การศึกษา TEL-AML1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดโลหิตขาวในเด็ก และบทบาทของยีนต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมาย

นางสาวทัศวรรณ สิงห์ศิลารักษ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
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 Singhsilarak
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

P. Kam. Dean of the Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

Thesis Committee

Apiwat Mutirangura Chairman

(Associate Professor Apiwat Mutirangura, M.D. Ph.D.)

Issarang Nuchprayoon Thesis Advisor

(Associate Professor Issarang Nuchprayoon, M.D. Ph.D.)

Vorasuk Shotelersuk Member

(Associate Professor Vorasuk Shotelersuk, M.D.)

Rachata Lumkul Member

(Lieutenant Colonel Rachata Lumkul, M.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 จากการศึกษาพบว่าสาเหตุหนึ่งคือมีความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว การสลับตำแหน่งของโครโมโซมเป็นสาเหตุที่พบบ่อย และเป็นปัจจัยสำคัญที่ใช้ในการติดตามการรักษาโรค การสลับตำแหน่งของโครโมโซม t(12;21)(p13;q22) พบในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด B-precursor cell และมีความสำคัญในการพยากรณ์ถึงผลของการรักษาโรคที่อาจไม่มีการกลับมาเป็นโรคซ้ำอีก อัตราการเกิดการสลับตำแหน่งของยีน *TEL* และ *AML1* ในผู้ป่วยเด็กที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษา การสลับตำแหน่งของโครโมโซมดังกล่าวเกิดจากยีน *TEL* (12p13) และยีน *AML1* (21q22) การเชื่อมต่อกันของยีน *TEL* และ *AML1* ก่อให้เกิดเป็นโปรตีน TEL-AML1 ซึ่งโปรตีนนี้รบกวนการถอดรหัสพันธุกรรมที่ตำแหน่ง promoter หรือ enhancer ในหลายยีน การศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาอัตราการเกิด TEL-AML1 ในเด็กไทย และเพื่อศึกษาถึงการแสดงออกของยีนบางยีน เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มี TEL-AML1 และกลุ่มที่ไม่มี TEL-AML1 ไขกระดูกผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน 39 รายที่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด B-precursor ALL ด้วยวิธี Immunophenotype นำไปศึกษาการแสดงออกของยีน TEL-AML1 และการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ผลการศึกษาพบผู้ป่วยมีการแสดงออกของ TEL-AML1 9 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 39 ราย ในกลุ่ม B-precursor ในเด็กไทยคิดเป็นร้อยละ 23 เลือกเฉพาะเซลล์ที่เป็น B-precursor เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยการทำ Immunomagnetic isolation และตรวจหาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-PCR จากการศึกษาพบว่าการแสดงออกของยีนเป้าหมายไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ระหว่างกลุ่มที่มีการแสดงออกของ TEL-AML1 และไม่มีการแสดงออกของ TEL-AML1 (Fisher's exact tests) ยีนเป้าหมายได้แก่ *IL-3* ($p=0.30$), *TCRγ* ($p=1.00$), *CR1* ($p= 0.71$), *PKC* ($p=1.00$), และ *RAG1* และจากการทดสอบความสัมพันธ์กันระหว่างยีนเป้าหมายในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันพบว่า *IL-3* กับ *CR1* ($p=0.08$) ในกลุ่มที่มี TEL-AML1 และ *IL-3* กับ *PKC* ($p=0.07$) ในกลุ่มที่ไม่มี TEL-AML1 มีแนวโน้มที่จะมีความสัมพันธ์กัน อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาการแสดงออกของยีนเป้าหมายกับอาการของโรคต้องมีการติดตามผลในระยะยาว

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต...ทัศวรรณ สิงห์ศิลารักษ์...
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา...[illegible]...
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

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 $CD10^{+}CD19^{+}$ 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 Khuppatawindtu, 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.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Appendix D.....71

Biography.....74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Model of chromosome translocation	8
2. Schematic representation of *TEL-AML1* fusion transcript	13
3. *TEL-AML1* 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 representating Immunophenotype of an ALL patient	34
12.RT-PCR amplification of TEL-AML1 transcript	35
13.Flow cytometry representating CD10 and CD19 positive using 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. TEL and AML1 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

ALL	=	Acute lymphoblastic leukemia
TEL	=	Translocation Ets Leukemia
AML1	=	Acute myeloid leukemia1
IL-3	=	Interleukin-3
TCRγ	=	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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย