

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALENKA AMBROŽIČ

**DOLOČANJE MUTACIJ V GENU TP53 PRI
BOLNIKI S KRONIČNO LIMFATIČNO
LEVKEMIJO**

**TP53 GENE MUTATION ANALYSIS IN
PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC
LEUKEMIA**

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju, Kliničnega oddelka za hematologijo, UKC Ljubljana, pod mentorstvom izr.prof. dr. Helene Podgornik univ.dipl.inž.kem.inž., spec.med.biokem. in somentorstvom asist. dr. Tadeja Pajiča spec.med.biokem.

Zahvala mentorjema in vsem zaposlenim v laboratoriju. Iskrena hvala za vso pomoč, nasvete in prilagajanje svojega dela v času mojega laboratorijskega dela. Hvala mojim bližnjim za vso podporo v času študija in za strpnost v času pisanja naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice izr.prof. dr. Helene Podgornik univ.dipl.inž.kem.inž., spec.med.biokem. in somentorja asist. dr. Tadeja Pajiča spec.med.biokem.

VSEBINA

KAZALO SLIK.....	V
KAZALO PREGLEDNIC	V
POVZETEK.....	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VIII
1 UVOD	- 1 -
1.1 PATOGENEZA IN PATOFIZIOLOGIJA.....	- 1 -
1.2 DIAGNOSTIKA KLL.....	- 2 -
1.2.1 Klinična in krvna slika	- 2 -
1.2.2 Imunofenotip	- 3 -
1.3 NAPOVED POTEKA BOLEZNI.....	- 3 -
1.3.1 Citogenetske in molekularno genetske preiskave.....	- 3 -
1.3.2 MiRNA.....	- 5 -
1.3.3 Uvrstitev v stadij oziroma napovedno skupino	- 6 -
1.3.4 Drugi prognostični kazalci	- 6 -
1.4 Protein p53	- 7 -
1.4.1 Gen	- 7 -
1.4.2 Protein p53	- 8 -
1.4.3 Struktura proteina.....	- 8 -
1.4.4 Mutacije v genu <i>TP53</i>	- 9 -
1.4.5 <i>TP53</i> in KLL	- 10 -
1.4.6 Zdravljenje KLL.....	- 13 -
2 NAMEN IN CILJI.....	- 15 -
3 BOLNIKI, METODE IN MATERIALI	- 16 -
3.1 PREISKOVANCI	- 16 -
3.2 MATERIALI IN OPREMA	- 19 -
3.2.1 Reagenti.....	- 19 -
3.2.2 Oprema	- 20 -
3.2.3 Materiali	- 20 -
3.3 IZOLACIJA DNA IZ MONONUKLEARNIH CELIC	- 21 -

3.3.1 Vzorec za analizo	- 21 -
3.3.2 Izolacija mononuklearnih celic (limfociti B) preko fikola	- 21 -
3.3.3 Izolacija DNA z reagenčnim kompletom QIAamp DNA Mini Kit	- 22 -
3.3.4 Meritve koncentracije in kakovosti izoliranih nukleinskih kislin	- 24 -
3.4 POMNOŽEVANJE IZOLIRANE DNA Z METODO VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO Z UPORABO SPECIFIČNIH NUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV	- 25 -
3.4.1 Priprava vzorcev DNA z optimalno koncentracijo	- 25 -
3.4.2 Priprava ZON	- 25 -
3.4.3 Priprava reakcijske mešanice za reakcijo PCR	- 27 -
3.4.4 Agarozna gelska elektroforeza produktov PCR	- 27 -
3.5 SEKVENCIONIRANJE.....	- 29 -
3.5.1 Vzorec za sekvencioniranje nukleinskih kislin	- 29 -
3.5.2 Čiščenje produktov reakcije PCR z reagenčnim kompletom ExoSAP-IT	- 29 -
3.5.3 Sekvenčna reakcija (PCR).....	- 30 -
3.5.4 Čiščenje produktov sekvenčne reakcije PCR z reagenčnim kompletom BigDye X Terminator Purification kit.....	- 31 -
3.5.5 Analiza podatkov.....	- 32 -
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	- 33 -
4.1 Postavitev protokola za pomnoževanje gena <i>TP53</i> v reakciji PCR – modificirani protokol IARC	- 33 -
4.1.1 Preverjanje optimalne koncentracije matrične DNA.....	- 33 -
4.1.2 Optimizacija pogojev pomnoževanja DNA na PCR aparatu	- 33 -
4.1.3 Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov	- 35 -
4.2 Pomnoževanje gena <i>TP53</i> v sekvenčni reakciji PCR.....	- 37 -
4.3 Določanje mutacij v genu <i>TP53</i> pri vzorcih pacientov	- 37 -
5. SKLEP	- 43 -
6. LITERATURA	- 44 -

KAZALO SLIK

Slika 1: Elektroferogram pomnoževanja DNA po protokolu TP53-B.	- 33 -
Slika 2: Elektroferogram - optimizacija temperature prileganja T_a (58°C, 59°C, 60°C).	- 35 -
Slika 3: Optimizacija koncentracije izhodiščne DNA in začetnih oligonukleotidov.	- 36 -

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela I: Preiskovanci.	- 17 -
Tabela II: ZON za pomnoževanje gena TP53.	- 21 -
Tabela III: Delovni postopek za izolacijo DNA z reagenčnim kompletom QIAamp DNA Mini Kit (50).	- 23 -
Tabela IV: Spektrofotometrične meritve koncentracije in kakovosti izoliranih nukleinskih kislin.	- 25 -
Tabela V: Reakcijska mešanica.	- 27 -
Tabela VI: Reakcijska mešanica za sekvenčno reakcijo PCR, če v le-to dodamo 0,75 µL z ExoSAP očiščenih produktov reakcije PCR. Reakcijsko mešanico alikvotiramo po 18,7 µL. ..	- 31 -
Tabela VII: Protokol za pomnoževanje v sekvenčni reakciji PCR.	- 31 -
Tabela VIII: »Protokol TP53-B«.	- 34 -
Tabela IX: Protokol pomnoževanja DNA za določitev prisotnosti genskih sprememb v genu TP53; »modificirani protokol TP53-C«.	- 35 -
Tabela X: Določanje mutacij v genu TP53 pri vzorcih pacientov.	- 38 -

POVZETEK

Mutacije v genu *TP53* so močan samostojen, od drugih kromosomskih in / ali genskih sprememb neodvisen napovedni dejavnik krajšega preživetja pri bolnikih s kronično limfatično levkemijo (KLL). Priporočena je tako mutacijska analiza kot določanje delecije na kratkem kraku kromosoma 17 pred začetkom zdravljenja. Smernice trenutno predpisujejo določanje mutacij v genu *TP53* s sekvencioniranjem po Sanger-ju. Občutljivost mutacijske analize povečamo z izolacijo DNA iz mononuklearnih celic, oziroma pri KLL iz limfocitov B. V magistrski nalogi smo na osnovi priporočila International Agency for Research on Cancer – »Detection of *TP53* mutations by direct sequencing« vpeljali postopek določanja mutacij v genu *TP53* (eksoni 4-10). Za izbiro vzorca je bila ključna velikost klona celic s KLL nad 15%. Dodaten kriterij izbire bolnikov je bila prisotnost vsaj ene od ponavljajočih kromosomskih sprememb: delecija kratkega kraka kromosoma 17, delecija dolgega kraka kromosomov 11 ali 13, ter trisomija kromosoma 12, ki so ključne za napoved poteka bolezni in odločanja glede izbire zdravljenja. Pri nekaterih kromosomskih spremembah (npr. del(17p)), ki so povezane z neugodnim, hitrejšim ali agresivnejšim potekom bolezni ter neodzivnostjo na zdravljenje, je verjetnost za prisotnost mutacij na alelu za p53 večja. Zahtevam je ustrezalo 11 vzorcev od 30 skupnih. Izvedli smo ustrezne prilagoditve pogojev v posameznih stopnjah, to je pri pomnoževanju DNA v reakciji PCR in pri sekvencioniranju. Določili smo optimalne koncentracije in pogoje za uspešno in ponovljivo pomnoževanje posameznih eksonov (4-10) in skupnih eksonov (5+6, 8+9) z uporabo specifičnih nukleotidnih začetnikov. S primerjavo z referenčno sekvenco za gen smo določili spremembe v zaporedju DNA. Z mutacijsko analizo gena *TP53* smo določili nekaj naravnih polimorfizmov v eksonih 4 in 10. Klinični pomen le-teh verjetno ni pomemben oziroma ni znan, ali pa je povezan z benignim kliničnim potekom. V eksonu 7 smo pri enem pacientu določili mutacijo c.742C>T s spremenjenim pomenom v DNA vezavni domeni. Posledica zamenjave aminokisline arginin s triptofanom je neaktivnost proteina p53. Omenjena mutacija na mestu kodona 248 je ena najpogostejših vroče točkovnih (hot spot) mutacij. Klinično je taka sprememba napovedno neugodna. V eksonu 10 smo pri eni pacientki našli mutacijo c.1009C>T. Njena posledica je zamenjava aminokisline ter zmanjšana aktivnost p53.

Postopek mutacijske analize gena *TP53* smo uspešno vpeljali v redno delo laboratorija. Metoda bo pripomogla k celovitejši obravnavi pacientov s KLL, kot v pomoč pri napovedovanju poteka bolezni in pri odločanju glede izbire zdravljenja.

Ključne besede: delecija gena *TP53*, sekvencioniranje po Sangerju, napovedni dejavnik, mutacije v genu *TP53*

ABSTRACT

CLL with *TP53* mutation carries a poor prognosis regardless of the presence of 17p deletion. Thus it is a strong independent prognostic factor of short survival. *TP53* mutation analysis and determination of the deletion on the short arm of the chromosome 17 should be incorporated into the evaluation of patients with CLL before treatment initiation. Current guidelines suggest Sanger sequencing as the method of choice for assessing *TP53* mutations. We analyzed patients' peripheral blood samples (11) who had a CLL cell clone greater than 15% to increase the sensitivity of sequencing. There had to be at least one of the chromosomal abnormalities (del(17p), del(11q), del(13q) and +12) detected by FISH analysis. Some (del(17p)) associate with short overall survival, more aggressive disease progression and resistance to therapy and are therefore crucial in prognosis evaluation. Also the higher incidence of *TP53* mutations is significantly linked to CLL with those chromosomal abnormalities. We increased the sensitivity of sequencing by DNA isolation from mononuclear cells or in CLL from B lymphocytes. For the master's thesis we have used recommendations of International Agency for Research on Cancer. We adjusted PCR conditions for repetitive *TP53* gene amplifying and sequencing within the exons 4-10. Depending on the primers used we amplified each exon 4-10 separately and exons 5+6 and 8+9 together in one PCR reaction. PCR products were analyzed by a sequencer to assess the nucleotide sequences. To determine the changes in nucleotide sequences we compared it with the reference sequence for the gene. We found germline polymorphisms in exons 4 and 10. Clinical impact is unknown or is linked to benign disease course. Patients with those polymorphisms are on watch and wait protocol. We found c.742C>T mutation in the exon 7. The mutation is localized within the central DNA binding domain. The mutation inactivates p53 protein. A codon 248 mutation is one of the most known hot spot mutations and associates with poor prognosis. We also found c.1009C>T mutation in exon 10 that leads to amino acid change and impaired p53 function. We have successfully incorporated the mutation analysis of *TP53* gene into routine laboratory work. The method will provide better patient evaluation, disease progression evaluation and treatment approach assessment.

Key words: *TP53* gene deletion, Sanger sequencing, prognostic factor, *TP53* gene mutation

SEZNAM OKRAJŠAV

AK – aminokislina oziroma aminokislinski ostanek

ATM gen – Ataxia telangiectasia mutated

B₂M – beta2-mikroglobulin

DBD – DNA vezavna domena

DNaza – encim, ki razgrajuje DNA

dNTP – deoksi-nukleotidtrifosfat

Ex – ekson

F primer – smiselni oligonukleotidni začetnik

FC(R) zdravljenje – kombinirano zdravljenje s fludarabinom, ciklofosfamidom (in rituksimabom)

IGHV – variabilni del gena za težko verigo imunoglobulina

FISH – fluorescenčna *in-situ* hibridizacija

KLL – kronična limfatična levkemija

KM – kostni mozeg

LFS – Li-Fraumenijev sindrom

MNC – mononuklearne celice

OS – celokupno preživetje

PBS – fosfatni pufer s soljo

PCR – verižna reakcija s polimerazo

PFS – preživetje do napredovanja bolezni

PK – periferna kri

PRP – s prolinom bogata regija

R primer – protismiselni oligonukleotidni začetnik

Rb gen – gen retinoblastoma

RNaza – encim, ki razgrajuje RNA

SDS-PAGE - poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecilsulfatom

SNP – polimorfizmi

ZON – oligonukleotidni začetnik

1 UVOD

Kronična limfatična levkemija (KLL) je kronična limfoproliferativna bolezen, pri kateri gre za kopičenje zrelih, funkcionalno nekompetentnih limfocitov B monoklonskega izvora. KLL enačimo z limfomom malih zrelih limfocitov B, ki je eden izmed indolentnih ne-Hodgkinovih limfomov. Limfom malih limfocitov (MLL) je nelevkemična oblika KLL z enako tkivno morfologijo in imunofenotipom limfocitov. Značilna je limfadenopatija, odsotnost citopenij in manj kot $5 \times 10^9/L$ limfocitov B v periferni krvi. Diagnozo MLL potrdimo s histološkim pregledom prizadete bezgavke (1, 2, 3).

KLL je najpogostejša levkemija odraslih. Obolevnost moških je 1,7-krat večja kot pri ženskah. Povprečna starost pacientov ob postavitvi diagnoze je 70 let. Študije so pokazale, da je KLL pogostejša pri sorodnikih bolnikov v prvem kolenu. Obstajajo namreč določeni genetski polimorfizmi, ki verjetno predstavljajo večje tveganje za nastanek bolezni (1). Na splošno velja KLL za indolentno bolezen, ki se v povprečju klinično izrazi v desetih do dvajsetih letih po postavitvi diagnoze. Zdravljenje je predpisano ob napredovanju bolezni oziroma šele ob pojavu simptomov. Okoli 30% pacientov se nikoli ne zdravi. Njihova življenjska doba je primerljiva z zdravo populacijo. Najpogostejši vzrok smrti so hude sistemske okužbe. Pri nekaterih pacientih pa bolezen poteka hitro in agresivno. Smrt nastopi v obdobju dveh do treh let po odkritju bolezni. Spet drugi pacienti živijo pet do deset let z relativno benigno začetno fazo bolezni, ki naenkrat napreduje v terminalno fazo; preživetje je nato leto do dve. Spontana klinična regresija bolezni je izjemno redka (2).

1.1 PATOGENEZA IN PATOFIZIOLOGIJA

Molekularna patogeneza KLL je kompleksen, večstopenjski proces namnožitve klona maligno preobraženih zrelih limfocitov B. Maligne celice KLL so večino časa v G_0 fazi celičnega cikla. Manj kot odstotek teh celic se spontano deli. Klonsko se limfociti razraščajo in kopičijo, ker so dolgoživeči. Take celice imajo sposobnost zaobiti proces apoptoze in sicer preko povečanega izražanja proteina *bcl2* in inhibitorjev receptorja smrti Fas ter izgube genov za specifične miRNA (1, 4).

V splošnem naj bi se KLL razvila iz premaligne B-celične proliferativne motnje, ki se imenuje monoklonska B-celična limfocitoza (MBCL). Vzroka za njen pojav ne poznamo. MBCL naj bi bila posledica genskih nepravilnosti, ki nastanejo kot odgovor na antigensko stimulacijo. Tako nastane klon spominskih celic B praviloma s fenotipom KLL. Dodatne

genske spremembe ali spremembe v mikrookolju kostnega mozga so dražljaj B-celičnemu klonu za nadaljnjo maligno preobrazbo. Posledica tega je napredovanje MBCL v KLL. Verjetnost je 1 do 2 odstotka na leto. O MBCL govorimo, kadar zaznamo monoklonske limfocite B v periferni krvi, njihova koncentracija pa ne presega $5 \times 10^9/L$. Ti pacienti nimajo limfadenopatije, organomegalije, citopenij ali simptomov povezanih s KLL. Limfociti pacientov z MBCL s fenotipom KLL izkazujejo iste genske spremembe kot levkemične celice pri KLL (1, 2, 3).

