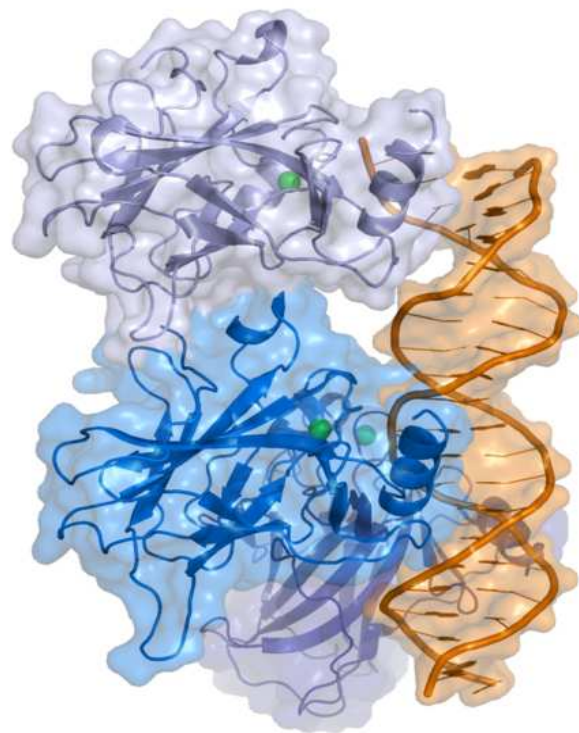


p53 mutatie analyse; het bepalen van de klonale verwantschap tussen longtumoren.



Scriptieverslag

<i>Naam:</i>	Tobias Sprong
<i>Bedrijf:</i>	Sint Antonius ziekenhuis
<i>Begeleidster:</i>	Wendy Pellis; Analist specialist histologie
<i>Begeleider:</i>	Dr. Alain Kummer; Patholoog en klinisch moleculair bioloog in de pathologie
<i>Instituut:</i>	Hogeschool Utrecht
<i>Klas :</i>	DL7
<i>Begeleider:</i>	Robert Jan Veldman; Docent
<i>Datum:</i>	21-5-2014

Bron afbeelding voorzijde: Cho, Y.; Gorina, S.; Jeffrey, P. D.; Pavletich, N. P. (1994). "Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations". *Science* 265 (5170): 346–355.

Samenvatting

In het St. Antonius ziekenhuis(AZN) is er een onderzoek gestart om de klonale verwantschap tussen twee longtumoren, afkomstig van één patiënt, te bepalen met Next Generation Sequences (NGS). Er wordt hierbij in 50 genen gezocht naar mutaties. Als de twee longtumoren overeenkomende mutaties hebben in dezelfde genen kan men zeggen dat de longtumoren klonaal verwant zijn (metastase) en als de mutaties niet overeenkomen kan men zeggen dat de tumoren een andere primaire oorsprong hebben. Dit is van belang voor de verdere behandeling van de patiënt.

Men wil de resultaten van dit onderzoek gaan vergelijken met de resultaten van de p53 mutatie analyse, dit is een conventionele methode om klonale verwantschap aan te tonen tussen tumoren. Het probleem is echter dat deze analyse niet aanwezig is in het laboratorium. Het doel van deze scriptieopdracht is dan ook om een p53 mutatie analyse op te zetten, om zo de klonale verwantschap tussen twee longtumoren in één patiënt te bepalen.

De analyse bestaat uit het amplificeren van exonen uit het *TP53* gen middels Polymerase Chain Reaction (PCR) en sequencen volgens de Sanger methode om de sequentie te verkrijgen. Als er in beide tumoren exact dezelfde mutatie aanwezig is in het *TP53* gen, kan men concluderen dat zij klonaal verwant zijn. Echter heeft één enkele tumor een mutatie of beide tumoren een andere mutatie kan men spreken van twee longtumoren met verschillende primaire oorsprong.

Eerst werd de analyse opgezet op benigne weefselmateriaal. Na optimalisatie werd de analyse uitgevoerd op tumormateriaal van vijf patiënten met dubbele longtumoren. Op dit tumormateriaal had het Universitair Medisch Centrum Utrecht(UMCU) eerder een p53 mutatie analyse uitgevoerd. De oorspronkelijke resultaten van het UMCU werden vergeleken met de resultaten van het AZN, zodat bepaald kon worden of de analyse van het AZN goed werkt.

Op het DNA, geïsoleerd uit geparaffineerd weefsel, is exon 5 tot en met 8 van het *TP53* gen geamplificeerd en gesequenced. Deze exonen coderen voor het core-domein van het p53 eiwit en volgens de literatuur worden hier de meeste mutaties aangetroffen. Voor zowel de amplificatie als de sequentiereactie zijn twee primersets getest afkomstig uit de twee verschillende artikelen van *Van der Sijp et al.* en *Angelopoulou et al.*

Beide primersets geven goede resultaten voor exon 7 en 8 bij het benigne weefselmateriaal. Echter voor exon 5 en 6, bij primerset *Van der Sijp et al.*, worden slecht beoordeelbare sequenties verkregen.

De primerset *Angelopoulou et al.* verkrijgt ook slecht beoordeelbare sequenties bij exon 6 en goed beoordeelbare sequenties bij exon 5, echter wordt er tijdens de PCR van exon 5 sporadisch een PCR-product verkregen.

Het optimaliseren van de PCR voor exon 5 geeft bij beide primersets weinig verbeteringen bij de vorming van een PCR-product. Tevens is er door het tijdschema weinig tijd overgebleven om de PCR en sequentiereactie van exon 6 te optimaliseren.

Aangezien exon 5 een beter beoordeelbare sequentie verkrijgt bij de primerset van *Angelopoulou et al.* dan bij de primerset van *Van der Sijp et al.*, is er voor gekozen om de primerset van *Angelopoulou et al.* te gaan testen voor de p53 mutatie analyse op tumormateriaal.

Van vijf patiënten met dubbele longtumoren, verkrijgt de p53 mutatie analyse in het AZN bij vier patiënten hetzelfde resultaat als in het UMCU. Bij één patiënt wordt er een mutatie gemist, een reden hiervoor kan zijn dat het tumorpercentage te laag was om de mutatie in de sequentie te kunnen detecteren.

Bij deze vijf patiënten worden goede resultaten verkregen voor exon 7 en 8. Echter net als bij de opzet op benigne weefselmateriaal zijn exon 5 en 6 nog niet optimaal, waar exon 5 niet altijd een PCR-product verkrijgt en exon 6 slechte forward sequenties geeft.

Op basis van de resultaten kan men concluderen dat de p53 mutatie analyse goed werkt voor exon 7 en 8. Voor exon 5 en 6 moet echter de PCR en het sequencen nog verder geoptimaliseerd worden, om ook hier een goede sequenties te verkrijgen voor het vinden van mutaties.

Om de PCR van exon 5 en 6 te optimaliseren kan de primer concentratie nog aangepast worden, deze is waarschijnlijk te hoog. Een hoge concentratie kan zowel inhibitie veroorzaken van de PCR bij exon 5 als aspecificiteit bij exon 6.

Summary

At the St. Antonius hospital (AZN) a study is launched to determine the clonal relationship between two lung tumors in one patient. This will be determined by Next Generation Sequencing (NGS) with this technique 50 genes are screened for mutations. If exactly the same mutation is present in the same genes in both lung tumors, it can conclude that the lung tumors have a clonal relationship (metastasis) and when the mutations are not the same, it can conclude that both tumors have a different primary origin. This is important information for the further treatment of the patient.

The results from this NGS study will be compared with the results of the p53 mutation analysis; this is a conventional method to determine the clonal relationship between tumors.

The problem is that the p53 mutation analysis is not present in the laboratory. The goal for this thesis assignment is to develop the p53 mutation analysis, to determine the clonal relationship between two lung tumors in one patient.

The analysis consists of the amplification of exons from the *TP53* gene by using the Polymerase Chain Reaction (PCR) and the Sanger sequencing method to get the sequence data. When both tumors have exactly the same mutation on the same location in the *TP53* gene, you can conclude that the tumors are clonally related to each other. However when only one tumor has a mutation or both tumors have a different mutation you conclude that the primary origin is different.

First, the analysis is tested on benign tissue material. When the analysis works on this material, the analysis will be performed on tumor tissue from five patients with double lung tumors. On this tumor material the University Medical Center Utrecht (UMCU) previously had performed a p53 mutation analysis. The results of the AZN will be compared with the result obtained from the UMCU, so that it can be determined whether the assay of the AZN works.

After DNA-isolation from paraffin tissue exon 5 to 8 of the *TP53* gene is amplified and sequenced. These exons encode for the core-domain of the p53 protein and according to the literature most mutations are found here.

Two primer sets were tested for both the amplification and the sequencing reaction. These two primer sets derived from the two different articles of *Van der Sijp et al.* and *Angelopoulou et al.*

Both primer sets obtain good results for exon 7 and 8. However poor sequences are obtained for exon 5 and 6 with primer set *Van der Sijp et al.* The primer set *Angelopoulou et al.* also gives bad sequences for exon 6, but good sequences for exon 5, however only sporadic PCR-products are formed with the latter technique. Optimizing the PCR for exon 5 gives a little improvement for both primer sets. In addition, there was little time for the improvement of the sequence reaction for exon 6.

Because exon 5 gives good sequences for the entire exon with the primers of *Angelopoulou et al.*, as well as for exon 7 and 8, it was decided to use this primer set for the p53 mutation analysis on tumor tissue.

From five patients with double lung tumors, four patients show the same results in which the p53 mutation analysis of the AZN was compared with the results of the UMCU. For one patient a mutation was not detected, a reason for this may be that the tumor percentage was too low in order to detect the mutation in the sequence. For these five patients good results are obtained for exon 7 and 8. However, just as in the set-up on benign tissue material for exon 5 and 6 the p53 analysis is not yet optimal, exon 5 does not always show a PCR product and exon 6 obtains bad forward sequences.

On the basis of these results one can conclude that the p53 mutation analysis works well for exon 7 and 8. For exons 5 and 6 the PCR and sequencing should be further optimized, in order to good sequences for the detection of a mutation.

