

**Uttrykk av Wilms tumor gen 1(WT1)
ved akutt myelogen leukemi**

**5.årsoppgave i Stadium IV
medisinstudiet ved
Universitetet i Tromsø.**

Av: Hilde Laukvik, mk-02

Veileder: Bjørn Skogen

Maria Therese Ahlên

Tromsø, mars -07

Sammendrag

Pasienter med akutt myelogen leukemi som oppnår komplett remisjon etter behandling har mindre enn 5 % morfologiske blaster i beinmargsprøven. De resterende leukemicellene kan representere diagnosen minimal restsykdom (MRD), og kan være utgangspunktet for oppvekst av den leukemiske cellepopulasjonen og gi klinisk tilbakefall av sykdommen. For å følge sykdomsutviklingen i MRD, brukes i dag multiparameter flow cytometri og kvantitativ PCR, hvor man leter etter kjente markører som er til stede i kreftcellene og fraværende eller i svært lave konsentrasjoner i normale celler.

Wilms Tumor Gen (*WT1*) uttrykkes normalt kun i enkelte spesifikke vev i kroppen. Analyser har vist at det er et overuttrykk av (*WT1*) i perifert blod hos mange av AML pasientene. Formålet med dette prosjektet var å etablere en kjent analyse for å detektere *WT1* uttrykk i perifert blod som markør hos AML-pasienter.

WT1 uttrykk ble undersøkt i prøver fra perifert blod fra 13 pasienter med diagnosen AML og 6 normale blodgivere. Prøvene ble analysert ved hjelp av kvantitativ PCR (RQ-PCR). Vi detekterte ingen eller svært lave nivåer av *WT1* uttrykk hos de normale blodgivere. De tidligste prøvene vi hadde tilgang til, ga positiv *WT1* deteksjon for 11 av 11 pasienter med *HPRT* sensitivitet innefor normalområdet, og to av pasientprøvene hadde en sensitivitet på <0,001. Denne testen vil dermed være en god MRD markør for disse pasientene. For å oppnå god nok *WT1* sensitivitet, må prøven tas rundt diagnosetidspunktet.

På grunn av det begrensede prøvematerialet må testen evalueres videre etter at den har vært i bruk en stund. Man bør analysere flere pasientprøver, men også flere normale prøver for å kunne nærme seg på sikt å definere et mer nøyaktig normalområde.

Den testen skal brukes som en markør på nye AML pasienter. Testen kan brukes alene eller i kombinasjon med andre tester. I en utprøvningsfase er det også ønskelig å sammenligne med andre markører.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	2
Innholdsfortegnelse	3
Forkortelser	5
Innledning	6
Formål/hensikt.....	6
MRD.....	6
MRD markører.....	6
WT1.....	7
Referansegen.....	7
Kvantitativ PCR.....	8
Materiale og metode	9
Blod prøver.....	9
Isolering av RNA fra MNC.....	9
Syntese av cDNA.....	9
Amplifikasjon av WT1 fragment – Konvensjonell PCR.....	9
Kvalitativ analyse av PCR produkt.....	10
Isolering av PCR produkt fra gel.....	10
Sekvensering av PCR produktet.....	10
Kloning og transformasjon av WT1 fragmentet.....	11
Transformasjon.....	11
Sekvensering av plasmid DNA.....	11
Restriksjonskutting <i>HindIII</i>	12
Kvalitativ analyse av kuttingreaksjonen.....	12
Etanolfelling av kuttet materiale.....	12
RQ-PCR for standardkurve.....	13
Normalområde og sensitivitet HPRT og WT1.....	13
RQ-PCR av pasientprøver og normale kontroller.....	14
Resultat	15
Kvalitativ analyse av WT1 amplifikasjon.....	15
Sekvensering av plasmid DNA.....	15
Restriksjonskutting <i>HindIII</i>	15

RQ-PCR for standardkurve.....	15
Normalområde og sensitivitet HPRT og WT1	15
RQ-PCR av pasientprøver og normale kontroller	16
Diskusjon	17
Kvalitativ analyse av WT1 amplifikasjon.....	17
Restriksjonskutting <i>HindIII</i>	17
Normalområde og sensitivitet WT1.....	17
RQ-PCR av pasientprøver og normale kontroller	17
Evaluering av testen.....	18
Strategi	20
Konklusjon	20
Tabell 1.....	21
Figur 1	21
Tabell 2-3.....	22
Figur 2	22
Tabell 4.....	23
Tabell 5.....	24
Figur 3	25
Figur 4	26
Figur 5	27
Figur 6-7.....	28
Tabell 6.....	29
Tabell 7.....	30
Tabell 8	31
Kildehenvisning.....	32

Forkortelser

AML	akutt myelogen leukemi
Ct	Cycle threshold
MNC	Mononuclear Cells
MRD	minimal restsykdom
NA	Kan ikke beregnes
PB	Perifert blod
PCR	Polmerase Chain Reaction
RQ-PCR	Real Time Quantitative PCR
WT1	Wilms Tumor Gen

Innledning

Formål/hensikt

Formålet med dette prosjektet var å etablere en kjent analyse for å detektere *WT1* uttrykk i perifert blod som markør i fusjontranskript negative AML-pasienter. Vi ønsker å sette opp testen tilpasset våre betingelser. Så vidt vi kjenner til er ikke testen i bruk i Norge.

MRD

Når en pasient får diagnosen akutt leukemi, er det totale antall leukemiceller anslått til å være mellom 10^{12} og 10^{13} celler. 60 til 80 % av disse pasientene når komplett remisjon etter behandling med kjemoterapi (1). Ved komplett remisjon er antallet leukemiceller så lavt at sykdommen ikke lenger kan detekteres med klassiske morfologiske metoder. Sykdommen ansees å være i komplett remisjon når færre enn 5 % av cellene i beinmargsprøven er morfologiske blaster. På dette tidspunktet kan pasienten fortsatt ha opp til 10^{10} (2) leukemiceller igjen. Dette er utgangspunktet for diagnosen minimal restsykdom (MRD). Disse cellene har potensialet til å være utgangspunktet for oppvekst av den leukemiske cellepopulasjonen, og gi klinisk tilbakefall av sykdommen (2). For å følge utviklingen av sykdommen etter behandlingen, trenges andre metoder enn de morfologiske. I dag brukes multiparameter flow cytometri og kvantitativ PCR (2) hvor man leter etter kjente markører som er til stede i kreftcellene og fraværende eller i svært lave konsentrasjoner i normale celler.

MRD markører

Komponenter som er mulig å bruke for MRD deteksjon i hematologisk malignitet er for eksempel rearrangering av Ig og/eller TCR gener, fusjons-gen transkript, avbruddspunkt regioner rundt kromosomale eller molekylære rearrangeringer eller unormale uttrykk av gener. Foruten det unormale uttrykket av gener, er flere av disse genene veldig spesifikk og har ingen bakgrunns signaler i normale celler. Tilstedeværelsen av disse markørene varierer mellom sykdommene og mellom pasientene (2).

Mer enn 50 % av AML-pasientene mangler en klonal markør som egner seg for MRD-monitorering. Dette kan skyldes at pasienten ikke har noen translokasjon, eller at man mangler en analyse som kan oppdage denne. Translokasjoner er spesifikke, og det gjør at

utviklingen av leukemiklonen kan følges nøyaktig. Hos de pasientene som har flere enn en leukemiklon, vil man kunne følge utviklingen av den ene spesifikke leukemiklonen, men ikke sykdommen som sådan. Under behandling kan antallet av de leukemicellene med den kjente translokasjonen gå ned, og dermed gi plass til oppvekst av eventuelle andre cellekloner som ikke monitoreres.

Ved analysering av generelle kreftmarkører, vil man ha mulighet til å følge hele sykdomsutviklingen. Om man ikke har analyser for mange forskjellige translokasjoner, og dermed ikke har mulighet for å finne spesifikke markører for alle pasientene, vil en analyse av en generell kreftmarkør gi et tilbud til mange flere pasienter. Analysen kan brukes alene eller i kombinasjon med andre analyser.

WT1

Wilms Tumor Gen (*WT1*) er lokalisert på kromosom 11p13 (3), og koder for et protein som kan fungere som en transkripsjons regulator eller som en RNA prosesseringsfaktor på en isoformavhengig måte(4). *WT1* uttrykkes normalt kun i testis, ovarier, myometrium, stromaceller i uterus, lunger, hjertet, tarmene, lever, støttevev og i kapselen rundt milten (5). I tidligere undersøkelser har det vært brukt prøver fra både perifert blod, og fra beinmarg. *WT1* transkript vil detekteres i prøver fra frisk beinmarg (6), fordi det er en markør for udifferensierte celler. Undersøkelser har vist at flesteparten av prøvene fra normal perifert blod er negativ på *WT1* uttrykk, og median antallet *WT1* kopier er veldig lavt i de positive prøvene (5, 6). Majoriteten av akutte myelogene og lymfatiske leukemier uttrykker derimot en stor mengde *WT1*(5). AML pasienter har ulikt uttrykk av *WT1*, og i tidligere studier er det funnet overuttrykk av *WT1* ved diagnostidspunktet i mellom 70 % og 98 % av tilfellene (7, 8). Vi ønsker å bruke prøver fra perifert blod i stedet for beinmarg, fordi disse prøvene er lettere tilgjengelig, og en slik undersøkelsesmetode er mindre ubehagelig for pasienten.

Referansegene

Referansegene benyttes for å normalisere for kvalitative forskjellene mellom de kliniske prøvene (9). Det beste alternativet er å måle uttrykket av flere referansegener, og normalisere ved hjelp av det gjennomsnittlige uttrykket av disse.

I dette prosjektet tok vi utgangspunkt i en artikkel (10) hvor de brukte ABL som referansegene. Vi ville velge et referansegen til bruk i RQ-PCR fast system. Hypoxanthine ribosyltransferase (HPRT) har vært validert som presis og økonomisk alternativ som enslig

referansegen(9). HPRT har vist høy korrelasjons koeffisient for forskjellige vevstyper (9), så vi valgte denne.

Kvantitativ PCR

I kvantitativ PCR måles antallet kopier av et bestemt genuttrykk ved hjelp av cDNA som templat. Det benyttes en fluorescensmerket probe for å detektere mengden av spesifikt PCR-produkt. En probe annealer til templatsekvensen nedstrøms for 5'-primeren. Proben har en reporter fluorescens farge i 5'-enden og en quencher farge i 3'-enden. Når proben er intakt, vil nærværet av quencheren redusere fluorescensen som emitteres av reporteren. I elongeringstrinnet vil polymerasen kløyve proben slik at reporteren frigjøres fra quencheren. Reporteren vil da avgi fluorescens som kan detekteres av instrumentet.

Materiale og metode

Blod prøver

Perifere blodprøver, 15ml EDTA, ble samlet fra tolv friske blodgivere med generelt samtykke ved Blodbanken ved Universitetssykehuset Nord-Norge (UNN). Disse ble brukt som normale kontroller.

Det ble brukt totalt RNA fra blodprøver fra tretten pasienter med diagnosen akutt myelogen leukemi (AML). Dette er prøver avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved UNN mottar til diagnostiske formål. Disse inngår som en del av diagnostisk biobank, og prøvene kan derfor benyttes til etablering av nye tester.

Isolering av mononukleære celler (MNC) ved bruk av Lymphoprep (AXIS-SHIELD PoC, Norway) i henhold til medfølgende prosedyre, med buffer PBS 0,3 % EDTA 0,1 % DEPC. Cellene ble resuspendert i PBS 0,3 % EDTA 0,1 % DEPC til et volum av ca. 1200 µl. Kvantitering av MNC på Sysmex K-1000.

Isolering av RNA fra MNC

Totalt RNA ble isolert fra 6-10 millioner MNC ved bruk av RNeasy Mini Kit (QIAGEN) i henhold til protokoll fra leverandør. Eluering av RNA i 50 µl RNase-fritt vann. Kvantitering av RNA ved bruk av Nanodrop.

Syntese av cDNA

Syntese av cDNA fra 1 µg RNA ved bruk av Superscript II RT (Invitrogen) i henhold til prosedyre fra leverandør, med 250 ng Random primer (Promega) og 100U RNaseIN (promega) i 50 µl reaksjon.

Amplifikasjon av *WT1* fragment – Konvensjonell PCR

WT1 amplifikasjon i 5 AML pasienter og fra 5 blodgivere.

Uprøving av *WT1* amplifikasjon ved bruk av HotStarTaq (QIAGEN) protokoll.

Optimalisering med hensyn på primerkonsentrasjon og antall sykluser.

Sekvensene for *WT1* spesifikke primere og probe hentet vi fra artikkelen som vi tok utgangspunkt i for vårt prosjekt (10), er beskrevet i tabell 1.

Endelig PCR program:

PCR betingelser: (50µl reaksjon)

94 °C 15 min	} 42 sykluser	<i>WT1</i> forward primer	200 nM
94 °C 30 sek		<i>WT1</i> reverse primer	200 nM
65 °C 60 sek		PCR-buffer	1x PCR buffer
72 °C 60 sek		Hot Star Taq	2,0 U
72 °C 7 min		dNTP	0,2 mM
4 °C ∞			

Kvalitativ analyse av PCR produkt

PCR produkt (12 µl + 3 µl loading buffer) analyseres på 1,6 % agarose gel med Ethidium bromid (80 ng/ 100 ml gel) (120V, 30 min). 1 kb ladder brukes som størrelsesmarkør.

Isolering av PCR produkt fra gel

PCR produkt renses fra gel ved bruk av GFX PCR DNA Gel band purification Kit (Amersham Biosciences) i henhold til prosedyre fra leverandør. DNA elueres i 50 ul TE-buffer (pH = 8,0). Kvantitering av eluert DNA ved bruk av spektrofotometer (Biophotometer).

Sekvensering av PCR produktet

Primere fra tabell 1 ble benyttet for sekvensering.

Sekvenseringsreaksjon betingelser:

(20 µl reaksjon)

45 ng templat (pcr produkt)
6,4 µM primer (WT1 Forward/WT1 Revers)
8 µl Big Dye 3.1 (Applied Biosystems)

Sekvenseringsprogram PCR:

95 °C 15 min
96 °C 10 sek }
50 °C 5 sek } 25 sykluser
60 °C 4 min
4 °C ∞

Kloning og transformasjon av *WT1* fragmentet

Kloning og transformasjon utføres ved hjelp av TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) etter DH5 α -protokoll fra leverandør. Plasmid pCR2.1 fra Invitrogen i figur 1.

Kloningsreaksjon (6 μ l reaksjon)

PCR-produkt	4 μ l
Saltløsning	1 μ l
Topo vektor	1 μ l

Inkuberes ved romtemperatur i fem minutter og settes på is.

Transformasjon

Det tilsettes 2 μ l av kloningsreaksjonen til et rør med DH5 α One Shot kompetente celler og løsningen inkuberes på is i 5 minutter. Cellene sjokkvarmes i 30 sekunder ved 42 °C uten risting, og settes deretter på is. Det tilsettes 250 μ l romtemperert S.O.C.medium, og røret ristes horisontalt (200 rpm) ved 37 °C i en time.

Det spredes 10-50 μ l fra hver transformasjon på LB-skål med ampicillin (50 μ g/ml) med X-gal (1,6 μ g) og inkuberes ved 37 °C over natt.

Isolering av plasmid DNA fra to transformanter (I og II) ved bruk av QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) i henhold til prosedyre fra leverandør. Plasmid DNA ble eluert i 50 μ l.

Renset plasmid kvantiteres ved bruk av Nanodrop.

Sekvensering av plasmid DNA

Sekvenserer plasmid DNA fra to transformanter (WT1-I, WT1-II).

Reaksjonene er satt opp i tabell 2, og sekvensene for primerene finnes i tabell 3.

Sekvenseringsreaksjon betingelser: (20 μ l reaksjon)

- 27,4 ng templat (WT1 plasmid)
- 3,2 μ M primer (M13 Forward/M13 Revers)
- 8 μ l Big Dye 3.1 (Applied Biosystems)

Sekvenseringsprogram PCR:

Samme sekvenseringsprogram ble for sekvensering av plasmid DNA som for sekvensering av PCR produkt (se side 10).

Restriksjonskutting *HindIII*

Linearisering av plasmidene ble utført med restriksjonskutting med *HindIII*. Plasmidet har kun ett restriksjonssete for *HindIII*. Kuttingssete for *HindIII* er vist i figur 2.

Betingelser for kuttingsreaksjon: (50 µl reaksjon).

2,5µg templat

1 x REact II buffer

25U *HindIII*

1 time inkubering i 37 °C vannbad.

Kvalitativ analyse av kuttingreaksjonen

Det kuttete produktet analyseres (15µl + 3 µl loading buffer) på 0,9 % agarosegel med ethidium bromid (80 ng/ 100 ml gel) (150V, 35 min). 1 kb ladder brukes som størrelsesmarkør.

Etanolfelling av kuttet materiale

50µl kuttet plasmid ble tilsatt 5 µl natriumacetat og 150 µl 96 % etanol. Prøven inkuberes på -70 °C i 30 min og spinnes ved 13000 rpm i 30 min. Supernatanten fjernes og pelleten vaskes med 500 µl 70 % etanol. Sentrifugering ved 14000 rpm i 7 min, og forsiktig fjerning av supernatanten. Pelleten lufttørker i ca. 15 min, og resuspenderes i 30 µl TE-buffer.

Renset kuttet materiale ble kvantitert ved bruk av Nanodrop, og antall kopier/µl ble beregnet etter følgende formel:

$$\frac{[\text{kuttet materiale}] \times 6,023 \times 10^{14}}{4413\text{bp} \times 658} = \text{antall molekyler}/\mu\text{l}$$

RQ-PCR for standardkurve

Analysen ble kjørt på ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems).

Primer og probe brukt i RQ-PCR presenteres i tabell 4.

RQ-PCR betingelser: (25µl reaksjon)

<u>WT1</u>	<u>HPRT</u>
1 x RQ-mix	1 x RQ-mix
900nM Forward primer	500nM Forward primer
900nM Revers primer	500nM Revers primer
200nM Probe	100nM Probe
5µl cDNA templat	5µl cDNA templat

RQ-PCR program:

95 °C 20 sek
95 °C 1 sek } 45 sykluser
60 °C 20 sek }

WT1 spesifikk probe har FAM reporter og dark quencher (BHQ), mens *HPRT* spesifikk probe har FAM reporter og TAMRA quencher. Standardkurven kjøres fra 10^6 kopier til 10 kopier.

Normalområde og sensitivitet *HPRT* og *WT1*

AML pasienter har ulikt uttrykk av *WT1*. Det medfører at det stilles krav både til *HPRT* sensitivitet og *WT1* sensitivitet. *HPRT* sensitiviteten angir hvor god kvalitet prøven har. Sensitiviteten som kreves, er lik for alle pasienter og prøver. Kravet til *HPRT* sensitiviteten bestemmes ut fra analyser på normale prøver. *WT1* sensitiviteten vil variere blant pasientene, og vil avgjøre hvorvidt *WT1* uttrykket er egnet som MRD markør hos en gitt pasient. Kravet til *WT1* sensitivitet vil derfor være $\leq 0,001$ beregnet med utgangspunkt i et normalområde basert på normale prøver.

Normalområdet for *HPRT* defineres som et område på en logfaktor rundt median beregnet på normale prøver.

$$\text{Normalområde} = \text{Median Ct verdi } HPRT \pm (\text{HPRT slope}) / 2$$

Krav til *HPRT* sensitivitet beregnes:

$$\text{Sensitivitet} = 10^Z$$

$$Z = \frac{\text{Ct verdi } HPRT - \text{Øvre Ct-verdi for normalområdet for } HPRT}{\text{Slope } HPRT}$$

Normalområdet for *WTI* baseres på resultater fra analyser av normale prøver. Det er ønskelig å legge normalområdet 1 Ct-verdi under laveste positive Ct-verdi for *WTI* deteksjon.

WTI sensitivitet beregnes til 10^Z hvor

$$Z = \frac{\text{Ct verdi } WTI - \text{Øvre Ct-verdi for normalområdet for } WTI}{\text{Slope } WTI}$$

Forventet sensitivitet for må være $>0,001$ for at *WTI* skal kunne brukes som markør for denne pasienten.

RQ-PCR av pasientprøver og normale kontroller

Det brukes samme RQ-PCR betingelser og RQ-PCR program ved kjøring av pasientprøver og normale kontroller som ved kjøring for standardkurve. Oversikt over pasientprøver brukt til utprøving av analysen i tabell 5.

Resultat

Kvalitativ analyse av *WT1* amplifikasjon

Resultatet av kvalitative analysen av *WT1* amplifikasjonen viser ingen eller svært svake bånd fra de normale blodgivere. Prøvene fra fire av de fem AML pasientene viser kraftige bånd på om lag 500bp (figur 3).

Sekvensering av plasmid DNA

Resultatene av sekvenseringen av transformantene (plasmid DNA) viser at vi har plasmid med innsatt *WT1* fragment (figur 4).

Restriksjonskutting *HindIII*

Resultatet av den kvalitative analysen av restriksjonskuttingen viser at alt materialet i begge prøvene, *WT1*-I og *WT1*-II, er fullstendig kuttet (figur 5). Det ukuttete plasmidet migrerer raskere enn det kuttete. Ukuttet plasmid migrerer i henhold til under 3kb størrelse.

Kuttet plasmid ble kvantitert. Resultat i tabell 6.

RQ-PCR for standardkurve

Standardkurvene for *WT1* (figur 6) og *HPRT* (figur 7) deteksjon er lineære fra 10^6 til 10^8 kopier.

Normalområde og sensitivitet *HPRT* og *WT1*

Normale prøver ble analysert for *HPRT* og *WT1* uttrykk (tabell 7).

Median av *HPRT* beregnet av de normale prøvene:

Median = 26,57

Normalområdet for *HPRT* defineres som et område på en logfaktor rundt median.

$$\text{Median Ct verdi } HPRT \pm (HPRT \text{ slope}) / 2 = 26,57 \pm 3,41 / 2$$

$$\text{Sensitivitet} = 10^z \quad Z = \frac{\text{Ct verdi } HPRT - \text{Øvre Ct-verdi for normalområdet for } HPRT}{\text{Slope } HPRT}$$

Dette gir normalområdet: 24,78-28,36, som gir krav om *HPRT* sensitivitet $\leq 0,000527$.

Selv om Ct-verdien på *WTI* standardkurven går til 40,9, er det ønskelig å sette en øvre grense for *WTI* normalområdet på 39. Det er vanlig å sette deteksjonsgrensen til 40, men grensen ble satt til 39 for å ha et normalområde som går mer enn 1 Ct-verdi under vår eneste positive normale kontroll (40,55).

RQ-PCR av pasientprøver og normale kontroller

Pasientprøver ble analysert med hensyn på *HPRT* og *WTI* uttrykk. *HPRT* og *WTI* sensitivitet samt *WTI/HPRT* ratio ble beregnet som beskrevet i diskusjon for normalområde og sensitivitet *HPRT* og *WTI*. Samlede data for pasientprøver og normale prøver er presentert i tabell 8.

Resultatene fra RQ-PCR av og normale blodgivere viser at det detekteres ingen eller svært lave nivåer av *WTI*. Alle prøvene hadde god sensitivitet på *HPRT* ($<0,0004$).

En prøve regnes som positiv når minst to av tre paralleller kommer opp, og med mindre enn en Ct-verdi i spredning.

Alle unntatt to pasientprøvene hadde en sensitivitet for *HPRT* $< 0,00073$. De to prøvene som hadde lavere sensitivitet hadde heller ingen *WTI* deteksjon.

Den tidligste prøven vi hadde tilgang til, ga positiv *WTI* deteksjon for 11 av 11 pasienter med *HPRT* sensitivitet innefor normalområdet.

WTI sensitivitet ble beregnet for de tidligste prøvene som vi hadde tilgang fra hver pasient. Resultatene viser at to av pasientprøvene hadde en sensitivitet på $<0,001$ (tabell 8).

Diskusjon

Kvalitativ analyse av *WT1* amplifikasjon

Resultatene viser at *WT1* amplifikasjonen var vellykket for fire av fem AML pasienter, men ikke for de normale prøvene (med unntak av det ene svært svake signalet i brønn 3). Dette er som forventet.

Vi mangler kontroll på cDNA på prøvene uavhengig av *WT1*, men denne kjøringen var ikke ment for å screene pasienter, men for å få opp et *WT1* fragment som kan brukes videre i kloningen som utgangspunkt for standardkurven.

Restriksjonskutting *HindIII*

Det kuttete plasmidet migrerer i gelen i henhold til sin størrelse (4431bp). Ukuttet plasmid migrerer raskere på grunn av supercoiling.

Normalområde og sensitivitet *WT1*

Det er ønskelig med en *WT1* sensitivitet på $< 0,001$ for å ha mulighet til å følge reduksjon av *WT1* uttrykk med tre logfaktorer ned til normalområdet. Med en slik sensitivitet ansees testen å være en god MRD markør. For å definere et normalområde for *WT1* deteksjon, er det ønskelig å kjøre et stort antall prøver fra normale blodgivere. Det er vanskelig å definere et normalområde på grunnlag av det begrensede antall normale prøver som er analysert. Nivået av *WT1* i normale prøver er rapportert å være svært lavt, og detekterbart hos ca. 30 % av de normale givene (10). Samme studie har definert høyeste normalverdi for *WT1* uttrykk *WT1/ABL* til 0,14 %. Vi kan ikke sammenligne denne verdien direkte fordi vi bruker *HPRT* som referansen, men forventer at våre verdier er i samme størrelsesorden.

RQ-PCR av pasientprøver og normale kontroller

Pasient 2 kan vi ikke vurdere forekomsten av *WT1* pga. for lav *HPRT* sensitivitet og ingen *WT1* deteksjon.

Pasient 12 og 13 manglet prøve på diagnosetidspunktet. De første tilgjengelige prøvene vi hadde på disse pasientene tatt henholdsvis 6 og 1 mnd etter diagnosetidspunkt. Disse prøvene

gav lav *WT1* deteksjon (Ct = 35,78, og 38,36). Dette er ikke uventet da vi må anta at de har fått behandling i etterkant av at diagnosen ble satt.

Diagnosedato for tre av pasientene (1, 8 og 10) var ukjent, og behandlingsstatus ved prøvetakingsdato var derfor også ukjent. Alle disse 3 pasientene var imidlertid *WT1* positive. For pasient 8 var *WT1* sensitiviteten 0,0002, og *WT1* vil være en god markør for denne pasienten. *WT1/HPRT* er 78,58 %.

Pasient 1 og 10 hadde *WT1* sensitivitet $>0,001$, og *WT1* uttrykket kan derfor ikke brukes som markør for disse pasientene.

For pasient 10 hadde vi også tilgjengelig en oppfølgingsprøve en måned etter første tilgjengelige prøve. *WT/HPRT* gikk ned fra 5,52 % til 0,13 %.

Pasienten 10 hadde også diagnosen Down Syndrom. Slike pasienter har 150 ganger økt risiko for å utvikle AML(11). 10 % av disse pasientene er født med en transient leukemi, med flere blaster i blod enn i beinmarg. Denne tilstanden går som regel over spontant, men omtrent 25 % av disse utvikler myeloid leukemi innen 3 år etter at de er bra av sin transiente leukemi. Det foreslås at *WT1* uttrykk hos pasienter med transient leukemi kan være en markør for å følge den transiente leukemien og for utvikling av AML (11).

For pasient 3, 5, 6, 7 og 11 hadde vi prøve fra diagnostidspunktet, og samtlige var positive for *WT1*, men ikke god nok *WT1* sensitivitet til å brukes som MRD markør for disse pasientene.

Fra pasient 9 var det tilgjengelig prøver fra diagnostidspunktet, samt oppfølgingsprøver etter 2 og 4 uker. Diagnoseprøven hadde god nok *WT1* sensitivitet ($< 0,001$) til å kunne brukes som MRD markør for pasienten. *WT1/HPRT* ratioen var på 37 % i diagnoseprøven.

Oppfølgingsprøve etter 2 uker viste en nedgang i *WT1/HPRT* ratio til 0,46 %, og i oppfølgingsprøve etter 4 uker kunne *WT1* ikke lenger detekteres. Dette tilfellet demonstrerer monitorering av sykdomsforløpet under behandling med *WT1* som markør.

Evaluering av testen

Den testen skal brukes som en markør på nye AML pasienter, spesielt hos pasienter som er *PML-RAR α* negative, og vi dermed ikke har andre markører for. Vi ønsker også å benytte

testen på *PML-RAR α* positive pasienter for å se om nivået av *WT1* uttrykk avtar i samsvar med nivået av *PML-RAR α* uttrykk.

Testen må evalueres videre etter at den har vært i bruk en stund, og man har flere resultater å forholde seg til. Man bør analysere flere pasientprøver, men også flere normale prøver for å kunne nærme seg på sikt å definere et mer nøyaktig normalområde. Det bør kanskje være et mål å analysere 50 normale prøver.

Preanalytiske faktorer som innvirker på resultatene er tid fra prøvetaking til analysetidspunkt samt kvaliteten på selve prøvetakingen. Som for andre MRD analyser vil kvaliteten på prøven være avgjørende. Ved lagring av prøven over ett døgn, vil kvaliteten forringes.

På grunn av at testen stiller krav til nivået av *WT1* uttrykk, er det viktig at prøven tas ved diagnosetidspunkt, før behandlingen starter.

Strategi

- Med *HPRT* deteksjon $\leq 28,36$ og *WT1* deteksjon med en sensitivitet $\leq 0,001$ kan testen brukes som MRD markør for denne pasienten.
- Uten *WT1* deteksjon og med $HPRT \leq 28,36$, vurderes resultatet som ikke deteksjon av *WT1*, men *WT1* kan ikke benyttes som markør for denne pasienten.
- Uten *WT1* deteksjon og med $HPRT > 28,36$, kan ikke resultatet vurderes på grunn av dårlig kvalitet på prøven.
- Med deteksjon av *WT1*, men med en $HPRT > 28,36$, normaliseres prøven ved å beregne en forventet sensitivitet:

$$\text{Antall kopier } WT1 \text{ beregnet} = \frac{\text{Median antall kopier } HPRT \text{ i normale prøver} \times \text{Antall kopier } WT1 \text{ detektert}}{\text{Antall kopier } HPRT \text{ detektert}}$$

Ct verdi *WT1* beregnet = Slope *WT1* x Antall kopier *WT1* beregnet + y-intersepsjon for *WT1*

Forventet sensitivitet *WT1* hos aktuell pasient beregnes til 10^Z hvor

$$Z = \frac{\text{Ct verdi } WT1 - \text{Øvre grense for normalområdet}}{\text{Slope } WT1}$$

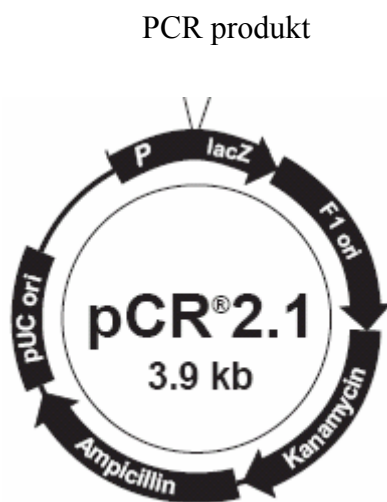
Forventet sensitivitet for må være $>0,001$ for at *WT1* skal kunne brukes som markør for denne pasienten.

Konklusjon

Vi har etablert en test som bør utprøves som MRD markør hos nydiagnostiserte AML pasienter, især de pasientene vi ikke har andre tester for. I en utprøvningsfase er det også ønskelig å sammenligne med andre markører.

Tabell 1: Primersekvenser for amplifikasjon av *WT1* fragment.

Primere RT- PCR	Sekvens
<i>WT1</i> forward primer	5'-GGC-ATC-TGA-GAC-CAG-TGA-GAA-3'
<i>WT1</i> reverse primer	5'-GAG-AGT-CAG-ACT-TGA-AAG-CAG-T-3'



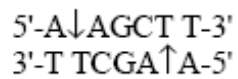
Figur 1: Plasmid pCR2.1 fra Invitrogen (TOPO TA Cloning Kit)

Tabell 2: Reaksjoner for sekvensering av plasmid med innsatt WT1 fragment.

Templat	Sekvenseringsprimer
WT1-I	M13-forward
WT1-II	M13-forward
WT1-I	M13-reverse
WT1-II	M13-reverse

Tabell 3 Primersekvenser for sekvensering av plasmid

Primere	Sekvens
M13 Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13 Reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'



Figur 2: Kuttingssete for *Hind*III

Tabell 4: Oligosekvenser til bruk i RQ-PCR.

Primere RQ-PCR	Sekvens
WT1 Forward	5'-CAG-GCT-GCA-ATA-AGA-GAT-ATT-TTA-AGC-T -3'
WT1 Reverse	5'-GAA-GTC-ACA-CTG-GTA-TGG-TTT-CTC-A -3'
WT1 Probe	5'-CTT-ACA-GAT-GCA-CAG-CAG-GAA-GCA-CAC-TG-3'
HPRT Forward	5'-TAT-GGA-CAG-GAC-TGA-ACG-TCT-TG-3'
HPRT Reverse	5'-CCA-GCA-GGT-CAG-CAA-AGA-ATT-3'
HPRT Probe	5'-CCA-TCA-CAT-TGT-AGC-CCT-CTG-TGT-GCT-C-3'

Tabell 5: Oversikt over pasientprøver brukt til utprøving av analysen.

Pasient	Prøvedato	Kommentar
1	220199	Ukjent diagnosedato
2	110705 270905	Diagnosedato: 12.05.05
3	260399	Diagnosedato: 26.03.99
5	230500	Diagnosedato: 23.05.00
6	150503 300903	Diagnosedato: 15.05.03
7	160801	Diagnosedato: 16.08.01
8	191205	Ukjent diagnosedato
9	260104 100204 260204	Diagnosedato: 26.01.04
10	010805 290805	Ukjent diagnosedato, diagnose AML og Downs syndrom
11	230306	Diagnosedato: 23.03.06
12	280804 161104	Diagnosedato: 01.03.04
13	110506 190606	Diagnosedato: 10.04.06



Figur 3: Agarosegel med prøver fra normale blodgivere (brønn 1-5), prøver fra fem forskjellige AML-pasienter (brønn 6-10), negative kontroller (brønn 11-12), 1kb ladder (brønn 14).

```

10       20       30       40       50       60       70       80       90       100      110      120
TOPO pCR2.1  GAAACACGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCCGGATCCACTAGTAAACGGCCGCCAGTGCTGCTGGCAATTCGCCCTT
WT1-I M13F  -----NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
WT1-II M13F  -----NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
WT1-I M13R  GAAACACGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCCGGATCCACTAGTAAACGGCCGCCAGTGCTGCTGGCAATTCGCCCTTGGCATCTGAGACCAGT
WT1-II M13R  GAAACACGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCCGGATCCACTAGTAAACGGCCGCCAGTGCTGCTGGCAATTCGCCCTTGGCATCTGAGACCAGT

130      140      150      160      170      180      190      200      210      220      230      240
TOPO pCR2.1  GTGTGTTACCCNCGNNNNNNNTAAGAGATATTTTAAGCTGTCCCACTTACAGATGCCACAGCAGGAAAGCACACTGGTGACAAAACCATACCAGTGTGACTTCAAGGACT
WT1-I M13F  GTGTGTTACCCNCGNNNNNNNTAAGAGATATTTTAAGCTGTCCCACTTACAGATGCCACAGCAGGAAAGCACACTGGTGACAAAACCATACCAGTGTGACTTCAAGGACT
WT1-II M13F  GTGTGTTACCCNCGNNNNNNNTAAGAGATATTTTAAGCTGTCCCACTTACAGATGCCACAGCAGGAAAGCACACTGGTGACAAAACCATACCAGTGTGACTTCAAGGACT
WT1-I M13R  GTGTGTTACCCNCGNNNNNNNTAAGAGATATTTTAAGCTGTCCCACTTACAGATGCCACAGCAGGAAAGCACACTGGTGACAAAACCATACCAGTGTGACTTCAAGGACT
WT1-II M13R  GTGTGTTACCCNCGNNNNNNNTAAGAGATATTTTAAGCTGTCCCACTTACAGATGCCACAGCAGGAAAGCACACTGGTGACAAAACCATACCAGTGTGACTTCAAGGACT

250      260      270      280      290      300      310      320      330      340      350      360
TOPO pCR2.1  TTCTCGTTTCCAGCCAGCTCAAAAGACACCAAAGGAGACATACAGGCTGTGAAACCATTTCCAGTGTAAAACTTGTACGCGAAAAGTTCTCCCGGTCCGACCACCT
WT1-I M13F  TTCTCGTTTCCAGCCAGCTCAAAAGACACCAAAGGAGACATACAGGCTGTGAAACCATTTCCAGTGTAAAACTTGTACGCGAAAAGTTCTCCCGGTCCGACCACCT
WT1-II M13F  TTCTCGTTTCCAGCCAGCTCAAAAGACACCAAAGGAGACATACAGGCTGTGAAACCATTTCCAGTGTAAAACTTGTACGCGAAAAGTTCTCCCGGTCCGACCACCT
WT1-I M13R  TTCTCGTTTCCAGCCAGCTCAAAAGACACCAAAGGAGACATACAGGCTGTGAAACCATTTCCAGTGTAAAACTTGTACGCGAAAAGTTCTCCCGGTCCGACCACCT
WT1-II M13R  TTCTCGTTTCCAGCCAGCTCAAAAGACACCAAAGGAGACATACAGGCTGTGAAACCATTTCCAGTGTAAAACTTGTACGCGAAAAGTTCTCCCGGTCCGACCACCT

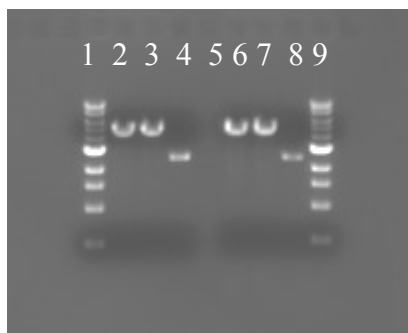
370      380      390      400      410      420      430      440      450      460      470      480
TOPO pCR2.1  TCATACAGGTAAAAACAAGTAAAAAGCCCTTCAGCTGTCGGTGGCCAACTTGTTCAGAAAAAGTTTGCCTCGGTACATGAAATAGTCCGTCATCACAACATG
WT1-I M13F  TCATACAGGTAAAAACAAGTAAAAAGCCCTTCAGCTGTCGGTGGCCAACTTGTTCAGAAAAAGTTTGCCTCGGTACATGAAATAGTCCGTCATCACAACATG
WT1-II M13F  TCATACAGGTAAAAACAAGTAAAAAGCCCTTCAGCTGTCGGTGGCCAACTTGTTCAGAAAAAGTTTGCCTCGGTACATGAAATAGTCCGTCATCACAACATG
WT1-I M13R  TCATACAGGTAAAAACAAGTAAAAAGCCCTTCAGCTGTCGGTGGCCAACTTGTTCAGAAAAAGTTTGCCTCGGTACATGAAATAGTCCGTCATCACAACATG
WT1-II M13R  TCATACAGGTAAAAACAAGTAAAAAGCCCTTCAGCTGTCGGTGGCCAACTTGTTCAGAAAAAGTTTGCCTCGGTACATGAAATAGTCCGTCATCACAACATG

490      500      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
TOPO pCR2.1  -----AAGGGCCGAAATTCGACATATCCATCAGACT
WT1-I M13F  ACTCCAGCTGGCCGTTTGGGGGTCCTCCCTCGGGGACCCCTTCACTGTCCCAGGCAGCAGTGTGTGAACAGCTTTCAGCTGTACTCTAAAGGGCCGAAATTCGACATATCCATCAGACT
WT1-II M13F  ACTCCAGCTGGCCGTTTGGGGGTCCTCCCTCGGGGACCCCTTCACTGTCCCAGGCAGCAGTGTGTGAACAGCTTTCAGCTGTACTCTAAAGGGCCGAAATTCGACATATCCATCAGACT
WT1-I M13R  ACTCCAGCTGGCCGTTTGGGGGTCCTCCCTCGGGGACCCCTTCACTGTCCCAGGCAGCAGTGTGTGAACAGCTTTCAGCTGTACTCTAAAGGGCCGAAATTCGACATATCCATCAGACT
WT1-II M13R  ACTCCAGCTGGCCGTTTGGGGGTCCTCCCTCGGGGACCCCTTCACTGTCCCAGGCAGCAGTGTGTGAACAGCTTTCAGCTGTACTCTAAAGGGCCGAAATTCGACATATCCATCAGACT

610      620      630      640      650      660      670      680
TOPO pCR2.1  GCGGCGCCCTCGAGCATGCATCTACAGGCCCCAAATTCGCCCTATAGTCACTCGTTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTAC
WT1-I M13F  GCGGCGCCCTCGAGCATGCATCTACAGGCCCCAAATTCGCCCTATAGTCACTCGTTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTAC
WT1-II M13F  GCGGCGCCCTCGAGCATGCATCTACAGGCCCCAAATTCGCCCTATAGTCACTCGTTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTAC
WT1-I M13R  GCGGCGCCCTCGAGCATGCATCTACAGGCCCCAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
WT1-II M13R  GCGGCGCCCTCGAGCATGCATCTACAGGCCCCAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

```

Figur 4: Resultater fra sekvensering av plasmid DNA viser plasmid med innsatt *WT1* fragment.



Figur 5: Agarosegel av ukuttet plasmid DNA *WT1-I* (brønn 2), kuttet plasmid DNA *WT1-I* (brønn 3 og 4), ukuttet plasmid DNA *WT1-II* (brønn 6) kuttet plasmid DNA *WT1-II* (brønn 7 og 8), negativ kontroll (brønn 5) og 1kb ladder (brønn 1 og 9).

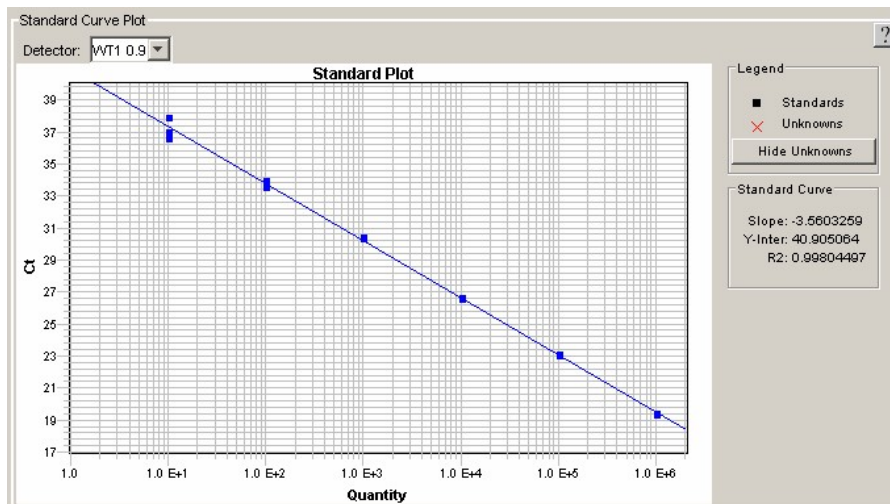


Figure 6: Standardkurve for *WT1*

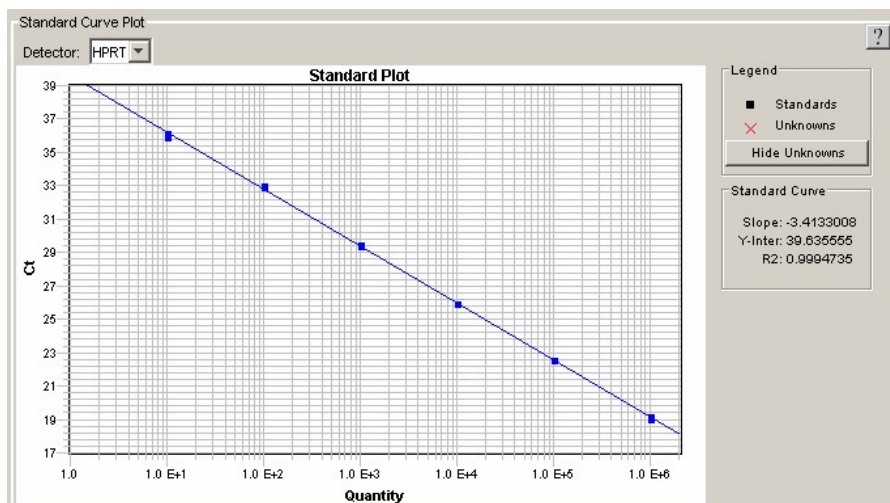


Figure 7: Standardkurve for *HPRT*.

Tabell 6: Konsentrasjon av kuttete rensede plasmider.

	Konsentrasjon	Antall kopier
<i>WT1 I</i>	76,19 ng/ μ l	$1,496 \times 10^{10}$ kopier/ μ l
<i>WT1 II</i>	71,04 ng/ μ l	$1,474 \times 10^{10}$ kopier/ μ l

Tabell 7: *WTI* og *HPRT* deteksjon i normale prøver

ID	<i>WTI</i> Ct-snitt	Antall kopier <i>WTI</i>	<i>HPRT</i> Ct-snitt	Antall kopier <i>HPRT</i>
N 1	Ikke detektert	0	26,29	8103
N 2	Ikke detektert	0	26,57	6723
N 3	Ikke detektert	0	26,72	6076
N 4	Ikke detektert	0	27,69	3157
N 5	40,55	1	26,90	5401
N 6	Ikke detektert	0	26,13	9027
N 7	Ikke detektert	0	26,31	8000

Tabell 8: Resultater fra *WTI* og *HPRT* analyser på pasientprøver og normale blodgivere.

ID	Prøve- dato	WTI Ct-snitt	Antall kopier WTI	HPRT Ct-snitt	Antall kopier HPRT	HPRT Sensitivitet	WTI Sensitivitet	Ratio WTI/HPRT (%)
Pasient 1	220199	33,04	158	26,38	7624	0,00014	0,0216	2,068
Pasient 2	110705	Ikke detektert	0	28,84	1450	0,00073	NA	0
	270905	Ikke detektert		28,37	1995	0,00053	NA	0
Pasient 3	260399	34,27	71	25,26	16257	0,00006	0,0478	0,438
Pasient 5	230500	31,99	309	25,34	15443	0,00007	0,0110	2,003
Pasient 6	150503	32,23	264	24,98	19711	0,00005	0,0129	1,340
	300903	Ikke detektert	0	27,93	2687	0,00039	NA	0
Pasient 7	160801	31,58	403	24,96	19900	0,00005	0,0084	2,028
Pasient 8	191205	25,87	15844	24,94	20162	0,00005	0,0002	78,584
Pasient 9	260104	27,70	4866	25,59	13014	0,00008	0,0007	37,000
	100204	35,01	44	26,05	9585	0,00011	0,0766	0,463
	260204	Ikke detektert	0	26,57	6746	0,00016	NA	0
Pasient 10	010805	31,06	562	25,96	10177	0,00010	0,0061	5,520
	290805	38,78	4	27,78	2979	0,00036	0,2561	0,131
Pasient 11	230306	38,02	6	24,96	19882	0,00005	0,5307	0,032
Pasient 12	280804	35,78	27	25,69	12207	0,00009	0,1262	0,221
	161104	Ikke detektert	0	26,89	5412	0,00020	NA	0
Pasient 13	110506	38,36	5	26,16	8843	0,00012	0,8692	0,044
	190606	Ikke detektert	0	26,54	6854	0,00015	NA	0
N 1		Ikke detektert	0	26,29	8103	0,00013	NA	0
N 2		Ikke detektert	0	26,57	6723	0,00016	NA	0
N 3		Ikke detektert	0	26,72	6076	0,00017	NA	0
N 4		Ikke detektert	0	27,69	3157	0,00034	NA	0
N 5		40,55	1	26,90	5401	0,00020	2,7100	0,023
N 6		Ikke detektert	0	26,13	9027	0,00012	NA	0
N 7		Ikke detektert	0	26,31	8000	0,00013	NA	0

Kildehenvisning

- 1** Buchner T, Berdel WE, Schoch C, Haferlach T, Serve HL, Kienast J, Schnittger S, Kern W, Tchinda J, Reichle A, Lengfelder E, Staib P, Ludwig WD, Aul C, Eimermacher H, Balleisen L, Sauerland MC, Heinecke A, Wormann B, Hiddemann W.
Double induction containing either two courses or one course of high-dose cytarabine plus mitoxantrone and postremission therapy by either autologous stem-cell transplantation or by prolonged maintenance for acute myeloid leukemia. [J Clin Oncol](#). 2006 Jun 1;24(16):2480-9
- 2** Wolfgang Kern, Claudia Schoch, Torsten Haferlach, Susanne Schnittger. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 56 (2005) 283-309.
- 3** Hans D. Menssen, Jan M. Siehl, Eckhard Thiel. Wilms Tumor Gene (WT1) Expression as a Panleukemic Marker. *Int J Hematol*. 2002;76:103-109.
- 4** Stefan GE Roberts. Transcriptional regulation by WT1 in development. *Current Opinion in Genetics & Development* 2005, 15:542-547.
- 5** Giuseppe Saglio, Sonja Carturan, Sara Grillo, Sara Capella, Francesca Arruga, Ilaria Defilippi, Valentina Rosso, Maria Rauco, Anna Marina Liberati and Daniela Cilloni. WT1 overexpression: A clinically useful marker in acute and chronic myeloid leukemias. *Hematology*, 2005; 10 Supplement 1: 76-78.
- 6** Mette Østergaard, Lene Hyldahl Olesen, Henrik Hasle, Eigil Kjeldsen and Peter Hokland. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70 % of acute myeloid leukaemia patients- results from a single-centre study. 2004 Blackwell Publishing Ltd, *British Journal of Haematology*, 125, 590-600.
- 7** U. Jaeger, B. Kainz. Monitoring minimal residual disease in AML: the right time for real time. *Ann Hematol* (2003) 82: 139-147.

- 8** M Weisser, W Kern, S Rauhut, C Schoch, W Hiddemann, T Haferlach and S Schnittger. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring MRD monitoring. *Leukemia* (2005) 19, 1416-1423.
- 9** Jacques B de Kok, Rian W Roelofs, Belinda A Giesendorf, Jeron L Pennings, Erwin T Waas, Ton Feuth, Dorine W Swinkels and Paul N Span. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Laboratory Investigation* (2005) 85, 154-159.
- 10** D Cilloni, E Gottardi, D De Micheli, A Serra, G Volpe, F Messa, G Rege-Cambrin, A Guerrasio, M Divona, F Lo Coco and G Saglio. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute in acute leukemia patients. *Leukemia* (2000) 16, 2115-2121.
- 11** Henrik Hasle, Bendik Lund, Charlotte Guldborg Nyvold, Petter Hokland, Mette Østergaard. WT1 Gene expression in children with Down Syndrome and transient myeloproliferative disorder. *Leukemia Research* 30 (2006) 543-546.