

AML hastalarında t(15;17) PML-RARA translokasyonunun real time RT-PCR ile 5 yıllık sonuçlarının değerlendirilmesi

Identification of t(15;17) PML-RARA translocation in acute promyelocytic leukemia prediagnosed children and adult cases by real time qRT-PCR with 5 year follow up results

Tezcanlı Kaymaz B ¹	Bozok Çetintaş V ¹	Tetik Vardarlı A ¹	Yılmaz Süslüer S ¹	Aygüneş D ¹
Dalmızrak A ¹	Aktan Ç ¹	Küçükaşlan A Ş ¹	Balcı T ¹	Kayabaşı Ç ¹
Özmen Yelken B ¹	Selvi Günel N ¹	Biray Avcı Ç ¹	Kosova B ¹	Eroğlu Z ¹
Aksoylar S ²	Çetingül N ²	Balkan C ³	Yılmaz D ³	Aydınok Y ³
Kavaklı K ³	Töbü M ⁴	Tombuloğlu M ⁴	Şahin F ⁴	Büyükkeçeci F ⁴
Saydam G ⁴	Gündüz C ¹			

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Onkoloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Hematoloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁴Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

Özet

Amaç: Akut promyelositik lösemi (APL), akut myeloid lösemisinin (AML) iyi tanımlanmış alt tipidir ve spesifik olarak t(15;17)(q22;q12) translokasyonu ile karakterizedir. t(15;17), 15. kromozom üzerinde bulunan promyelositik lösemi (PML) ve 17. kromozomda lokalize retinoik asit reseptör alfa (RARA) genlerinin füzyonu sonucu oluşur. Translokasyon varlığı, konvensiyonel sitogenetik, floresan in situ hibridizasyon analizi (FISH) ve sıklıkla gerçek zamanlı kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemiyle saptanır. Bu çalışmada, anabilim dalımıza başvuran APL ön tanılı olgulara ait kan ya da kemik iliği materyallerinden t(15;17) translokasyonunun gerçek zamanlı qRT-PCR ile kantitasyonu amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 2009-2013 yılları arasında başvuran 79 çocuk (7.28±5.20 yaş; 45 E, 34 K) ve 359 yetişkin (47.71±15.57 yaş; 193 E, 166 K) olgu dahil edilmiştir. Olguların kan ya da kemik iliği materyallerinden total RNA izolasyonunu takiben cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, qRT-PCR ile t(15;17) translokasyonu çalışılıp, kantite edilmiştir.

Bulgular: Çocuk olgulardan 2'si (%3), toplamda 6 test (%5) t(15;17) için pozitif olarak belirlenmiştir. Bu olgulara ait t(15;17) kantitasyon değeri ortalaması, 0.0002±0.0003'tür. Yetişkin olguların 26'sı (%7), toplamda 30 test (%8) t(15;17) için pozitif olarak belirlenmiştir. Bu olgulara ait t(15;17) kantitasyon değeri ortalaması, 0.067±0,144'tür.

Sonuç: qRT-PCR'in konvensiyonel sitogenetik çalışmalara göre üstünlüğü, tüm çalışma basamaklarının test esnasında eş zamanlı olarak izlenebilmesi ve oluşan ampliconların kantitasyonunun yapılabilmesidir. t(15;17) kalitatif tayininin klinikteki önemi, tanının kesinleştirilmesinde, tüm trans-retinoik asit ve trioksid arsenik tedavisine yanıtın öngörülmesi ve tedavinin yararlılığının bilinmesinde, minimal rezidüel hastalığın (MRH) takibi ve relapsın erken evrede belirlenebilmesidir.

Anahtar Sözcükler: Akut promyelositik lösemi, minimal rezidüel hastalık, PML/RARA, qRT-PCR, t(15;17).

Yazışma Adresi: Burçin TEZCANLI KAYMAZ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
İzmir, Türkiye

Makalenin Geliş Tarihi: 06.03.2014 Kabul Tarihi: 19.03.2014

Summary

Aim: Acute promyelocytic leukemia (APL) is a well-defined subtype of acute myeloid leukemia (AML) specifically characterized by the t(15;17)(q22;q12) translocation. t(15;17) results in the fusion of the genes, promyelocytic leukemia (PML) on chromosome 15 and retinoic acid receptor alpha (RARA) located on 17th chromosome. Translocation is detected by conventional cytogenetic, fluorescence in situ hybridization analyses (FISH) and often a real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) method. In this study, quantification of t(15; 17) translocation via real time qRT-PCR was aimed in blood or bone marrow materials belonging to APL pre-diagnosed cases that appealed our department.

Materials and Methods: Seventy nine children (7.28 ± 5.20 years; 45 M, 34 F) and 359 adults (47.71 ± 15.57 years; 193 M, 166 F) were included in the study between the years 2009-2013. Following total RNA isolation from blood or bone marrow materials of the cases, cDNA synthesis was carried out. Then, t(15; 17) translocation was studied by qRT-PCR and quantitated.

Results: Two cases from children (3%), and in total 6 tests (5%) were detected positive for t(15;17). The average t(15;17) quantification value was 0.0002 ± 0.0003. Twenty six cases of the adults (7%), in total 30 tests (8%) were determined as t(15;17) positive. Average t(15;17) quantification value of these cases was 0.067 ± 0.144.

Conclusion: The superiority of qRT-PCR compared to conventional cytogenetic studies can be found in the fact that all working steps can be monitored simultaneously during the test and the resulting amplicons can be quantitated. The clinical significance of t(15;17) qualitative determination is, confirmation of the diagnosis, all trans-retinoic acid and trioxide arsenic treatment response prediction and treatment efficacy knowledge in addition to minimal residual disease (MRD) monitoring and ability to identify relapse at early ages.

Key Words: Acute promyelocytic leukemia, minimal residual disease, PML/RARA, qRT-PCR, t(15;17).

Giriş

Lösemi, kan ya da kemik iliği orjinli, lökositlerin aşırı proliferasyonu ile karakterizedir. Lösemi hücrelerindeki anomali, farklılaşmanın engellenmesi ve proliferasyonu hızındaki artıştan kaynaklanır. Lösemi öncelikle akut ve kronik olarak; sonrasında lenfositik ve myeloid olarak alt gruplara ayrılır (1). Bu gruplar içerisinde de genellikle ileri sınıflandırmalar gerekmeyle birlikte; içlerinde en heterojen grup, akut myeloid lösemilerdir (AML) (2).

AML, kemik iliğinde bulunan myeloid progenitör hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla oluşur ve lösemilerin %15-25'ini oluşturur. Akut promyelositik lösemi (APL), AML'nin bir alt grubu olmakla birlikte; kemik iliğinde hematopoezin promyelositik safhasında durması ve lösemik blast hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile karakterizedir (3). Morfolojik olarak AML'nin M3 alt tipi olarak sınıflandırılır (4). Sitogenetik olarak, tüm APL olgularının yaklaşık %90-95'inde 15. ve 17. kromozomlar arasında t(15;17) resiprokal translokasyonu gözlenir (5). t(15;17) sonucunda, promyelositik lösemi (PML) ve retinoik asit reseptör alfa (RARA) genlerinin füzyonuyla birlikte; PML-RARA şimerik onkoproteini oluşur (6, 7). Böylece t(15;17), düzgün ilerleyen promyelositik farklılaşmayı bozan majör bir etmen olmakla birlikte; APL hastalığı için moleküler bir marker olarak öne çıkar (8). Geriye kalan hastaların küçük bir grubunda, alternatif RARA füzyonları meydana gelebilir (9-11). APL tedavisinde farklılaşmayı ve PML-RARA degradasyonunu tetikleyici ajan olarak, all-trans-retinoik asit (ATRA) temel tedavi olarak kullanılmaktadır (12). PML-RARA translokasyonu karyotip analizi, floresan in situ

hibridizasyon ve sıklıkla gerçek zamanlı kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemiyle saptanır. qRT-PCR, 10⁵-10⁶ hücre arasından 1 lösemik hücreyi saptayabilme hassasiyetindedir. Böylece hastalar minimal rezidüel hastalık açısından takibe alınıp, izlenebilir. t(15;17)'nin kantitatif olarak saptanmasının klinik yansıması, remisyondaki ve yüksek relaps risk grubunda olan olguların erken evrede belirlenebilmesidir. Ayrıca, tüm trans-retinoik asit ve triksid arsenik tedavisine yanıtın öngörülmesi ve tedavinin yararlılığının bilinmesi, MRH takibi ile mümkün olmaktadır.

Bu çalışmada, 2009-2013 yılları arasında, anabilim dalımıza başvuran APL ön tanılı olgulara ait kan ya da kemik iliği materyallerinden t(15;17) translokasyonunun gerçek zamanlı qRT-PCR ile kantite edilip değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

2009-2013 yılları arasında olguların kan ya da kemik iliği materyallerinden sırasıyla 2 ml ve 1 ml alınıp, "red blood cell lysis buffer" (Roche, Mannheim, Germany) ile lökositler çöktürülmüş ve "Magpure compact RNA Isolation kit" (Roche, Mannheim, Germany) ile MagnaPure cihazında (Roche Applied Science, Germany) total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA'ların miktarları ve saflıkları Nanodrop cihazında ölçülmüştür. İzole edilen RNA'lardan 1 µg alınıp ve "High Fidelity First Strand cDNA Synthesis kit" (Roche, Mannheim, Germany) ile konvansiyonel PCR cihazında (Techne) komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmiştir. Sonrasında, t(15;17) PML-RAR deteksiyon kiti

(Way2Gene), referans gen olarak "G6PGH House Keeping Gene Set" (Way2Gene) kiti ve "Fast Start DNA Master Hybridisation Probes" (Roche, Mannheim, Germany) kullanılarak gerçek zamanlı qRT-PCR cihazı olan LightCycler ver. 2.0'da (Roche Applied Science, Germany) manuelle verilen termal profil doğrultusunda t(15;17) translokasyonu çalışılmıştır.

Kantitasyon değerinin saptanması için, PML-RARA füzyon genine ait mRNA kopya sayısı bilinen standartlar (5×10^2 - 5×10^6 kopya sayısı aralığında toplam 5 standart) ve G6PDH referans genine ait mRNA kopya sayısı bilinen standartlar ile (5×10^2 - 5×10^6 kopya sayısı aralığında toplam 5 standart) ayrı ayrı standart eğriler çizdirilmiştir. Böylelikle, bu eğrilere göre mRNA kopya sayılarını bilmediğimiz örneklerin hedef gen konsantrasyonları belirlenebilir. Bir pozitif olgu için t(15;17) için absolut kantitasyon değeri, "hedef gen" kopya sayısının "referans gen" kopya sayısına oranlanmasıyla elde edilmiştir. Çalışmamızın qRT-PCR basamağı ve kantitasyon hesaplamaları literatür bilgisine uygun şekilde gerçekleştirilmiştir (13).

Bulgular

t(15;17) çalışılması istemiyle anabilim dalımıza, 79 çocuk ((7,28±5,20 yaş), (45 E, 34 K)) ve 359 yetişkin ((47,71±15,57 yaş), (193 E, 166 K)) toplam 438 olgu başvurmuştur. Toplam olgu sayımızın %18.04'ünü çocuk grubu, %81.96'sını yetişkin grubu oluşturmaktaydı.

Çalışmaya dahil olan çocuk olgulardan 9 adet (%7) kan, 115 adet (%93) kemik iliği olmak üzere toplam 124 adet materyal alınmıştır. Yetişkin olgulardan ise 243 adet

(%45) kan, 284 adet (%55) kemik iliği olmak üzere toplamda 527 materyal gelmiştir. Çocuk ve yetişkin olgulara ait toplam kan ve kemik iliği örnek sayısı ise, 642'dir.

Çalışmada yer alan 79 çocuk olgunun 24'ü (%28.24), 359 yetişkin olgunun ise 61'i (%17.76) olmak üzere toplam 85 kişi takip hastasıdır. Takip hastası çocuk olgulardan 124 adet (%19.31) t(15;17) testi çalışılmıştır. Bunların içerisinde 69 test (%23.88), 2-5 kez arasında tekrar edilmiştir. Takip hastası yetişkin olgulardan ise 518 adet (%80.69) t(15;17) testi çalışılmış; bunlardan 220 tanesi (%76.12) 2-14 kez arasında tekrar edilmiştir. Çocuk ve yetişkin grupları birlikte değerlendirildiğinde, toplam 642 adet çalışılan t(15;17) testinin 289'u 2 ile 14 kez arasında değişen sayıda tekrar edilmiştir.

Çalışmanın sonucunda çocuk olgulardan 2'si (%3) t(15;17) için pozitif olarak saptanırken, toplamda 6 test (%5) pozitif olarak belirlenmiştir. Bu olgulara ait t(15;17) kantitasyon değeri ortalaması, 0.0002 ± 0.0003 olarak belirlenmiştir. Yetişkin olguların ise 26'sı (%7), t(15;17) için pozitif olarak saptanırken, toplamda 30 test (%8) pozitif olarak belirlenmiştir. Bu olgulara ait t(15;17) kantitasyon değeri ortalaması, 0.067 ± 0.144 olarak belirlenmiştir. Çocuk ve yetişkin grupları birlikte değerlendirildiğinde toplam 28 olgu (15;17) için pozitif olarak belirlenmiş iken, toplam pozitif test sayısı 36'dır. Tüm olguların t(15;17) için ortalama kantitasyon değeri ise 0.065 ± 0.141 olarak hesaplanmıştır. Olgulara ait tüm veriler, Tablo-1'de özetlenmiştir.

Tablo-1. Çocuk ve Yetişkin Olgulara Ait t(15;17) Testi Çalışma Özeti.

	Çocuk		Dahiliye		Toplam
	n	%	n	%	
Test Sayısı	124	19.31	518	80.69	642
Hasta Sayısı	79	18.04	359	81.96	438
Takip Hasta Sayısı	24	28.24	61	71.76	85
Test Tekrar Sayısı	69 (2-5)	23.88	220 (2-14)	76.12	289 (2-14)
Kadın	34 (%43)	17.00	166 (%46)	83.00	200
Erkek	45 (%57)	18.91	193 (%54)	81.09	238
Yaş Ortalaması	7.28±5.20		47.71±15.57		38.13±22.13
Pozitif Hasta	2 (%3)	7.14	26 (%7)	92.86	28
Pozitif Test	6 (%5)	16.67	30 (%8)	83.33	36
CN Ortalaması	0.0002 ± 0.0003		0.067 ± 0.144		0.065 ± 0.141
Kan	9 (%7)	3.70	243 (%45)	96.30	243
Kemik İliği	115 (%93)	28.82	284 (%55)	71.18	399

Tartışma

Moleküler genetik alanındaki gelişmelere paralel olarak, çocukluk ve yetişkin çağı APL etiolojisinde genetik anomalilerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Lösemide gözlenen bu genetik defektler, kanserli hücrenin biyolojisini; bu nedenle de hastalığı klinik seyrini ve prognozunu etkilemektedir. APL patogenezindeki en yaygın genetik anomali, PML-RARA şimerik füzyon geninin oluşumuyla sonuçlanan t(15;17)'dir. t(15;17)

kromozomal yeniden düzenlenmesinin sonucu oluşan PML-RARA füzyon proteini, transkripsiyonel faktör olarak lökomogeneze etkilidir (3, 14). Bu nedenle, oluşan şimerik onkoproteininin aktif transkript seviyesinin belirlenmesi, hastalığın seyrinin izlenmesi açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, 2009-2013 yılları arasında anabilim dalımıza APL ön tanısıyla başvuran toplam 438 adet çocuk ve yetişkin olguda, t(15;17) analizinin gerçek

zamanlı qRT-PCR metodu ile saptanmasıydı. Çalışmanın sonucunda pediatrik olgulardan 2'si (%3) t(15;17) için pozitif olarak saptanırken, toplamda 6 test (%5) pozitif olarak belirlenmiştir. Yetişkin olguların ise 26'sında (%7), t(15;17) pozitif olarak saptanmış, toplamda 30 test (%8) pozitif olarak belirlenmiştir. Böylelikle çalışılan toplam 642 test arasında, 36 testte (%5.6) PML-RARA pozitifliği saptanmıştır. Bu pozitiflik oranı, önceki rapor edilen çalışmalarla da uyumludur. Betancourt ve ark. ile Sazawal ve ark.'nın 2009 yılında yayınladıkları iki ayrı çalışmada da, tüm AML hastaları içinde PML-RARA pozitiflik oranının %6-9 arasında olduğu rapor edilmiştir (15,16). İtalya'da 2005 yılında yapılan başka bir retrospektif çalışmada ise, 983 olgudan 91'inde (%9) PML-RARA pozitif saptanmıştır (17). Türkiye'de ise, Çukurova Üniversitesi'nden 2010 yılında Kömür M. ve ark.'nın rapor ettiği çalışmada, 34 pediatrik AML ön tanılı olgudan 3'ünde, %8.8 oranında t(15;17) pozitifliği saptanmıştır (18). Sonuç olarak, önceki çalışmalara ait pozitiflik oranları ile kendi merkezimizde elde ettiğimiz oranlar benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda t(15;17) kantitatif tayini için gerçek zamanlı qRT-PCR kullanmamızın önemli bir nedeni, hastaları minimal rezidüel hastalık takibinde incelemektir. Translokasyonlar genellikle FISH, konvansiyonel sitogenetik, multipleks PCR gibi metotlarla ile uzun bir süreçte belirlenebilmektedir (19). Ancak yüksek spesifite, sensitivite ve kısa sürede tanı koyabilme imkanı sağlayan gerçek zamanlı qRT-PCR metodu aynı zamanda, t(15;17) için pozitif olguların kantitasyon değerinin hesaplanmasına, blastik hücrelerin saptandığı siklusun belirlenmesine olanak verdiğinden, çalışmalara özgüllük katmaktadır. Ayrıca, sitogenetik yöntemler MRH takibi açısından yeterli olmamaktadır. Aktif transkripsiyon düzeyini belirlemede kullanılan qRT-PCR yönteminin sitogenetik metoda göre üstünlüğü, daha hızlı ve duyarlı

olmasının yanı sıra; sayısal bir değer olarak elde edilen sonuçların olguların tedaviye verdikleri yanıtın takibinde kolaylık sağlamasıdır (20). Çalışmamızda MRH takibinde olan pediatrik olgulardan ve ilk kez Mart 2011'de gelen erkek olgudan (A.E.), toplam 4 kez t(15;17) testi çalışılmış, hepsi de negatif sonuç vermiştir ve olgunun remisyon hali devam etmektedir. Yetişkinler grubundan ilk kez Haziran 2011'de gelen kadın olguda (Ş.A.) PML-RARA negatif olarak saptanmış ve sonraki 6 aylık süreçte 6 kez daha t(15;17) testi negatif olarak saptanmıştır. MRH bağlamında takip edilen olguda Nisan 2012'de nüks gerçekleşmiş ve t(15;17) absolut kantitasyon değeri 0.0000017 olarak belirlenmiştir. Bir ay sonra test tekrarı istenen olgu, tekrar remisyon sergileyip PML-RARA negatif olarak değerlendirilmiştir. Günümüze kadar olan süreçte 6 kez daha t(15;17) çalışılan olgunun remisyon hali devam etmektedir. Bu nedenle translokasyon çalışmalarında kısa sürede kantitatif sonuç verilebilmesi klinisyenler için yol gösterici olmakta, tedavinin takibini kolaylaştırmakta ve çok düşük düzeydeki ekspresyonların bile belirlenebilmesi hastalığın prognozu için erken ipuçları verebilmektedir.

Sonuç

Çocukluk ve yetişkin çağında gözlenen kromozomal yeniden düzenlenmelerin erken evrede saptanabilmesi hem klinisyen hem de hasta için kritik öneme sahiptir. Anabilim dalımızda t(15;17) kantitasyonu için kullandığımız qRT-PCR yöntemi, hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar, APL hastalarında yeni tanı döneminde ve tedavi sürecinde t(15;17) PML-RARA translokasyonunun kantitatif tayininin; tanının kesinleştirilmesinde, moleküler remisyon sağlanmasına yönelik tedaviyi yönlendirmesinde ve MRH takibi açısından değerli bir yöntem olduğunu desteklemektedir.

Referanslar

1. Hoffbrand A, Moss P, Pettit J. Essential Haematology. 5th ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2006.
2. Lowenberg B. Acute myeloid leukemia: The challenge of capturing disease variety. Hematology 2008;8(1):1-11.
3. Hillestad L. Acute promyelocytic leukemia. Acta Med Scand 1957;159(3):189-94.
4. Bennett J, Catovsky D, Daniel M, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol 1976;33(4):451-8.
5. Choughule A, Polampalli S, Amre P, et al. Identification of PML/RARA fusion gene transcripts that showed no t(15;17) with conventional karyotyping and fluorescent in situ hybridization. Genet Mol Res 2009;8(1):1-7.
6. Arber D, Vardiman J. Acute promyelocytic leukemia with t(15;17)(q22;q12) PML-RARA. 4th ed. Geneva: World Health Organization Publications; 2008;112-4.
7. Dong S, Geng J, Tong J, et al. Breakpoint clusters of the PML gene in acute promyelocytic leukemia: Primary structure of the reciprocal products of the PML-RARA gene in a patient with t(15;17). Gene Chromosomes Cancer 1993;6(3):133-9.
8. Akagi T, Shih L, Kato M, et al. Hidden abnormalities and novel classification of t(15;17) acute promyelocytic leukemia (APL) based on genomic alterations. Blood 2009;113(8):1741-8.
9. McConnell M, Licht J. The PLZF gene of t(11;17)-associated APL. Curr Top Microbiol Immunol 2007;313(1):31-48.
10. Falini B, Nicoletti I, Bolli, N, et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. Haematologica 2007;92(4):519-32.

11. Redner R. Variations on a theme: The alternate translocations in APL. *Leukemia* 2002;16(10):1927-32.
12. Collins S. Retinoic acid receptors, hematopoiesis and leukemogenesis. *Curr Opin Hematol* 2008;15(4):346-51.
13. Gabert J, Beillard E, Velden VH, et al. 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* 2003;17(12):2318-57.
14. Martínez Climent JA. Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies. *Leukemia* 1997;11(12):1999-2021.
15. Betancourt-García RD, Castro J, Fernández AC, et al. Acquired acute myelogenous leukemia after therapy for acute promyelocytic leukemia with t(15;17): A case report and review of the literature. *P R Hlth Sci J* 2009;28(2):146-50.
16. Sazawal S, Kumar B, Hasan SK, et al. Haematological & molecular profile of acute myelogenous leukaemia in India. *Indian J Med Res* 2009;129(3):256-61.
17. Testi AM, Biondi A, Lo Coco F, et al. GIMEMA-AIEOPAIDA protocol for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) in children. *Blood* 2005;106(2):447-53.
18. Kömür M, Erbey F, Bayram I, Tanyeli A. Incidence and prognostic importance of molecular genetic defects in children with acute myeloblastic leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010;11(5):1393-5.
19. Gabert J, Beillard E, van der Velden HJ, et al. 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* 2003;17(12):2318-57.
20. Koshy J, Qian YW, Bhagwath G, Willis M, Kelley TW, Papenhausen P. Microarray, gene sequencing, and reverse ranscriptase-polymerase chain reaction analyses of a cryptic PML-RARA translocation. *Cancer Genet* 2012;205(10):537-40