1.2 DIAGNOSTIKA KLL

Ob sumu na KLL naredimo celotno in diferencialno krvno sliko s pregledom razmaza periferne krvi pod mikroskopom in imunofenotipizacijo limfocitov. Za postavitev diagnoze pregled aspirata kostnega mozga ali biopsija bezgavke niso predpisani, prav tako ne citogenetske preiskave za določitev kromosomskih sprememb. Te preiskave so ključne za spremljanje bolezni, določitev njenega poteka in izbiro zdravljenja (2).

1.2.1 Klinična in krvna slika

Na KLL posumimo, ko v periferni krvi ugotovimo absolutno limfocitozo s koncentracijo limfocitov več kot $5 \times 10^9/L$, ki traja vsaj tri zaporedne mesece (5). Večinoma so koncentracije precej višje in dosegajo celo $100 \times 10^9/L$. V primeru tako visokih vrednosti moramo biti pozorni na zaplete, ki so posledica zvečane viskoznosti krvi. Taki zapleti so izjemno redki. Ob postavitvi diagnoze so lahko prisotne blažja nevtropenija, anemija in/ali trombocitopenija (2, 5). Praviloma dlje časa trajajoča limfocitoza izključuje virusne infekcije, ki so tudi lahko vzrok absolutni limfocitozi. Pri KLL lahko maligno spremenjene celice B predstavljajo tudi več kot 90 odstotkov vseh limfocitov. Znižan je delež celic T in naravnih celic ubijalk (NK) (2). V razmazu periferne krvi pod mikroskopom vidimo male zrele limfocite z ozkim robom citoplazme in z gostim jedrom. Jedrca niso vidna. Pri pripravi razmaza nastajajo t.i. Gumprechtove sence (5). Morfološko so celice KLL enake malim zrelim limfocitom periferne krvi zdravih ljudi. Približno 25 % pacientov nima nobenih simptomov, bolezen odkrijemo slučajno ob rutinskem pregledu krvi. Večina pacientov obišče zdravnika zaradi vztrajajočih otečenih bezgavk, ki so neboleče. Manjši delež pacientov izkazuje tako imenovane simptome B, to so: nepojasnjena izguba telesne teže, zmanjšanje teka, vztrajajoča povišana telesna temperatura nad 38°C v odsotnosti infekcij, nočno potenje, splošna utrujenost (2, 5).

1.2.2 Imunofenotip

Imunofenotipizacija s pretočno citometrijo je ključna za postavitev diagnoze KLL. Morfološko normalne levkemične celice so imunofenotipsko, funkcionalno in razvojno nezrele. Glede na stopnje dozorevanja in aktivacije so limfociti KLL ujeti v fazi zorenja ali celične diferenciacije med pre-B in zrelo celico (1). Izražene so tri osnovne imunofenotipske značilnosti, in sicer:

- B-celični antigeni: Izraženi so CD19, CD20 (šibko) in CD23. Delež površinskih imunoglobulinov (Ig) CD20 in CD79b je značilno manjši kot pri normalnih zrelih limfocitih B. Večinoma odsotni ali slabo izraženi sta še molekuli FMC7 in CD22. Lahko opazimo tudi izražanje CD21 in CD24, ki pa nista ključna antigena pri opredelitvi bolezni.
- T-celični antigen: izražanje CD5.
- Nizka raven izražanja membranskih imunoglobulinov (SmIg). Ti so najpogostejše razreda IgM ali IgM in IgD. Na klonalnost levkemičnih celic kaže izražanje le ene vrste lahkih imunoglobulinskih verig, kapa ali lambda, in ne obeh.

Ti označevalci so KLL specifični, delež njihovega izražanja pa se lahko razlikuje. V redkih primerih je bolezen biklonalna, kjer s pretočno citometrijo zaznamo prisotnost dveh različnih levkemičnih klonov limfocitov B (2).

1.3 NAPOVED POTEKA BOLEZNI

1.3.1 Citogenetske in molekularno genetske preiskave

Napovedne vrednosti so opredeljene za naslednje kromosomske spremembe: delecija kratkega kraka kromosoma 17 (del(17p)), delecija dolgega kraka kromosoma 11 (del(11q)), trisomija kromosoma 12 (+12), normalni kariotip in delecija dolgega kraka kromosoma 13 (del(13q)) (2, 3, 6). Poleg napovedne vrednosti ima citogenetika tudi diagnostični pomen, predvsem pri diferencialni diagnostiki limfoma plaščnih celic oziroma izključevanju drugih limfoproliferativnih bolezni (5). Kljub odsotnosti kromosomskih sprememb lahko pri pacientih s KLL določimo spremembe na nivoju gena. Mutacije prizadenejo tumor supresorske gene, onkogene ter gene, ki nosijo zapis za popraviljanje poškodovane DNA, za izrezovanje in zorenje (splicing) RNA, ki uravnavajo celično signaliziranje. Njihovo določanje je uporabno v smislu vpogleda v patobiološko ozadje bolezni ali pa za namene zdravljenja in odkrivanja novih, potencialnih tarč zdravil (3, 7). Nekatere genske spremembe

so pomembne in uporabne pri napovedi poteka bolezni. Glede na zgoraj omenjene spremembe lahko paciente razvrstimo v molekularno citogenetske napovedne skupine (6, 7):

- **S preiskavo fluorescenčna *in-situ* hibridizacija (FISH) v 5-20 odstotkih pacientov zaznamo delecijo gena *ATM*.**

Delecija 11q je povezana z nemutiranim statusom variabilnega dela gena za težko verigo imunoglobulina (*IGHV*), z obsežno limfadenopatijo, napredovalo boleznijo oziroma hitrim potekom bolezni in krajšim časom preživetja, predvsem pri bolnikih mlajših od 55 let. Področje kromosoma 11q vsebuje gen *ATM*, prizadenejo pa ga zlasti atipične delecije manjšega obsega. V primeru izgube ali mutacije tega gena v obeh alelih gre za še slabšo napoved bolezni. Čas preživetja je krajši zaradi celične neodzivnosti na obsevanje in kemoterapijo. Z ustrezno kombinacijo zdravil fludarabin-ciklofosamid-rituksimab (FCR) je uspešnost zdravljenja večja in preživetje daljše. Poleg gena *ATM* so na področju 11q pomembne še mutacije in delecije v genu *BIRC3*. Bolj značilne so za refraktarno KLL po zdravljenju s fludarabinom in manj za KLL ob postavitvi diagnoze. Pacienti s takimi spremembami so uvrščeni v napovedno skupino z visokim tveganjem (6, 8).

- **Trisomijo 12 in normalen kariotip povezujemo z majhnim do vmesnim tveganjem.**

Pojav trisomije (+12) razumemo kot prvo spremembo in vodilno mutacijo v razvoju KLL. Odgovorna naj bi bila za nastanek sekundarnih kromosomskih aberacij ali mutacij v genih, kot sta na primer *NOTCH1* in *TP53*. Visoka frekvenca mutacij v *NOTCH1* je povezana s slabo prognozo, nemutiranim statusom *IGHV* in / ali izražanjem ZAP70, izražanjem CD38 ter CD49d (6). Za KLL s +12 je značilna atipična morfologija limfocitov in atipičen imunofenotip (9). Spremenjena je aktivnost genov vzdolž celotnega kromosoma, kot so *P27*, *CDK4*, *HIP1R*, *MYF6*, *MDM2*. Bistvena posledica trisomije 12 je amplifikacija in povečana ekspresija *MDM2*, ki vodi v represijo transkripcijske aktivnosti samega *TP53* in številnih od p53 odvisnih genov in miRNA (miR-34a efektor p53). Zmanjšano aktivnost miR-34a tako povezujemo z agresivnejšim potekom KLL (6). Protein *MDM2* je obenem tudi ubikvitin-protein ligaza, ki sproži razgradnjo proteinov Rb in p53 (10).

- **Prisotnost izolirane *del(13)(q14)* povezujemo z zelo majhnim tveganjem.**

Pojavlja se pri približno 55 odstotkih pacientov. Pogostejše so delecije znotraj regije 13q14.3, telomerno od gena za retinoblastom (*Rb*). Te delecije so pogosto povezane z inaktivacijo omenjenega gena. Neizražanje gena *Rb* je značilno tako za KLL ob postavitvi diagnoze kot ob

napredovali bolezni. Kadar gre za izolirano monoalelno ali bialelno delecijo govorimo o dobri prognozi. Bialelne delecije ne vključujejo gena *Rb* in so nekoliko bolj neugodne od monoalelnih. V kritičnem področju delecije so zapisi za gen *DLEU7* in miR-15a ter miR-16-1, ki izkazujejo tumor supresorsko aktivnost. MiR-15a in miR-16-1 naj bi z neposredno interakcijo z *bcl-2* povzročile njegovo povečano izražanje. *Bcl-2* je med protoonkogeni edinstven primer supresorja programirane celične smrti ali apoptoze. Normalne celice B (CD5-) ne izražajo proteina *bcl-2*. Izraža ga samo klon CD5+ celic KLL v odvisnosti od mikrookolja. Izražanje je močnejše pri celicah KLL bezgavk kot pri celicah KLL iz kostnega mozga ali periferne krvi. Njegovo povečano izražanje se kaže v podaljšanem preživetju celic. Pri KLL z del(13q) sta torej miR-15a in miR-16-1 odsotni, kar prispeva k boljšemu poteku bolezni. Gre pa za eno prvih sprememb v razvoju KLL (6, 11).

- **Del(17p)** kot močan napovedni kazalec za slab potek bolezni pomeni s hkratno prisotno del(11q) še slabšo napoved bolezni.

Monoalelne spremembe v genu *TP53* ne prizadenejo popolnoma funkcije p53. Ob tem so pogoste spremljajoče mutacije v genu *ATM* (12). Del(17p) povezujemo z atipičnim imunofenotipom – povečano izraznostjo CD20, FMC7, CD79b in površinskih Ig. Značilno je povečano izražanje CD38 in ZAP-70 ter nemutiran status *IGHV* (6, 13).

Začetne spremembe v razvoju KLL so heterozigotna del(13q), trisomija 12 in mutacije v genu *NOTCH1*. Kasneje, kot sekundarne spremembe, se najprej kot subkloni pojavljajo mutacije v *TP53*, *ATM* ter homozigotna del(13q). Del(17p) in del(11q) se sicer lahko pojavljata tudi že v začetni fazi bolezni. Kemoterapija ali naraven potek bolezni pa povzročita klonsko razraščanje tistih subklonov celic, ki nosijo spremembe v *TP53*. Sčasoma se pokaže dominanca teh sprememb in njihova prevlada med razvojem bolezni (6).

1.3.2 MiRNA

Vedno več raziskav miRNA je usmerjenih v študij nastanka raka. To so kratke nekodirajoče molekule RNA, ki uravnavajo ekspresijo genov po njihovem prepisu (post-transkripcijska modulacija). Ekspresija miRNA je uravnavana s tumor supresorskimi geni ali pa je podvržena epigenetskim modifikacijam. MiRNA lahko delujejo kot tumor supresorji ali kot onkogeni. Profil izraznosti miRNA je specifičen za posamezno stopnjo bolezni in omogoča ločevanje normalnih celic B od malignih. Uporabne so kot markerji za postavitev diagnoze KLL, napovedovanje poteka bolezni in kot kazalec neodzivnosti na zdravljenje. MiRNA z največjo pojavnostjo sprememb v izražanju pri KLL so miR-15/16, miR-34b/c, miR-29, miR-181b,

miR-17/92, miR-150 in miR-155. Večje izražanje miR-21 in miR-155 povezujejo z večjo umrljivostjo. MiR-181b je uporaben kazalec napredovanja bolezni. Povečano izražanje miR-148a, miR-222 in miR-21 povezujejo z neodzivnostjo na zdravljenje, zmanjšano izražanje miR-34a pa z rezistentno obliko bolezni, kljub odsotnosti sprememb v genu *TP53*. Povečano izražanje p53 pri pacientih z delecijo 13q povezujejo s transaktivacijo miR-34b/c. Posledica je zmanjšano izražanje molekule ZAP-70 in ugodnejša prognoza. Pri pacientih z del(11q) pa zaznamo zmanjšano izražanje miR-34b/c in povečano izraznost ZAP-70. Prognoza je zato pričakovano neugodna. Pri pacientih s prisotnimi mutacijami v *TP53* in / ali del(17p) ter pri pacientih z refraktarno obliko bolezni po zdravljenju s fludarabinom in odsotnostjo sprememb v *TP53* prav tako zaznamo zmanjšano izražanje miR-34a (11, 14).

1.3.3 Uvrstitev v stadij oziroma napovedno skupino

Zaradi potreb napovedovanja poteka bolezni in odločanj o izbiri zdravljenja, predvsem pa za oceno razširjenosti bolezni International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) priporoča modificirano razvrstitev v napovedne skupine s pričakovanim kliničnim potekom bolezni (1, 7). Tako imenovani razvrstitvi po Binet-u in Rai-u temeljita na kliničnem pregledu in enostavnih laboratorijskih kazalcih (5). Sama določitev stadija bolezni ni zadosten napovedni kazalec. Pri napovedovanju poteka bolezni se upoštevajo še: obsežnost limfocitoze, morfologija limfocitov v venski krvi (relativni delež prolimfocitov), kariotip, fenotipski profil limfocitov B, starost, spol in raven serumskih imunoglobulinov. V kliničnih raziskavah se ugotavlja pomen novejših napovednih kazalcev za odločanje glede zdravljenja (7).

1.3.4 Drugi prognostični kazalci

Podvojitveni čas limfocitov (LDT – lymphocyte doubling time) ustreza številu mesecev, ki je potrebno za podvojitev absolutnega števila limfocitov. Ta vrednost poda oceno dinamike oziroma napredovanja bolezni. LDT pod 12 mesecev pri nezdravljenih pacientih napoveduje napredujočo bolezen (7, 15).

Vzorec limfocitne infiltracije pri biopsiji kostnega mozga velja za samostojen in neodvisen napovedni kazalec. In sicer, difuzni vzorec infiltracije napoveduje napredovalo bolezen, nodularna in intersticijska infiltracija pa bolj indolentno obliko bolezni (7).

Raven beta-2 mikroglobulina (B₂M) korelira s stadijem bolezni in razširjenostjo tumorja. Povišane vrednosti so povezane s slabšim potekom bolezni (7).

Variabilni del gena za težko verigo imunoglobulinov (*IGHV*) nosi zapis za protitelesa v imunskem odzivu. Pacienti s hipermutiranim *IGHV* imajo indolenten potek bolezni, njihovo preživetje je daljše. Nemutiran status v variabilnem delu gena za težko verigo imunoglobulinov (mutacijski status *IGHV*) je kazalec krajšega časa preživetja (OS) in večjega tveganja za relaps oziroma ponoven izbruh bolezni po končanem zdravljenju. Z reverzno transkriptazno reakcijo PCR (RT-PCR) in direktnim sekvencioniranjem se s primerjavo z referenčno sekvenco za VH regijo določi delež mutiranosti gena. Če se nukleotidno zaporedje z zarodno vrsto razlikuje v več kot 2%, je gen mutiran. (13, 16).

Izražanje CD38 določimo s pretočno citometrijo in je povezana z nemutiranim statusom *IGHV*. Neodvisno od tega napoveduje slabši potek bolezni (7, 14).

ZAP-70 (zeta chain associated protein 70) je tirozin kinaza. Normalno ga izražajo naravne celice ubijalke (NK) in limfociti T, limfociti B pa ne. Potreben je za normalno signaliziranje T-celičnega receptorja (TCR). Povišane vrednosti predstavljajo slabo napoved bolezni. Prav tako je abnormalno izražanje ZAP-70 v celicah KLL značilno povezano z nemutiranim statusom *IGHV* in slabo napovedjo poteka bolezni. Nemutiran status *IGHV* povezujejo s krajšimi telomerami in s povečano telomerazno aktivnostjo v celicah KLL (7, 12, 13, 14).

