

Somatiske *TP53*-mutasjoner i brystkreft

Kamilla Haug Dahl



Prosjektoppgave medisinsk fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

07.03.2014

Somatiske *TP53*-mutasjoner i brystkreft

© Forfatter

2014

Somatiske *TP53*-mutasjoner i brystkreft

Kamilla Haug Dahl

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

Abstract

Somatiske *TP53*-mutasjoner i brystkreft

Background: Mutations in tumor suppressor genes may facilitate malignant transformation of cells. A *TP53* mutation is the most common genetic alteration in breast cancer, and is found in approximately 25 % of breast tumors. A *TP53* mutation is shown to be an independent prognostic marker in breast cancer. Recent research indicates that *TP53* is mutated in a subtype specific manner, implying diverse roles in tumor development and progression.

Objective: The purpose of this study was to examine tumor tissue for mutations in the *TP53* gene through direct sequencing.

Materials and methods: Tissue samples collected perioperatively from 152 primary breast tumors were analyzed for *TP53* point mutations through direct sequencing with 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems.

Results: Exons 4 and 7 were sequenced and found to harbor four and nine mutations respectively. All mutations found were point mutations with single base substitutions, 11 missense, one nonsense and one silent.

Conclusion: All mutations that were found were previously described in the IARC database. The remaining exons must be sequenced to consider the clinical impact of *TP53*-mutations in the material.

Forord

Jeg vil takke min veileder Vessela for å ha gitt meg muligheten til å gjennomføre dette prosjektet. Jeg vil også takke Torben og Helene for opplæring og hjelp underveis, Jovana for hjelp til å lese sekvensene, og til Aina, Tove og Anna som har hjulpet meg med feilsøking.

Oslo 06.03.2014 Kamilla Haug Dahl

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Mutasjon	1
1.2	Proto-onkogener og tumor-suppressorer	2
1.3	Kromosomale endringer og kreftutvikling	2
1.4	Villtype p53 induserer cellesyklusarrest og apoptose	3
1.4.1	Funksjonelt villtype p53 har en beskyttende effekt mot kreft.....	3
1.4.2	Onkogene egenskaper?.....	4
1.5	P53-mutasjoner er ulikt fordelt i subtyper av brystkreft.....	4
1.6	Klassifisering av mutasjoner	5
1.7	TP53-mutasjoner og behandlingsrespons	5
1.8	Polymorfismer	7
1.9	TP53-database	7
2	Materiale og metode.....	8
2.1	Bakgrunn PCR.....	8
2.2	Bakgrunn sekvensering.....	9
2.3	PCR.....	9
2.3.1	Kontroll av PCR-produkter med elektroforese	11
2.3.2	Rensing av PCR-produkter.....	12
2.4	Sekvensering.....	12
2.4.1	Rensing.....	13
2.4.2	Sekvensator	13
2.5	Avlesing.....	14
3	Resultater.....	15
3.1	PCR.....	15
3.2	Sekvensering.....	15
4	Diskusjon.....	17
4.1	Funn	17
4.2	Valg av metode	17
4.3	Feilkilder PCR	18
4.4	Feilkilder sekvensering.....	18
4.5	Anvendelse av resultatene	20

5	Konklusjon	21
	Litteraturliste	22
Tabell 1:	Primere	10
Tabell 2:	PCR-mix for ekson 4.....	10
Tabell 3:	PCR-mix for ekson 7.....	11
Tabell 4:	Sekvenseringsmix for genspesifikk primer, ekson 4.....	12
Tabell 5:	Sekvensering ekson 4.....	12
Tabell 6:	Sekvenseringsmix ekson 7	13
Tabell 7:	Sekvenseringsprogram ekson 7	13
Tabell 8:	Oversikt mutasjoner	27

1 Introduksjon

Brystkreft er den hyppigste kreftformen blant kvinner i Norge. Klinisk og med tanke på valg av adjuvant behandling skiller man mellom tre typer. Østrogenfølsomme svulster uttrykker østrogen- og eller progesteronreseptor og responderer ofte på endokrin behandling. Svulster som uttrykker tyrosin-kinase-reseptoren her2 behandles med antistoffer mot denne. En tredje gruppe er de trippelnegative, som ikke mottar vekstsignaler gjennom noen av ovennevnte reseptorene. Foreløpig har man ingen skreddersydd behandling for disse svulstene, og standard adjuvant behandling er kjemoterapi (1).

Kreft er et resultat av akkumulerte mutasjoner som påvirker sentrale kontrollmekanismer i cellene, og kan føre til ukontrollert proliferasjon av celler som kan invadere omliggende vev og spre seg til andre organer. Et gen som ofte er mutert på tvers av krefttyper er *TP53*, som koder for proteinet p53 (2). Ved undersøkelse av brystkreftsvulster er det funnet rundt *TP53*-mutasjoner i rundt 25 % av tilfellene, og dette er det hyppigst muterte genet (3). En mutasjon i *TP53* i tumorvev har vist seg å være en uavhengig prognostisk faktor for overlevelse på linje med trippelnegativitet, tumorstørrelse og lymfeknutestatus (4). I en gjennomgang av et større materiale fant Olivier og kolleger at dødeligheten etter kirurgi over en 10-årsperiode var 2,27 ganger høyere blant kvinner hvis tumor hadde en *TP53* mutasjon i ekson 5-8 (5).

Mitt mål for prosjektoppgaven var å lære mer om p53 og hvilken betydning det har for brystkreft, og anvende en analysemetode. I denne oppgaven ville jeg se på forekomsten av somatiske *TP53*-mutasjoner i et tumormateriale fra Akershus Universitetssykehus. Målet var å kunne sekvensere ekson 2-11 og hadde til hensikt å utforske forholdet mellom punktmutasjoner og kliniske variabler som overlevelse og histologi.

1.1 Mutasjon

En mutasjon er en endring i den genetiske koden, og omfatter alt fra utskifting eller tap av et enkelt nukleotid i baserekkefølgen, til translokasjon eller sletting på kromosomnivå.

Mutasjoner er tilfeldige, uunngåelige hendelser i prosessen der cellen dobler hele arvematerialet og fordeler seg på to. Endringen kan føre til at proteinene som genet koder får andre egenskaper, og dette er noe av opphavet til genetisk variasjon (6). Hver gang et gen replikeres vil det kunne oppstå feil. En mutasjon kan også være resultat av en ytre påvirkning,

som for eksempel stråling. Cellene har mekanismer for å gjenkjenne og reparere feil som oppstår, eventuelt programmere sin egen død (apoptose) dersom skaden er uopprettelig. Mutasjoner i gener som regulerer vekst og apoptose er sentrale, da en forutsetning for kreftutvikling er at muterte celler unngår reparasjon og/eller apoptose, og kan overføre sine egenskaper til neste cellegenerasjon .

1.2 Proto-onkogener og tumor-suppressorer

Et proto-onkogen er et protein med malignt potensiale, som er involvert i blant annet vekstsignaler og intracellulære signalveier. Mutasjoner kan øke aktiviteten og således stimulere til økt celledeling. Et eksempel på dette er amplifisering av genet *ERBB2* som koder for her2-reseptoren, som fører til at cellen uttrykker flere reseptorer på overflaten og gjør cellen mer sensitiv for vekstsignaler. En tumor-suppressor har i motsetning til proto-onkogenene gjerne veksthemmende egenskaper, blant annet ved kontrollfunksjoner og reparasjon og eventuell apoptose. Bortfall av slike kontrollmekanismer legger til rette for at muterte celler kan vokse og dele seg (7). Et eksempel på dette er genet *BRCA1* som er assosiert med arvelig brystkreft. *BRCA1* koder blant annet for p220, et protein som er involvert i DNA-reparasjon (8). En medfødt *BRCA1*-mutasjon disponerer for brystkreft.

1.3 Kromosomale endringer og kreftutvikling

Ved bruk av ulike cytogenetiske teknikker kan man studere hvilke gener som kommer til uttrykk i en svulst, altså hvilke gener som aktiveres og lages proteiner av. Med såkalt komparativ genomisk hybridisering (CGH) kan tumorvev sammenlignes med annet vev fra pasienten for å kartlegge eventuelle delesjoner og amplifikasjoner av hele eller deler av kromosomer. I en gjennomgang av et større materiale av brystkreftsvulster ble det funnet tilbakevendende økninger og tap av loci for kjente proto-onkogener eller tumor-suppressorgener, eksempelvis amplifikasjon av *ERBB2*-genet (9). Ulike kromosomale endringer er antagelig helt sentrale i kreftutvikling. I 1991 fant Roylance og kolleger at 65 % av undersøkte DCIS-tilfeller grad I hadde delesjon av den lange armen av kromosom 16, i motsetning til 16 % av grad III. Dette ble brukt for å understøtte at svulster har ulik patogenese, og ikke progredierer fra grad I (10). Videre er det påvist sammenheng mellom ulike kromosomalerasjoner og type, histologi, prognose og Tamoxifenrespons (11) (12). Delesjon av den korte armen på kromosom 17 observeres ofte i lavgradige, østrogenpositive

svulster, men sjelden i basal-lignende, normal-lignende og her2+ svulster (13), og understøtter teorien om at brystkreft oppstår gjennom ulike mekanismer.

1.4 Villtype p53 induserer cellesyklusarrest og apoptose

Proteinet p53 er en transkripsjonsfaktor som aktiveres ved DNA-skade (14). I 1984 observerte Maltzman og kolleger en rask stigning i p53-nivået når de utsatte celler fra mus for stråling (15). Den reaktive økningen i p53 ble senere koblet til stans i første fase av cellesyklus (16). Nivået av p53 i celler er vanligvis lavt. Dette reguleres gjennom negativ tilbakekobling, da p53 ved aktivering samtidig induserer transkripsjon av MDM2, et protein som bidrar til stabilisering og degradering av p53 (17, 18). P53 aktiveres via ulike mekanismer som er følsomme for blant annet brudd på DNA-tråden, UV-stråling og kjemoterapi (14). Kern fant at p53 kunne binde seg til spesifikke DNA-sekvenser, og at punktmutasjoner kunne hindre denne bindingen (19). p53 utøver sin funksjon gjennom transkripsjon av et sett gener som fører til cellesyklusarrest og reparasjon, blant annet proteinet p21 (20). Dersom skaden ikke er til å reparere kan cellen inaktiveres slik at den ikke responderer på vekstsignaler utenfra, G0-fase eller såkalt *cellular senescence* (21). Cellen slutter å vokse og dele seg, og biologisk ligner denne tilstanden på aldring som ved forkortede telomerer. Prosessen kalles SIPS, stress-induced premature aging. Alternativet er programmert celledød, apoptose. P53 oppregulerer ulike proapoptotiske gener (22) og nedregulerer gener som motvirker apoptose (23, 24). Hvordan cellens skjebne avgjøres er fortsatt uklart. Villtype p53 synes å være en forutsetning for noen former for programmert celledød, særlig når cellene utsettes for ioniserende stråling (25). I følge Marzayans og kolleger viser derimot eksperimenter at villtype p53 ofte responderer med SIPS på denne type eksponering (26). Disse egenskapene har gitt p53 tilnavnet genomets vokter (27).

1.4.1 Funksjonelt villtype p53 har en beskyttende effekt mot kreft

I 92 viste Donehower og kolleger at mus som er homozygot for nullallel av p53 er mer utsatt for sporadiske krefttilfeller. Over 70 % av musene utviklet kreft i løpet av seks måneder, i motsetning til ingen i gruppen blant mus med villtypealleler (28). p53 utøver en forebyggende effekt ved å reparere eller sette muterte celler ut av spill. På et senere stadium i kreftutviklingen tenker man at p53 kan hindre akkumulering av mutasjoner og overgang til en

invasiv type (29). p53 kan inaktiveres gjennom forskjellige mekanismer. Et allel kan være mutert eller slettet på stamcellenivå, og mutasjonen nedarves fra mor eller far. Dette gir et klinisk bilde svarende til Li-Fraumeni syndrom, en sjelden tilstand som disponerer for karsinomer og sarkomer i ung alder (30). Knudson introduserte i 1971 den såkalte two-hit hypotesen, som går ut på at tumor suppressorgener inaktiveres i to omganger, først ved mutasjon i det ene allelet, etterfulgt av delesjon av det gjenværende allelet (31). En person som er født med et mutert allel har bare et å gå på, og p53 vil kunne inaktiveres allerede etter første «hit». Ved undersøkelse av svulster fra pasienter med familiær belastning fant man derimot at begge allelene var affisert i under halvparten av tilfellene (32), noe som tyder på at kreft kan utvikle seg selv til tross for et gjenværende villtypeallel. Forsøk med knock-out mus viste at mus som var heterozygot for villtypeallel kom ut et sted midt i mellom de som var homozygote for enten nullallel eller villtypeallel. Dette kan tyde på en doseeffekt, eller såkalt haploinsuffisiens, at man er avhengig av to villtypealleler for optimal funksjon (33). Thymocytter med et nullallel går i færre tilfeller i apoptose når de utsettes for ioniserende stråling enn thymocytter med to villtypealleler (34).

1.4.2 Onkogene egenskaper?

Det er vist at et mutert allel kan ødelegge for det gjenværende villtypeallelet, blant annet gjennom å forstyrre signalveier for aktivering. Dette er et eksempel på dominant negativ effekt (35). p53 opererer i form av en tetramer, og i konfigurasjoner der mutante proteiner inngår, kan for eksempel evnen til DNA-binding være nedsatt (29). Mutert p53 er koblet til oppregulering av MDR-1 proteinet, et overflateprotein som pumper fremmede stoffer ut av cellen, og kan forårsake manglende respons på kjemoterapi (36) (37). Funnene er eksperimentelle, og med tanke på utvikling av kreft er spontane mutasjoner og tap av evnen til å regulere transkripsjon det sentrale (29).

1.5 P53-mutasjoner er ulikt fordelt i subtyper av brystkreft

Brystkreft kategoriseres i fem undergrupper ut ifra mønstre i genekspressjon. Disse er østrogenreseptor positive som deles inn i luminal A og B, her2 positive, basallignende og normal-lignende (38). Forekomsten av *TP53* mutasjoner er høyest i basal-lignende og her2+ type svulster med mutasjoner i henholdsvis 80 og 70 %, og var assosiert med flere høygradige

svulster i et større materiale (39). Luminal A type har den laveste forekomsten av *TP53* mutasjoner med ca. 10 % (40). *TP53* mutasjon er uavhengig prognostisk markør, og det er ikke funnet signifikant sammenheng mellom spesifikke mutasjoner og overlevelse (5).

1.6 Klassifisering av mutasjoner

TP53-mutasjonene som observeres i brystkreft er overveiende punktmutasjoner i form av enkeltbasesubstitusjoner, etterfulgt av delesjoner og insersjoner (39). En *stille* mutasjon er en mutasjon som ikke fører til endring i aminosyren det kodes for. Ved en missense-mutasjon fører baseendringen til utskifting av en aminosyre. Eventuelle konsekvenser for proteinets funksjon avhenger av hvilken aminosyre som innføres. Dersom endringen skulle føre til et stoppkodon og terminering er det snakk om en nonsense-mutasjon. Andre eksempler på mutasjoner er delesjoner eller insersjoner av nukleotid(er), som kan tilføye eller fjerne aminosyrer, eventuelt forskyve leserammen. Mutasjoner i introner kan påvirke den post-translasjonelle foldingen av proteinet (5).

Hvor en missense-mutasjon er lokalisert, kan si noe om hvordan det påvirker proteinets funksjon. De fleste kjente missense-mutasjonene i *TP53*, vel 80 % i et større materiale, ligger innenfor sekvensen som koder for det DNA-bindende området, ekson 5-8 (39). Enkelte kodon er hyppigere gjenstand for mutasjoner og utgjør såkalte 'hot spots'. Sju av disse er hyppig observert i kreft, og assosiert med tap av den genregulerende aktivitet (29).