In order to optimize the PCR of exon 5 and 6, the primer concentration can be adjusted, this is likely to be too high. A high concentration can cause both inhibition of the PCR by exon 5 as specificity by exon 6.

Afkortingenlijst

ADC:	Adenocarcinoom
ARF:	Alternate Reading Frame
ATM:	Ataxia-telangiectasia mutated
AZN:	St. Antonius ziekenhuis
Bp:	Basenpaar
CHK2:	Checkpoint Kinase 2
DNA:	Deoxyribonucleïnezuur
EGF:	Epidermal Growth Factor
EGFR:	Epidermal Growth Factor Receptor
GCC:	Grootcellig carcinoom
HE:	Hematoxyline en Eosine
KT:	Kamertemperatuur
LOH:	Loss of Heterozygosity
MDM2:	Mouse Double Minute 2 homolog
NGS:	Next Generation Sequencing
nAChrs:	Nicotine Acetylcholine Receptors
NSCLC:	Niet-kleincellige long carcinomen
PC:	Paraffine Coupe
PCR:	Polymerase Chain Reaction
Rpm:	Round per minute
SCC:	Squameus cel carcinoma
SCCP:	Single-strand conformation polymorphism
SCLC:	Kleincellige long carcinomen
TP53:	Tumor protein 53
UMCU:	Universitair Medisch Centrum Utrecht

Inhoudsopgave

1.	Inleiding.....	7
2.	Literatuurstudie.....	8
2.1.	Longtumoren.....	8
2.2.	Mutaties initiëren de tumorgenese.....	8
2.3.	Nicotine stimuleert de tumorgenese.....	8
2.4.	Tumorsuppressor p53.....	9
2.5.	p53 als klonale marker.....	11
2.6.	p53 mutatie analyse: bepalen klonale verwantschap.....	12
2.7.	Het Core-domein van TP53.....	12
2.8.	Immunohistochemische p53-kleuring als indicator.....	13
3.	Opzet strategie van de p53 mutatie analyse.....	14
3.1.	Opzet strategie p53 mutatie analyse: Weefsel/materiaal uitzoeken.....	14
3.2.	Opzet strategie p53 mutatie analyse: PCR.....	14
3.3.	Opzet strategie p53 mutatie analyse: sequencing.....	15
4.	Materiaal en methoden.....	16
4.1.	Weefsel.....	16
4.2.	DNA isolaties.....	17
4.3.	TP53 PCR.....	18
4.4.	Gelektroforese.....	18
4.5.	Zuivering met ExoSAP-IT.....	18
4.6.	Sequentie reactie.....	18
4.7.	3500 gen analyzer.....	19
4.8.	Sequentie analyse.....	19
5.	Resultaten.....	20
5.1.	Resultaten optimalisatie primerpaar 5.2 van der Sijp.....	22
5.2.	Optimalisatie exon 5 primerset Angelopoulou.....	23
5.3.	P53 mutatie analyse op tumormateriaal.....	24
5.3.1.	Patiënt 1.....	25
5.3.2.	Patiënt 2.....	26
5.3.3.	Patiënt 3.....	27
5.3.4.	Patiënt 4.....	27
5.3.5.	Patiënt 5.....	28
6.	Discussie en Conclusie.....	30
6.1.	Opzet en optimalisatie op benigne weefselmaterialen: Van der Sijp primerset.....	30
6.2.	Opzet en optimalisatie op benigne weefselmaterialen: Angelopoulou.....	31
6.3.	PCRen met Angelopoulou en sequenzen met Van de Sijp.....	31
6.4.	p53 mutatie analyse op tumormateriaal uitvoeren met Angelopoulou primerset.....	32
6.5.	De p53 mutatie analyse op tumormateriaal.....	32
6.6.	P53 mutatie analyse naast andere methodes.....	33
6.7.	Conclusie.....	33
6.8.	Advisering voorzetting opzet p53 mutatie analyse.....	33
7.	Literatuurlijst.....	35
A.	Bijlage I : Optimalisatie PCR met primerpaar 5.2 uit primerset Van der Sijp.....	2
B.	Bijlage II: Optimalisatie PCR met primerpaar 5 van Angelopoulou primerset.....	5
C.	Bijlage III: Sequentie dekking van exon bij p53 mutatie analyse op tumormateriaal.....	7
D.	Bijlage VI: primersequentie Van der Sijp en Angelopoulou.....	12

1. Inleiding

Longtumoren zijn oorzaak nummer één bij kanker gerelateerde mortaliteit. Het is algemeen bekend dat carcinogene stoffen in sigarettenrook een oorzaak zijn van longtumoren. Naar schatting veroorzaken deze carcinogenen wereldwijd 85% van de longtumoren bij mensen die roken. Dit in tegenstelling tot 15-25% van de longtumoren die voorkomen bij mensen die minder dan 100 sigaretten in hun leven gerookt hebben.^{[1][2][3]}

In het St. Antonius ziekenhuis(AZN) op de afdeling pathologie zijn in het jaar 2013 bij ongeveer 200 patiënten één longtumor of meerdere longtumoren gediagnosticeerd.

Bij de patiënten met meerdere longtumoren kan het zijn dat er bij de diagnose direct meerdere tumoren gevonden worden in de long. Ook kan het zijn dat er eerst een tumor gevonden wordt en dat er na behandeling van deze eerste tumor, zich op een later tijdstip een tweede tumor vormt in de long.

Voor de patiënten met meerdere longtumoren wordt er momenteel een onderzoek opgezet op de moleculaire afdeling van de pathologie in het AZN. Hierbij wil men onderzoeken of meerdere tumoren van één patiënt klonaal verwant zijn, wat betekend dat de tumor gemetastaseerd is. Of dat de tumoren van verschillende klonaliteit zijn, dit betekend dat er twee primaire tumoren zijn. Deze informatie is van belang voor de verdere behandeling van de patiënt.

Om het verschil aan te tonen tussen een metastase en een tweede primaire tumor wil men gebruik maken van Next Generation Sequencing (NGS). Hierbij wordt een panel van 50 genen gesequenced en geanalyseerd voor aanwezigheid van eventuele mutaties in deze genen. Dit levert vervolgens per tumor een mutatiepatroon op.

Wanneer meerdere tumoren van één patiënt hetzelfde mutatiepatroon hebben kan men zeggen dat dit een gemetastaseerde tumor is. Indien de patronen in de tumoren niet overeenkomen kan men zeggen dat de tumoren geen klonale verwantschap hebben en dat er dus sprake is van twee primaire tumoren.

Om de resultaten die afkomstig zijn van de NGS goed te kunnen interpreteren moeten deze eerst worden vergeleken met de resultaten van de conventionele methodes die men in de pathologie laboratoria gebruikt. Één van deze conventionele moleculaire methodes is de p53 mutatie analyse.

In tegenstelling tot de NGS wordt er bij de p53 mutatie analyse naar één gen gekeken, namelijk het *tumor protein 53 gen (TP53)*. Door de exonen van *TP53* te amplificeren middels een polymerase chain reaction(PCR) en te sequencen volgens de Sanger methode, kan bepaald worden of er een mutatie aanwezig is.

Indien er in beide tumoren één mutatie gezien wordt op exact dezelfde positie in *TP53*, kan men zeggen dat het een metastase betreft. Als er twee mutaties worden gevonden op twee verschillende posities in *TP53* kan men stellen dat de tumoren een andere klonale oorsprong hebben. Hetzelfde geldt als een tumor een mutatie heeft en de andere tumor geen mutatie.

In het verleden is de p53 mutatie analyse vooral op vers (ongefixeerd) weefsel uitgevoerd in het AZN, waarbij RNA uit weefsel werd omgezet in copy DNA en vervolgens werd hiervan de sequentie bepaald en geanalyseerd op mutaties.

Ook is de analyse uitgevoerd op gefixeerd materiaal, waaruit het DNA geïsoleerd werd en hierop een nested-PCR werd uitgevoerd. Een nested-PCR houdt in dat er tweemaal een PCR wordt uitgevoerd, eerst op het target DNA en vervolgens met interne primers op de verkregen PCR-producten van de eerste PCR. Dit werd vervolgens gesequenced en geanalyseerd op aanwezigheid van mutaties.

Gezien de resultaten niet optimaal waren en de gehele procedure veel tijd in beslag nam is in 2010 besloten om de p53 mutatie analyse uit te besteden aan de moleculaire pathologie van het Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU). Echter met het oog op het NGS project wil men de p53 mutatie analyse weer opzetten in het AZN. Dit om de vergelijking te kunnen maken tussen de resultaten van de NGS en de conventionele p53 mutatie analyse.

De doelstelling van deze scriptie opdracht is dan ook om een p53 mutatie analyse op te zetten op DNA geïsoleerd uit gefixeerd weefselmateriaal, waarbij maar eenmalig een PCR wordt uitgevoerd en er gesequenced hoeft te worden. Dit om de mogelijke klonale verwantschappen tussen longtumoren aan te tonen. Afhankelijk van de resultaten zou ook getracht worden om de analyse nog te valideren.

2. Literatuurstudie

2.1. Longtumoren

Bij de longtumoren valt een onderverdeling te maken tussen twee grote groepen, namelijk de niet-kleincellige long carcinomen (NSCLC) en de kleincellige long carcinomen (SCLC). Dit is de belangrijkste onderverdeling met betrekking tot de behandeling van de patiënt. Waarbij patiënten met SCLC meestal een palliatieve chemotherapie krijgen, kan een patiënt met een NSCLC mogelijk nog geopereerd worden. Deze laatste groep patiënten heeft een grotere overlevingskans.^[2] Tot de NSCLC behoren de volgende typen carcinomen:

- *Squameus cel carcinoma (SCC)*: Origine van bronchiale epitheelcellen.
- *Adenocarcinoom (ADC)*: Origine van de tumorcellen zijn broncho alveolaire epitheelcellen.
- *Grootcellig carcinoom (GCC)*: Kleine groep waarbij geen differentiatie te maken valt tussen ADC of SCC.

In het verleden is er ook geprobeerd een onderverdeling te maken voor de SCLC groep, welke van origine neuroendocrine is. Echter doordat er geen verschil was tussen de overlevingskansen van de patiënt en omdat ervaren long pathologen moeilijk histologisch het onderscheid konden maken, is de onderverdeling vervallen. Er wordt nog wel een onderverdeling gemaakt tussen de groep SCLC en een combinatiegroep van SCLC en NSCLC.^{[2][4][5]}

2.2. Mutaties initiëren de tumorgenese

Zoals al eerder vermeld bevat sigarettenrook vele carcinogene stoffen die kunnen leiden tot de vorming van longtumoren. Deze carcinogene stoffen kunnen een binding aangaan met het DNA in de longcellen, waarbij het de voorkeur heeft om aan de nucleotiden adenine en guanine te binden. Een binding van het carcinogeen aan nucleotiden wordt een DNA-adduct genoemd.

Wanneer het DNA-adduct niet opgemerkt wordt door het repair mechanisme van de cel, kan dit leiden tot fouten in de codering in het DNA. Deze coderingsfouten kunnen leiden tot permanente mutaties in het DNA. Als de coderingsfouten niet door het repair mechanisme worden verbeterd kan de cel als laatste redmiddel nog in apoptose gaan om de mutatie ongedaan te maken. Echter wanneer deze mutatie in een cruciaal gen voorkomt dat betrokken is bij de apoptose, zoals een oncogen of een tumorsuppressor gen als *TP53*, kan de cel niet in apoptose gaan en kan dit uiteindelijk leiden tot de vorming van een tumor.^[6]

2.3. Nicotine stimuleert de tumorgenese

De carcinogene stof nicotine is zelf niet in staat om mutaties te veroorzaken die leiden tot longkanker, maar promoot met name de tumorgenese na het ontstaan van deze mutaties. Bijvoorbeeld door proliferatie van de tumorcellen te promoten.

Op het celoppervlak van de longtumorcellen en normale longcellen zijn nicotine acetylcholine receptors (nAChrs) aanwezig. De nAChrs binden acetylcholine, dat als een autocrine of paracrine groeifactor werkt in een feedbackloop. Deze feedbackloop leidt tot proliferatie van de longcellen en tumorcellen.

Naast acetylcholine als ligand heeft ook nicotine de mogelijkheid om als ligand te binden aan de nAChrs. Wanneer nicotine bindt aan een nAChrs stimuleert dit het vrijkomen van epidermal growth factor (EGF) in het weefsel en het vrijkomen van meer acetylcholine. Het EGF is een ligand voor de epidermal growth factor receptor (EGFR), waardoor de Ras-Raf-Erk route in de cel geactiveerd wordt. (zie fig. 1) Deze route leidt uiteindelijk tot proliferatie van de cel die geactiveerd wordt.^[7]

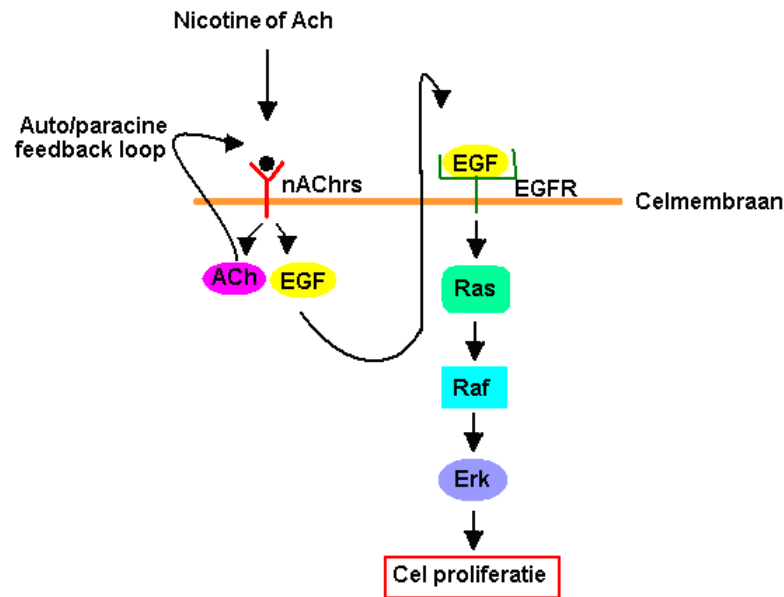


Fig. 1: Binding van nicotine en Ach aan het membraan gebonden nAChrs leidt tot een autocrine of paracrine feedback loops van ACh en tot het vrijkomen van EGF. Het EGF bindt aan EGFR, wat leidt tot de activatie van de Ras-Raf-Erk route en zorgt voor cel proliferatie.(afbeelding zelf gemaakt)

2.4. Tumorsuppressor p53

Mutaties en beschadigingen in het DNA kunnen leiden tot cellulaire stress en uiteindelijk tot het ontstaan van tumoren. Wanneer er cellulaire stress optreedt, wordt het tetramere eiwit p53 geactiveerd. Het *TP53* gen, bestaande uit 11 exonen, is gelegen op de korte arm van chromosoom 17(17.13) en codeert voor deze tumorsuppressor.^[9] De tumorsuppressor heeft als functie de cel in groei arrest te laten treden om de eventuele schade te herstellen of de cel met onherstelbare schade in apoptose te laten gaan.

Normaal is het p53 eiwit als inactieve transcriptie factor in een lage concentratie aanwezig in de cellen van het lichaam, waar het een complex vormt met het eiwit Mouse Double Minute 2 homolog (MDM2). Door de binding van het transactivatie domein van p53 aan MDM2, wordt er voor gezorgd dat het p53 inactief is en niet in staat is om transcriptie te activeren van de genen die betrokken zijn bij apoptose of cel cyclus arrest. Daarnaast heeft MDM2 ook de eigenschap om als p53-specifieke E ubiquitin ligase te acteren. Hiermee kan het ubiquitine als markers binden aan het p53 eiwit, deze markers worden vervolgens opgemerkt door proteasomen met als gevolg dat het eiwit wordt afgebroken in kleine peptides.^{[7][10][11]} Deze afbraak door proteasomen wordt via een negatieve feedbackloop in stand gehouden door p53, welke voor transcriptie zorgt van MDM2.^[11] Op twee verschillende manieren kan het inactieve p53 geactiveerd worden, namelijk door cellulaire stress veroorzaakt door DNA schade of door oncogene activiteit(zie fig. 2).^[10]

Cellulaire stress door DNA schade kan veroorzaakt worden door bijvoorbeeld het breken van de DNA strengen, telomeren erosie of U.V.-straling.^[5] De cellulaire stress signalen zorgen ervoor dat het eiwit Ataxia-telangiectasia mutated (ATM), MDM2 en Checkpoint kinase 2(CHK2) fosforyleert (zie fig 2. punt 2 t/m 4). Door de fosforylatie van MDM2 laat het inactieve p53 los, deze wordt op zijn beurt gefosforyleerd door CHK2, waardoor het p53 nu actief is en transcriptie kan uitvoeren van verschillende genen die betrokken zijn bij apoptose(Bax, PIG of NOVXA) en cel cyclus arrest(p21).^[11]

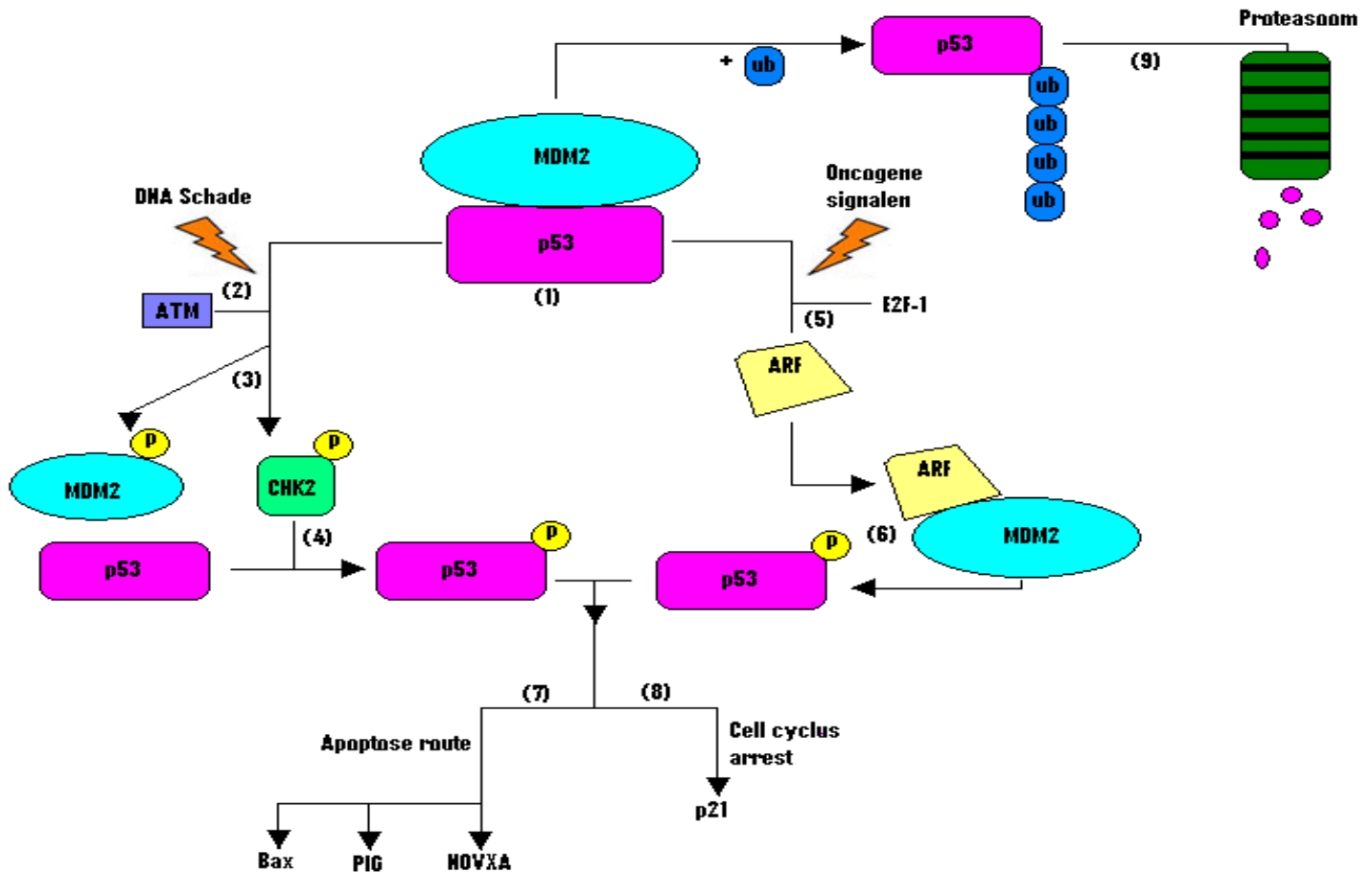


Fig. 2: Het complex MDM2/p53(1). Door DNA-schade (2) wordt ATM geactiveerd, welke MDM2 en CHK2 fosforyleerd(3). Het MDM2/p53 complex komt los en p53 wordt gefosforyleerd door CHK2(4). Bij de oncogene route activeren de oncogene signalen E2F-1 transcriptie factor, welke zorgt voor de transcriptie van het eiwit ARF(5). ARF bindt aan MDM2, waardoor p53 los laat van MDM2 en nu actief kan worden(6). Beide routes die p53 activeren, stimuleren of de apoptose route waarin de eiwitten Bax, PIG en NOVXA betrokken zijn(7), of de cel cyclus arrest route, waarbij p21 de cel cyclus stil legt en er herstel van eventuele beschadigen plaats kan vinden. (8) Bij de cellen zonder stress houdt MDM2 het p53 level laag, door hieraan ubiquitous markers te binden, die herkend worden door de proteasomen en vervolgens p53 afbreken in kleine peptides.(9) (afbeelding zelf gemaakt)

De andere activatie route vindt plaats door de oncogene signalen afkomstig van de pro-oncogene cellen. De transcriptie factor E2F-1 wordt door oncogene signalen gestimuleerd tot het uitvoeren van de transcriptie van het gen dat codeert voor het Alternate Reading Frame (ARF) eiwit. Het ARF hecht vervolgens aan MDM2 waardoor p53 los laat en gefosforyleerd kan worden (zie fig2. punt 5 t/m 6). p53 kan nu net als bij de DNA schade route transcriptie uitvoeren van eiwitten die betrokken zijn bij apoptose en cel cyclus arrest.^{[11][12]}

2.5. p53 als klonale marker

Bij patiënten met longtumoren heeft ongeveer 15% van de patiënten kans op een synchrone longtumor, wanneer de eerste diagnose gesteld wordt. Daarnaast heeft zo'n 10% van de patiënten na behandeling van de eerste tumor kans op het ontwikkelen van een tweede tumor, een metachrone tumor genoemd (Fig. 3A&B).^[13]

In beide situaties is het probleem dat er moeilijk een onderscheid gemaakt kan worden tussen tumoren, hetzij synchroon of metachroon tumoren, of zij klonaal verwant zijn en de tumor dus gemetastaseerd is. Of dat beide tumoren een andere klonale oorsprong hebben en er sprake is van twee primaire tumoren.

Histologisch is het verschil goed aantoonbaar wanneer het gaat om twee verschillende typen tumoren, zoals een SCC en ADC. Echter komt het vaak voor dat zowel de primaire tumor als de secundaire tumor (metastase of tweede primaire) er histologisch hetzelfde uitzien (Fig. 3C).^{[13][14]}