Aktivnost serumske timidin kinaze (TK) je povezana s hitro napredujočo boleznijo in višjim stadijem. Encim je neaktiven v nedeležih se celicah (15).

1.4 Protein p53

1.4.1 Gen *TP53*

Tumor supresor gen *TP53*, ki nosi zapis za protein p53, se pri človeku nahaja na kratkem kraku kromosoma 17, natančneje na področju 17p13.1. Velikost gena je 20 kb. Ekson 1 je nekodirajoč. Prvi intron je izredno velik – dolg 10 kb. Kodirajoče zaporedje vsebuje pet regij, ki so med vretenčarji evolucijsko ohranjene. To so predvsem regije v eksonih 2, 5, 6, 7 in 8. DNA vezavno domeno (DBD) predstavljajo eksoni od 5 do 9 (17). Inaktivacija tega gena kot posledica delecije in/ali točkovne mutacije je povezana z mnogimi malignimi spremembami. Več kot 99% mutacij je razpršenih med 4. in 11. eksonom. Največkrat spremenjena mesta proteina (vroče točke ali »hot spots«) so AK 248 in 273, pri čemer je prizadeta interakcija z DNA, ter AK 175, 245, 249 in 282, kjer se spremeni konformacija proteina p53 (18).

1.4.2 Protein p53

Tumorski protein p53 poznamo tudi pod imeni celični tumorski antigen p53, fosfoprotein p53, tumor supresor p53, antigen NY-CO-13. Je protein, ki ga pri človeku kodira gen *TP53*. Ime p53 se nanaša na maso proteina (53 kDa) določeno z elektroforezo (SDS-PAGE). Dejanska molska masa p53 je samo 43,7 kDa. Razlika gre na račun visokega deleža AK prolina, ki upočasni potovanje proteina na SDS-PAGE. P53 povezuje številne signalizacijske poti nadzora in uravnavanja celičnega cikla in vzdrževanja integritete genoma. Deluje kot tumor supresor, torej preprečuje nastanek raka. Zaradi svoje vloge ga opisujejo kot varuha genoma. S svojo funkcijo skrbi za genomsko stabilnost in preprečuje nastanek mutacij. Vezava p53 na specifična DNA zaporedja je ključna za biološko aktivnost samega proteina. P53 aktivira transkripcijo številnih genov, ki so vključeni v kontrolo/nadzor celičnega cikla, ki nadzorujejo proces apoptoze ali programirane celične smrti ter številne gene, ki nosijo zapis za proteine, ki so vključeni v presnovo reaktivnih kisikovih spojin (ROS). Nekatere študije predpostavljajo, da p53 deluje ne le kot aktivator ampak tudi kot represor transkripcije določenih genov. Mehanizmi represije niso dobro poznani in njihova vloga v razvoju raka je nejasna (17).

1.4.3 Struktura proteina

P53 je homotetramerni transkripcijski faktor (393 AK). Protein je organiziran v domene, ki so med seboj ločene z neorganiziranimi povezovalnimi (linker) regijami. Transaktivacijsko domeno (TAD) amino-terminalnega konca proteina lahko naprej razdelimo na poddomeni TAD1 in TAD2, ki jima sledi s prolini bogata regija PRP (64-92 AK) pomembna za apoptotično aktivnost. Aktivacijsko domeno 1 (TAD1) predstavljajo AK ostanki od 1 do 42. Ti so odgovorni za vezavo in s tem aktivacijo transkripcijskih faktorjev. AK 43-63 predstavljajo aktivacijsko domeno 2 (TAD2), ki je potrebna za apoptotično aktivnost proteina. V regijah TAD1 in TAD2 so identificirali tandemsko zaporedje devetih AK. Te domene uravnavajo interakcije p53 s koaktivatorji, z regulatornim proteinom MDM2 (protein z ubikvitin ligazno aktivnostjo) in replikacijskim proteinom A (RPA). Regulatorno domeno na karboksilnem koncu predstavljajo AK ostanki 356-393. Centralno DNA vezavno domeno (DBD) predstavljajo AK ostanki 102-292. DBD vsebuje tetraedrično koordiniran cinkov ion med Cys176, His179, Cys238 in Cys242. DBD humanega proteina p53 je termodinamsko intrinzično slabo stabilizirana. Razpolovni čas razvijanja pri telesni temperaturi je devet minut. Nizka termodinamska in kinetična stabilnost omogočata hitro prehajanje proteina iz zvitega v razvito stanje in nazaj. To predstavlja dodatno regulacijo funkcionalno aktivnega celičnega proteina. Nizka stabilnost p53 je osnova za strukturno plastičnost, s tem pa je

pospešena vezava z različnimi partnerskimi proteini. Hkrati je zaradi tega na tem mestu protein bolj dovzeten za mutacije. Tetramer p53 po principu kooperativnosti veže tarčno specifično dvoveržno DNA. AK ostanki 316-325 predstavljajo signalizacijsko domeno (nuclear localization signaling domain). Oligomerizacijsko stanje p53 je uravnavano s tetramerizacijsko domeno, ki jo pri človeku predstavljajo AK ostanki 325-355. Oligomerizacija proteina je ključna za biološko aktivnost proteina. Mutanti p53, ki niso tetrameri, niso sposobni zavreti rasti rakavih celic. Tvorba tetramera poteka preko dimerne intermediata. In sicer gre najprej za kotranslacijsko formacijo dimerov na polisomu, ki ji sledi dimerizacija dimerov. Nastane trdno pakiran tetramer z visoko termodinamsko stabilizacijo. Protein je sicer specifično podvržen procesu ubikvitinacije in proteosomske razgradnje (17).

1.4.4 Mutacije v genu *TP53*

Nizke koncentracije proteina p53 povezujejo z normalno funkcionalnimi celicami, visoke vrednosti pa so prisotne v mnogih tumorskih celicah. Na podlagi študij različnih tumorjev, kjer so našli mutacije v genu *TP53*, in pojavnosti teh mutacij, verjamejo da je *TP53* eden najpogostejše mutiranih genov pri človeku. Mutacije v *TP53* so močan, od drugih kromosomskih in/ali genskih sprememb neodvisen napovedni dejavnik krajšega preživetja. Glede na tip tumorja ločimo različen spekter mutacij v *TP53* (»p53 fingerprint«). Posledice na proteinu p53 so odvisne od vrste mutacij. Določanje funkcionalnega statusa p53 se je izkazalo za izjemno pomembnega. Lahko so namreč prisotne spremembe v *TP53* (kot posledica delecije 17p in / ali mutacij v genu *TP53*) z neprizadeto funkcijo p53, lahko pa je gen *TP53* nespremenjen s prisotnimi spremembami v funkciji proteina (kot na primer posledica post-translacijske modifikacije, utišanja gena ali »gene silencing«) (14, 19). Funkcija proteina p53 je lahko prizadeta zaradi somatskih ali prirojenih mutacij v genu *TP53*. Obstajajo pa tudi drugi mehanizmi, neodvisni od *TP53*, ki inaktivirajo protein. P53 vezavni protein MDM2 se prekomerno izraža kot posledica amplifikacije ustreznega gena na 12q in takrat deluje kot onkogen. To pomeni, da s svojo vezavo maskira transaktivacijsko domeno in prepreči aktivacijo transkripcije p53. S tem sproži oziroma pospeši ubikvitinacijo in razgradnjo proteina v proteasomu. Protein MDM2 z vezavo na p53 in transportom iz jedra ali z reverzibilno ubikvitinacijo uravnava njegovo aktivnost. Fosforilacija p53 s protein kinazami (družina proteinov MAPK, ATM) je pogoj za aktivacijo proteina. Hkrati pa je s tem onemogočena vezava MDM2 (20).

Prevladujoča oblika somatskih mutacij v *TP53* so drugačnosmiselne točkovne (»missense«) mutacije znotraj centralne domene kodirajoče regije za p53, ki vodijo v zamenjavo

aminokisline. Amino in karboksilni konec proteina sta neobčutljiva na substitucije, zato je DBD bolj dovzetna za pojav mutacij. Predvsem so za spremembe v AK zaporedju dovzetne sekundarne strukture in evolucijsko ohranjene regije (IV in V) znotraj DBD, ker so prostorsko bližje DNA. Najbolj dovzetni del DBD pa so AK-ostanki, ki vežejo Zn, in tisti, ki so v neposrednem stiku z DNA. Posledica teh mutacij je spremenjena sposobnost vezave proteina p53 na specifična DNA zaporedja, ki jih funkcionalno normalen protein prepozna. Nekatere mutacije neposredno prizadenejo sekvenčno specifično vezavo na DNA, druge pa povzročijo spremenjeno zvitje proteina p53. S tem je preprečeno prepisovanje genov, ki jih p53 uravnava (21, 22). Prirojene (germ-line) mutacije v genu *TP53* so opazili pri ljudeh s tako imenovanim Li-Fraumeni-jevim sindromom (LFS). Dedovanje je avtosomno dominantno (21). Prizadetost z omenjenim sindromom LFS povezujejo z večjim tveganjem za razvoj številnih tumorjev – sarkomi mehkega tkiva, osteosarkomom, možganskimi tumorji, rakom dojk in levkemijami. Do dve tretjini pacientov s tem sindromom ima mutacije gena *TP53* v centralni jedrni domeni kodirajoče regije. Nekateri imajo mutiran gen *hCHK2*, ki fosforilira p53 in nadzira celični odziv na poškodbe DNA (20).

Pomen mutacij v *TP53* za napovedovanje poteka bolezni je pri KLL tako velik, da se smiselnost mutacijske analize gena *TP53* proučuje tudi pri drugih hematoloških boleznih (akutna mieloična levkemija ali AML, mielodisplastični sindromi ali MDS). Pojavnost mutacij v *TP53* je večja pri sekundarni bolezni kot pri bolezni *de novo*. Pojavljajo se v kombinaciji s kompleksnejšimi kromosomskimi preureditvami in pri starejših pacientih. Tako pri mieloičnih kot limfatičnih novotvorbah spremembe v *TP53* vplivajo na uspešnost zdravljenja. Zdravila, katerih tarča je DNA, lahko zaradi močnega selekcijskega učinka celo uspešneje delujejo pri mutiranem klonu.

1.4.5 *TP53* in KLL

Med številnimi mutacijami pri klonu KLL so spremembe v *TP53* edini uspešen in statistično značilen molekularni napovedni kazalec. Vpliv inaktivacije gena *TP53* na razvoj in napredovanje raka je znan že nekaj let. Rutinska analiza gena *TP53* za napovedovanje poteka bolezni in v pomoč pri izbiri in načrtovanju zdravljenja pa se izvaja le za nekaj tumorjev. Razlog je predvsem v tehnični zahtevnosti zaradi heterogenosti tumorjev in kontaminacije z netumorskimi celicami. Relativno dolgo preživetje, uspešnost ponavljajočih terapij in lahka dostopnost vzorca za analizo z relativno visokim deležem tumorskih celic pa pri KLL omogoča študij izvora in razvoja bolezni na molekularni ravni. Prisotnost mutacij in / ali delecij gena *TP53* vpliva na čas do napredovanja bolezni (PFS), na odziv in uspešnost

zdravljenja in celokupno preživetje (OS). Zelo omejene učinkovite možnosti zdravljenja pacientov z mutacijami v *TP53* so dodaten razlog za smiselnost vpeljave metode za mutacijsko analizo tega gena v klinično hematologijo. Pacienti s spremembami v *TP53* so ciljna skupina za intervencijsko zdravljenje in so zanimivi za testiranje poskusnih zdravil (23). Z interfazno fluorescenčno *in-situ* hibridizacijo (FISH) so opredelili paciente s prisotno del(17p13), kot skupino z značilno krajšim OS v primerjavi s pacienti z normalnim kariotipom in drugimi kromosomskimi spremembami, kot so: del(11q), +12, del(13q). Delecija gena *TP53* (del(17p13)) je pomemben neodvisni dejavnik tveganja. Povezana je z napredovalo, aktivno in hitro oziroma agresivno potekajočo obliko KLL. Napoveduje neodzivnost na standardne postopke zdravljenja. Ugotavljanje del(17p) s standardno FISH je relativno enostavno in občutljivo. Izvedba FISH pa hkrati poda še informacije o drugih napovedno pomembnih kromosomskih spremembah. Približno 80 odstotkov bolnikov s prisotno del(17p13) ima prisotne še mutacije na homolognem alelu. Mutacijska analiza *TP53* je bolj zapletena. Kljub temu pa ji pripisujejo vedno večjo pomembnost, saj se mutacije tega gena pojavljajo tudi kot samostojna sprememba, torej v odsotnosti del(17p). Prisotnost mutacije v *TP53* kot samostojne spremembe ali v kombinaciji z del(17p) na drugem alelu je torej povezana z neugodnim potekom bolezni – napredovalim kliničnim stadijem, hitrim napredovanjem bolezni, kemorezistenco in krajšim preživetjem. Ob postavitvi diagnoze KLL ali pred začetkom zdravljenja ima le manjši delež pacientov (5-15 odstotkov) prisotno okvaro v *TP53*. Pojavnost tekom napredovanja bolezni narašča (25-40 odstotkov tistih z napredovalo boleznijo). Za vsako posamezno fazo bolezni ločimo značilen mutacijski profil. V fazi transformacije bolezni v bolj agresivno prolimfocitno levkemijo ali difuzni visokocelični B limfom (Richterjeva transformacija) ima vsak drugi pacient spremembo v *TP53*. Večjo pojavnost mutacij v *TP53* povezujejo z zdravljenjem s fludarabinom ali z analogi purinskih baz (12, 19, 23). Napoved poteka bolezni je odvisna od velikosti mutiranega levkemičnega klona, tipa mutacije, ter vpliva na funkcijo mutiranega proteina. Govorimo o prognostični heterogenosti (19). Klasičen vzorec mutacij, ki se pojavlja, je inaktivacija *TP53* kot posledica heterozigotnih drugačnosmiselnih (missense) mutacij. Te predstavljajo 75 odstotkov vseh mutacij. Spremljajoča izguba alela je redkejša. Ta fenomen razlagajo z dominantnim negativnim fenotipom drugačnosmiselnih mutacij s pridobitvijo funkcije (23). Posledica letih je hujša kot pri deleciji gena *TP53* (12). Drugačnosmiselne mutacije znotraj motivov DNA vezavne domene so povezane s še krajšim časom do začetka zdravljenja in krajšim OS v primerjavi z ostalimi vrstami mutacij. Brezsmiselne (nonsense ali truncating) mutacije so značilne za področje gena *TP53* izven DNA vezavne domene in so pogostejše pri pacientih z

del(17p) na drugem alelu. Takšna sprememba je značilna za paciente z Li-Fraumeni-jevim sindromom. Pojavnost tako imenovanih »hot spot« mutacij je v primerjavi z drugimi raki redka. Z napredovanjem bolezni se pojavnost le-teh večja. Ob napredovanju bolezni ali obliki bolezni, ki je kemorezistentna, prevladujejo brezsmiselne (nonsense) mutacije, mikrolelecije in homozigotne mutacije. Mikrolelecije so bolj značilne za napredovalo bolezen, nesmiselne mutacije pa za paciente, ki so neodzivni na zdravljenje. Vzrok za neodzivnost na zdravljenje je verjetno izguba funkcije p53. Tranzicije na CpG otočkih se pogosteje pojavljajo ob postavitvi diagnoze in ob napredovanju bolezni, manj pogoste so pri kemorezistentni KLL (19). Poleg del(17p) in mutacij v *TP53* na napredovanje bolezni in OS vplivajo še mutacije v kinaznem genu *ATM*. S FISH se sicer rutinsko določa delecija gena *ATM*, poznana kot del(11q), medtem ko so mutacije določa redko, saj je gen izredno velik. Monoalelne spremembe v *TP53* pogosto spremlja delecija gena *ATM* (12, 23). Mutacije v *TP53* pripisujejo pri nezdravljeni KLL spontanemu mutagenemu procesu, medtem ko je zdravljenje gonilni eksogeni mutageni dejavnik in vzrok za večjo pojavnost mutacij v kasnejših stadijih bolezni. Po selekcijski hipotezi s specifičnim zdravljenjem izzovemo ekspanzijo oziroma razrast klonov celic KLL s prisotno del(17p) in/ali mutacijami v genu *TP53* (12, 23, 24). Napovedni pomen omenjenih sprememb ni enak za paciente, ki predhodno niso bili zdravljeni ali jim je bila diagnoza KLL na novo postavljena, in tiste ob ponovnem pojavu bolezni. Zato potrebujemo specifične označevalce, ki bi ustrezno in zanesljivo napovedali klinični potek bolezni (23).

Priporočena je tako mutacijska analiza kot določanje del(17p) pred začetkom zdravljenja KLL (12, 23). Za mutacijsko analizo se uporabljajo številne metode. Smernice trenutno predpisujejo sekvencioniranje po Sanger-ju. Je relativno enostavna metoda in dostopna v večini laboratorijev. Tehnološki napredek napoveduje uvedbo moderne genomske tehnologije – DNA mikromrež in naslednje generacije sekvencioniranja (NGS) v klinično prakso. Največ obeta predvsem uporaba NGS. NGS ali masivno paralelno sekvencioniranje je tehnologija hkratnega branja tisoč do bilijon sekvenc. DNA molekule v zmesi so analizirane ločeno. Omogočena je analiza le posameznih, tarčnih genov ali celotnih eksonov in celotnega genoma. Za samo detekcijo je še vedno potrebno pomnoževanje DNA. Razvoj gre v smeri detekcije na nivoju ene same molekule DNA. S tem bi se izognili artefaktom, ki so posledica napak encimov pri pomnoževanju v verižni reakciji s polimerazo (PCR). Moderna tehnologija hkrati omogoča še detekcijo sprememb na nivoju subklonov, ker je bolj občutljiva kot sekvencioniranje po Sanger-ju (23, 24).

1.4.6 Zdravljenje KLL

Kljub mnogim znanim načinom zdravljenja ostaja KLL neozdravljiva bolezen. Osnovni protokol oskrbe pacientov z novoodkrita KLL, ki ne kažejo simptomov, je »watch and wait«, kar pomeni, da se pacienta redno spremlja v hematološki ambulanti. Ne glede na stadij se vedno lahko odločimo zgolj za sledenje bolezni brez aktivnega zdravljenja. Približno polovica obolelih s KLL nikoli ne potrebuje zdravljenja. Zdravimo z alkilirajočimi citostatiki in analogi nukleozidov v kombinaciji z imunoterapijo in obsevanjem. Z zdravljenjem skušamo podaljšati obdobja bolezni v remisiji in podaljšanje OS (6). Zdravljenje KLL v obliki monoterapije je praviloma primerno samo za starejše bolnike, ki imajo pridružene kronične bolezni. Obstajajo standardne sheme kombiniranega citostatičnega zdravljenja. Izbira ustreznega zdravljenja in učinkovitost le-tega je odvisna od zdravstvenega stanja pacienta in posameznih spremljajočih molekularno genetskih sprememb. Zdravljenje prve izbire je največkrat kombinacija fludarabina in ciklofosfamida (FC). Kemoimunoterapija (kombinirano zdravljenje s citostatiki in z monoklonskimi protitelesi) prve izbire je kombinacija fludarabina, ciklofosfamida in rituksimaba (FCR). Za enako učinkovito se je izkazalo zdravljenje s FCR tudi kot druga izbira. Zdravljenje z alogenično presaditvijo krvotvornih matičnih celic (HSCT) naj bi bilo po priporočilih Evropskega združenja za presaditev kostnega mozga (EBMT) smiselno pri neugodnih bolezenskih značilnostih, kot so: neodzivnost na zdravljenje z nukleozidnimi analogi purinov ali zgodnja ponovitev bolezni (znotraj 12 mesecev); relaps ali ponovitev bolezni (znotraj 24 mesecev) po kombiniranem zdravljenju, ki vključuje nukleozidne analoge purinov ali po zdravljenju z avtologno HSCT; mutacije v genu *TP53* / delecije 17p, ko je potrebno uvesti zdravljenje (5). Pacienti s spremembami v *TP53* in / ali del(17p) so praviloma odporni na standardno/ konvencionalno kemoimunoterapijo s fludarabinom. Njihovo OS je približno tri leta (23). Opredelitev citogenetskih in molekularno-genetskih nepravilnosti KLL ima velik pomen pri izbiri začetnega zdravljenja kot tudi pri načrtovanju zdravljenja v celoti. Prav za namene odločanja glede izbire ustreznega zdravljenja je smiselna uvedba mutacijske analize *TP53* v rutinsko delo oziroma klinično prakso. Zlasti mlajši pacienti z mutacijami in delecijami *TP53* so ciljna skupina tudi za alogeno HSCT (1, 23).

Rituksimab je protitelo (anti-CD20) proti aktiviranemu, glikoziliranemu fosfoproteinu CD20, ki ga na svoji površini izražajo zrele celice B. Vloga proteina še ni poznana. Verjetno deluje kot kalcijev kanalček. Rituksimab kot monoterapija ni tako učinkovit kot v kombinaciji, razen v večjih odmerkih. Rituksimab zato vedno uporabljamo v sklopu kombiniranega citostatičnega zdravljenja. Ofatumumab je humanizirano protitelo usmerjeno proti

specifičnemu epitopu na CD20. Učinkovitejše je predvsem na celicah, kjer je izražanje CD20 šibkejše. FDA in EMA sta ofatumumab potrdili kot monoterapijo pri pacientih, kjer je bilo zdravljenje s fludarabinom in alemtuzumabom neuspešno. Zdravilo alemtuzumab, rekombinantno humanizirano monoklonsko protitelo proti antigenu CD52, je zdravilo prve izbire pri pacientih z neugodnimi citogenetskimi značilnostmi (delecije 11q, delecije 17p / mutacije v *TP53*) (1). Z njim zdravimo bolnike, kjer zdravljenje s fludarabinom ni učinkovito ter bolnike z del(17p), katerih preživetje je najkrajše. Zdravljenje z alemtuzumabom zaradi hudih neželenih pojavov in pogostih okužb potrebuje skrben nadzor in dodatno preventivno dajanje protimikrobnih zdravil (4). Potekajo obširna klinična testiranja različnih kombinacij zdravil (flavopiridol, lenalidomid, alemtuzumab / kortikosteroidi, rituksimab / kortikosteroidi). Veliko obljublja razni inhibitorji ključnih poti v patogenezi celic B (6). Poti signaliziranja BCR receptorja imajo pomembno vlogo v preživetju celic KLL. Inhibitorji različnih tirozin kinaz (Bruton ali BTK, ZAP-70, PI3K) so zato potencialna nova zdravila, ki so že na tržišču. Mehanizem delovanja je indukcija apoptoze celic KLL (1). Podaljšano obdobje z limfocitozo kot posledica zdravljenja z ibrutinibom (inhibitor Bruton kinaze) ne povečuje tveganja za napredovanje bolezni. V primeru prekinitve terapije pa je tveganje za agresiven potek bolezni in pojav del(17p) in / ali kompleksnih citogenetskih in molekularno-genetskih preureditev občutno večje (25).

2 NAMEN IN CILJI

Namen magistrske naloge je vpeljava metode za določanje mutacij v eksonih 4 do 10 gena *TP53* v rutinsko diagnostično obravnavo pri bolnikih s kronično limfatično levkemijo (KLL). Namenjena je kot dodatno orodje za napovedovanja poteka bolezni in kot pomoč pri izbiri zdravljenja bolnikov z napredujočo obliko KLL. Naš cilj je ugotoviti prisotnost mutacij v genu *TP53* pri najmanj enem pacientu.

Kot osnova in izhodišče za eksperimentalno delo ter vpeljavo protokola bo služilo priporočilo mednarodne agencije za raziskave raka (International Agency for Research on Cancer – IARC) (26). V njem so navedeni: sestava reakcijske zmesi za verižno reakcijo s polimerazo (PCR), pogoji izvedbe reakcije PCR, sestava zmesi za sekvenčno reakcijo in pogoji sekvenčne reakcije za ugotavljanje mutacij v genu *TP53*. Po potrebi bomo izvedli prilagoditve protokola glede na: koncentracijo izolirane DNA iz vzorcev krvi bolnikov s KLL, koncentracijo začetnih oligonukleotidov ter temperaturne in časovne profile reakcije PCR. Optimizacijo pogojev postopka določanja mutacij v genu *TP53* bomo izvedli na izbranih vzorcih bolnikov s KLL tako z normalnim kariotipom kot s prisotnimi genskimi spremembami: trisomijo kromosoma 12, del(13q), del(11q) in del(17p). Pri slednjih je verjetnost za prisotnost mutacij na alelu za *TP53* večja. Za izbiro vzorca bo ključna tudi velikost klona celic s KLL. Klon limfocitov B večji od 15 odstotkov naj bi zadoščal za doseg ustreznosti občutljivosti sekvencioniranja. Vse ostale postopke in metode bomo izvajali po standardnih operativnih postopkih Specializiranega hematološkega laboratorija.

Analizirali bomo nukleotidna zaporedja v eksonih 4 do 10 gena *TP53* (področje 17p13.1). Po uspešni optimizaciji metode bomo dobljene rezultate obdelali in analizirali s pomočjo podatkovnih baz in računalniških programov – Blast, Ensembl, IARC ter Applied Biosystems Variant ReporterTM Software (Version 1.1) .

3 BOLNIKI, METODE IN MATERIALI

3.1 PREISKOVANCI

Za vpeljavo metode za mutacijsko analizo gena *TP53* smo uporabili vzorce periferne krvi (PK) in/ali kostnega mozga (KM) pacientov s KLL, ki so bili v obdobju od marca 2014 do junija 2014 na prvem oziroma kontrolnem pregledu v hematološki ambulanti in odposlani na redno diagnostično obravnavo. Pri vseh bolnikih je bila diagnoza KLL postavljena z imunofenotipizacijo limfocitov s pomočjo pretočne citometrije. Značilen imunofenotip limfocitov KLL je: CD19+, CD20(š)+, CD23+, CD5+, FMC7-, CD22-. V omenjenem obdobju smo uspeli zbrati skupno 30 vzorcev PK (29) oziroma KM (1). Vse vzorce smo odvzeli z antikoagulantom EDTA, razen enega. Šlo je za vzorec za citogenetske preiskave, ki se odvzame z antikoagulantom heparin. Preveriti smo želeli vpliv drugega antikoagulant na uspešnost pomnoževanja v (sekvenčni) reakciji PCR. Po vpeljavi postopka smo v mutacijsko analizo gena *TP53* vključili le 11 vzorcev (*Tabela I*) PK (6) oziroma KM (5). Za napovedovanje poteka bolezni je bila pri vseh teh bolnikih opravljena preiskava FISH, s katero se določajo naslednje kromosomske spremembe: trisomija kromosoma 12, del(11q), del(13q), del(17p) ter preureditve gena *IGH*. Tako rezultati imunofenotipizacije kot FISH analize so bili za vsakega od testiranih bolnikov izvedeni kot del rutinske obravnave ob postavitvi diagnoze oziroma pred začetkom zdravljenja. Ker se mutacije v genu *TP53* pogosteje pojavljajo v kombinaciji z delecijo enega alela na kratkem kraku kromosoma 17, smo morebitne paciente z mutacijo v tem genu iskali v skupini s predhodno določeno del(17p). Dodaten kriterij za vključitev vzorca v analizo je bil klon limfocitov B večji od 15%. Ta delež naj bi zadoščal za ustrezno občutljivost sekvencioniranja.

Vzorcem smo določili delovno številko. S tem smo zagotovili sledljivost vzorca od trenutka odvzema pa do izdaje izvida, kasneje pa tudi njegovo arhiviranje za morebitne kasnejše preiskave. Hkrati smo tako prikrili pacientovo identiteto in varovali njegove podatke. Iz vseh vzorcev smo izolirali MNC in iz slednjih DNA.

Tabela I: Preiskovanci.

ZAPOREDNA ŠTEVILKA VZORCA	DATUM ROJSTVA	SPOL	VRSTA VZORCA	VELIKOST KLONA LIMFOCITOV B	POSTAVITEV DIAGNOZE	PREDHODNO ZDRAVLJENJE
1	1951	Ž	KM	81%	2014*	Ne
2	1939	M	PK	70%	2014*	Ne
3	1930	M	PK	30%	2014*	Ne
4	1950	M	PK	91%	2014*	Ne
5	1953	M	PK	72%	2014*	Ne
6	1957	Ž	KM	43%	2010	Fludarabin 2012, nato Arzera 2013 in MabCampath 2014 in zopet Arzera

ZAPOREDNA ŠTEVILKA VZORCA	DATUM ROJSTVA	SPOL	VRSTA VZORCA	VELIKOST KLONA LIMFOCITOV B	POSTAVITEV DIAGNOZE	PREDHODNO ZDRAVLJENJE
7	1937	M	KM	93%		2012 Mabthera, 2013 Arzera, MabCampath
8	1954	Ž	PK	85%	2010	Fludarabin 2012
9	1946	Ž	KM	19%	2008	2012 Arzera, 2013 Mabthera, ...
10	1942	Ž	KM	60%	2012	Ne
11	1943	M	PK	58%	2014*	Ne

*novoodkriti bolnik

3.2 MATERIALI IN OPREMA

3.2.1 Reagenti

- Fikol proizvajalca GE Healthcare (Ficoll - PaqueTM PLUS, kat. št. 17-1440-02, 100 ml), Velika Britanija.
- Reagenčni komplet za izolacijo DNA QIAamp DNA Mini Kit (50) (kat. št. 51304, QIAGEN, Nemčija).
- Reagenčni komplet HotStarTaqDNA Polymerase (250 U; kat. št. 203203), Qiagen, Nemčija.
- Za določitev velikosti nukleinskih kislin smo uporabili standarde GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, kat. št. SM0241, ZDA).
- Reagenčni komplet ExoSap-IT proizvajalca USB Affymetrix, Biotechnology, ZDA (kat. št. 78201).
- Reagenčni komplet ABI PRISM Big Dye Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit (kat. št. 4337450), ki ga proizvaja Applied Biosystems, ZDA. Je mešanica deoksinukleotidov, DNA polimeraze in fluorescentno označenih dideoksinukleotidov ter BigDye sequencing Buffer v1.1 – BigDye pufer za optimalno delovanje DNA polimeraze.
- Voda, prosta DNaz in RNaz.
- Reagenčni komplet BigDye XTerminator Purification kit (P/N 4376486), Applied Biosystems, ZDA.
- ZON proizvajalca Eurofins mwg/operon (ZDA). Posamezni so navedeni v tabeli *Tabela II*.

3.2.2 Oprema

Aparati za izvedbo agarozne gelske elektroforeze nukleinskih kislin s sistemom EX-Gel (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, ZDA: aparat za izvedbo agarozne gelske elektroforeze s sistemom EX- gel in E-Gel iBase Power System, ki omogoča tudi detekcijo nukleinskih kislin med samim potekom elektroforeze ob uporabi transiluminatorja; foto - dokumentacijski sistem (Bio-Rad Gel Doc 1000), ki je sestavljen iz kamere in komore z UV svetilko (Bio-Rad Laboratories Inc., Life Science, ZDA); računalniški program Molecular Analyst za elektronsko obdelavo rezultatov elektroforeze nukleinskih kislin. Centrifuge Hereaus Biofuge Pico in Hereaus Biofuge 22 R ali analogi. Spektrofotometer Perkin Elmer Lambda 25. Aparat za PCR Perkin Elmer Gene Amp 9700, Veriti ali analogi. Orbitalni mešalniki – vorteksi. Digestorij, komore, ki omogočajo sterilno delo (Holten Laminar Air, Iskra Pio LFVP 12, DNA/RNA UVT-cleaner box UVC/T-M-AR) ali analogi. Avtomatski sekvenator ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, ZDA).

3.2.3 Materiali

1,5 ml in 0,2 ml sterilne mikrocentrifugirke (proste RNaz in DNaz); mikrotitrne ploščice; plastična folija; sterilni nastavki (prosti RNaz in DNaz); nosilci za epruvetke in pipete; sterilne pincete; pipete (10, 100 in 1000 µl). Predhodno pripravljeni agarozni EX – gel, Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, ZDA.

Tabela II: Oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje gena *TP53*.

Ime ZON	Sekvenca 5'→3'	Pomnoževani ekson
P-329	tgctcttttcacccatctac (20)	ex4_F
P-330	atacggccaggcattgaagt (20)	ex4_R
P-236	tggtcacttggtgcctgact (20)	ex5+6_F
P-240	ttaaccctctctccagaga (20)	ex5+6_R
P-237	aggcgactggcctcatctt (20)	ex7_F
P-238	tgtgcagggtggcaagtggc (20)	ex7_R
P-314	ttgggagtagatggagcct (20)	ex8+9_F
P-315	agtgttagactggaaacttt (20)	ex8+9_R
P-E10Li	caattgtaactgaaccatc (20)	ex10_F
P-562	ggatgagaatggaatcctat (20)	ex10_R

3.3 IZOLACIJA DNA IZ MONONUKLEARNIH CELIC

3.3.1 Vzorec za analizo

Izhodni material za izolacijo DNA, ki predstavlja matrico za nadaljnje postopke določanja mutacij v genu *TP53*, so bile mononuklearne celice (MNC). Vzorec za izolacijo MNC je bila periferna kri (PK) ali punktata kostnega mozga (KM). Vzorci so bili odvzeti v epruvete Vacutainer z antikoagulantom K₂EDTA/K₃EDTA (vijoličast zamašek). Običajno potrebujemo 2×10 mL PK ali 1-2 mL punktata KM. V primeru izolacije iz KM smo v 10 mL epruveto z EDTA predhodno dodali 2 mL sterilnega fosfatnega pufra s soljo (PBS).

3.3.2 Izolacija mononuklearnih celic (limfociti B) preko fikola

3.3.2.1 Delovni postopek

MNC smo izolirali iz periferne krvi ali KM z gradientnim centrifugiranjem preko fikola. Fikol je nevtralni hidrofilni in vodotopni polisaharid (27). Reagenti in vzorci morajo biti ogreti na sobno temperaturo, razen 1-kratnega PBS za spiranje MNC po izolaciji preko fikola (ohlajen na 2-8°C). Periferno kri odvzeto v epruveto Vacutainer z antikoagulantom K₂EDTA/K₃EDTA smo razredčili v razmerju 1:1 z raztopino 1-kratnega PBS sobne temperature. V 15 mL plastične centrifugirke smo z iglo in brizgo vbrizgali 2-3 mL fikola. Vzorec razredčen z 1-kratnim PBS smo počasi in previdno pipetirali ob steni na plast fikola, da je ostala meja med njim in krvjo ostra. Centrifugirali smo 22 minut pri 941* g pri sobni temperaturi. Pri

centrifugiranju se eritrociti in granulociti zaradi večje specifične gostote posedejo na dno centrifugirke pod plast fikola. Nad plastjo fikola, ki ostane bistra, nastane plast MNC. Njena debelina je odvisna od količine celic v vzorcu. Nad plastjo MNC, v supernatantu, se nahajajo PBS, krvna plazma, trombociti in maščobe. S pipeto smo previdno odstranili plast supernatanta do približno 1 cm nad plastjo MNC. Plast MNC smo previdno odstranili in prenesli v novo 15 mL centrifugirko. Pri tem smo pazili, da smo prenesli čim manj fikola, ki je toksičen za celice. Vzorec z MNC smo dopolnili s hladnim 1-kratnim PBS in premešali z obračanjem in/ali vorteksiranjem. Centrifugirali smo 10 min pri $630 \times g$, da so se MNC posedle na dno centrifugirke. Odlili smo supernatant in postopek spiranja še enkrat ponovili. S pipeto smo popolnoma odstranili supernatant. MNC v peletu smo raztopili v hladnem 1-kratnem PBS do koncentracije 5×10^6 celic v 200 μ L raztopine 1-kratnega PBS oziroma smo volumen pufra prilagodili številu celic, in prenesli 200 μ L celične suspenzije v 1,5 mL sterilne mikrocentrifugirke.

3.3.3 Izolacija DNA z reagenčnim kompletom QIAamp DNA Mini Kit

Reagenčni komplet QIAamp DNA Mini Kit (50) (kat. št. 51304, QIAGEN, Nemčija) je namenjen hitri izolaciji manjših količin (do 7 μ g) celotne DNA iz različnih bioloških vzorcev, kot so celotna kri, plazma, serum, KM, limfociti, druge telesne tekočine, celične kulture in tkiva. Komplet se lahko uporablja na svežih ali zamrznjenih vzorcih krvi ali KM, ki so jim bili dodani različni inhibitorji koagulacije krvi (EDTA, citrat, heparin). Izolirana DNA se lahko uporablja za reakcijo PCR in ostale molekularno genetske metode. DNA se lahko tudi zamrzne in shrani za nadaljnjo uporabo.

3.3.3.1 Delovni postopek

V spodnji tabeli (Tabela III) je opisan postopek izolacije DNA iz izoliranih limfocitov B.

Tabela III: Delovni postopek za izolacijo DNA z reagenčnim kompletom QIAamp DNA Mini Kit (50).

Korak	Postopek	Volumen (µL)	Pogoji
1	Segrejmo vzorce na sobno temperaturo. Segrejemo termoblok na 56 °C. Resuspendiramo 5×10^6 celic v 200 µl PBS oziroma so celice že shranjene v PBS.		
2	K 200 µl vzorca celic dodamo: proteinazo K, pufer AL (vsebuje kaotropne soli). Premešamo z vorteksiranjem. Kratko centrifugiramo.	20, 200	15 s
3	Inkubiramo. Kratko centrifugiramo.		10 min, 56 °C
4	Dodamo absolutni etanol. Premešamo z vorteksiranjem. Kratko centrifugiramo.	200	15 s
5	Celotno raztopino prenesemo na kolone v zbiralnih epruvetah. Centrifugiramo.		1 min, 8000 * g
6	Zavržemo zbiralno epruveto in znova sestavimo kolono z novo zbiralno epruveto. Dodamo pufer AW 1 (vsebuje kaotropne soli). Centrifugiramo.	500	1 min, 8000 * g

Korak	Postopek	Volumen	Pogoji
7	Zavržemo zbiralno epruveto in znova sestavimo novo zbiralno epruveto s kolono. Dodamo pufer AW 2 (vsebuje natrijev azid kot konzervans). Centrifugiramo.	500	3 min, 16100 * g
8	Vstavimo kolono v 1,5 mL epruveto. Dodamo pufer AE. Inkubiramo na sobni temperaturi. Centrifugiramo.	200	5 min 1 min, 8000 * g
9	Označimo DNA in jo shranimo v zamrzovalnik.		

3.3.4 Meritve koncentracije in kakovosti izoliranih nukleinskih kislin

Spektrofotometer (Perkin Elmer Lambda 25) je namenjen za spektrofotometrično analizo biokemijskih vzorcev v UV in vidnem področju svetlobe. Z njim smo določili koncentracijo in čistost izolirane DNA. Z uporabo kivete TrayCell (kat. št. 105.800-UVS, Hellma, Nemčija) smo za posamezno meritev potrebovali 3 μ L nerazredčenega vzorca. Spektrofotometer lahko istočasno izmeri več valovnih dolžin in izračuna razmerje absorbanc pri teh valovnih dolžinah. Posname lahko tudi absorpcijski spekter. Računalniški program, ki podpira delovanje spektrofotometra omogoča tudi izračun koncentracije vzorcev, kjer lahko spreminjamo faktor redčitve vzorcev. V tabeli spodaj (*Tabela IV*) so podana razmerja absorbanc (A) in koncentracije izolirane DNA za posamezne vzorce. Koncentracija DNA je določena na podlagi predispozicije, da čisti DNA z absorbenco 1 ustreza koncentracija 50 μ g/mL. Razmerja absorbanc pri valovni dolžini 260 in 280 nm ($A_{260/280}$) ter pri valovni dolžini 260 in 230 nm ($A_{260/230}$) podajata čistost izolirane DNA. Pri 260 nm absorbirajo svetlobo tako eno- in dvoverižne molekule DNA kot molekule RNA. Omenjena vrednost razmerja absorbanc ($A_{260/280}$) okoli 1,8 velja za čisto DNA, 2,0 pa za čisto RNA. Nižje vrednosti so posledica prisotnosti proteinov ali kontaminacije s fenoli. Pričakovana vrednost za razmerje absorbanc pri valovni dolžini 260 in 230 nm je 2,0 - 2,2 (28). Čistost izolirane DNA iz zbranih vzorcev je bila ustrezna za nadaljnjo analizo.

Tabela IV: Spektrofotometrične meritve koncentracije in kakovosti izoliranih nukleinskih kislin.

vzorec	A _{260/280}	A _{260/230}	koncentracija DNA [ng/μL]
1	1,635	1,873	103,0
2	1,680	1,909	84,0
3	1,440	1,286	36,0
4	1,771	1,378	62,0
5	1,578	1,578	101,0
6	1,594	1,500	102,0
7	1,744	2,273	75,0
8	1,660	1,509	83,0
9	1,700	1,759	51,0
10	1,678	1,690	245,0
11	1,797	2,255	230,0

3.4 POMNOŽEVANJE IZOLIRANE DNA Z METODO VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO Z UPORABO SPECIFIČNIH NUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV

Izhodišče za vpeljavo metode je bil protokol kot ga navaja vir (Detection of TP53 mutations by direct sequencing) (26). V njem so navedeni pogoji PCR oziroma opredeljeni posamezni programi s priporočenimi temperaturami in števili ciklov posamezne stopnje reakcije PCR. Programi so različni za najbolj optimalno pomnoževanje eksonov 2-11 gena *TP53*. Glede na izbran program PCR protokol priporoča uporabo encimov GoTaqHotStart Polymerase (Promega, ZDA) ali HotStarTaq (Qiagen, Nemčija). Temu so prilagojeni volumni oziroma koncentracije posameznih reagentov reakcijske zmesi (master mix). Eksone 2-3, 5-6 in 8-9 lahko pomnožujemo hkrati, torej v isti reakciji PCR z uporabo ustreznih oligonukleotidnih začetnikov. Protokol v odvisnosti od kvalitete izolirane DNA priporoča izbiro ustreznega para začetnikov; torej par začetnikov za pomnoževanje daljših ali krajših DNA fragmentov.

3.4.1 Priprava vzorcev DNA z optimalno koncentracijo

Optimalna koncentracija izhodiščne DNA je bila 50 ng/μL. Izolirane vzorčne DNA (*Tabela IV*) smo ustrezno redčili do končne delovne koncentracije z dodatkom spiralnega pufra, ki smo ga uporabili pri izolaciji z reagenčnim kompletom QIAamp DNA Mini Kit (kat. št. 51304, QIAGEN, Nemčija).

3.4.2 Priprava ZON

ZON (*ang. primer*) je krajša veriga DNA, ki deluje kot začetnik pomnoževanja DNA v pogojih *in vitro*, ker DNA polimeraza lahko le nadaljuje izgradnjo začetne verige nukleinske

kislina. ZON so običajno dolgi od šest do petdeset in več nukleotidov. Dva ZON omejita področje DNA, ki se pomnožuje med reakcijo PCR. Pri tem se eden – smerni ali smiselni (*ang. sense, forward/F*) prilega na eno verigo, drugi – protismerni ali protismiselni (*ang. antisense, reverse/R*) pa na nasprotno verigo matrične DNA (29).

Uporabljali smo ZON proizvajalca Eurofins mwg/operon (ZDA, *Tabela II*). Koncentracija ZON je bila 10 μM . ZON so bili v liofilizirani obliki. Raztopili in redčili smo jih do koncentriranih in delovnih raztopin z vodo, ki je prosta DNaz in RNaz. Liofilizirani ZON so od datuma proizvodnje uporabni dve leti ali več, če so pravilno shranjeni v zamrzovalniku na -20°C . Raztopljeni ZON so uporabni vsaj dvanajst mesecev od datuma priprave raztopin, če so pravilno shranjeni v zamrzovalniku pri -20°C . Večkrat kot so ZON redčeni, manjša je njihova stabilnost.

3.4.2.1 Priprava koncentriranih ZON koncentracije 100 pmol/ μL (100 μM)

ZON so še najbolj stabilni v liofilizirani obliki. Hranimo jih v zamrzovalniku pri -20°C , prenašamo pa jih lahko na sobni temperaturi. Raztopimo jih šele po potrebi. Pripravili smo raztopine s koncentracijo 100 pmol/ μL , kar predstavlja koncentrirano raztopino ZON – ‘stock’.

Preverili smo količino liofiliziranih ZON v viali; če je bila količina različna od 10 nmol smo postopek ustrezno prilagodili. Mikrocentrifugirko z liofiliziranimi začetnimi oligonukleotidi smo kratko centrifugirali. V mikrocentrifugirko z liofiliziranimi začetnimi oligonukleotidi smo dodali 100 μL sterilne vode. Inkubirali smo 5 - 10 min na sobni temperaturi. Premešali smo z orbitalnim mešalnikom in kratko centrifugirali. Inkubirali smo na sobni temperaturi 20 - 25 min. Ponovno smo premešali z orbitalnim mešalnikom in kratko centrifugirali. Na mikrocentrifugirko smo napisali datum raztapljanja začetnih oligonukleotidov in koncentracijo (100 pmol/ μL), ter volumen dodane sterilne vode. Raztopino začetnih oligonukleotidov smo shranili v zamrzovalnik pri -20°C v ustrezno škatlo za posamezno analizo ali pa pripravili razredčene začetne oligonukleotide, kot je opisano spodaj.

3.4.2.2 Priprava razredčenih raztopin ZON s koncentracijo 10 pmol/ μL

Oligonukleotidne začetnike s koncentracijo 10 pmol/ μL smo pripravili iz koncentrirane raztopine ZON s koncentracijo 100 pmol/ μL .

Koncentrirane začetne oligonukleotide smo odtalili na sobni temperaturi in jih inkubirali 10 min na sobni T. Premešali smo in kratko centrifugirali. Mikrocentrifugirke smo označili z

imenom začetnih oligonukleotidov in koncentracijo 10 pmol/ μ L ter datumom priprave razredčene raztopine ZON. V označene mikrocentrifugirke smo dodali 45 μ L sterilne vode. Dodali smo 5 μ L koncentriranih ZON s koncentracijo 100 pmol/ μ L. Temeljito smo premešali in kratko centrifugirali. Shranili smo v zamrzovalnik na -20°C v škatlo za posamezno analizo.

3.4.3 Priprava reakcijske mešanice za reakcijo PCR

Z izbiro ustreznih ZON (*Tabela II*) v verižni reakciji s polimerazo smo pomnoževali specifično zaporedje nukleinskih kislin oziroma specifični del gena *TP53*. Uporabili smo encim HotStarTaq - reagenčni komplet HotStarTaqDNA Polymerase 250 U (kat. št. 203203, Qiagen, Nemčija). Program oziroma protokol za pomnoževanje DNA za določitev mutacij v eksonih 4 do 10 gena *TP53* v preiskovanih vzorcih je naveden v tabeli (*Tabela IX*). V prvem koraku je zahtevana aktivacija encima s 15-minutnim zvišanjem temperature na 95°C . V spodnji tabeli (*Tabela V*) so navedeni ustrezni volumni in končne koncentracije posameznih reagentov v reakcijski mešanici oziroma t.i. master mix-u. Skupni volumen reakcijske mešanice je bil 19,0 μ L. Dodali smo 1,0 μ L DNA, da je bil končni volumen 20,0 μ L.

Tabela V: Reakcijska mešanica.

Reagent	Volumen (μ L)	Končna koncentracija
10X PCR pufer s 15mM MgCl_2	2	1 X
5X Q-Solution	4	1 X
dNTP mix (10 mM)	0,4	0,2 mM vsak dNTP
Smerni (Forward) primer (10 μ M)	0,5	0,25 μ M
Protismerni (Reverse) primer (10 μ M)	0,5	0,25 μ M
HotStarTaq DNA polimeraza (5 U/ μ L)	0,1	0,5 U
Sterilna voda	11,5	
Σ	19,0	

3.4.4 Agarozna gelska elektroforeza produktov PCR

Elektroforezo smo izvedli za preverjanje uspešnosti pomnoževanja produktov PCR. Elektroforeza omogoča ločitev nabitih snovi v električnem polju. Molekule nukleinskih kislin imajo močan negativen naboj. Potujejo od katode proti anodi. Na hitrost potovanja snovi v agaroznem gelu vplivajo zamreženost in gostota gela, ter velikost, oblika in naboj molekul.

Uporabljali smo sistem predhodno pripravljenih gelov E-GelEX proizvajalca Invitrogen, z vsebnostjo agaroze 2%. V agarozni gel med pripravo dodajo fluorescentno barvilo SYBR Gold, ki po osvetlitvi z UV svetlobo fluorescira, kar omogoča detekcijo DNA. Molekule fluorescentnih barvil interkalirajo med baze nukleinskih kislin in fluorescirajo močneje kot proste molekule barvil in nukleinskih kislin. Fluorescenco smo zaznali s fotodokumentacijskim sistemom, ki je sestavljen iz aparata Bio-Rad - Gel-Doc 100 (kamera in komora z UV svetilko) ter računalniškega programa Molecular Analyst. Računalniški program omogoča elektronsko obdelavo rezultatov elektroforeze NK. Rezultate lahko shranimo v elektronski obliki in jih natisnemo.

Baza (PowerBase) za E-Gel predstavlja nosilec, kamor vstavimo pred-pripravljene agarozne gele - E-GelEX (Invitrogen, ZDA) in se uporablja kot povezovalni element med geli in virom napetosti. Vir napetosti predstavlja povezavo med bazo PowerBase in električnim omrežjem. Vir napetosti je bil adaptor (model L5A-120090R), ki omrežno napetost (230 V, ~ 50 Hz, 0,2 A) pretvori v izhodni tok (12 V, 900 mA), ki je potreben za normalen potek agarozne elektroforeze s sistemom E-Gel. Z E-Gel iBase Power System smo spremljali ločevanje pomnoženih produktov DNA med samim potekom elektroforeze ob uporabi transiluminatorja. EX-Geli so uporabni do datuma zabeleženega na embalaži in se shranjujejo na sobni temperaturi. Za določitev velikosti nukleinskih kislin smo uporabili standarde GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, kat. št. SM0241, ZDA). Reagent vsebuje fragmente DNA z velikostjo 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 in 1000 bp in koncentracijo 0,5 µg/µl, ki so shranjeni v pufru Tris/EDTA. V ločen žepk smo nanесли 3 µl standarda in 17 µl vode. Volumen pomnoženega produkta DNA v posameznem žepku je bil 10 µl. Dodali smo še 10 µl vode, skupni volumen je bil torej 20 µl. V prazne žepke pri posamezni elektroforezni ločbi smo nanесли 20 µl vode. Čas elektroforezne ločbe je bil 7 minut.

3.5 SEKVENCIONIRANJE

Sekvencioniranje nukleinskih kislin zajema določitev nukleotidnega zaporedja in analizo pridobljenih podatkov. V prvi stopnji izvedemo sekvenčno reakcijo PCR, sledi čiščenje dobljenih produktov, ter analiza podatkov sekvenčne reakcije s pomočjo sekvenatorja. S sekvencioniranjem določamo nukleotidno zaporedje preiskovanega fragmenta DNA. V sekvenčni reakciji PCR najprej pomnožimo specifične odseke DNA. Poleg običajnih deoksinukleotidov (dNTP) uporabljamo tudi dideoksinukleotide (ddNTP). To so sintetični nukleotidi, ki na mestu 3'-C deoksiriboze nimajo proste -OH skupine, ki je potrebna za podaljševanje fosfodiesterne vezi v verigi DNA. Ob vgradnji ddNTP se tako podaljševanje oziroma sinteza DNA zaključi. Na ta način nastanejo fragmenti DNA, ki so različno dolgi. Področje DNA, ki mu želimo določiti nukleotidno zaporedje, določimo z izbiro ZON, ki specifično nalega na preiskovani del DNA. Za potrditev rezultatov običajno preiskovanemu delu DNA določimo nukleotidno zaporedje na obeh verigah. Uporabimo dva različna ZON (F in R) v dveh ločenih sekvenčnih reakcijah. Nastale produkte sekvenčne reakcije najprej očistimo in nato ločimo v električnem polju s kapilarno elektroforezo, kjer pride do ločitve fragmentov DNA zaradi različne velikosti. Najprej iz kolone pridejo krajši in nato daljši fragmenti. Dideoksinukleotidi so označeni z različnimi fluorescenčnimi barvili, ki po vznujanju z lasersko svetlobo oddajajo svetlobo različnih valovnih dolžin. To zazna kamera v sekvenatorju. Rezultat se izpiše kot elektroferogram. Zaporedje nukleotidov analiziramo ročno ali pa z različnimi bioinformatičnimi orodji in ga primerjamo z znanim nukleotidnim zaporedjem preiskovanega gena (30, 31).

3.5.1 Vzorec za sekvencioniranje nukleinskih kislin

Za sekvencioniranje nukleinskih kislin smo uporabili produkte reakcije PCR, ki smo jih pred sekvencioniranjem očistili z reagenčnim kompletom ExoSap-IT (USB Affymetrix, ZDA, kat. št. 78201).

3.5.2 Čiščenje produktov reakcije PCR z reagenčnim kompletom ExoSAP-IT

Za sekvencioniranje gena *TP53* smo uporabili produkte reakcije PCR, ki smo jih pred sekvencioniranjem očistili snovi (neporabljeni nukleotidi, začetni oligonukleotidi in enoverižne molekule nukleinskih kislin), ki bi lahko motile nadaljnjo analizo, z reagenčnim kompletom ExoSap-IT (proizvajalca USB Affymetrix, kat. št. 78201, ZDA). Reagenčni komplet predstavlja viala z 1mL mešanice dveh hidrolitičnih encimov: eksonukleaze 1 in alkalne fosfataze morskega rakca. Oba encima sta optimalno aktivna pri 37°C in sta temperaturno labilna. Z inkubacijo pri 80°C ju lahko inaktiviramo. Encima sta aktivna v

pufrih, ki se uporabljajo med reakcijami PCR, zato ob uporabi reagenčnega kompleta ni potrebno dodajati dodatnih pufrov za čiščenje produktov PCR. Eksonukleaza I razgradi enoverižne začetne oligonukleotide in druge enoverižne molekule nukleinskih kislin, alkalna fosfataza pa hidrolizira preostale neporabljene dNTP. Reagenčni komplet ne razgradi dvoverižne DNA, ki jo lahko predstavljajo produkti reakcije PCR ali pa dimeri začetnih oligonukleotidov. Prav tako ne pride do razgradnje nespecifičnih produktov reakcije PCR. Postopek čiščenja produktov reakcije PCR je hiter (30 min) in poteka v eni mikrocentrifugirki, ki jo lahko uporabimo v nadaljnjih analizah, pri tem pa ne pride do izgube vzorcev. Reagenčni komplet je uporaben eno leto. Zaradi temperaturne labilnosti obeh uporabljenih encimov mora biti reagenčni komplet ves čas na hladnem v zamrzovalniku ali v hladilnem bloku.

3.5.3 Sekvenčna reakcija (PCR)

3.5.3.1 Delovni postopek

Za pomnoževanje DNA v sekvenčni reakciji smo uporabili standardni reagenčni komplet ABI PRISM Big Dye Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit (kat. št. 4337450), ki ga proizvaja Applied Biosystems (ZDA). V spodnji tabeli (*Tabela VI*) so navedeni ustrezni volumni posameznih reagentov reakcijske mešanice za sekvenčno PCR. Za sekvencioniranje gena *TP53* smo v sekvenčno reakcijo dodali 0,75 µL z ExoSAP-IT očiščenih produktov reakcije PCR. ZON, ki smo jih uporabili za sekvenčno reakcijo, so bili koncentracije 5 pmol/µL. Uporabili smo iste ZON kot za reakcijo PCR (*Tabela II*). Pripravili smo jih z ustreznim redčenjem, enako kot je opisano pri pripravi ZON za reakcijo PCR. V sekvenčno reakcijo smo dodali 0,64 µL ZON. V posamezno sekvenčno reakcijo smo dodali le en ZON (F ali R). Sekvencionirali smo v obeh smereh oziroma obe antiparalelni verigi DNA, kot rečeno v ločenih reakcijah (epicah/luknjicah mikrotitrne ploščice). Po istem protokolu smo pomnoževali posamezne eksone (ex4, ex5, ex6, ex7, ex8, ex9, ex10) in nekatere skupno (ex5+6, ex8+9).

Na sobni temperaturi smo odtalili vse reagente, jih premešali z orbitalnim mešalnikom in kratko centrifugirali. Vzorce nukleinskih kislin smo rahlo premešali. Reakcijsko mešanico za sekvenčno reakcijo smo pripravili glede na količino dodanih očiščenih produktov reakcije PCR in jo alikvotirali v odvisnosti od v sekvenčno reakcijo dodanih vzorcev. Pripravili smo jo v razmerju, ki je navedeno v tabeli spodaj. Mikrocentrifugirke oziroma mikrotitrsko ploščico z reakcijsko mešanico za sekvenčno reakcijo smo kratko centrifugirali in jih prenesli v aparat za PCR. V primeru odložene sekvenčne reakcije smo vzorce shranili na hladnem. Nastavili

smo pogoje za sekvenčno reakcijo PCR (*Tabela VII*). Po končani reakciji smo produkte sekvenčne reakcije PCR očistili po postopku opisanem v točki **3.5.4**. Čiščenje produktov sekvenčne reakcije smo izvedli takoj po končani reakciji PCR.

3.5.3.2 Priprava reakcijske mešanice za sekvenčno reakcijo

Reakcijsko mešanico (ang. master mix) za sekvenčno analizo smo pripravili tako, kot je navedeno v tabeli *Tabela VI* in jo pomnoževali po protokolu, navedenem v tabeli *Tabela VII*.

Tabela VI: Reakcijska mešanica za sekvenčno reakcijo PCR, če v le-to dodamo 0,75 µL z ExoSAP očiščenih produktov reakcije PCR. Reakcijsko mešanico alikvotiramo po 18,7 µL.

	Število reakcij				
Reagent	1	2	3	4	5
Ready reaction premix (µl)	1	2	3	4	5
BigDye sek. pufer (µl)	3,5	7	10,5	14	17,5
Voda (µl)	14,15	28,3	42,45	56,6	70,75
Skupni volumen (µl)	18,65	37,3	55,95	74,6	93,25

Tabela VII: Protokol za pomnoževanje v sekvenčni reakciji PCR.

Temperatura	Čas	Št. Ciklov
96°C	1 min	1
96°C	10 s	25
50°C	5 s	
60°C	4 min	
4°C	∞	1

3.5.4 Čiščenje produktov sekvenčne reakcije PCR z reagenčnim kompletom BigDye X Terminator Purification kit

Po končani sekvenčni reakciji PCR smo mikrocentrifugirke oziroma mikrotitrsko ploščico kratko centrifugirali. Produkta sekvenčne reakcije PCR smo očistili z reagenčnim kompletom BigDye X Terminator Purification kit (P/N 4376486, Applied Biosystems, ZDA). Vsakemu produktu PCR smo dodali reagent SAM Solution in BigDye X Terminator Solution glede na

volumen reakcije PCR (20 μ L – 90 μ L SAM Solution + 20 μ L BigDye X Terminator Solution). Preverili smo, da v reagentu SAM Solution ni precipitativ. Reagent BigDye X Terminator Solution smo dobro premešali, da so se delci v raztopini porazdelili (magnetne kroglice ali ang. beads). Mikrotitrsko ploščico smo prelepili s prozorno prekrivno folijo in preverili, da je zatesnjena vsaka luknjica. Stresali smo jo vsaj 30 minut na hladnem (2-8°C), pri maksimalni hitrosti stresalnika 2200 RPM. Ploščico smo nato centrifugirali 2 minuti pri 941 * g. 30 μ L supernatanta smo prenesli v čiste trakove centrifugirke (*ang. strips*) in prenesli vzorce v sekvenator. Čas injiciranja vzorca v kapilaro je bil 6-7 sekund.

3.5.5 Analiza podatkov

Po končanem mehanskem sekvencioniranju smo podatke analizirali. Poleg elektroferograma smo dobili tudi izpisano zaporedje nukleotidov - sekvenco. Zaporedje nukleotidov analiziramo ročno ali pa z različnimi bioinformatičnimi orodji. Primerjali smo ga z znanimi nukleotidnimi zaporedji in tako določili spremembe v zaporedju DNA.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 Postavitev protokola za pomnoževanje gena *TP53* v reakciji PCR – modificirani protokol IARC

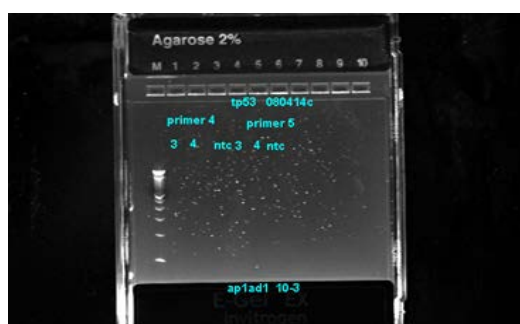
V omenjenem obdobju zbiranja vzorcev pacientov s KLL smo uspeli zbrati 30 vzorcev PK oz. KM. Za postavitev metode smo naključno izbrali DNA dveh pacientov. V mutacijsko analizo smo nato vključili le tiste vzorce pacientov (11 vzorcev, *Tabela I*), pri katerih je bil klon limfocitov B nad 15%, koncentracija izolirane DNA večja od 50 ng/ μ L in dostopni rezultati citogenetske preiskave FISH.

4.1.1 Preverjanje optimalne koncentracije matrične DNA

Izhodiščna koncentracija DNA, ki naj bi zadoščala za uspešno pomnoževanje v reakciji PCR je bila 20 ng/ μ L. Poskusili smo še s koncentracijama 50 ng/ μ L in 100 ng/ μ L (*Slika 3*). Na podlagi intenzitete in specifičnosti lis na elektroforeznem gelu smo se odločili za optimalno delovno koncentracijo 50 ng/ μ L, kot je navedeno v osnovnem protokolu (26). Za negativno kontrolo (ntc) smo v vsaki reakciji PCR uporabili bidestilirano vodo.

4.1.2 Optimizacija pogojev pomnoževanja DNA na PCR aparatu

Začetni pogoji, ki smo jih postavili, so navedeni v spodnji tabeli (*Tabela VIII*). Protokol smo poimenovali »*TP53-B*«. Po tem protokolu smo pomnoževali specifične odseke DNA. V posameznih reakcijah smo uporabili ZON za pomnoževanje ex4, ex5+6, ex7 in ex8+9 (*Tabela II*). Pomnoževanje je bilo neuspešno, kar vidimo po odsotnosti lis na sliki *Slika 1*.



Slika 1: Elektroferogram pomnoževanja DNA po protokolu TP53-B; nanos 10 μ L vzorca (izolirana DNA) in 3 μ L standarda velikosti nukleinskih kislin. primer 4/5 – ZON za pomnoževanje eksona 4/5, 3, 4 – izolirana DNA naključnega vzorca.

Verjetno je šlo za napačne nastavitve na aparatu PCR in preostre pogoje. Protokol smo izpopolnjevali in prilagajali temperaturo prileganja ter število ciklov v posamezni fazi amplifikacije. V ločenih reakcijah smo uporabili še ZON za pomnoževanje posameznih

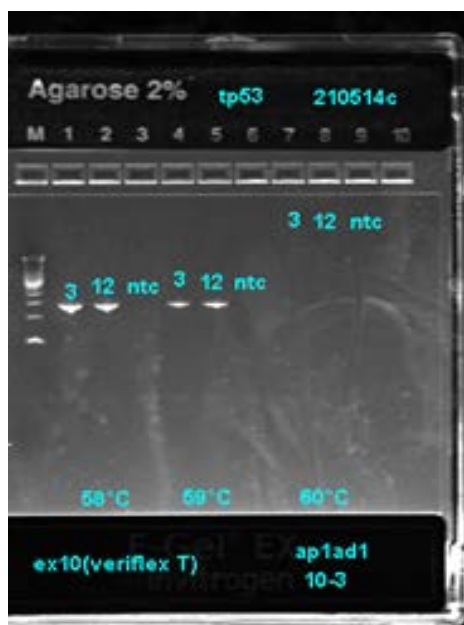
eksonov, torej: ex4, ex5, ex6, ex7, ex8 in ex9 (*Tabela II*). Zaradi slabega in neponovljivega pomnoževanja DNA smo se odločili za uporabo nemodificiranega protokola PCR, *TP53-C* po IARC (26). Postopek smo večkrat ponovili. Problematično je bilo skupno pomnoževanje ex5+6 in ex8+9. Zaradi ostrih pogojev smo temperaturo prileganja (T_a) s 60°C spustili na 58°C in 59°C. Za optimalno T_a se je izkazala temperatura 58 °C (*Slika 2*). Uspešno smo pomnožili vse eksone, tako z uporabo ZON za skupno in posamezno pomnoževanje eksonov. Na elektroforeznem gelu smo dobili specifične in intenzivne lise (*ang.band*). Protokol smo poimenovali »modificiran protokol *TP53-C*« (*Tabela IX*). Po osnovnem IARC protokolu (26) naj bi se ekson 10 pomnoževal ločeno, po posebnem protokolu PCR, zato ga v prvi fazi nismo pomnoževali. Po vpeljavi »modificiranega protokola *TP53-C*« (*Tabela IX*) smo optimizirane pogoje uporabili še za pomnoževanje ex10. Ex10 smo uspešno ponovljivo pomnoževali. Končno smo optimizirali vse pogoje za vpeljavo enega protokola za hkratno pomnoževanje ex4, ex5+6, ex7, ex8+9 in ex10. S tem smo precej olajšali delo in skrajšali čas za pridobitev produktov PCR za nadaljnjo sekvenčno analizo.

Tabela VIII: »Protokol TP53-B«.

Korak	T [°C]	Čas	Število ciklov	Stopnja
1	94	2 min	1	
2	94	30 s	20	amplifikacija (vsak 4. cikel znižanje T_a za 0,5 °C)
3	63	45 s		
4	72	1 min		
5	94	30 s	30	amplifikacija
6	60	45 s		
7	72	1 min		
8	72	10 min	1	podaljševanje
9	16	∞		

Tabela IX: Protokol pomnoževanja DNA za določitev prisotnosti genskih sprememb v genu TP53; »modificirani protokol TP53-C«.

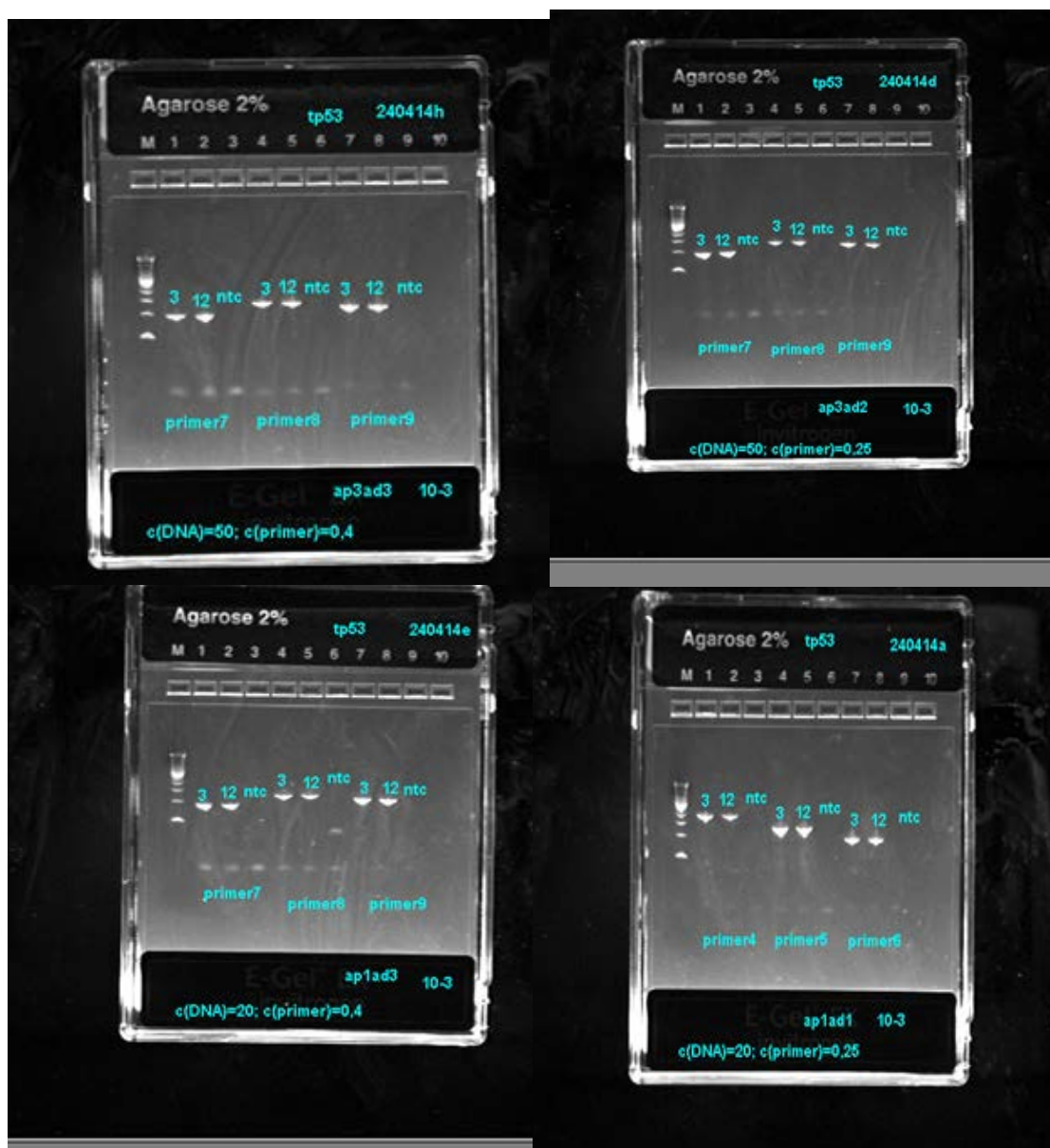
TEMPERATURA	ČAS	ŠTEVILO CIKLOV
95°C	15 min	1
94°C	30 s	50
58°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	10 min	1
10°C	∞	



Slika 2: Elektroferogram - optimizacija temperature prileganja Ta (58°C, 59°C, 60°C). ZON za pomnoževanje eksona 10; nanos 10 µL vzorca (izolirane DNA) in 3 µL standarda velikosti nukleinskih kislin. 3, 12 – izolirana DNA naključnega vzorca, ntc – negativna kontrola (bidestilirana voda).

4.1.3 Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov

Izhodiščna koncentracija ZON po osnovnem IARC protokolu (26) je bila 0,4 µM. Zaradi močne intenzitete ZON na elektroforeznem gelu smo koncentracijo zmanjšali na 0,25 µM (*Slika III*). Ta koncentracija je zadoščala za uspešno pomnoževanje DNA.



Slika 3: Optimizacija koncentracije izhodiščne DNA in začetnih oligonukleotidov. Koncentracija DNA 50 mM (zgoraj) in 20 mM (spodaj). Koncentracija ZON 0,4 mM (zgoraj in spodaj levo) in 0,25 mM (zgoraj in spodaj desno). 3, 12 – izolirana DNA naključnega vzorca, ntc – negativna kontrola (bidestilirana voda), primer 4/5/6/7/8/9 – ZON za pomnoževanje ustreznega eksona.

4.2 Pomnoževanje gena *TP53* v sekvenčni reakciji PCR

Glede na izkušnje iz rutinskega dela v laboratoriju smo sekvenčno reakcijo najprej izvedli z 1 μ L očiščenih produktov reakcije PCR. Intenziteta fluorescentnih signalov je bila previsoka, zato smo volumen zmanjšali. Delovna količina pri analizi preiskovanih vzorcev je bila tako 0,75 μ L. Uravnali smo čas injiciranja vzorca v kapilaro med sekvencioniranjem s priporočenih 30 sekund na 6-7 sekund.

4.3 Določanje mutacij v genu *TP53* pri vzorcih pacientov

Mutacije v genu *TP53* se pogosteje pojavljajo v kombinaciji z delecijo na kratkem kraku kromosoma 17. Pacienti s predhodno določeno del(17p) so bili zato skupina, pri kateri smo z večjo verjetnostjo pričakovali prisotnost mutacij. Zaradi primerjave pa smo vključili tudi bolnike z drugimi citogenetskimi spremembami. Z uporabo optimiziranih postopkov, ki so opisani v prejšnji točki (4.1) magistrske naloge, smo na zbranih 11-ih vzorcih (Tabela I) določili sekvence oziroma nukleotidna zaporedja gena *TP53*. Za potrditev rezultatov smo za vsak vzorec določili sekvenco v F in R smeri ter v vsaj dveh ločenih reakcijah. Dobljene sekvence vzorcev smo z uporabo programa Variant Reporter primerjali z referenčnim zaporedjem NC_000017.10 (RefSeq DNA NCBI GenBank). Referenčna primerjalna sekvenca mRNA prepisa je bila NM_000546.5. Zaznali smo nekaj mutacij in polimorfizmov (SNP-jev). V genskih bazah (Gene Bank, Ensembl, IARC) smo za ugotovljene spremembe v nukleotidnem zaporedju gena *TP53* pridobili informacije o morebitnih posledicah na nivoju proteina (referenčna sekvenca NP_000537.3).

Zaradi majhnega števila analiziranih vzorcev smo se v razpravi posvetili vsakemu pacientu oziroma vzorcu posebej. Grupiranje vzorcev se nam zaradi heterogenosti bolezni in zgodovine pacientov ni zdelo smiselno.

Mutacije v genu *TP53* smo določili na vzorcih pacientov z različnimi citogenetskimi spremembami. Imunofenotip oziroma izražanje posameznih površinskih molekul je odvisno od spremljajočih citogenetskih in molekularno-genetskih sprememb in obratno. Prav tako na pojavnost omenjenih sprememb vpliva razširjenost tumorja oziroma stadij bolezni, morebitno uvedeno zdravljenje, aktivna bolezen (12, 19, 23). Zaradi heterogenosti bolezni težko opredelimo vzročno-posledično povezanost prisotnih kazalcev. Med omenjenimi napovednimi dejavniki, ki jih navaja literatura, smo v razpravi izpostavili tiste, ki so bili dostopni. Skušali smo povezati vse informacije za obrazložitev poteka bolezni in zdravljenja. S pomočjo dejstev iz literature in dostopne zgodovine pacientov ter dobljenih rezultatov

mutacijske analize gena *TP53* smo naredili okvirne zaključke glede napovedi poteka KLL.

*Tabela X: Določanje mutacij v genu *TP53* pri vzorcih pacientov.*

ZAPOREDNA ŠTEVILKA VZORCA	CITOGENETSKE SPREMEMBE	IMUNO-FENOTIPSKE POSEBNOSTI [#]	MUTACIJE V GENU <i>TP53</i>
1	Trisomija 12 (74%)	/	Ekson 10: rs2856754
2	/	/	Ekson 4: rs1042522 Ekson 10: rs2856754, rs2856755
3	del(11q22) (91%)	/	Ekson 4: rs1042522 Ekson 10: rs2856754, rs2856755
4	del(13q) (81%, bialelna)	/	Ekson 4: rs1042522 Ekson 10: rs2856754, rs2856755
5	del(17p) (65%)	CD38(+) 27% celic	Ekson 7: določena mutacija g.14069C>T, heterozigot; (NM_000546.5: c.742C>T); mutacija s spremenjenim pomenom (missense) v DNA vezavni domeni, p.Arg248Trp, posledica zamenjave AK je neaktivnost proteina; somatska mutacija ali LFS (37) Ekson 10: rs2856754, rs2856755
6	del(17p) (27%)	CD38(+) 57% celic	Ekson 4: rs1042522 Ekson 10: rs2856754, rs2856755, mutacija c.1009C>T (NM_000546.5), heterozigot, p.Arg337Cys; rs587782529, posledica zamenjave AK je zmanjšana aktivnost proteina p53 (37)

(Legenda: #tipični imunofenotip: CD19+, CD20(š)+, CD23+, CD5+, FMC7-, CD22-; **rs2856754**: NC_000017.10: g.7574069A>T; A/T SNP (NM_000546.5: c.994-36T>A) (32, 33) [g. 17536A>T, homozigot]; **rs1042522**: NC_000017.10: g.7579472G=; NM_000546.5: c.215C>G(C), p.Arg72Pro / p.R72P (34) [g.12139G>C, heterozigot]; **rs2856755**: NC_000017.10: g.7573906G>T, G/T transverzija (substitucija); A/C SNP, NM_000546.5: c.1100+21C>A (35, 36) [g. 17699A>C, homozigot])

ZAPOREDNA ŠTEVILKA VZORCA	CITO-GENETSKE SPREMEMBE	IMUNO-FENOTIPSKE POSEBNOSTI	MUTACIJE V GENU <i>TP53</i>
7	del(13q) (39%), del(11q) (98%), del(17p) (32%). Prisotna je tudi preureditev gena za <i>IGH</i> (45% celic).	CD38(+/-)	Ekson 10: rs2856754, rs2856755
8	del(13q) (94%), del(17p) (20%)	FMC7(+/-)	Ekson 5+6: določena mutacija g.13399A>G, heterozigot; rs1800372: 841A>C; NM_000546.5: _c.639A>C; p.Arg213Arg; tiha mutacija (CGA>CGC), nespremenjena funkcija; zarodna linija (germline); potencialno z benigno klinično pomembnostjo, LFS (39) Ekson 10: rs2856754, rs2856755
9	del(13q) (43%), del(17p) (11%)	CD38(+/-)	Ekson 10: rs2856754, rs2856755
10	del(13q) (41% monoalelna), del(11q) (11%), del(17p) (25%)	/	Ekson 4: rs1042522 Ekson 10: rs2856754, rs2856755
11	del(13q) (90%), del(11q) (73%), del(17p) (11%)	FMC7(+/-)	Ekson 4: rs1042522 Ekson 10: rs2856754, rs2856755

(Legenda: #tipični imunofenotip: CD19+, CD20(š)+, CD23+, CD5+, FMC7-, CD22-; **rs2856754**: NC_000017.10: _g.7574069A>T; A/T SNP (NM_000546.5: _c.994-36T>A) (32, 33) [g. 17536A>T, homozigot]; **rs1042522**: NC_000017.10: _g.7579472G=; NM_000546.5: _c.215C>G(C), p.Arg72Pro / p.R72P (34) [g.12139G>C, heterozigot]; **rs2856755**: NC_000017.10: _g.7573906G>T, G/T transverzija (substitucija); A/C SNP, NM_000546.5: _c.1100+21C>A (35, 36) [g. 17699A>C, homozigot])

Pri sedmih preiskovancih (Tabela X: pacienti 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) je bila s FISH ugotovljena del(17p). Od tega je bila pri dveh (pacienta 5 in 6) prisotna kot samostojna citogenetska sprememba. Del(17p) je vedno napovedno neugodna (6). Pričakovano pri nobenem od pacientov brez del(17p) nismo določili mutacij v genu *TP53*. Mutacije v genu *TP53* se namreč pogosteje pojavljajo na preostalem alelu *TP53*. Tudi pri tistih pacientih, kjer smo določili mutacije v genu *TP53* ob prisotnosti del(17p), se napovedni pomen ni spremenil. V kolikor gre za prisotnost del(17p) in / ali mutacije v genu *TP53* je napoved bolezni neugodna – potek

bolezni je hitrejši, agresivnejši, preživetje je krajše, značilna je neodzivnost na zdravljenje s fludarabinom (12, 19, 23). Pri obeh pacientih (pacienta 5 in 6) z del(17p) je bilo s predhodno imunofenotipizacijo ugotovljeno izražanje označevalca CD38 na membrani limfocitov B. Obe spremembi povezujemo z aktivno boleznijo in agresivnejšim potekom (7, 14). Pri pacientu 5 smo v eksonu 7 ugotovili še mutacijo s spremenjenim pomenom znotraj DNA vezavne domene. Posledica zamenjave AK je neaktivnost proteina p53 (37). Omenjena mutacija na mestu kodona 248 je ena izmed najpogostejše pojavljajočih »hot spot« mutacij (18). Mutacije v *TP53*, ki prizadenejo funkcionalnost proteina, so kot samostojna sprememba napovedno neugodne. V kombinaciji z delecijo drugega alela pa je prognoza še slabša (12, 19, 23). Pacienta se po priporočilih vključi v eno izmed kliničnih poskušanj zdravil. Je tudi potencialen kandidat za zdravljenje z alogenično presaditvijo krvotvornih matičnih celic (1, 5, 23). Pri pacientu 6 smo poleg napovedno neugodne del(17p) v eksonu 10 ugotovili mutacijo, katere posledica je zamenjava AK ter zmanjšana aktivnost p53 (37). Skupaj z izražanjem molekule CD38 gre za zelo neugoden potek bolezni. Verjetno je bilo zdravljenje komaj dve leti po postavitvi diagnoze (*Tabela I*) uvedeno zaradi prisotnosti del(17p) in / ali mutacije v *TP53*. Zdravljenje s fludarabinom je bilo prav zaradi teh sprememb tako neuspešno.

Pri šestih preiskovancih (*Tabela X*: pacienti 2, 3, 4, 6, 10, 11) smo v eksonu 4 ugotovili polimorfizem rs1042522. Velja za najpogostejšo spremembo, mutacijo s spremenjenim pomenom (missense). Na podlagi baze podatkov o mutacijah v *TP53* je sprememba verjetno povezana z benignim kliničnim potekom in Li-Fraumeni-jevim sindromom (LFS) (34). Napovedni pomen ob prisotnosti te spremembe torej ostaja nespremenjen. Le pri enem od preiskovancev (*Tabela X*: pacient 1) v eksonu 10 nismo določili naravnega polimorfizma rs2856755 (35, 36). Pri vseh preiskovancih smo v eksonu 10 ugotovili polimorfizem rs2856754 (32, 33). Pomen obeh navedenih klinično ni pomemben, saj gre za spremembo v intronu.

Pri pacientu 1 je bila določena prisotnost trisomije 12. Kot samostojna sprememba je napovedno vmesna (6). Ker mutacije v genu *TP53* pri tem pacientu nismo našli, ostaja napovedni pomen vmesen. Pacienta se redno spremlja.

Pri pacientu 2 niso bile ugotovljene citogenetske spremembe. Mutacij v genu *TP53* nismo našli. Napovedni pomen za normalen kariotip je vmesen (6). Po mutacijski analizi gena *TP53* se tako napovedni pomen ni spremenil.

Pri pacientu 3 je bila določena del(11q), ki je napovedno neugodna (6). Z mutacijsko analizo gena *TP53* smo določili polimorfizme v eksonih 4 in 10. Pomen vseh treh ni jasen oziroma je nepatogen. Napovedni pomen torej ostaja neugoden zaradi prisotnosti delecije gena *ATM*.

Pri pacientu 4 je bila s FISH preiskavo določena del(13q). Kot samostojna sprememba je napovedno ugodna (6). Pomen določenih polimorfizmov v eksonih 4 in 10 gena *TP53* ni poznan. Napovedni pomen za bolnika torej ostaja ugoden.

Pri pacientu 7 so predhodno določili del(13q), del(11q) in del(17p), največji je bil klon z del(11q). Prisotna je bila tudi preureditev gena *IGH* in delno izražanje molekule CD38. Vse izpostavljene spremembe so vključno s kompleksno preurejenim kariotipom napovedno zelo neugodne (6). Pacient je bil zdravljen z različnimi kombinacijami zdravil. Neuspešnost zdravljenja pripisujemo neugodnim genetskim spremembam. Spremembe v genu *TP53* so lahko posledica zdravljenja, torej sekundarna sprememba (12, 23, 24).

Pri pacientu 8 je bila ugotovljena prisotnost del(13q). Kot samostojna sprememba je sicer napovedno ugodna (6), vendar pa spremljajoča del(17p) napoved popolnoma spremeni. Del(17p) je tudi razlog za neuspešno zdravljenje s fludarabinom, saj so ti pacienti nanj neodzivni (23). Z mutacijsko analizo gena *TP53* smo ugotovili tiho mutacijo v eksonu 5+6, ki pa naj bi bila klinično nepomembna.

Pri pacientu 9 so predhodno določili prisotnost del(13q) in del(17p). Zaznali so tudi izražanje CD38. Omenjene spremembe so skupno napovedno neugodne. Del(17p) je namreč kot samostojna sprememba ali v kombinaciji vedno napovedno zelo neugodna (12, 19, 23). Izražanje CD38 je značilno povezano z aktivno, agresivno potekajočo boleznijo (7, 14). Z mutacijsko analizo smo določili polimorfizme v eksonu 10, katerih pomen je neznan. Napoved poteka bolezni je neugodna zaradi del(17p).

Pri pacientu 10 so določili prisotnost del(13q), del(11q) in del(17p). Določeni polimorfizmi v genu *TP53* so klinično nepomembni. Zdravljenje pri pacientki od postavitve diagnoze leta 2012 še ni bilo uvedeno. Ob nastopu aktivne bolezni se odsvetuje zdravljenje s fludarabinom, ker so pacienti s prisotnimi spremembami v kromosomu 17 neodzivni nanj. Po selekcijski teoriji pa je zdravljenje tudi eden izmed vodilnih elementov za ekspanzijo klona celic in pojav dodatnih sprememb, vključno z mutacijami v genu *TP53* (12, 23, 24).

Pri pacientu 11 je bila postavljena diagnoza atipične KLL. V mutacijsko analizo smo ga vključili zaradi prisotnih sprememb v kromosomih 11, 13 in 17. Pri tem bolniku je bil vzorec

vzet z antikoagulantom heparin. Preveriti smo namreč želeli vpliv drugega antikoagulanta na uspešnost pomnoževanja v (sekvenčni) reakciji PCR. Pri izvedbi nismo imeli nobenih težav. Določili smo le omenjene polimorfizme v eksonih 4 in 10, katerih pomen je neznan.

Po naših pričakovanjih mutacije v genu *TP53* pri pacientih brez del(17p) nismo našli. Pri tistih z del(17p), kjer smo ugotovili prisotnost določenih mutacij, pa se napovedni pomen ni spremenil. Prav zato pri bolnikih, pri katerih s hitrejšo in cenejšo FISH preiskavo določimo del(17p), mutacijska analiza gena *TP53* nima smisla. Mi smo jo izvajali pri teh bolnikih predvsem zato, da bi pri postavitvi metode katero od mutacij tudi določili. Ta analiza pa je zelo pomembna za bolnike, kjer bi zaradi prisotnosti mutacije v genu *TP53* prišlo do spremembe napovednega pomena. Tako bi lahko potrebo po uvedbi zdravljenja in agresivnejši potek bolezni pripisali prisotnosti mutacij v genu *TP53*. Pacienti s prisotno del(17p) in / ali mutacijo v *TP53* so praviloma odporni na zdravljenje s fludarabinom. Uvedba mutacijske analize *TP53* v rutinsko delo oziroma klinično prakso je smiselna prav zaradi odločanja o izbire ustreznega zdravljenja (23).

5. SKLEP

- ❖ Iz limfocitov B (velikost klona s KLL nad 15%) smo izolirali DNA in dosegli ustrezno občutljivost sekvencioniranja gena *TP53* po Sanger-ju.
- ❖ Uspešno smo optimizirali vse pogoje - koncentracijo matrične DNA, koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov, temperaturni in časovni profil pomnoževanja gena *TP53* v (sekvenčni) reakciji PCR.
- ❖ Postavili smo enak protokol za pomnoževanje gena *TP53* za vsak posamezen ekson (od 4-10) in skupno (ex5+6, ex8+9).
- ❖ Vrsta antikoagulanta (EDTA ali heparin) pri odvzemu vzorca ni imela vpliva na pomnoževanje gena *TP53*.
- ❖ Gen *TP53* smo sekvencionirali pri 11-ih bolnikih in našli naslednje:
 - Polimorfizmi:
 - o Pri šestih preiskovancih (pacienti 2, 3, 4, 6, 10, 11) smo v eksonu 4 ugotovili polimorfizem rs1042522.
 - o Le pri enem od preiskovancev (pacient 1) v eksonu 10 nismo določili naravnega polimorfizma rs2856755.
 - o Pri vseh preiskovancih smo v eksonu 10 ugotovili polimorfizem rs2856754.
 - Mutacije:
 - o Pri pacientu 5 smo v eksonu 7 na mestu kodona 248 ugotovili eno izmed najpogostejše pojavljajočih »hot spot« mutacij.
 - o Pri pacientu 6 smo v eksonu 10 ugotovili mutacijo, katere posledica je zamenjava AK ter zmanjšana aktivnost p53.
 - o Mutacije v genu *TP53* pri pacientih brez del(17p) nismo našli.
- ❖ Metodo za določanje mutacij v genu *TP53* smo vpeljali v redne preiskave laboratorija. Pripomogla bo k celovitejši obravnavi pacientov s KLL, kot v pomoč pri napovedovanju poteka bolezni in pri odločanju glede izbire zdravljenja.

6. LITERATURA

1. Hallek M: Chronic lymphocytic leukemia: Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* 2015; 90: 446-60.
2. Uptodate: Pathologic features, diagnosis, and differential diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. Dostopno na: http://www.uptodate.com/contents/pathologic-features-diagnosis-and-differential-diagnosis-of-chronic-lymphocytic-leukemia?source=search_result&search=chronic+lymphocytic+leukemia&selectedTitle=5~150 [online julij 2014].
3. Uptodate: Pathophysiology and genetic features of chronic lymphocytic leukemia. Dostopno na: http://www.uptodate.com/contents/pathophysiology-and-genetic-features-of-chronic-lymphocytic-leukemia?source=search_result&search=chronic+lymphocytic+leukemia&selectedTitle=7~150 [online julij 2014].
4. Podgornik H, Gržinič N, Černelč P: Kronična limfatična levkemija. *Farm Vestn* 2013; 64: 354–62.
5. Zver S: Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične limfatične levkemije. *Zdrav Vestn* 2010; 79: 465-74.
6. Puiggros A, Blanco G, Espinet B: Genetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia: Where We Are and Where We Go. *Biomed Res Int* 2014; 435983.
7. Uptodate: Staging and prognosis of chronic lymphocytic leukemia. Dostopno na: http://www.uptodate.com/contents/staging-and-prognosis-of-chronic-lymphocytic-leukemia?source=search_result&search=chronic+lymphocytic+leukemia&selectedTitle=1~150 [online julij 2014].
8. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, et al.: Disruption of *BIRC3* associates with fludarabine chemorefractoriness in *TP53* wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; 119: 2854-62.
9. Quijano S, López A, Rasillo A, et al.: Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-Cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry Part B* 2008; 74B: 139-49.

10. Villalona-Calero MA, Duan W: MDM2 (transformed mouse 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2007; 11: 102-4.
11. Balatti V, Yuri Pekarky Y, Croce CM: Role of microRNA in chronic lymphocytic leukemia onset and progression. *J Hematol Oncol*. 2015; 8: 12.
12. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, et al.: Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* 2009; 114: 5307-14.
13. Delgado J, Salaverria I, Baumann T, et al.: Genomic complexity and IGHV mutational status are key predictors of outcome of chronic lymphocytic leukemia patients with TP53 disruption. *Haematologica* 2014; 99: 231-34.
14. Le Garff-Tavernier M, Blons H, Nguyen-Khac F, et al.: Functional assessment of p53 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J*. 2011; 1: 5.
15. Cramer P, Hallek M: Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia—what do we need to know?. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 38-47.
16. IgVH Mutation Analysis in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL).
Dostopno na:
<https://www.labcorp.com/wps/wcm/connect/IntOncologyLib/integratedoncology/home/our+services/oncology+testing/igvh-mutation-analysis-b-cll> [online 8.7.2015].
17. European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute: P53.
Dostopno na: <http://pfam.xfam.org/family/PF08563#tabview=tab0> [online 25.1.2015].
18. Pospisilova S, Gonzales D, Malcikova J, et al.: ERIC (European Research Initiative on CLL) recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012; 26: 1458-61.
19. Marinelli M, Peragine N, Di Maio V, et al.: Identification of molecular and functional patterns of p53 alterations in chronic lymphocytic leukemia patients in different phases of the disease. *Haematologica* 2013; 98: 371-75.
20. Park BH, Vogelstein B. The p53 Gene. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12826/>.
21. Duke University Health System. Clinical Molecular Diagnostics Laboratory: TP53 Targeted Mutation Analysis. Dostopno na:

<http://dukemolecular.duhs.duke.edu/TemplateTest.aspx?ID=10024&MenuItem=5>
[online 10.2.2015].

22. Kato S, Han SY, Liu W, et al.: Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. PNAS 2003; 100: 8424-29.
23. Malcikova J, Pavlova S, Kozubik KS, Pospisilova S: TP53 Mutation Analysis in Clinical Practice: Lessons From Chronic Lymphocytic Leukemia. Hum Mutat 2014; 35: 663-71.
24. Rossi D, Khiabani H, Spina V, et al.: Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2014; 123: 2139-47.
25. Forconi F: Three years of ibrutinib in CLL. Blood 2015; 125(16): 2455-56.
26. IARC protocol (2010 update): Detection of TP53 mutations by direct sequencing. Dostopno na: http://p53.iarc.fr/Download/TP53_DirectSequencing_IARC.pdf [online april 2014].
27. GE Healthcare Life Sciences: Isolation of mononuclear cells. Methodology and applications. Dostopno na: http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1353593752833/litdoc18115269_20140821224501.pdf [online 26.5.2015].
28. 260/280 and 260/230 Ratios. Dostopno na: <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf> [online 8.7.2015].
29. QIAGEN: PCR Protocols & Applications. Dostopno na: <https://www.qiagen.com/si/resources/molecular-biology-methods/pcr/> [online 26.5.2015].
30. Applied Biosystems Chemistry Guide (Second Edition): DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. Dostopno na: https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041003.pdf [online 26.5.2015].
31. Obenrader S: The Sanger Method. Dostopno na: http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Obenrader/sanger_method_page.htm [online 26.5.2015].

32. NCBI dbSNP: Rs2856754. Dostopno na:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs2856754 [online 10.2.2015].
33. GeneCards: Tumor Protein P53. Dostopno na: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TP53&snp=2063#snp> [online 10.2.2015].
34. NCBI dbSNP: Rs 1042522. Dostopno na:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1042522 [online 10.2.2015].
35. GeneCards: Tumor Protein P53. Dostopno na: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TP53&snp=2063#snp> [online 10.2.2015].
36. Life technologies corporation: Rs2856755. Dostopno na:
http://www.lifetechnologies.com/order/genome-database/details/genotyping/C__16075659_20 [online 10.2.2015].
37. DUFOUR et al: TP53 abnormalities in previously treated CLL. Dostopno na:
<http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/suppl/2013/03/22/blood-2012-10-458695.DC1/blood-2012-10-458695-1.pdf?sso-checked=true> [online 10.2.2015].
38. NCBI ClinVar: NM_000546.5(TP53):c.1009C>T. (p.Arg337Cys). Dostopno na:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/142536/> [online 10.2.2015].
39. NCBI: NM_000546.5(TP53):c.639A>G (p.Arg213=). Dostopno na:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/43591/> [online 10.2.2015].