Mutasjoner i området som koder for bindingsstedet for sink skiller ofte ut som en egen gruppe, og er assosiert med dårlig prognose og behandlingsrespons (41). Frameshift-mutasjoner forekommer på tvers av eksonene og fører ofte til trunkering av proteinet (39).

1.7 *TP53*-mutasjoner og behandlingsrespons

På grunn av mutasjoner i sentrale kontroll- og reparasjonsmekanismer har kreftceller nedsatt evne til å reparere skader som oppstår på DNA og celleapparat, og dette er angrepspunktet for strålebehandling og kjemoterapi. Celler i en kreftsvulst vil i mindre grad enn normale celler tolerere gjentatt eksponering og DNA-skade, og dette fører til celledød i kreftsvulsten. p53 synes å være nødvendig for effektiv apoptoseinduksjon ved ulike typer kreftbehandling (42).

Kombinasjonsterapi med Fluoracil, Epirubicin og Cyclofosfamid (FEC) og antracycliner er mye brukt i behandling av brystkreft. Dette fører til kryssbinding og brudd på DNA-tråden, en skade som typisk fører til aktivering av p53 (43).

Lowe og kolleger undersøkte sammenhengen mellom p53-status i tumor og behandlingsrespons hos mus. Behandlingen som ble gitt var stråling eller kjemoterapi i form av Adriamycin, som begge fører til DNA-skade. I svulster som uttrykte p53 ble det observert en høy andel apoptotiske celler og regress av tumor. Svulster som ikke uttrykte p53 fortsatte derimot å vokse, og gikk i liten grad i apoptose (44).

Undersøkelse av pasientdata har gitt motstridene resultater. Geisler og kolleger fant sammenheng mellom spesifikke *TP53*-mutasjoner og dårligere respons på ulike typer kjemoterapi (45). En annen studie finner at *TP53* mutasjon var assosiert med dårligere respons, uavhengig av lokalisasjon (46). I en annen studie finnes ingen signifikant assosiasjon mellom *TP53* mutasjon og respons på kjemoterapi, men klar assosiasjon til Tamoxifenrespons. To undergrupper skilte seg ut med dårligst respons på Tamoxifen; svulster med mutasjon i det DNA-bindende området eller i området som koder for sinkbinding (47). Dette er det samme området som knyttes til dårlig respons på kjemoterapi i studien til Geisler (45).

En studie viste økt effekt av Paclitaxel på svulster med mutert p53 (46). Paclitaxel er et taxan, en gruppe kjemoterapi som virker på celletubuli, rammeverket i cellen, og fører til apoptose i forbindelse med delingsfasen i cellyklus (48). Den potensiende effekten av p53-mutasjon kan bero på bortfall av sjekkpunktet i G1-fase, som fører til at flere cellene går over i M-fase, der Paclitaxel virker (49).

En studie fra 1995 viste at postoperativ strålebehandling førte til lengre residivfritt intervall og økt overlevelse i svulster med mutert p53, i motsetning til svulster med villtype (50). I et annet materiale hadde stråleterapi tilsynelatende liten effekt på svulster med p53-mutasjon (47).

I en litteraturgjennomgang fra 2000 antydes det at ulike metoder for kartlegging av p53-status kan være noe av årsaken til motstridene funn. Flertallet av studiene som ikke fant noen sammenheng mellom p53 og behandlingsrespons var basert på immunhistokjemi, en metode som detekterer ekspresjonsnivået av p53 i tumor. Ikke alle mutasjoner fører til akkumulering

eller redusert mengde p53, til tross for effekt på proteinets funksjon (51). Ti år senere er det fortsatt ikke konsensus, og det etterlyses studier mer med homogene pasientpopulasjoner og behandlingsregimer (49).

1.8 Polymorfismer

Polymorfismer er genetiske varianter, medfødte avvik som forekommer i minst 1 % av befolkningen. Den enkleste formen er enkeltbasesubstitusjoner, *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)* (52). Den mest kjente for *TP53* er på kodon 72, der arginin i mange tilfeller erstattes med prolin. Eksperimenter har demonstrert forskjeller på de to variantene, og at p53 med arginin i 72.posisjon har bedre evne til apoptoseinduksjon og transkripsjonsaktivitet enn p53 med prolin (53, 54). Det er forsket på en mulig sammenheng mellom denne polymorfismen og ulike krefttyper. En metaanalyse fra 2013 finner ingen assosiasjon mellom økt bryskreftrisiko og homo- eller heterozygotitet for polymorfismen på kodon 72 (55).

1.9 TP53-database

Det er utformet databaser med oversikt over ulike mutasjoner og polymorfismer som er funnet i *TP53*, og i denne oppgaven bruker jeg IARC-databasen (56). Eksperimenter på både gjærceller og humane celler brukes til å undersøke hvordan ulike mutasjoner påvirker proteinet, og ser på blant annet evne til apoptoseinduksjon, cellesyklusarrest og transkripsjonsaktivitet, og om det utøver en dominant effekt over villtypeallelet. Man kan bruke dette til å si noe om i hvilken grad mutasjonen er funksjonell. Klassifiseringen i databasen er basert på publiserte studier av dette (57-59).

2 Materiale og metode

Materialet som er undersøkt er frysesnitt tatt perioperativt fra primære brystsvulster, innhentet i forbindelse med en pågående studie, og består av totalt 154 prøver, hvorav 152 var tilgjengelig. En kollega har på et tidligere tidspunkt isolert DNA fra vevsprøvene ved hjelp av TriReagent(60) og DNeasy spinnkolonner(61). Dette vil bli omtalt som DNA-templat. Parallelt foreligger histologiske data og opplysninger om operasjonsmetode, behandling, eventuelle metastaser og 5-års overlevelse på de aller fleste.

2.1 Bakgrunn PCR

Polymerase Chain Reaction er teknikk for å isolere og amplifisere et DNA-segment av interesse. Man trenger et sett med primere, et kort nukleotidsekvens som er komplementær med det aktuelle DNA-området. DNA transkriberes fra 5' til 3' posisjon, og man trenger en primer som sekvenser i hver retning, forward og reverse. Reaksjonsmiksen består av primer for det aktuelle eksonet, frie nukleotider som byggesteiner og en varmestabil DNA-polymerase. Prosessen består av tre trinn som gjentas, denaturering, hybridisering og polymerisering. I denatureringsfasen varmes blandingen opp til ca. 95 °C slik at DNA-heliksen kveiles ut og hydrogenbindingene mellom nukleotidene spaltes. DNA vil da foreligge som to separate tråder. I neste fase, hybridiseringsfasen, kjøles blandingen ned til ca. 60 °C, avhengig av lengden på og optimumtemperatur for primerne, og primerne fester seg til sine komplementærsekvenser. I polymeriseringsfasen økes temperaturen til ca. 72 °C, som er optimal temperatur for Taq-polymerasen, og DNA syntetiseres fra den frie 3'OH-enden. Disse syklusene gjentas et gitt antall ganger, og fører til massiv amplifikasjon av det ønskede segmentet (62). Etter siste syklus holdes temperaturen på 72 °C i ti minutter. PCR-reaksjonen er avhengig at det er tilstrekkelig primer og nukleotider i blandingen i forhold til templatkonsentrasjonen. Misforhold mellom komponentene er derfor en viktig feilkilde. Metoden kontrolleres ved hjelp av en positiv kontroll i form av humant DNA med kjent konsentrasjon og en negativ kontroll med dH₂O.

Lengden på PCR-produktene kontrolleres ved hjelp av gelelektroforese. Størrelsen vurderes opp mot en DNA-markør med kjente båndstørrelser. Produktlengde er angitt på primersertifikat.

2.2 Bakgrunn sekvensering

Direkte sekvensering er basert på *dideoxynucleotide chain termination*, eller Sanger-metoden (63). Dette er en DNA-syntesereaksjon som tilsettes dideoxynukleotider, der OH-gruppen på 3'karbon som er bindingsstedet for neste nukleotid er erstattet av en H₂-gruppe. Når en ddNTP fester seg vil transkripsjonen stoppe. Man ender opp med tusenvis av sekvenser av ulik lengde, og ved hjelp av elektroforese kan man bestemme posisjonen til de ulike basene. Merking av ddNTPene med forskjellige fluorescerende farger gjør baserekkefølgen kan leses av fortløpende (63).

Sekvensatoren som ble benyttet (3130x/Genetic Analyzer, Applied Biosystems) baserer seg på dette prinsippet kombinert med kapillær elektroforese.

En forutsetning for sekvensering er at produktene renses for overflødige nukleotider og primere, da disse kan hindre reaksjonen. Det finnes ulike teknikker, herunder fysisk filtrasjon gjennom plater/rør der kun molekyler av en viss størrelse slipper gjennom, alternativt tilsetning av hydrolytiske enzymer.

I reaksjonsmiksen for sekvensering inngår polymerase, fluorescinfargede dideoxynukleotider og en buffer. Før prøvene settes på sekvensatoren må DNA renses og konsentreres. Felling med etanol eller isopropanol baserer seg på at DNA og salter er vannløselige, og vil krystallisere og felles ut når løsningen tilsettes etanol. Når løsningen sentrifugeres vil det utfelte DNA samles i en pellet i bunnen.

Sekvensering ble gjort med utgangspunkt i to protokoller, *Detection of TP53 mutations by direct sequencing, IARC 2010* og *Resequencing of the TP53 gene on ABI 3730 DNA Analyzer*, utarbeidet av Vu, Due og Frøyland ved Radiumhospitalet.

2.3 PCR

Primerne som ble brukt for ekson 4 var basert på IARC-protokollen, 20 baser. For ekson 7 ble det brukt en primer med såkalt «hale», eller forlengelse av selve primersekvensen. Ved å bruke primere med haler kan man kjøre en felles sekvenseringsreaksjon for forward og reverse, eventuelt flere sekvenser om man vil, i motsetning til ved genspesifikke primere. Ekson 7 ble derfor sekvensert med dertil egnede primere som beskrevet i protokoll fra Radiumhospitalet.

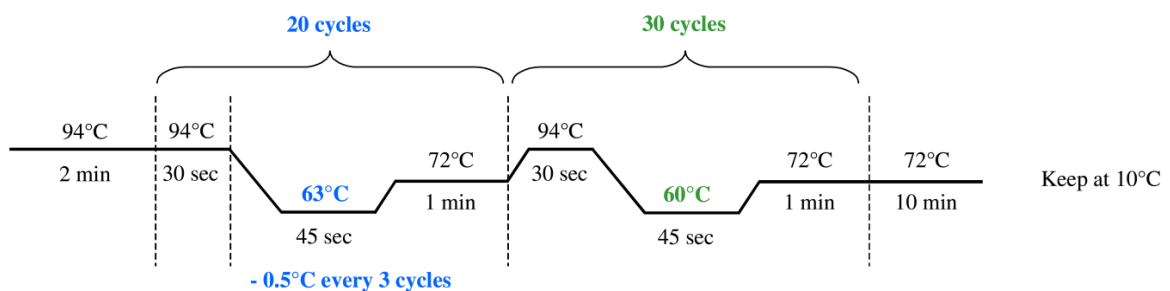
Tabell 1: Primere

Primer	Sekvens	primerlengde	retning	amplifisert område	produktlengde
TP53-4F	TGCTCTTTTCACCCATCTAC	20 baser	forward	ekson 4	353 bp
TP53-4R	ATACGGCCAGGCATTGAAGT	20 baser	reverse		
TP53_7F	TGTA AAAACGACGGCCAGTCTT GCCACAGGTCTCCCAA	38 baser	forward	ekson 7	273 bp
TP53_7R	CAGGAAACAGCTATGACC AGGGGTCAGCGCAAGCAGA	38 baser	reverse		

DNA-konsentrasjonen i prøvene varierer, de fleste er beregnet til mellom 30 og 60 ng/μl. DNA-templat ble tilsatt i respektive rør til slutt, de øvrige komponentene ble blandet og fordelt på strips. PCR-mix og programmer er beskrevet med tabell og figur.

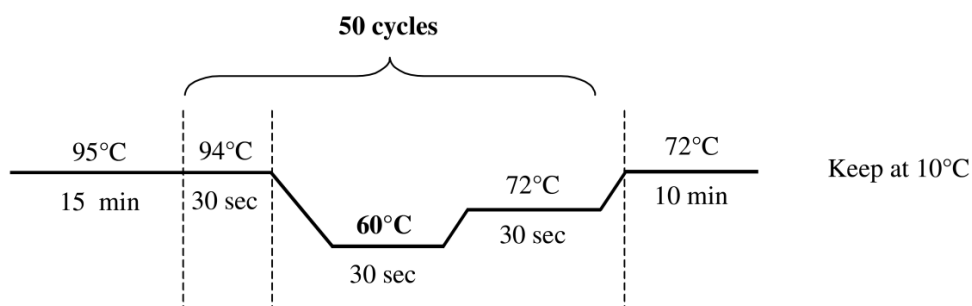
Tabell 2: PCR-mix for ekson 4

Komponenter	Volum per reaksjon
10x PCR buffer med 15mM MgCl ₂	2 μl
dNTP mix 2,5 mM	1,6 μl
Primer 4aF (forward) 10uM	0,8 μl
Primer 4aR (reverse) 10 uM	0,8 μl
HotStarTaq DNA polymerase (5U/μl)	0,1 μl
DNA templat	1 μl
dH2O	13,7 μl
Totalt	20 μl

**Figur 2:** PCR-program for ekson 4 (hentet fra IARC-protokoll)

Tabell 3: PCR-mix for ekson 7

Komponenter	Volum per reaksjon
10x PCR buffer med 15 mM MgCl ₂	2 µl
5x Q-solution	4 µl
dNTP mix 2,5 mM	1,6 µl
Primer 7F (forward) 10uM	0,8 µl
Primer 7R (reverse) 10uM	0,8 µl
Hot StarTaq 5U/µl	0,1 µ
DNA templat	1 µl
dH ₂ O	9,7 µl
Totalt	20 µl



Figur 3: PCR-program ekson 7 (hentet fra IARC-protokoll)

2.3.1 Kontroll av PCR-produkter med elektroforese

PCR-produktene ble kontrollert mot en DNA-ladder på agarosegel. Gelen ble laget av 1,5 g agarose per 100 ml 1xTBE-buffer, og varmet under omrøring i mikrobølgeovn ca. fire minutter. Buffer ble etterfylt ved behov. Deretter ble blandingen kjølt ned til ca. 60 grader under rennende vann og tilsatt 2 µl ethidiumbromid. Eventuelle bobler ved brønnene ble forsøkt fjernet forsiktig med en pipettespiss. Gelene ble laget med ca. 5 mm tykkelse, og satt til å stivne i ca. 25-30 minutter. Den ferdige gelen ble plassert i et passende kar med elektroder og dekket med 1x TBE-buffer. En blanding av 1,5µl PCR-produkt og 2 µl Orange Dye ble deponert i brønnene. Elektrodene ble deretter koblet til 200V i ca. 20-25 minutter. For å visualisere båndene som er farget med ethidiumbromid ble gelen fotografert med UV-

lys etter elektroforesen. Alle synlige bånd i størrelsesordenen 350 basepar ble godtatt, da man regner med at begynnelsen av sekvensen kan gå tapt i reaksjonen. Produktene ble fortynnet i forholdet 1:10.

2.3.2 Rensing av PCR-produkter

PCR-produktene ble rensed ved tilsetning av 2 µl ExoSap IT til 5 µl produkt, inkubasjon i 15 minutter på 37 grader, etterfulgt av 15 minutter på 80 grader for å deaktivere enzymene.

ExoSap består av to enzymer, Exonuclease 1 og Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) som hydrolyserer henholdsvis overfløydige primere og nukleotider (64).

2.4 Sekvensering

Til sekvenseringen ble det benyttet BigDye Terminator v1.3 Cycle Sequencing Kit.

Komponentene ble blandet og fordelt på respektive strips, PCR-produkt ble tilsatt til slutt.

Tabell 4: Sekvenseringsmix for genspesifikk primer, ekson 4

Komponenter	Volum per reaksjon
Renset PCR-produkt (PCR-produkt + ExoSap)	7 µl
Sekvenseringsbuffer	1,25 µl
BigDye	1,5 µl
Primer (forward eller reverse) 10 uM	0,5 µl

Tabell 5: Sekvensering ekson 4

Temperatur	Varighet	30 sykluser
96°C	10 sekunder	
50°C	5 sekunder	
60°C	4 minutter	

Tabell 6: Sekvenseringsmix ekson 7

Komponenter	Volum per prøve
5x sekvenseringsbuffer	1,5 µl
BigDye Terminator Reaction mix v.1.3 (?)	1,0 µl
Primer M13 forward og reverse, 0.8 uM	1,0 µl
Fortynnet PCR-produkt (10 ng/µl)	1 µl
Renset vann (MilliQ)	5,5 µl
Totalt	10,0 µl

Tabell 7: Sekvenseringsprogram ekson 7

Temperatur	Varighet	gjentagelse
96 °C	2 minutter	25 sykluser
96 °C	15 sekunder	
50 °C	5 sekunder	
60 °C	4 minutter	
8 °C	∞	

2.4.1 Rensing

Prøvene ble tilsatt 90 µl 69% isopropanol, blandet og inkubert ca. 15 minutter ved romtemperatur. Deretter ble prøvene ble sentrifugert, først 3000g i 30 minutter ved 21°C. Etterpå ble stripsene umiddelbart snudd på hodet og sentrifugert med 700g i 1 minutt for å tømme stripsene for isopropanol. Det ble benyttet lavere akselerasjon og bremsing for at ikke pelleten i bunnen skulle falle ut. Etter sentrifugering ble det tilsatt 12 µl HiDi formamid under avtrekk, en væske som løser og holder DNA denaturert under sekvenseringen.

2.4.2 Sekvensator

Sekvensatoren ble klargjort med buffer og vann, programmet ble innstilt etter manual og de ulike prøvene ble registrert. Prøvene er navngitt med «cm» eller «cmg» etterfulgt av et nummer.

2.5 Avlesing

Kvaliteten på enkeltsekvensene ble i første omgang vurdert i Sequencing Analysis Software, analysert med Seqscape-programvaren og kontrollert manuelt av meg og en erfaren kollega. Som sammenligningsgrunnlag er det lastet inn *TP53*-sekvens fra IARC-databasen.

Programvaren detekterer alle basesubstitusjoner og endringer i forhold til denne referansesekvensen, og markerer eventuelle avvik. Prøvene sorteres etter navn, og samler alle eksoner og begge retninger og stiller dem opp mot hverandre. Baserekkefølgen vises ved hjelp av «bølger» med farge som svarer til de forskjellige basene. En punktmutasjon med basesubstitusjon vil synes ved at en av bølgene har en liten bølge av annen farge under seg. Mutasjonene kan være homo- eller heterozygote. For SNPer vil enkeltbasesubstitusjonene markeres som avvik fra referansesekvens. Kjemiske artefakter som fargesøl eller støysignaler kan oppfattes som avvik av programvaren, men vil ikke føre til basesubstitusjon.

3 Resultater

Viser til vedlagt tabell 8. 143 prøver (21 mangler ekson 4, 19 mangler ekson 7).

Sekvenseringen ga lesbare sekvenser for ekson 4 og 7 i henholdvis 122 og 124 prøver. Det ble funnet totalt 13 mutasjoner, alle punktmutasjoner. Ni var lokalisert i ekson 7, hvorav åtte var missense-mutasjoner og en nonsense. Fem av missensemutasjonene var lokalisert til kodon 248, de øvrige var spredt.

Av de fire mutasjonene i ekson 4 var tre missense, og en stille. Mutasjonene var fordelt på tre prøver, den ene hadde en stille og en missense-mutasjon. I tillegg ble det oppdaget en frameshift-mutasjon i en av prøvene, uten at man kunne lokalisere starten. Sannsynligvis er det en delesjon eller insersjon i intron. 101 av prøvene var homo- eller heterozygote for arg-pro polymorfismen på kodon 72.

Alle mutasjonene som ble funnet var beskrevet i IARC-databasen.

3.1 PCR

Prøver som ikke lot seg amplifisere i første runde ble forsøkt på nytt. 24 prøver lot seg ikke amplifisere ved PCR for ekson 4, tilsvarende 11 for ekson 7. 11 prøver ga ikke resultater for hverken ekson 4 eller 7. Disse 11 ble forsøkt rensset etter standard prosedyre etanol-presipitasjon (65) og/eller phenol, kloroform og isoamylalkohol (66). 10 av disse lot seg amplifisere for ekson 7. Prøvene ble kjørt i ulike omganger med positiv og negativ kontroll, så det var ikke feil med reaksjonsmiksen.

3.2 Sekvensering

Ved forsøk på sekvensering av ekson 4 ble signal/støyforholdet ratio ble veldig lavt, og sekvensene var ikke lesbare. PCR-produktlengde ble kontrollert, og basepar ble telt med High Sensitivity DNA kit på Bioanalyser 2100 (Agilent). Det ble forsøkt fortynningsrekker uten hell. En runde med ExoSap ga fine sekvenser med en signal/noise ratio på 400-1000. For mye signal kan forstyrre reaksjon ved at det metter deteksjonskapasiteten til sekvensatoren, det var derfor ønskelig å redusere DNA-konsentrasjonen noe. Endte derfor med å fortynne av PCR-produktene, noe som ga lesbare forward-sekvenser. Jevnt over mye støy, dobbel tråd i

reverssekvensene. Etter å ha forsøkt med noen kontrollprøver og lest den doble sekvensen kom vi fram til at stockløsningen til reversprimer sannsynligvis var kontaminert. Ny primer ga fine sekvenser med samme framgangsmåte. Under sekvenseringen var det påfallende at en del sekvens gikk tapt i starten av 4-forwardsekvensen, ofte mellom 60-90 av de første basene.

4 Diskusjon

4.1 Funn

Funnene gjenspeiler noen tendenser som er observert i andre materialer. Missense punktmutasjoner var dominerende (11 av 13 mutasjoner totalt). Nesten halvparten av mutasjonene som ble funnet i ekson 7 var i kodon 248. I et utvalg på 1420 brystkreftsvulster som ble undersøkt av Silwal-Pandit og kolleger var kodon 248 det hyppigst muterte, og vanligst i her2-positive, luminal B og basal-lignende subtyper (39). I et annet stort materiale var dette et av flere kodon som hyppig var rammet av missense-mutasjoner(5). Tall fra IARC-databasen i 2001 viser at kodon 248 er en hotspot for enkeltbasesubstitusjoner, både i brystkreft og på tvers av krefttyper(3). En annen av mutasjonene som ble funnet i ekson 7 var i kodon 245, som også er rapportert som et hotspot i de ovennevnte kildene.

4.2 Valg av metode

Flere studier har sammenlignet ulike teknikker for mutasjonsdeteksjon. Direkte sekvensering har vært kjent som gullstandard, men er tidkrevende. Flere enkeltstudier hevder at automatisert direkte sekvensering misser ca. en fjerdedel av mutasjonene, og for det meste punktmutasjoner med enkeltbasesubstitusjoner (67). Materialet som ble undersøkt et svært lite, men noe man bør ha i mente i og med at dette er de hyppigste mutasjonene man ser i *TP53*. Ahrendt og kolleger peker på at automatisert sekvensering allikevel kommer bedre ut enn arrayteknikk såfremt ekson 2-11 sekvenseres (68). Et problem er at det i en tumor vil foreligge celler både med og uten mutasjoner, og at villtypealleler kan selekteres i amplifikasjonsprosessen. PCR er også følsomt for kontaminasjon, og Taq-polymerasen har feilmargin. Påfallende mange av de tidligere studiene har dessuten begrenset sekvenseringen til ekson 5-8, fordi majoriteten av mutasjonene befinner seg der. Gjennomgang av tidligere materialer har vist at en ikke ubetydelig andel av mutasjonene finnes i ekson 4 og 10 (39), og at disse som et minimum bør sekvenseres.

Ingen teknikker er perfekte, og man kan hevde at å kombinere sekvensering med en annen teknikk ville kunne fange opp prøver med mutasjoner som slipper unna. Her vil også tidsaspekt og økonomiske hensyn spille inn. Hadde man skullet kartlegge *TP53*-status hos pasienter som ledd i behandlingsvalg ville man stilt høyere krav til kontroll enn i denne

oppgaven. Materialet er heller ikke undersøkt med tanke på for eksempel kopinummervariasjoner eller tap av heterozygocitet.

I denne oppgaven ble ikke introner sekvensert, her kan det ligge noe som har strukturell effekt på proteinet. Det ble også observert en mutasjon i ekson 4, som antageligvis starter i intron. Her kunne man gått etter og sekvensert intronet.

4.3 Feilkilder PCR

Utfordringen er å få det PCR-produktet man ønsker seg. Utfordringer med primer kan være at de binder seg til hverandre, eventuelt til flere steder på genet og gir opphav til ulike sekvenser. En viktig feilkilde er blandingsforholdet mellom komponentene. DNA-kvalitet seiler opp som en mulig årsak når DNA ikke reagerer med flere av primerne. Kontaminasjon kan være i form av celler fra vevsprøven, eventuelt fra andre prøver eller personen som arbeider med dem.

4.4 Feilkilder sekvensering

Sekvensering ble gjort med utgangspunkt i to protokoller, *Detection of TP53 mutations by direct sequencing, IARC 2010* og *Resequencing of the TP53 gene on ABI 3730 DNA Analyzer*, utarbeidet av Vu, Due og Frøyland ved Radiumhospitalet. IARC-protokollen er relativt kostbar, og det ble forsøkt en del modifikasjoner. Rensesteget etter PCR ble forsøkt erstattet med 1:10 fortykning og rensing med plater. I sekvenseringssteget ble det brukt isopropanolfelling isteden for plater, som er en rimeligere metode kolleger hadde god erfaring med.

For ekson 7 hadde jeg tilsvarende utfordringer med mye bakgrunnsstøy. En kollega hadde dårlig erfaring med genspesifikke primere og dette eksonet, og det ble derfor valgt en primer med M13-hale. PCR-reaksjonen ble allikevel utført etter samme protokoll som de genspesifikke, hvilket betød både høyere DNA- og primerkonsentrasjon inn i PCR. Endte med rensing med ExoSAP.

Lav signal/støyratio tyder på mislykket reaksjon. Dette kan skyldes at man har feil templat, at PCR-produktet ikke er det man tror det er, og derfor ikke har komplementærsekvens til primer. Hovedutfordringen er å ha så rent DNA som mulig og riktig konsentrasjon, og dette er

ofte nøkkelen. Alt som settes på sekvensatoren vil gi signaler; DNA, primer, nukleotider og buffer. Utilstrekkelig rensing av prøvene kan føre til at denne bakgrunnsstøyen dominerer. IARC-protokollen er tilpasset de spesifikke primerne, og hele 7 µl templat inngår i sekvenseringsreaksjonen. Her blir sannsynligvis DNA-konsentrasjon og fjerning av primere og nukleotider enda viktigere. Dessuten benyttes primere med høyere konsentrasjon enn standard i PCR-reaksjonen. Trolig var det urealistisk å tenke at man kunne fortynne dette ned til et akseptabelt nivå. Det løste seg med ExoSAP, sett bort fra 4R-primeren som viste seg å være kontaminert.

Man risikerer også at primere fester seg til hverandre eller andre steder. Forholdet mellom reagensene er viktig, særlig for mye primer eller DNA inn i reaksjonen kan mette kapasiteten til apparatet. Kontaminasjon av templat eller reagenser kan oppstå på flere steder i prosessen, fra andre prøver eller de som jobber med dem.

Det er vanlig at de første 30-50 basene ikke er lesbare, og man må beregne litt margin ved valg av primer. Når man har sekvens begge retninger er det som regel ikke noe problem å lese av sekvensen. Primerne til ekson 7 hadde M13-hale, og da taper man mindre sekvens fordi målsekvensen er halen, og ikke en del av sekvensen man er interessert i. I og med at jeg ikke fikk sekvensert med flere genspesifikke forwardprimere har jeg ikke noe å sammenligne med. Det er kjent at man taper mer sekvens når man bruker HiDi formamid som løsemiddel, dette kan være medvirkende sammen med primer. En annen mulighet er å løse i vann, men dette er ikke et reelt alternativ når man skal sekvensere mange prøver om gangen, fordi vannet fordamper og fører til gradvis dårligere resultat.

Ekson 7 kan være vanskelig å sekvensere fordi PCR-produktet er kort, kun 273 basepar. Valget av M13-primer virker derfor fornuftig. En viktig feilkilde her er nok for høy DNA-konsentrasjon. PCR-reaksjonen i denne protokollen har mindre mengde DNA-templat, nemlig 25 ng i motsetning til 50 ng i IARC. Styrken på de ulike båndene ble heller ikke vurdert, og alle prøvene ble fortynnet i forholdet 1:10. Mye støy på sekvensene kan skyldes dårlig rensing, men også rett og slett for høy DNA-konsentrasjon.

4.5 Anvendelse av resultatene

Med kun to eksoner er det ikke hensiktsmessig å gjøre noen analyse i forhold til kliniske variabler. Det foreligger kliniske data på nesten alle pasientene, og det er mange forhold man kunne undersøkt, som for eksempel overlevelse, grad og relasjon til subtype.

5 Konklusjon

PCR og sekvensering krever gode rutiner på laboratoriet. Riktig DNA-konsentrasjon og rensing av PCR-produktet er avgjørende for gode resultater. Det tok tid å bli fortrolig med metoden, og sekvenseringen ble begrenset til ekson 4 og 7. Ved sekvensering av ekson 4 og 7 ble det funnet henholdsvis 9 og 4 punktmutasjoner, hvorav 11 var missense-mutasjoner. I og med at kun en liten del av genet er kartlagt kan ikke dette brukes til å si noe generelt om forekomsten av mutasjoner i materialet, eller relasjon til kliniske variabler.

Resultatene mine kan brukes videre når resten av genet er sekvensert, eventuelt fungere som kontroll dersom man vil prøve ut eller sammenligne metoder for mutasjonsdeteksjon.

Litteraturliste

1. Blåboka, nettsversjon. Behandlingsanbefalinger fra Norsk Bryst Cancer gruppe: Norsk Bryst Cancer Gruppe; Januar 2011 [cited 2014 28.02]. Available from: <http://www.nbcg.no/nbcg.blaaboka.html>.
2. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991 Jul 5;253(5015):49-53. PubMed PMID: 1905840.
3. Olivier M, Hainaut P. *TP53* mutation patterns in breast cancers: searching for clues of environmental carcinogenesis. *Seminars in cancer biology*. 2001 Oct;11(5):353-60. PubMed PMID: 11562177.
4. Langerod A, Zhao H, Borgan O, Nesland JM, Bukholm IR, Ikdahl T, et al. *TP53* mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2007;9(3):R30. PubMed PMID: 17504517. Pubmed Central PMCID: 1929092.
5. Olivier M, Langerod A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, et al. The clinical value of somatic *TP53* gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006 Feb 15;12(4):1157-67. PubMed PMID: 16489069.
6. Brøgger A. Mutasjon. Store Norske Leksikon. www.snl.no/2009.
7. Lodish H BA, Zipursky SL, et.al. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W.H.Freeman; 2000.
8. Silver DP, Livingston DM. Mechanisms of BRCA1 tumor suppression. *Cancer discovery*. 2012 Aug;2(8):679-84. PubMed PMID: 22843421. Pubmed Central PMCID: 3437262.
9. Forozan F, Mahlamaki EH, Monni O, Chen Y, Veldman R, Jiang Y, et al. Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer research*. 2000 Aug 15;60(16):4519-25. PubMed PMID: 10969801.
10. Roylance R, Gorman P, Harris W, Liebmann R, Barnes D, Hanby A, et al. Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer research*. 1999 Apr 1;59(7):1433-6. PubMed PMID: 10197608.
11. Popescu NC, Zimonjic DB. Chromosome and gene alterations in breast cancer as markers for diagnosis and prognosis as well as pathogenetic targets for therapy. *American journal of medical genetics*. 2002 Oct 30;115(3):142-9. PubMed PMID: 12407694.
12. Achuthan R, Bell SM, Roberts P, Leek JP, Horgan K, Markham AF, et al. Genetic events during the transformation of a tamoxifen-sensitive human breast cancer cell line into a drug-resistant clone. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2001 Oct 15;130(2):166-72. PubMed PMID: 11675139.
13. Burger H, de Boer M, van Diest PJ, Korsching E. Chromosome 16q loss--a genetic key to the understanding of breast carcinogenesis. *Histology and histopathology*. 2013 Mar;28(3):311-20. PubMed PMID: 23348384.
14. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):307-10. PubMed PMID: 11099028.

15. Maltzman W, Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Molecular and cellular biology*. 1984 Sep;4(9):1689-94. PubMed PMID: 6092932. Pubmed Central PMCID: 368974.
16. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research*. 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6304-11. PubMed PMID: 1933891.
17. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*. 1992 Jun 26;69(7):1237-45. PubMed PMID: 1535557.
18. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*. 1997 May 15;387(6630):299-303. PubMed PMID: 9153396.
19. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*. 1991 Jun 21;252(5013):1708-11. PubMed PMID: 2047879.
20. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):817-25. PubMed PMID: 8242752.
21. Nakagawa H, Opitz OG. Inducing cellular senescence using defined genetic elements. *Methods in molecular biology*. 2007;371:167-78. PubMed PMID: 17634581.
22. Akhtar RS, Geng Y, Klocke BJ, Latham CB, Villunger A, Michalak EM, et al. BH3-only proapoptotic Bcl-2 family members Noxa and Puma mediate neural precursor cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006 Jul 5;26(27):7257-64. PubMed PMID: 16822983.
23. Pietrzak M, Puzianowska-Kuznicka M. p53-dependent repression of the human MCL-1 gene encoding an anti-apoptotic member of the BCL-2 family: the role of Sp1 and of basic transcription factor binding sites in the MCL-1 promoter. *Biological chemistry*. 2008 Apr;389(4):383-93. PubMed PMID: 18208354.
24. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Feb 1;277(5):3247-57. PubMed PMID: 11714700.
25. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*. 1991 Jul 25;352(6333):345-7. PubMed PMID: 1852210.
26. Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;2012:170325. PubMed PMID: 22911014. Pubmed Central PMCID: 3403320.
27. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6. PubMed PMID: 1614522.
28. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992 Mar 19;356(6366):215-21. PubMed PMID: 1552940.
29. Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. *TP53* mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*. 2007 Apr 2;26(15):2157-65. PubMed PMID: 17401424.

30. Li FP, Fraumeni JF, Jr., Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer research*. 1988 Sep 15;48(18):5358-62. PubMed PMID: 3409256.
31. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971 Apr;68(4):820-3. PubMed PMID: 5279523. Pubmed Central PMCID: 389051.
32. Varley JM, Thorncroft M, McGown G, Appleby J, Kelsey AM, Tricker KJ, et al. A detailed study of loss of heterozygosity on chromosome 17 in tumours from Li-Fraumeni patients carrying a mutation to the *TP53* gene. *Oncogene*. 1997 Feb 20;14(7):865-71. PubMed PMID: 9047394.
33. Berger AH, Pandolfi PP. Haplo-insufficiency: a driving force in cancer. *The Journal of pathology*. 2011 Jan;223(2):137-46. PubMed PMID: 21125671.
34. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):849-52. PubMed PMID: 8479523.
35. Kastan MB, Berkovich E. p53: a two-faced cancer gene. *Nature cell biology*. 2007 May;9(5):489-91. PubMed PMID: 17473858.
36. Thottassery JV, Zambetti GP, Arimori K, Schuetz EG, Schuetz JD. p53-dependent regulation of MDR1 gene expression causes selective resistance to chemotherapeutic agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997 Sep 30;94(20):11037-42. PubMed PMID: 9380755. Pubmed Central PMCID: 23579.
37. Sampath J, Sun D, Kidd VJ, Grenet J, Gandhi A, Shapiro LH, et al. Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Oct 19;276(42):39359-67. PubMed PMID: 11483599.
38. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52. PubMed PMID: 10963602.
39. Silwal-Pandit LV, HK., Chin S, Rueda O, McKinney S, Osako T, Quigley D, et al. *TP53* mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. submitted.
40. Quigley D, Vaske C, Silwal-Pandit L, Dannenfelser R, Langerød A, Vollan H, et al. Lymphocyte invasion of Basal-like breast tumors is associated with wild-type *TP53*. submitted.
41. Borresen AL, Andersen TI, Eyfjord JE, Cornelis RS, Thorlacius S, Borg A, et al. *TP53* mutations and breast cancer prognosis: particularly poor survival rates for cases with mutations in the zinc-binding domains. *Genes, chromosomes & cancer*. 1995 Sep;14(1):71-5. PubMed PMID: 8527388.
42. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*. 1993 Sep 24;74(6):957-67. PubMed PMID: 8402885.
43. Bellamy CO. p53 and apoptosis. *British medical bulletin*. 1997;53(3):522-38. PubMed PMID: 9374035.
44. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*. 1994 Nov 4;266(5186):807-10. PubMed PMID: 7973635.
45. Geisler S, Borresen-Dale AL, Johnsen H, Aas T, Geisler J, Akslen LA, et al. *TP53* gene mutations predict the response to neoadjuvant treatment with 5-fluorouracil and mitomycin in locally advanced breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the*

- American Association for Cancer Research. 2003 Nov 15;9(15):5582-8. PubMed PMID: 14654539.
46. Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel C, et al. *TP53* mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000 Jan;6(1):50-6. PubMed PMID: 10656431.
 47. Bergh J, Norberg T, Sjogren S, Lindgren A, Holmberg L. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nature medicine*. 1995 Oct;1(10):1029-34. PubMed PMID: 7489358.
 48. Multani AS, Li C, Ozen M, Imam AS, Wallace S, Pathak S. Cell-killing by paclitaxel in a metastatic murine melanoma cell line is mediated by extensive telomere erosion with no decrease in telomerase activity. *Oncology reports*. 1999 Jan-Feb;6(1):39-44. PubMed PMID: 9864398.
 49. Bertheau P, Espie M, Turpin E, Lehmann J, Plassa LF, Varna M, et al. *TP53* status and response to chemotherapy in breast cancer. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2008;75(2):132-9. PubMed PMID: 18544968.
 50. Jansson T, Inganas M, Sjogren S, Norberg T, Lindgren A, Holmberg L, et al. p53 Status predicts survival in breast cancer patients treated with or without postoperative radiotherapy: a novel hypothesis based on clinical findings. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1995 Nov;13(11):2745-51. PubMed PMID: 7595733.
 51. Hamilton A, Piccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: a review of the literature on HER-2, p53 and BCL-2. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2000 Jun;11(6):647-63. PubMed PMID: 10942052.
 52. Børresen-Dale A, Dissen E. Polymorfisme. Store Norske Leksikon, nettutgave2011.
 53. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature genetics*. 2003 Mar;33(3):357-65. PubMed PMID: 12567188.
 54. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Molecular and cellular biology*. 1999 Feb;19(2):1092-100. PubMed PMID: 9891044. Pubmed Central PMCID: 116039.
 55. Hou J, Jiang Y, Tang W, Jia S. p53 codon 72 polymorphism and breast cancer risk: A meta-analysis. *Experimental and therapeutic medicine*. 2013 May;5(5):1397-402. PubMed PMID: 23737888. Pubmed Central PMCID: 3671901.
 56. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on *TP53* mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC *TP53* database. *Human mutation*. 2007 Jun;28(6):622-9. PubMed PMID: 17311302.
 57. Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Jul 8;100(14):8424-9. PubMed PMID: 12826609. Pubmed Central PMCID: 166245.

58. Kakudo Y, Shibata H, Otsuka K, Kato S, Ishioka C. Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s. *Cancer research*. 2005 Mar 15;65(6):2108-14. PubMed PMID: 15781620.
59. Kawaguchi T, Kato S, Otsuka K, Watanabe G, Kumabe T, Tominaga T, et al. The relationship among p53 oligomer formation, structure and transcriptional activity using a comprehensive missense mutation library. *Oncogene*. 2005 Oct 20;24(46):6976-81. PubMed PMID: 16007150.
60. Protocol - TRI Reagent DNA Isolation Thermo Fisher Scientific Inc.: Life Technologies; [cited 2014 03.03]. Available from: <http://www.lifetechnologies.com/no/en/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/dna-extraction-protocols/tri-reagent-dna-protein-isolation-protocol.html>.
61. DNeasy Blood and Tissue Handbook. Qiagen; 2006.
62. Hauge JG. Polymerasekjedereaksjon. Store Norske Leksikon2009.
63. Metzzenberg D. Lecture 3 - Sanger Method [cited 2014 04.03]. Available from: <http://www.csun.edu/~hcbio027/biotechnology/lec3/sanger.html>.
64. ExoSAP-IT For PCR Product Cleanup. In: Affymetrix, editor.
65. : Qiagen; 2012 [cited 2012 08.08]. Available from: <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/faq/?ID=5d591b8b-968a-4a17-849f-9d0f719b40af>.
66. Zhu S. DNA extraction from TRIZOL. Available from: http://changelab.stanford.edu/DNAextractionfromTRIZOL_Organicphase_update.
67. Duddy PM, Hanby AM, Barnes DM, Camplejohn RS. Improving the detection of p53 mutations in breast cancer by use of the FASAY, a functional assay. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2000 Aug;2(3):139-44. PubMed PMID: 11229518. Pubmed Central PMCID: 1906912.
68. Ahrendt SA, Halachmi S, Chow JT, Wu L, Halachmi N, Yang SC, et al. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 Jun 22;96(13):7382-7. PubMed PMID: 10377423. Pubmed Central PMCID: 22094.

Tabell 8: Oversikt mutasjoner

sample	gene	exon	codon	base change	codon change	AA	strand	type	missing in ex 7	missing in ex4	codon 72 CCC→CGC
cm421											
cm422											F+R
cm423										F starts at B61	F+R
cm425											
cm426										F starts at B58	F+R
cm435										F starts at B58	F+R
cm439										F starts at B58	F+R
cm441										F starts at B58	F+R
cm442										F starts at B51	F+R
cm446											F+R
cm455										F starts at B50	F+R
cm457										F starts at B110	F+R
cm458										F strand	F
cm459										F strand	
cm461	mut	7	248	C→T	CGG→TGG	arg-trp	F+R	missense		F starts at B80	F+R
cm93										F starts at B80	F+R
cm96										R starts at B60	F+R
cmg3										F starts at B60	F+R
cmg41										F starts at B90	F+R
cmg44										F and R start at B60	F+R
cmg56											
cmg57										F starts at B60	F+R
cmg58										F starts at B80	F+R
cmg59											F+R
cmg5										F starts at B60	F+R
cmg60										F starts at B60	
cmg61										F starts at B60	F+R
cmg62										F starts at B60	F+R
cmg63										F starts at b60	F+R
cmg64										F starts at B60	F+R
cmg55										F strand	F
cmg7	mut	7	258	G→T	GAA→TAA		F+R	nonsense		F starts at B60	F+R
2cm354									exon7	F strand	R

2cm357								exon7	F strand	R
2cm411								exon7	F strand	R
2cm412								exon7	F strand	R
2cm417								exon7	F strand	
cm101										
cm103								exon7	F strand	R
cm122								F strand	F strand	R
cm126										
cm214										
cm294									F starts at B110	F+R
cm295	mut	4	37	C→T	TCC→TTC	ser-phe		missense	F starts at B110	R
cm297									F+R start at B90	F+R
cm320									F+R start at B60	
cm321									F starts at B80	F+R
cm324								exon7	F+R start at B50	F+R
cm325								exon7	F+R start at B50	F+R
cm326									F starts at B60	F+R
cm329								exon7	F starts at B60	F+R
cm331								exon7	F starts at B60	F+R
cm332									F starts at B80	F+R
cm333										F+R
cm337	mut	4	63	G>C	GCT>CCT	ala-pro		missense	F starts at B60	F+R
cm342									F starts at B90	F+R
cm343									F starts at B90	F+R
cm344									F starts at B90	F+R
cm349									F starts at B90	F+R
cm350									F starts at B90	F+R
cm351								R strand	F starts at B90	F+R
cm354									F starts at B90	F+R
cm356	mut	7	245	G→A	GGC→GAC	gly-asp		missense	F starts at B90	F+R
cm357									F strand	R
cm360	mut	7	248	C→T	CGG→TGG	arg-trp		missense	F strand	
cm362								R strand	F strand	R
cm364									F starts at B90	F+R
cm385v									F strand	R
cm386									F strand	R
cm387									F starts at B80	F+R
cm388									F starts at B80	F+R
cm393									F starts at B60	F+R

cm394										F starts at B90	F+R
cm395										F strand	R
cm396										F starts at B90	F+R
cm398										F starts at B90	F+R
cm399										F starts at B90	F+R
cm404										F starts at B90	F+R
cm411										F starts at B90	F+R
cm412										F starts at B90	F+R
cm413										F strand	R
cm415									exon7		F+R
cm417										F starts at B90	F+R
cm418									exon7	F strand	R
cm419									exon7	F starts at B90	F+R
cm420	mut	4	108	T→G	GGT→GGG	gly-gly	R	silent	exon7	F starts at B90	F+R
	mut	4	109	T→G	TTC→GTC	phe-val	R	missense			
cm424										F strand	R
cm436										F starts at B60	
cmg42										F strand	R
cm330									exon7	R strand	F
cm407									exon7	R strand	F
cm363										F starts at B90	F+R
cm365											F+R
cm366										F starts at B90	
cm368											
cm370										F starts at B90	F+R
cm378										F starts at B90	F+R
cm385									exon7	F starts at B50, lacking R strand	F
cm196										F starts at B90, lacking R	F
cm211	mut	7	248	G→A	CGG→CAG	arg-glu	R	missense		F starts at B210	
cm213									F starts at B28*	F starts at B60	F+R
cm369									F starts at B20		
cm104										exon 4	
cm113										F starts at B84	
cm181										exon 4	
cm260										exon4	
cm261										F starts at B90	F+R

cm264										F starts at B50	F+R
cm267										F starts at B80	F+R
cm269										exon4	
cm270	mut	7	248	C→A	CGG→AGG		F+R	missense	2xR	F starts at B90, mut here?	
cm271										F starts at B90	
cm274	mut	7	236	A→G	TAC→TGC		F+R	missense		exon4	
cm275										exon4	
cm276									R strand	F starts at B90	F+R
cm278										F starts at b90	F+R
cm282										F starts at B90	F+R
cm289										F starts at B50	F+R
cm298										exon4	
cm299										exon4	
cm311										exon4	
cm313										exon4	
cm323										exon4	
cm327										exon4	
cm375										exon4	
cm385h										exon4	
cm99										F starts at B90	F+R
cmg22										F starts at B90	F+R
cmg32										F starts at B50	
cmg29										exon4	
cmg33										F starts at B55	F+R
cmg39										F starts at B55	F+R
cmg45										F starts at B50	F+R
cm216										F starts at B50	
cm219	mut	7	248	G>A	CGG→CAG	R+F		missense		exon4	
cm222										exon4	
cm229										exon4	
cm338	mut	7	233	A>C	CAC→CCC?			missense		exon4	
cm345										exon4	
cm400										exon4	
cm120									exon7	F starts at B90	F+R
cm129									exon7	F starts at B90	F+R
cm227										F starts at B90	F+R