, *TEL* (12p13) and *AML 1*(21q22). The chimeric TEL-AML1 fusion gene generates the TEL-AML1 fusion protein, which interferes with AML1-dependent transcription and inhibits basal transcription from promoter or enhancer to the various target genes. This study aims to determine the prevalence of TEL-AML1 in Thai children with ALL, and to determine the difference between TEL-AML1 positive and TEL-AML1 negative to the target genes. We collected bone marrow samples from 39 children newly-diagnosed with acute leukemia. After immunophenotype analysis, we selected B-precursor ALL cases to study TEL-AML1 expression and target gene expression. We found that TEL-AML1 translocation was detectable in 9 (23%) of 39 Thai children with B-precursor ALL. We selected CD10<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> blast cells with immunomagnetic isolation and applied RT-PCR to analyze five known target genes of TEL-AML1. We found that none of the genes were different in the expression, with the TEL-AML1 positive group and the TEL-AML1 negative group (Fisher's exact tests). These were *IL-3* ( $p=0.30$ ), *TCRγ* ( $p=1.00$ ), *CR1* ( $p= 0.71$ ), *PKC* ( $p=1.00$ ), and *RAG1*. The target gene association showed the tendency relationship between *IL-3* and *CR1* ( $p=0.08$ ) in TEL-AML1 positive ALL, *IL-3* and *PKC* ( $p=0.07$ ) in TEL-AML1 negative ALL. Clinical relevance should be confirmed in a long-term study.

Field of study Medical Science

Academic year 2003

Student's signature...Tasawan...Singhsilarak

Advisor's signature...Issarang...Nuchprayoon.

## ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my gratitude to all those who made the completion of this thesis possible. I want to thank the Committee of the Medical Science Program for giving me permission to commence this thesis and to conduct the necessary research work. I am deeply indebted to my advisor, Associate Professor Dr. Issarang Nuchprayoon, for his support and invaluable advice. His excellence in the molecular genetics of leukemia improved my own knowledge and skills. I thank Associate Professor Dr. Apiwat Mutirangura, for his stimulating guidance in this study and I express my appreciation to my other committee members, Associate Professor Vorasuk Shotelersuk, and Lieutenant Colonel Rachata Lumkul, for their helpful suggestions and insightful comments during my study.

I thank Ms.Pawinee Khuppatawindu, and the staff of the National Blood Center Thai Red Cross, for their technical assistance in immunophenotyping by flow cytometer.

I thank Dr.Wandee Ningsanond, and all of the staff at the Children's Hospital, for providing the bone marrow sample specimens of leukemic patients.

I am so grateful to Mr.Wichai, Miss Narisorn, Mr.Arkom and all of my friends for their assistance. I thank Mr.Paul Adams for correction the language.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents for their love and understanding.

This work was supported by the National Science and Technology Development Agency, the Ministry of University Affairs, Asahi Glass foundation and Chulalongkorn University.

## TABLE OF CONTENTS

|   | Page |
|---|------|
| Abstract (Thai).....                      | iv   |
| Abstract (English).....                   | v    |
| Acknowledgment.....                       | vi   |
| Table of Contents.....                    | vii  |
| List of Tables.....                       | ix   |
| List of Figures.....                      | x    |
| List of Abbreviations.....                | xi   |
| Chapter                                   |      |
| I. Introduction.....                      | 1    |
| II. Review of the Related Literature..... | 7    |
| III. Materials and Methods.....           | 22   |
| IV. Results.....                          | 32   |
| V. Discussion and Conclusion.....         | 44   |
| References.....                           | 48   |
| Appendices.....                           | 56   |
| Appendix A.....                           | 57   |
| Appendix B.....                           | 59   |
| Appendix C.....                           | 64   |

|                 |    |
|-----------------|----|
| Appendix D..... | 71 |
| Biography.....  | 74 |



# សាខាអាជីវិត្យរោគ ជុំផលសកម្មមហាវិទ្យាល័យ

## LIST OF TABLES

| Table   | Page |
|---|------|
| 1. Genetic abnormalities in leukemia  | 9    |
| 2. Contingency tables showing Fisher's exact test between two group   | 30   |
| 3. Comparison of the clinical laboratory features of patients with and without<br>TEL-AML1 gene expression. | 36   |
| 4. Relationship between TEL-AML1 expression and target gene expression                                      | 42   |
| 5. The association of each target gene  | 43   |
| 6. Target gene expression in TEL-AML1 positive ALL  | 71   |
| 7. Target gene expression in TEL-AML1 negative ALL  | 72   |


  
**ศูนย์วิทยทรรพยากร**  
**จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

## LIST OF FIGURES

| Figure   | Page |
|--|------|
| 1. Model of chromosome translocation   | 8    |
| 2. Schematic representation of <i>TEL-AML1</i> fusion transcript                         | 13   |
| 3. <i>TEL-AML1</i> translocation breakpoint  | 13   |
| 4. Partial nucleotide sequence of Interleukin-3 promoter region                          | 16   |
| 5. Partial nucleotide sequence of T-cell receptor gamma enhancer region                  | 17   |
| 5. Partial nucleotide sequence of Complement receptor 1 promoter region                  | 18   |
| 7. Partial nucleotide sequence of Protein kinase C promoter region                       | 19   |
| 8. Partial nucleotide sequence of Recombination activating gene 1 promoter region        | 20   |
| 9. Schematic representation of research methodology                                      | 22   |
| 10. Pie chart representing prevalence of acute leukemia patients                         | 32   |
| 11. Flow cytometry representing Immunophenotype of an ALL patient                        | 34   |
| 12. RT-PCR amplification of <i>TEL-AML1</i> transcript                                   | 35   |
| 13. Flow cytometry representing CD10 and CD19 positive using<br>Immunomagnetic isolation | 37   |
| 14. RT-PCR pattern of Interleukin-3 transcript   | 38   |
| 15. RT-PCR pattern of T-cell receptor gamma transcript                                   | 39   |
| 16. RT-PCR pattern of Complement receptor 1 transcript                                   | 39   |
| 17. RT-PCR pattern of Protein kinase C transcript  | 40   |
| 18. RT-PCR pattern of Recombination activating gene 1 transcript                         | 41   |
| 19. Southern blot hybridization analysis of recombination activating gene 1 gene         | 41   |
| 20. <i>TEL</i> and <i>AML1</i> oligonucleotide sequence primers                          | 64   |
| 21. Interleukin-3 oligonucleotide sequence primers                                       | 65   |
| 22. T-cell receptor gamma oligonucleotide sequence primers                               | 66   |
| 23. Recombination activating gene 1 sequence oligonucleotide primers                     | 67   |
| 24. Complement receptor 1 oligonucleotide sequence primers                               | 68   |
| 25. Protein Kinase C oligonucleotide sequence primers                                    | 69   |
| 26. Beta-actin oligonucleotide sequence primers  | 70   |

## LIST OF ABBREVIATIONS

|              |   |                                 |
|--------------|---|---------------------------------|
| ALL          | = | Acute lymphoblastic leukemia    |
| TEL          | = | Translocation Ets Leukemia      |
| AML1         | = | Acute myeloid leukemia1         |
| IL-3         | = | Interleukin-3                   |
| TCR $\gamma$ | = | T-cell receptor gamma           |
| CR1          | = | Complement Receptor type 1      |
| PKC          | = | Protein kinase C                |
| RAG1         | = | Recombination activating gene 1 |
| TF           | = | Transcription factor            |
| RT           | = | Reverse transcription           |
| cDNA         | = | Complementary DNA               |
| PCR          | = | Polymerase chain reaction       |

ศูนย์วิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย