
Karakteristik Klinis Pasien Leukemia Limfoblastik Akut (LLA) dengan Fusi Gen **TEL-AML1, BCR-ABL, dan E2A-PBX1**

Sri Mulatsih¹, Sutaryo,¹ Sunarto,¹ Allen Yeoh,² Yeow Liang,² Sofia Mubarika³

¹Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, RSUP DR. Sardjito, Yogyakarta, Indonesia

²Department of Paediatrics, Loo Lin School Medicine, National University Singapore

³laboratorium Biologi Molekular, Fakultas Kedokteran, UGM, Yogyakarta

Latar belakang. Leukemia limfoblastik akut (LLA) pada anak merupakan penyakit yang heterogen. Berdasarkan gambaran selular dan molekular, LLA mempunyai beberapa subtype yang berbeda. Fusi gena paling sering pada LLA anak adalah TEL-AML1, BCR-ABL, E2A-PBX1, dan MLL-AF4.

Tujuan. Mengetahui profil klinis pasien LLA dengan fusi gena TEL-AML1, BCR-ABL, E2A-PBX1.

Metode. Studi *cross sectional*, untuk menganalisis profil fusi gena digunakan metode *nested reverse-transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR).

Hasil. Tidak ditemukan perbedaan dalam hal karakteristik klinis seperti jenis kelamin, usia, jumlah leukosit, kelompok risiko, dan tipe LLA diantara pasien LLA dengan fusi gena TEL-AML1 dan E2A-PBX1 ($p>0,05$).

Fusi gena BCR-ABL tipe LLA lebih banyak terjadi pada kelompok pasien dengan leukosit awal $\geq 50.000/uL$ dibanding kelompok yang mempunyai leukosit awal $< 50.000/uL$ ($p=0,031$). Tidak ada perbedaan dalam hal jenis kelamin, usia, kelompok risiko dan tipe LLA diantara pasien LLA dengan gena BCR-ABL ($p>0,05$).

Kesimpulan. Karakteristik klinis pasien dengan fusi gena TEL-AML1, BCR-ABL, E2A-PBX1 adalah sama, kecuali pada kelompok pasien dengan jumlah leukosit $\geq 50.000/uL$ lebih banyak terjadi pada pasien dengan fusi gena BCR-ABL. (**Sari Pediatri** 2009;11(2):118-123).

Kata kunci: profil klinis-LLA-TEL-AML1-BCR-ABL-E2A-PBX1

Alamat korespondensi

Dr. Sri Mulatsih, Sp.A(K), Bagian Ilmu Kesehatan Anak, RSUP Dr. Sardjito/ FK UGM. Jl. Kesehatan No.1, Sekip utara, Yogyakarta. Tel: (0274) 553142, Fax.: (0274) 583745, E-mail: smular@gmail.com

Mekanisme molekular leukemia antara lain karena penyimpangan ekspresi proto-onkogen dan translokasi kromosom sehingga fusi gena yang menyebabkan kinase lebih aktif dan meningkatkan faktor transkripsi gena.¹ Perubahan genetik tersebut berperan penting

pada transformasi leukemik dari sel stem hematopoiesis atau sel progenitor melalui perubahan fungsi selular, sehingga berpengaruh terhadap proliferasi (*self-renewal*), menghalangi diferensiasi, dan menyebabkan resistensi terhadap apoptosis.² Berbagai gambaran klinis, biologis, genetik, dan molekular dapat digunakan sebagai indikator prognostik yang sangat bermakna terhadap luaran pasien LLA.³ TEL-AML1, BCR-ABL, E2A-PBX1, dan MLL-AF4 merupakan fusi gena tersering yang terjadi pada LLA anak kelompok B *cell*.⁴

Kemajuan ilmu dan teknologi kedokteran terkini telah sangat berperan dalam menentukan indikator prognosis berbasis genetik, molekular terhadap luaran pasien LLA. Namun demikian, klinisi di Indonesia belum melakukan diagnosis molekular dalam praktik klinik. Banyak rumah sakit mendiagnosis LLA anak hanya berdasarkan pemeriksaan klinis dan sitologi, analisis sitogenetik dan molekular belum secara rutin diterapkan di klinik.⁵

Tujuan penelitian untuk melihat profil klinis (usia, jenis kelamin, jumlah leukosit awal, stratifikasi risiko) pasien LLA dengan fusi Gena TEL-AML1, BCR-ABL, dan E2A-PBX1.

Metode

Subjek penelitian adalah pasien LLA anak yang dirawat di INSKA RSUP. Dr. Sardjito Yogyakarta periode Nopember 2003- Maret 2009 yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Data didapat dari registrasi kanker anak RSUP DR Sardjito berupa usia, jenis kelamin, jumlah leukosit, tipe LLA, dan stratifikasi risiko. Data laboratorium lain yang diperoleh adalah hasil pemeriksaan fusi gena dari masing-masing pasien (sampel).

Semua pasien dengan usia ≤ 15 tahun diikutsertakan dalam penelitian. Diagnosis LLA berdasarkan pada gejala klinis, pemeriksaan darah tepi, dan pemeriksaan aspirasi sumsum tulang. Kriteria FAB termasuk L1 dan L2. Dilakukan pemeriksaan sumsum tulang untuk penentuan morfologi dan klasifikasi menurut FAB serta pengecatan PAS dan SBB untuk menentukan morfologi. Fusi gena 1). TEL-AML1-positif, apabila terekspresi fusi gena TEL-AML1 pada fragmen 332 bp sesuai dengan kontrol positif (REH) pada hasil *nested* RT-PCR. 2). BCR-ABL-positif, apabila terekspresi fusi gena BCR-ABL tipe LLA pada fragmen 320 bp sesuai dengan control positif (SupB15) pada hasil *nested* RT-PCR. 3). E2A-PBX1-positif, apabila terekspresi fusi

gena E2A-PBX1 pada fragmen 376 bp sesuai dengan kontrol positif (697) pada hasil *nested* RT-PCR. 4). TEL-AML1-negatif, BCR-ABL-negatif, dan E2A-PBX1-negatif apabila terekspresi gena pada fragmen 690 bp sesuai dengan kontrol negatif (E2A) pada hasil *nested* RT-PCR. Risiko tinggi (RT) adalah apabila pasien LLA terdiagnosis memiliki salah satu tanda atau gejala sebagai berikut, usia < 1 atau > 10 tahun, jumlah leukosit $> 50.000/uL$, atau telah terjadi penyebaran sel leukemia ke mediastinum, cairan otak, atau testis. Risiko rendah (RR), apabila pasien LLA baru tidak memiliki salah satu tanda yang ada pada risiko tinggi (RT).

Alur pemeriksaan laboratorium untuk pemeriksaan fusi gena: sampel darah aspirat sumsum tulang diproses untuk isolasi sel mononuklear, kemudian dilanjutkan ekstraksi total RNA, sintesis cDNA (RT-PCR). Produk cDNA diproses untuk pemeriksaan fusi gena TEL-AML1, BCR-ABL tipe LLA, E2A-PBX1 dengan *Nested* RT-PCR. Deskripsi hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel, gambar, dan grafik. Untuk menguji hipotesis antar variabel digunakan Kai Kuadrat (χ^2)

Hasil

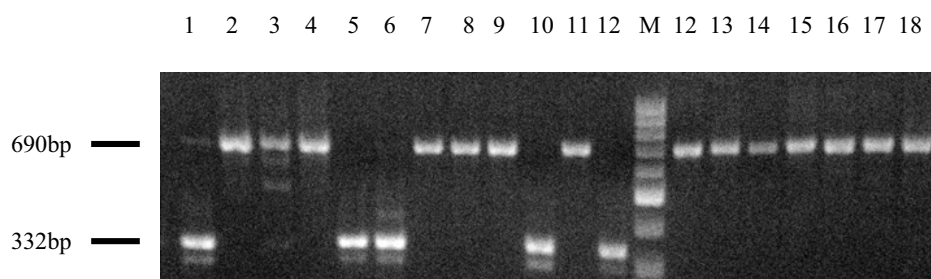
Terdapat 33 pasien LLA yang memenuhi kriteria inklusi. Hasil *nested* RT-PCR (Gambar 1, 2, dan 3) menunjukkan contoh hasil pemeriksaan fusi gena dari sampel/pasien LLA dengan masing-masing kontrol positif eksternal berturut-turut REH, SupB15, dan 697 untuk fusi gena TEL-AML1, BCR-ABL tipe LLA, E2A-PBX1. Kontrol negatif eksternal dengan HL60 *cell line*. Semua primer dan kontrol eksternal diperoleh dari Prof. dr. Allen Yeoh, *National University Hospital* (NUH), Singapura.

Karakteristik klinis pasien dengan fusi gena TEL-AML1

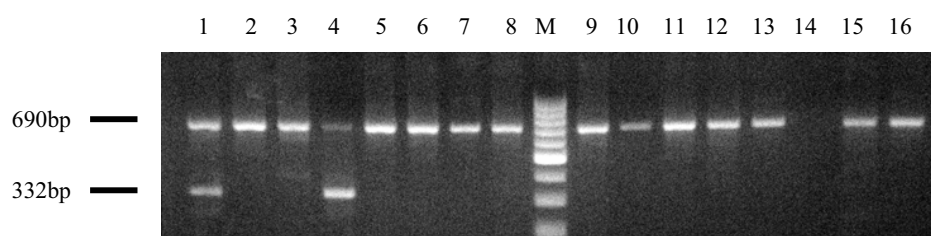
Tabel 1 memperlihatkan bahwa 13 pasien dengan TEL-AML1 positif, sebagian besar (92,3%) berusia 1 sampai 10 tahun dan mempunyai jumlah leukosit $< 50.000/uL$.

Karakteristik klinis pasien dengan fusi gena BCR-ABL tipe LLA

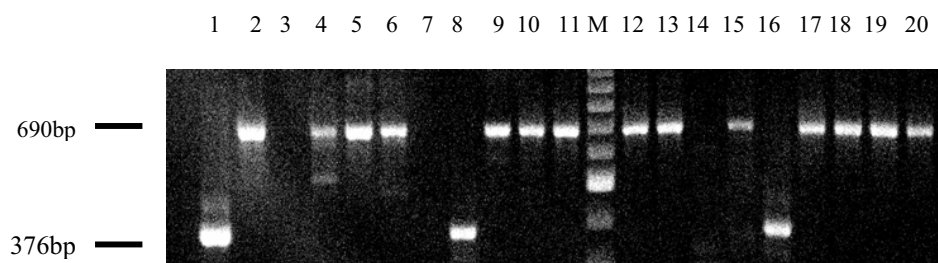
Pada penelitian ini ditemukan angka kejadian fusi gena BCR-ABL tipe LLA adalah 6 (10,2%) (Tabel 2).



Gambar 1. Gambaran produk PCR pada gel agarose fusi Gena TEL-AML1. Kolom 1: kontrol positif eksternal (REH); kolom 2: kontrol negatif eksternal (HL-60 cell line); Kolom 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12-18 adalah sampel dengan TEL-AML1-negatif; kolom 5, 6, 10, 12 adalah sampel dengan TEL-AML1-positif. M adalah Marker DNA 100bp.



Gambar 2. Gambaran produk PCR pada gel agarose fusi Gena BCR-ABL tipe LLA. Kolom 1: kontrol positif eksternal (SupB15); kolom 2: kontrol negatif eksternal (HL-60 cell line); Kolom 3, 5-8, 9-13, 15, 16 adalah sampel dengan TEL-AML1-negatif; kolom 4 adalah sampel dengan BCR-ABL tipe LLA positif. Kolom 14 adalah sampel yang tidak teramplifikasi. M adalah Marker DNA 100bp.



Gambar 3. Gambaran produk PCR pada gel agarose fusi Gena E2A-PBX1. Kolom 1: kontrol positif eksternal (697); kolom 2: kontrol negatif eksternal (HL-60 cell line); Kolom 3, 7, 14 adalah sampel yang tidak teramplifikasi. Kolom 8, 16 adalah sampel dengan E2A-PBX1 positif. M adalah marker DNA 100bp.

Karakteristik klinis pasien dengan fusi gena E2A-PBX1

Karakteristik klinis pasien dengan fusi gena E2A-PBX1 tidak berbeda bermakna menurut jenis kelamin, usia, jumlah leukosit awal, kelompok risiko, dan tipe LLA (Tabel 3).

Diskusi

Gena TEL dan AML1 sering mengalami gangguan pada sejumlah keganasan darah yang berbeda. Disamping AML1, TEL sering mengalami fusi ke gena yang menyandi tirosin kinase. Gena AML1 merupakan bagian dari faktor transkripsi CBF. AML1

Tabel 1. Karakteristik klinis pasien berdasar ada tidaknya fusi gen TEL-AML1

Karakteristik	Fusi gen TEL-AML1		p
	Ada	Tidak	
Jenis kelamin (%)			
Laki-laki	6 (46,2)	27 (58,7)	0,421
Perempuan	7 (53,8)	19 (41,3)	
Usia (%)			
<1 atau ≥10 tahun	1 (7,7)	14 (30,4)	0,152
1-<10 tahun	12 (92,3)	32 (69,6)	
Jumlah leukosit (μL,%)			
≥50.000	1 (7,7)	16 (34,8)	0,084
<50.000	12 (92,3)	30 (65,2)	
Risiko (%)			
Tinggi	5 (38,5)	27(58,7)	0,196
Rendah	8 (61,5)	19 (41,3)	
Tipe LLA (%)			
L1	5 (38,5)	13 (28,3)	0,509
L2	8 (61,5)	33 (71,7)	

p: uji statistik X²

Tabel 2. Karakteristik klinis pasien berdasarkan ada-tidaknya fusi gen BCR-ABL

Karakteristik	Fusi gen BCR-ABL		p
	Ada	Tidak	
Jenis kelamin (%)			
Laki-laki	4 (66,7)	29 (54,7)	0,685
Perempuan	2 (33,3)	24 (45,3)	
Usia (%)			
<1 atau ≥10 tahun	1 (16,7)	14 (26,4)	1,000
1-<10 tahun	5 (83,3)	39 (73,6)	
Jumlah leukosit (μL,%)			
≥50.000	4 (66,7)	13 (24,5)	0,031*
<50.000	2 (33,3)	40 (75,5)	
Risiko (%)			
Tinggi	4 (66,7)	28 (52,8)	0,678
Rendah	2 (33,3)	25 (47,2)	
Tipe LLA (%)			
L1	2 (33,3)	16 (30,2)	1,000
L2	4 (66,7)	37 (69,8)	

p: uji statistik X²; * : p <0,05, secara uji statistik X² berbeda bermakna

dapat mengalami gangguan pada anak LLA dan LMA (paling sering adalah fusi Gen AML1-ETO).⁶ Fusi gen TEL-AML1 (hasil dari translokasi t(12;21) (p13;q22) merupakan salah satu gangguan genetik yang penting pada anak dengan LLA. Kontribusi fusi gen secara umum belum diketahui tetapi khususnya mempengaruhi survival dan apoptosis.⁷ Dari penelitian

Tabel 3. Karakteristik klinis pasien berdasar ada tidaknya fusi gen E2A-PBX1

Karakteristik	Fusi gen E2A-PBX1		p
	Ada	Tidak	
Jenis kelamin (%)			
Laki-laki	3 (60)	30 (55,6)	1,000
Perempuan	2 (40)	24 (44,4)	
Usia (%)			
<1 atau ≥10 tahun	2 (40)	13 (24,1)	0,593
1-<10 tahun	3 (60)	41 (75,9)	
Jumlah leukosit (μL,%)			
≥50.000	0 (0)	17 (31,5)	0,308
<50.000	5 (100)	37 (68,5)	
Risiko (%)			
Tinggi	2 (40)	30 (55,6)	0,652
Rendah	3 (60)	24 (44,4)	
Tipe LLA (%)			
L1	0 (0)	18 (33,3)	0,310
L2	5 (100)	36 (66,7)	

p: uji statistik X²

kami ditemukan pasien dengan fusi gen TEL-AML1 sebagian besar berusia 1 sampai 10 tahun, jumlah leukosit ≤50.000/uL, namun secara statistik tidak ditemukan perbedaan secara bermakna dalam hal karakteristik klinis tersebut, termasuk jenis kelamin kelompok risiko, dan tipe LLA berdasarkan ada tidaknya fusi gen TEL-AML1 (p>0,05) (Tabel 1). Hal yang sama ditemukan peneliti sebelumnya.^{8,9}

Hal yang berbeda ditemukan di Taiwan, 4 dari 30 (13,3%) pasien dengan fusi gen TEL-AML1 memiliki jumlah leukosit awal >100.000/uL dan satu di antaranya jumlah leukosit >300.000/uL.¹⁰ Penelitian di Jepang menemukan pasien dengan fusi gen TEL-AML1 positif, 3 (21,4%) dari 14 pasien dengan jumlah leukosit >100.000/uL dan satu di antaranya dengan jumlah leukosit 200.000/uL.¹¹ Di Republik Czech kejadian tersebut terjadi pada sekitar 22% dari seluruh kasus LLA. Anak yang terdiagnosis dengan fusi gen sebagian besar usia pra sekolah dengan leukemia tipe sel-B, dan hasil terapinya sangat bagus.⁶ Di Brazil pasien LLA dengan fusi gen TEL-AML1 mempunyai rata-rata usia 4,8 tahun dan rata-rata jumlah leukosit 44.270/uL.¹² Di negara barat hanya beberapa kasus dengan TEL-AML1 positif mempunyai jumlah leukosit awal lebih dari 100.000/uL.^{1,11,13} Hal yang sama ditunjukkan pada penelitian lain, yaitu anak dengan fusi gen TEL-AML1 secara umum terjadi pada usia 2–9 tahun dan memiliki luaran yang baik.¹⁴

Fusi gena BCR-ABL tipe LLA hasil translokasi t(9;22) ditemukan pada 3-5% kasus LLA anak.¹⁵ Kelainan ini dihubungkan dengan prognosis yang buruk karena kelompok ini memiliki kenaikan resistensi terhadap pengobatan, namun demikian sebagian besar pasien juga mencapai remisi.¹⁶ Protein fusi merupakan protein kinase yang akan mengganggu jalur sinyaling yang mengatur proliferasi, survival, dan *self-renewal* sel stem hematopoietik.^{17,18}

Penelitian kami mendapatkan fusi gena BCR-ABL tipe LLA lebih banyak terjadi pada pasien dengan leukosit $\geq 50.000/uL$ (66,7%) dibanding kelompok yang mempunyai leukosit awal $< 50.000/uL$ (33,3%). ($p=0,031$) (Tabel 3). Fusi gena tersebut lebih banyak terjadi pada laki-laki (66,7%) dan pada usia 1 sampai 10 tahun, kelompok tipe L2 dan risiko tinggi, namun secara statistik tidak ditemukan perbedaan bermakna. Hal yang sama ditemukan oleh Arico dkk,¹⁸ 52% pasien LLA dengan fusi gena BCR-ABL terjadi pada laki-laki, 11% berusia di bawah 1 tahun, dan lebih dari 50% kasus mempunyai jumlah leukosit $> 50.000/uL$.

Fusi gena E2A-PBX1 hasil translokasi t(1;19) (q23;p13) terdeteksi pada 5% anak dengan LLA *pre-B cell* yang menghasilkan fusi gen E2A pada kromosom 19 dengan gen PBX1 pada kromosom 1. Gen E2A mengkode faktor transkripsi famili *helix-loop-helix*. Produk gena PBX1 juga merupakan faktor transkripsi yang berikatan dengan DNA melalui homeodomain. Mekanisme transformasi yang dihasilkan kemungkinan besar karena abnormalitas pengaturan transkripsi oleh *oncogene* tersebut. Pada percobaan hewan ditemukan fusi gen E2A/PBX1 akan meningkatkan proliferasi, dan apoptosis.^{17,19}

Penelitian kami mendapatkan fusi gena E2A-PBX1 lebih banyak terjadi pada pasien laki-laki, usia 1- < 10 tahun, jumlah leukosit $< 50.000/uL$, tipe L2, dan kelompok risiko standar, namun secara statistik tidak ada perbedaan antara LLA dengan translokasi t(1;19)/E2A-PBX1 yang diklasifikasikan sebagai LLA subtipe risiko tinggi apabila diobati dengan antimetabolit standar. Kemoterapi yang intensif akan memperbaiki prognosis sehingga *disease-free survival* mendekati 90%.¹⁹

Kesimpulan

Disimpulkan tidak ditemukan perbedaan karakteristik klinis seperti jenis kelamin, usia, jumlah leukosit,

kelompok risiko, dan tipe LLA berdasarkan ada tidaknya fusi gena TEL-AML1 dan E2A-PBX1. Fusi gena BCR-ABL tipe LLA lebih banyak terjadi pada kelompok pasien dengan leukosit awal $\geq 50.000/uL$ dibandingkan kelompok yang mempunyai leukosit awal $< 50.000/uL$. Proporsi jenis kelamin, usia, tipe LLA dan kelompok risiko tidak berbeda. Disimpulkan juga bahwa kejadian fusi gena pada LLA anak di Asia sebanding dengan di negara barat. Diperlukan penelitian lanjutan serupa dengan jumlah sampel yang lebih banyak. Untuk aplikasi di klinis, hendaknya fusi gena dipertimbangkan dalam pembuatan stratifikasi awal pasien LLA agar pengobatan yang diberikan lebih sesuai, efek toksik bisa dikurangi pada pasien yang betul-betul risiko rendah dan pengobatan bisa lebih agresif untuk pasien yang betul-betul risiko tinggi.

Ucapan terima kasih

Terima kasih kepada Triani, teknisi laboratorium Biologi molekular, FK, UGM, Yogyakarta dan Purwanto register yang membantu dalam penyediaan data klinis, dari subbagian Hematologi-onkologi, IKA, FK UGM/ RSUP Dr. Sardjito, Yogyakarta.

Daftar Pustaka

1. Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1998;339:605-9.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100:57-70. Cit Pui, CH, Relling MV, Downing JR. Mechanism of disease acute lymphoblastic leukemia. Narrator Engl J Med 2004;350:1535-48.
3. Friedman AM, Weinstein HJ. The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. Oncologist 2000;5:321-8.
4. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukaemia. N Engl J Med 2006;354:166-78. Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessell J, Baruchel A, dkk. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 2000;342:998-1006.
5. Hariyana SM. The importance of molecular biology studies of clinical leukemia in Indonesia. Scientific seminar on leukemia, Yogyakarta, 26 September 1998.
6. Zuna. The role of TEL and AML1 genes in the pathogenesis of hematologic malignancies. Cas Lek Cesk 2001;140:131-7.

7. Diakos C, Krapf G, Gerner C, Inthal A, Lemberger C, Ban J, dkk. RNAi-mediated silencing of TEL-AML1 reveals a heat-shock protein–and survivin-dependent mechanism for survival. *Blood* 2007;109:2607-10.
8. McLean TW, Ringold S, Neuberg D, Stegmaier K, Tantravahi R, Ritz J, Koefler HP, dkk. T.R. TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996;88:4252-8.
9. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, Rubnitz JE, Raimondi SC, Hancock ML, dkk. TEL AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* 1995;9:1985-9.
10. Liang DC, Shih LY, Yang CP, Hung IJ, Chen SH, Jaing TH, dkk. Multiplex RT-PCR assay for the detection of major fusion transcripts in taiwanese children with b-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 2002;39:12-7.
11. Pakakasama S, Kajanachumpol S, Kanjanapongkul S, Sirachainan N, Meekaewkunchrn A, Ningsanond V, dkk. Simple multiplex RT-PCR for identifying common fusion transcripts in childhood acute leukemia. *Int J Lab Hematol* 2008;30:286–91.
12. Zena PRG, Limab MC, Coserc VM, Sillad ML, Daudtd L, Fernandese MS, dkk. Prevalence of TEL/AML1 fusion gene in Brazilian pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet and Cytogenet* 2004;151:68–72.
13. Romana SP, Mauchaufee M, Coniat ML, Chumakov I., Paslier DL, Berger R, dkk. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* 1995;85:3662-70.
14. Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, Shuster J, Linda SB, Kurtzberg J, dkk. Prospective Analysis of TEL Gene Rearrangements in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2008;26:2186-91.
15. Gaynon PS, Steinherz PG, Bleyer WA, Ablin AR, Albo VC, Finklestein JZ, dkk. Improved therapy for children with acute lymphoblastic leukemia and unfavorable presenting features: A follow-up report of the Children's Cancer Group Study CCG-106. *J Clin Oncol* 1993;11:2234 42.
16. Brisco MJ, Sykes PJ, Dolman G, Neoh SH, Hughes E, Peng LM. dkk. Effect of the Philadelphia chromosome on minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia [see comments]. *Leukemia* 1997;11:1497-500.
17. Wickremasinghe RG, Hoffbrand V. Molecular basis of leukemia and lymphoma. In edited Drew Provan and John Gribben foreword by M.F. Perutz. *Molecular Haematol* 2000. United Kingdom; Blackwell Science; 2000.h.25-40.
18. Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessells J, Baruchel A. Outcome of Treatment in Children with Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia *N Engl J Med* 2000;342:998-1006.
19. Pui CH, Evans. Acute lymphoblastic leukaemia. *N Engl J Med* 2004;339:605-15.