

의학 석사학위 논문

급성 백혈병과 관련된 유전자 이상을 발견하기
위한 Multiplex RT-PCR의 효용성

아주대학교 대학원

의학과

정연무

급성 백혈병과 관련된 유전자 이상을 발견하기
위한 Multiplex RT-PCR의 효용성

지도교수 김 호 철

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2005년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

정 연 무

정연무의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 김 호 철 인

심사위원 임 호 영 인

심사위원 최 진 혁 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2004년 12월 17일

급성 백혈병과 관련된 유전자 이상을 발견하기 위한 Multiplex RT-PCR의 효용성

목적: 급성 백혈병에서 발견되는 유전자 이상은 발병원인, 예후 그리고 치료와 밀접한 관계가 있다. 전통적인 염색체 검사는 위음성률이 높고 시간과 노력이 많이 소모되는 작업으로, 이런 결점을 보완하여 빠르고 정확하게 유전자 이상을 발견할 수 있도록 고안된 multiplex RT-PCR을 진단된 급성백혈병 환자에게 적용하여 염색체 검사 결과와의 비교를 통해 효용성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법: 후향적인 연구로 1994년 9월부터 2004년 2월 사이에 아주대학교 병원에서 급성백혈병을 진단받고 치료 받은 환자 중 염색체 검사 결과가 알려져 있고, 진단 당시 채취한 골수세포가 동결 보관되어 있는 78명의 환자를 대상으로 하였다. 동결보관된 골수세포로부터 mRNA를 추출하고 HemaVision[®] kit (DNA Technology A/S, Research Park, aarhus, Denmark)을 이용하여 multiplex RT-PCR system을 수행하였다. 이 결과를 토대로 알려진 염색체검사의 결과와 multiplex RT-PCR 결과를 비교분석하였다.

결과: 대상 환자들의 중앙연령은 35.5세 (범위, 1-84세) 이였고, 남자 40명, 여자가 38명이었다. 급성 골수성 백혈병은 59례였고, 급성 림프구성 백혈병은 19례였다.

24명의 환자에게서 염색체 검사와 multiplex RT-PCR의 결과가 일치하지 않았고, 18명의 환자가 염색체 검사에서 정상염색체형을 보였지만 multiplex

RT-PCR에서 이상이 발견되었다.[t(15;17): 4명, t(8;21): 4명, t(9;22): 3명, t(9;11) 3명, t(11;19) 2명, t(9;9): 1명, inv(16): 1명] 6명의 환자는 multiplex RT-PCR에서 이상이 발견되지 않았으나 염색체 검사에서 유전자 전이가 발견되었다. 그 중 3명은 multiplex RT-PCR이 찾아내지 못하는, 급성 골수성 백혈병에서 알려진 임상적 유의성이 없는 유전자 재조합이었고{t(3;3) 1명, t(3;11) 1명, t(2;12)+t(8;14) 1명}, 3명은 t(15;17)을 multiplex RT-PCR이 찾아내지 못했는데, 그 중 2명은 급성골수성 백혈병 M3형이었으나 PML-RARa에 대한 FISH와 단독 RT-PCR에서 음성을 나타내었고, 1명은 급성 림프구성 백혈병 환자였다.

결론: 염색체 검사와 multiplex RT-PCR의 일치률은 73%를 보였으며, 염색체 검사에서 발견하지 못한 임상적으로 중요한 유전자 이상을 더 정확하고 신속하게 multiplex RT-PCR를 이용하여 찾아낼 수 있었다.

핵심어: 급성 백혈병, 유전자 변이, Multiplex RT-PCR

차 례

국문요약	i
차례	iii
그림 차례	iv
표 차례	v
I. 서론	1
II. 대상 및 방법	3
III. 결과	10
IV. 고찰	15
V. 결론	18
참고문헌	19
영문요약	23

그림 차례

Fig. 1. Flow diagram illustrating the multiplex RT-PCR and split-out analysis	9
Fig. 2. Interpretation table of multiplex RT-PCR system	11

표 차례

Table 1. Characteristics of the patients	10
Table 2. Prevalence of gene abnormality	12
Table 3. The cases of disparity between chromosome study and multiplex RT-PCR	13
Table 4. Comparison multiplex RT-PCR with chromosome study	14
Table 5. Cryptic translocation which can be found by multiplex RT-PCR	16

I. 서 론

급성백혈병에서 염색체 분석은 진단과 예후에 중요한 가치를 가지고 있음이 밝혀져 있고(Rowley, 1990; Rowley와 LeBeau, 1989; Bloomfield와 Chapelle, 1987; Yunis와 Brunning, 1986) 전통적인 Giemsa 염색법(G-banding)을 이용한 염색체 분석을 통해 규칙성 있는 염색체의 이상이 50% - 90%의 급성 골수성 백혈병에서 발견된다(Look, 1997; Pui, 1995). 최근의 분자생물학의 발전은 염색체검사 이외에 FISH(Fluorescein In Situ Hybridization)와 RT-PCR(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)과 같은 민감도 높은 검사를 이용하여 더 정확하게 백혈병과 관계된 유전자 변이를 찾을 수 있게 되었다. 또 세포사멸기전에 관련되는 발암유전자나 암억제 유전자의 변이와 재조합은 백혈병 발병과 관련이 되어 있어서 이에 대한 분자표적치료제가 개발되어 사용 중이다(Druker, 2002; Mistry등, 2002).

임상적으로 처음 진단된 백혈병의 경우 보다 빠르고, 정확하고, 간편하게 분자 생물학적인 진단과 예후군을 결정하여 치료지침을 결정해야한다. 하지만 염색체 검사는 위양성률이 높고, 분열기의 세포가 충분히 있어야만 결과를 얻을 수 있으며, 해석할 수 없는 모자이크양상의 염색체를 보이는 경우도 있고, 시간과 노력을 많이 필요로 한다(Grimwade등, 1997). 이에 반해 FISH나 RT-PCR과 같은 분자생물학적인 방법들은 소량의 검체만을 가지고 검사가 가능하며, 민감도가 뛰어나지만, 다양한 유전자변이를 한번에 찾아 낼 수 없고, 위양성률이 높은 단점이 있다.

이와 같은 현재의 진단방법들의 문제점을 극복하기 위해 정확하고 빠른 새로

운 기술이 필요하게 되었고, Pallisgaard 등은 multiplex RT-PCR을 통해 동시에 29개의 유전자재조합을 찾아낼 수 있고, 여러 가지 백혈병과 악성혈액질환에서 일차진단법으로 사용될 수 있음을 발표하였다(Pallisgaard등, 1998; Strehl등, 2001). 하지만 우리나라에서는 아직 임상에서 대규모의 환자들을 대상으로 multiplex RT-PCR system을 적용한 보고는 없다.

저자는 본 아주대학교 병원에서 진단된 급성 백혈병 환자들의 보관된 골수세포들을 이용하여 multiplex RT-PCR을 적용해보고 통상적인 염색체 검사결과와 multiplex RT-PCR 결과를 비교하여 그 효용성을 살펴보았다.

II. 대상 및 방법

A. 연구 대상

1994년 9월부터 2004년 2월 사이에 아주대학교병원에서 새로 진단된 급성 백혈병환자 78명을 대상으로 후향적인 연구를 하였다. 모든 대상 환자들은 진단 당시 골수검사와 염색체 검사가 이루어졌고, 일부의 환자는 PML-RARa, AML/Eto, Bcr/abl에 대한 RT-PCR과 FISH 검사가 행해졌다. 환자들의 동결보관된 골수검체를 이용하여 multiplex RT-PCR을 시행하였고 이들의 염색체 검사 결과, 임상소견, 치료, 생존 정보가 담긴 데이터베이스가 본 연구에 사용되었다.

B. Multiplex RT-PCR

보관된 환자들의 동결 골수 검체로 HemaVision[®] kit (DNA Technology A/S, Research Park, Aarhus, Denmark) multiplex RT-PCR system을 수행하였다.

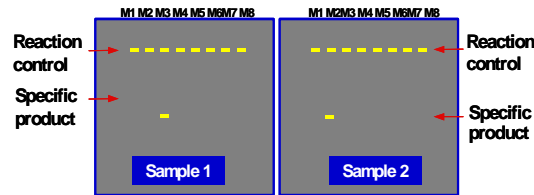
Multiplex RT-PCR system은 2단계로 나누어져있다(Pallisgaard등, 1998). 골수세포로부터 RNA를 추출해 내고, 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 만들어 Master PCR을 통해 8개군의 비정상띠 유무를 파악하고, 비정상띠가 존재하면 다음 단계로 비정상띠의 정체를 밝히는 Split-out PCR을 시행한다. (Fig. 1.)은 이 과정을 설명한 모식도이다.

C. 염색체 분석

G banding법이 이용되었고 20개의 세포중기 세포(metaphase cell)로부터 얻은 염색체를 Cytovision system으로 분석하였다.

cDNA synthesis - First Master PCR

RNA preparation
 ↓
 cDNA synthesis
 ↓
 First Master PCR amplification followed by Nested PCR
 ↓
 Detection



Split-out PCR

Split-out PCR amplification followed by Nested PCR
 ↓
 Sample 1: Specific product in lane 3 ⇒ Split-out-primer solutions M3A-M3D are used
 Sample 2: Specific product in lane 2 ⇒ Split-out-primer solutions M2A-M2E are used



Interpretation
 Sample 1: specific product in lane 2 → The sample has translocation t(17;19)(q22;p13)
 Sample 2: specific product in lane 1 → The sample has translocation t(1;11)(p32;q23)

Fig. 1. Flow diagram illustrating the multiplex RT-PCR and split-outanalysis

III. 결 과

A. 대상 환자들의 특성

대상 환자들의 중앙연령은 35.5세 (범위, 1-84세) 이었고, 남자 40명, 여자가 38명이었다. 급성 골수성 백혈병은 59례였고, 급성 림프구성 백혈병은 19례이었으며, 그 밖의 대상 환자들의 임상적인 특징들은 (Table. 1)과 같다.

Table 1. Characteristics of patients.

Gender (M/F)	40/38
Age, years, median (range)	35 (1-84)
Diagnosis	
AML	59
M0	3
M1	9
M2	19
M3	13
M4	10
M5	3
M6	2
ALL	19

B. Multiplex RT-PCR

모든 동결보관된 검체로부터 충분한 양의 RNA를 추출하는데 성공하였고, multiplex RT-PCR system을 수행하는데 기술적인 문제는 없었다.

45개의 검체에서 유전자 재조합으로 인한 비정상 전사물(fusion transcript)를 검출하였다. (Fig. 2.)에서 multiplex RT-PCR을 사용하여 발견할 수 있는 유전자 변이와 Table 2.에서 본 연구에서 발견한 유전자 변이의 빈도를 나타내었다.

	M1		M2		M3		M4
MIX	TRANSLOCATION	MIX	TRANSLOCATION	MIX	TRANSLOCATION	MIX	TRANSLOCATION
M1A	t(X;11)(q13;q23)	M2A	t(1;11)(p32;q23)	M3A	t(1;19)(q23;p13)	M4A	t(8;21)(q22;q22)
M1B	t(6;11)(q27;q23)	M2B	t(11;17)(q23;q21)	M3B	t(17;19)(q22;p13)	M4B	t(3;21)(q26;q22)
M1C	t(11;19)(q23;p13.1)	M2C	t(11;19)(q23;p13.3)	M3C	t(12;21)(p13;q22)	M4C	t(16;21)(p11;q22)
M1D	t(10;11)(p12;q23)	M2D	t(10;11)(p12;q23)	M3D	TAL1 ^d (40kb deletion)	M4D	t(15;17)(q12;q22)
	M5		M6		M7		M8
MIX	TRANSLOCATION	MIX	TRANSLOCATION	MIX	TRANSLOCATION	MIX	TRANSLOCATION
M5A	t(4;11)(q21;q23)	M6A	inv(16)(p13;q22)	M7A	t(6;9)(p23;q34)	M8A	t(11;17)(q23;q21)
M5B	t(10;11)(p12;q23)	M6B	t(9;22)(q34;q11)	M7B	t(9;9)	M8B	t(3;21)(q26;q22)
M5C	t(11;19)(q23;p13.3)	M6C	t(9;12)(q34;p13)	M7C	inv(16)(p13;q22)	M8C	t(15;17)(q21;q22)
M5D	t(9;11)(q22;q23)	M6D	t(5;12)(q33;p13)	M7D	t(3;21)(q26;q22)	M8D	t(5;17)(q35;q21)
M5E	t(1;11)(q21;q23)	M6E	t(12;22)(p13;q11)			M8E	t(3;5)(q25.1;q34)
						M8F	t(9;22)(q34;q11)

Fig. 2. Interpretation table of multiplex RT-PCR system

Table 2. Prevalence of gene abnormality.

Translocation	n
t(8;21)(q22;q22)	11
t(15;17)(q21;22)	8
t(9;22)(q34;q11)	6
t(11;19)(q23;p13.1)	2
t(9;11)(q22;23)	2
t(9;9)	1
t(3;5)(q25.1;q34)	1
inv(16)(p13;q22)	1

C. 염색체 검사

전체 환자의 50%인 39명의 환자는 정상염색체형을 보였다. 18명의 환자는 G-banding을 통해 염색체의 균형전위(balanced translocation)를 확인할 수 있었으며 나머지 18명의 환자에서는 염색체의 절단, 모자이크양상등의 이상을 보였다.

D. 염색체 검사와 Multiplex RT-PCR과의 비교

정상염색체형을 보이는 18명의 환자에서 multiplex RT-PCR의 이상이 발견되었다. 그 중에는 t(15;17), t(8;21)이 각각 4명이 있었고, t(9;22) 3명, t(9;11) 3명, t(11;19) 2명 그리고 t(9;9), inv(16)이 한 명씩 포함되어 있었다.

6명의 환자는 multiplex RT-PCR에서 이상이 발견되지 않았으나 염색체 검사에서 유전자 전이가 발견되었다. 그 중 3명은 multiplex RT-PCR이 찾아내지 못하는, 급성 골수성 백혈병에서 알려진 임상적 유의성이 없는 유전자 재조합이었던

고{t(3;3) 1명, t(3;11) 1명, t(2;12)+t(8;14)1명}, 3명은 t(15;17)을 multiplex RT-PCR이 찾아내지 못했는데, 그 중 2명은 급성골수성 백혈병 M3형이었으나 PML-RARa에 대한 FISH와 단독 RT-PCR에서 음성을 나타내었고, 1명은 급성 림프구성 백혈병 환자였다. (Table 3.)에 그 결과를 요약하였다.

Table 3. The cases of disparity between chromosome study and multiplex RT-PCR.

Chromosome study		mRT-PCR	
46XX or 46XY	18	t(15;17)	4
		t(8;21)	4
		t(9;22)	3
		t(9;11)	3
		t(11;19)	2
		Inv(16)	1
		T(9;9)	1
t(15;17)	3		
t(3;3)*	1	Negative	6
t(3;11)*	1		
t(2;12)*,(8;14)*	1		

*: mRT-PCR has no probe which can detect this type of translocations

염색체 검사와 multiplex RT-PCR의 일치률은 73%를 보였다(Table 4).

Table 4. Comparison multiplex RT-PCR with chromosome study.

		Chromosome study	
		Abnormal	Normal
MRTPCR	abnormal	15	18
	normal	3(3)*	39

* 3 patients have translocation which type cannot be detected by multiplex RT-PCR

IV. 고 찰

악성혈액질환에서 염색체의 균형전좌가 가지는 의미는 크다. 첫째, 염색체 전좌로 인한 이상 유전자가 백혈병 발병과정에 1차 원인이 될 수있다(Bloomfield와 Chapelle, 1987; Yunis와 Brunning, 1986; Look, 1997). 둘째, 염색체의 균형전좌와 이상유전자가 백혈병에서 독립적인 예후인자이다(Look, 1997; Pui, 1995; Druker, 2002). 예를 들어 t(8;21), t(15;17), inv(16)는 급성 골수성 백혈병에서 좋은 예후인자이고, 소아 급성 림프구성 백혈병에서 t(12;21)도 좋은 예후인자에 속한다(Pallisgaard등, 1999). 반면에 Bcr/abl 에 관련한 t(9;22)은 급성 백혈병에서 나쁜 예후 인자로 구분되어, 치료방침결정에 영향을 주게 된다. 셋째, 염색체 균형전위로 인한 이상유전자와 그 산물들은 최근에 개발되고 있는 분자 표적치료의 목표물이 된다. PML/RARa에 대한 all-trans retinoic acid 와 Bcr/abl에 의한 tyrosine kinase 억제제인 Gleevec(STI571), 급성 백혈병에 나타나는 FLT3 유전자의 internal tandem duplication에 대한 SU5416(Yee등, 2002) 등이 있다.

이밖에 미세잔류중양에 대한 검사에도 염색체 균형전위를 이용할 수 있다(Gabert등 2003).

이와 같은 중요성으로 급성백혈병 환자에게 있어 염색체의 이상유무와 유전자 변이를 신속정확하게 찾아내는 것은 매우 중요하다. 현재까지 염색체의 모양으로 염색체의 이상유무를 판별하는 G-banding법은 적어도 20개 이상의 분열중기 세포가 있어야 하며, 위음성률이 높고, 일부 악성세포들이 외부에서 배양되지 않아 검사가 불가능해 지는 등의 단점을 가지고 있다. 특히 t(12;21)처럼 염색체의 가장자리에서 일어나는 전위는 염색체 검사에서 찾지 못하는 경우가 많다

(Pallisgaard등, 1999).

1998년 Pallisgaard에 의해 소개된 이후 Multiplex RT-PCR은 여러 연구들을 통해 그 효용성이 증명되고 있다(Strehl등, 2001; Hany등, 2003; Loredana등, 2003; Lene등, 2004).

본 연구는 후향적인 조사로 국내 급성 백혈병 환자에서 나타나는 유전자 변이의 빈도는 알아볼 수는 없었지만, 기존의 염색체 검사법만으로는 찾을 수 없었던 급성백혈병의 예후와 관련된 중요한 유전자변이를 새로운 진단법인 mutiplex RT-PCR을 통해 정확하게 발견할 수 있었다. Multiplex RT-PCR이 발견하지 못한 염색체 검사의 이상은 FISH, 단독 RT-PCR 결과와 임상진단을 고려해 볼 때 염색체 검사의 위양성결과라고 의심되어진다.

또한 형태학적으로는 염색체 일부의 절단으로 혼돈될 수 있었던 또 다른 형태의 이상을 mutiplex RT-PCR system은 정확하게 알려주는 경우도 7례가 있었다(Table 5).

Table 5. Cryptic translocation which can be found by multiplex RT-PCR.

Chromosome analysis	Multiplex RT-PCR
46,XY[14]/45,X,-Y[3]/45,XY,-7[2]/45,XY,-9[1]	t(15;17)(q21;q22)
47,XX,21q+[18]/46,XX[2]	t(9;11)(q22;q23)
46,XX[16]/45,XX,der(21;22)(q10;q10)[4]	t(9;11)(q22;q23)
48,XX,-8,+8p+X2,13p+,+mar	t(9;11)(q22;q23)
46,X,-Y,2p-,21p+[19]/46,XY[1]	t(8;21)(q22;q22)
45,XY,8q-, -21	t(8;21)(q22;q22)
48,XY,+4,8q-,+21q,+X	t(8;21)(q22;q22)

multiplex RT PCR system은 알려진 유전자 이상외에 염색체의 숫적이상, 모자이크 양상, 염색체 일부의 절단 등을 알 수는 없어서 염색체 검사를 완전히 대체할 수는 없을 것으로 생각되지만, 효율적이고 신속하고 정확하며 가격이 저렴한 분자 생물학적 검사로 향후 악성 혈액질환에서 초기진단검사로 사용될 수 있을 것으로 사료되며, 이를 위해 전향적인 연구가 필요하겠다.

V. 결 론

결론적으로 본 연구에서는 multiplex RT-PCR system 이 신속하고, 정확하게 급성 백혈병에서 이상 유전자를 찾을 수 있는 새로운 진단법임을 밝혔고, 기존의 진단술기와의 상이점을 고려해볼 때 환자에 대한 더 많은 정보를 얻을 수 있었으며, 이외에 다른 악성 혈액질환에서의 유전자변이를 찾는데 multiplex RT-PCR이 유효한지에 대해 추가적인 연구가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

1. Bloomfield CD, de la Chapelle A : Chromosome abnormalities in acute non-lymphocytic leukemia: clinical and biological significance. *Semin Oncol* 14:372-381, 1987
2. Druker BJ : Imatinib and chronic myeloid leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy. *Eur. J. of cancer* 38(suppl. 5):S70-S76, 2002
3. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cave H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, Gonzalez M, Viehmann S, Malec M, Saglio G & van Dongen JJ : Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 17:2318-2357, 2003
4. Grimwade D, Gorman P, Duprez E, Howe K, Langabeer S, Oliver F, Walker H, Culligan D, Water J, Pomfret M, Goldstone A, Burnett A, Freemont P, Sheer D, & Solomon E : Characterization of cryptic rearrangement and variant translocations in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 90:4876-4885, 1997

5. Hany A, Chen SP, Wong HL, Yoeh A : Validation of a multiplex RT-PCR assay for screening significant oncogene fusion transcripts in children with acute lymphoblastic leukemia. *Singapore Med J* 44:517-520, 2003
6. Lene HO, Niels C, Andreja D, Gitte K, Eigil K, Peter H : Prospective application of a multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of balanced translocation in leukemia: a single-laboratory study of 390 pediatric and adult patients. *British J. of haematology* 127:59-66, 2004
7. Look AT: Oncogenic transcription factors in human acute leukemias. *Science* 278:1059-1064, 1997
8. Loredana E, Marco M, Luisa M, Givanna M, Sonia B, Mauro K, Giulio DR, Robin F, Giuseppe C : A multiplex RT-PCR strategy for the diagnostic molecular screening of chimeric genes: a clinical evaluation on 170 patients with acute lymphoblastic leukemia. *haematologica* 88:275-279, 2003
9. Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E & Grimwade D: The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia: implication for the clinical

management of disease. *Blood reviews* 17:71-97, 2003

10. Pallisgaard N, Clausen N, Schroder H & Hokland P : Rapid and sensitive minimal residual disease detection in acute leukemia by quantitative real-time RT-PCR exemplified by t(12;21) TEL-AML1 fusion transcript. *Genes, Chromosomes and Cancer* 26:355-365, 1999
11. Pallisgaard N, Hokland P, Riishoj DC, Pedersen B & Jorgensen P : Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood* 92, 574-588, 1998
12. Pui CH : Childhood leukemias. *NEJM* 332:1618-1630, 1995
13. Rowley JD : Recurring chromosome abnormalities in leukemia and lymphoma. *Semin Hematol* 27:122-131, 1990
14. Rowley JD, LeBeau MM : Cytogenetic and molecular analysis of therapy-related leukemia. *Ann NY Acad Sci* 567:130-139, 1989
15. Strehl S, Konig M, Mann G & Haas OA : Multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction screening in childhood acute myeloblastic leukemia. *Blood* 97, 805-808, 2001

16. Yee KW, O'Farrell AM, Smolich BD, Cherrington JM, McMahon G, Wait CL, McGreevey LS, Griffith DJ & Heinrich MC : SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. *Blood*, 100:2941-2949, 2002

17. Yunis JJ, Brunning Rd: Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Clin Hematol* 15:597-607, 1986

- ABSTRACT -

**Application of Multiplex Reverse-Transcriptase
Polymerase Chain Reaction for Identification of
Leukemia Associated Gene Abnormalities**

Youn-Mu Jung

Department of Medical Sciences
The Graduate school, Ajou University

(supervised by Professor Hugh Chul Kim)

Puopose: The best prognostic predictor for acute leukemia is known to be the finding of genetic abnormalities of leukemic cells. Methods for detecting the genetic abnormalities include chromosomal studies for karyotyping, FISH(Fluorescence in situ hybridization) and RT-PCR. However, each methods have limitations i.e. low sensitivity in karyotyping, uncertainty of molecular probe to be used in FISH or RT-PCR methods. Multiplex RT-PCR(MRT-PCR) allows simultaneous detection of 29 fusion genes, more

than 80 break points and splice variant. Therefore, this method can be used for the detection of molecular abnormality in fresh unknown leukemic cases, as well as for molecular remission in follow-up cases. The aim was to demonstrate whether a MRT-PCR system might be successfully used to screen a large number of patients with acute leukemia and compare the result with that of chromosome studies.

Design and Method: Frozen bone marrow cells from 78 patients, who were diagnosed with acute leukemia at Ajou university hospital between September 1994 and February 2004, were used for MRT-PCR. In all samples with known conventional cytogenetic results, we performed MRT-PCR and compared with conventional cytogenetic study regarding the concordance rate and analyzed discordant cases regarding their types.

Results: 78 samples(40 male and 38 female patients) were analyzed, and there were 59 AML patients and 19 ALL patients. We successfully obtained the mRNA from all frozen samples. In 21 cases, we identified gene abnormalities with chromosome studies and most of them (15/21) showed the same abnormalities with MRT-PCR.

In 57 patients with normal karyotype in cytogenetic technique, 18 translocations of clinical significance by MRT-PCR method were identified. In 18 discordant cases, there were 4 cases with t(15;17), 4 cases with t(8;21), 3 cases with t(9;22), 2 cases with t(11;19) and 4 others [t(9;11),t(9;9),t(3;11),inv(16)]

Conclusion: There were 73% concordance rate between cytogenetic technique

and MRT-PCR. Furthermore, clinically significant translocations were detected by MRT-PCR in 18 out of 57 normal karyotype patients, indicating improved sensitivity with MRT-PCR. Further investigations are needed to ascertain the usefulness of MRT-PCR for the screening tool of leukemic gene abnormalities

Key words : Acute leukemia, gene abnormality, Multiplex RT-PCR