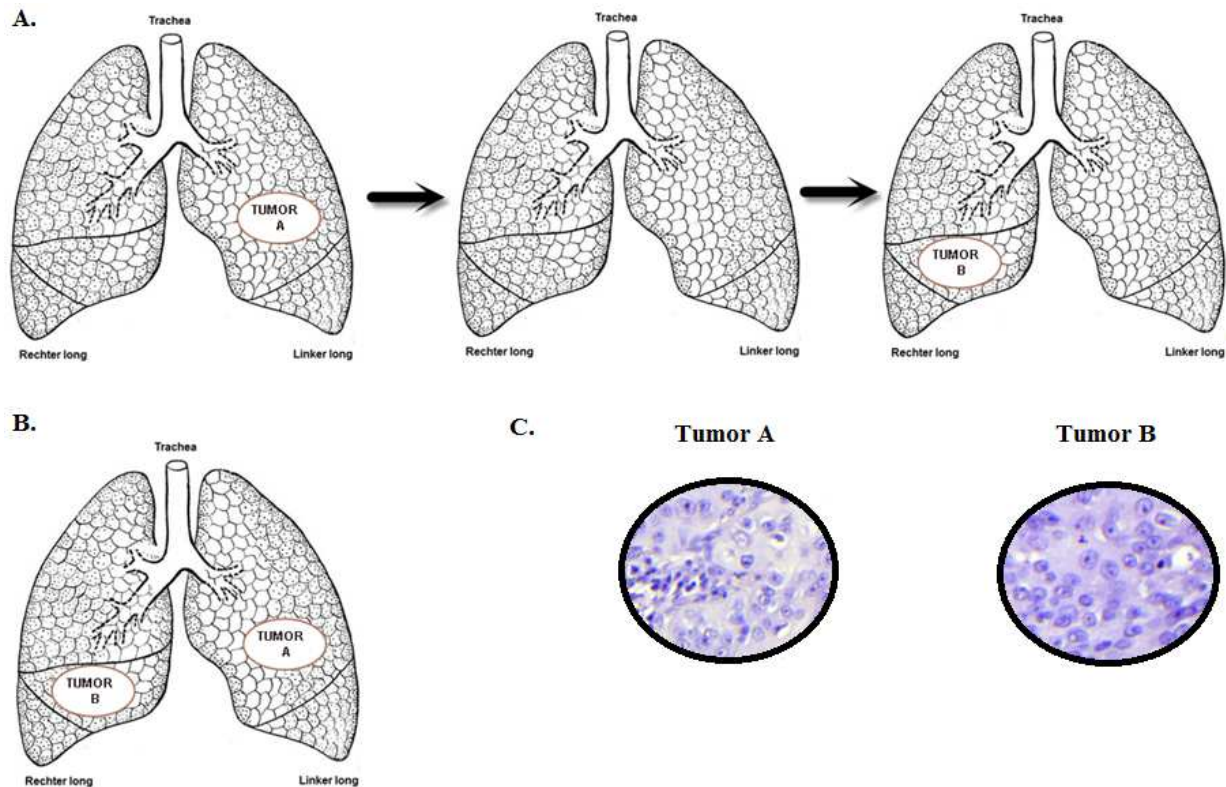


Fig. 3: A. Metachrone tumor: Tumor A is eerst gediagnosticeerd en behandeld. Na behandeling van tumor A ontstaat tumor B. B.

Synchrone tumor: Tumor A en B zijn gelijktijdig gediagnosticeerd. C. Voorbeeld van gelijkenis van morfologie van beide tumoren, op basis van dit beeld kan geen uitspraak gedaan worden over klonale verwantschap. (Bron: www.schoolplaten.com, zelf verder bewerkt.)

Het belang om onderscheid te maken tussen een metastase of een tweede primaire tumor heeft te maken met de behandeling van de patiënt. Bij patiënten met een tweede primaire tumor kan nogmaals een operatie overwogen worden en is de prognose beter dan bij patiënten met een metastase. Deze laatste groep patiënten wordt in het algemeen niet meer geopereerd en krijgt een palliatieve behandeling in de vorm van chemotherapie.^{[14][15]} Het betreft hier met name patiënten met een NSCLC, gezien patiënten met een SCLC meestal al een palliatieve behandeling krijgen.

Om het onderscheid toch te kunnen maken kan het *TP53* gen gebruikt worden als klonale marker. Het *TP53* is ongeveer bij 50% van alle tumoren gemuteerd, bij longtumoren is dit bij 50% van de SCC en bij 30% van de ADC. Deze mutaties blijven geconserveerd wanneer de tumor metastaseert.^{[15][10]} Door een vergelijking te maken van de mutaties aanwezig in de eerste tumor en de tweede tumor, kan men bepalen of het een metastase betreft of een tweede primaire tumor.

Voor het aantonen van mutaties in het *TP53* gen in tumoren, maakt men gebruik van de p53 mutatie analyse. Deze analyse bestaat uit de volgende stappen: DNA-isoleren van benigne weefsel en twee tumoren, amplificeren van de verschillende exonen van *TP53* door middel van PCR, sequencen van de PCR-producten volgens Sanger methoden en het analyseren van de verkregen sequenties op aanwezigheid van random mutaties.^{[13][14][15][16]}

2.6. *p53 mutatie analyse: bepalen klonale verwantschap*

Per tumor worden er bij de p53 mutatie analyse verschillende exonen uit het *TP53* gen geanalyseerd. Door de gevonden mutaties in de tumoren met elkaar te vergelijken kan men op basis van de mutaties tot een indeling van de volgende groepen komen:

- Groep 1: Alleen één mutatie in één tumor.
- Groep 2: De tumoren hebben elk een andere mutatie.
- Groep 3: Één identieke mutatie in beide tumoren.
- Groep 4: Geen mutaties in beide tumoren.

Wanneer de tumoren de patronen van groep 1 en 2 vertonen kan men concluderen dat de tumoren niet-klonaal verwant zijn. Echter moet bij de vergelijking van groep 1 rekening gehouden worden met mogelijke progressie van de tumoren. Hiermee wordt bedoeld dat er tijdens het ontstaan van de primaire tumor er geen p53 mutatie aanwezig is, maar dat er bij de metastase wel een mutatie optreedt om de groeivoordelen van de tumor te bevorderen. Bij groep 1 moet dus enige voorzichtigheid in acht genomen worden bij de conclusie.

De vergelijking van groep 3 geeft aan dat de tumoren klonaal verwant zijn. Volgens *Th. M. Rens et al.* is de kans op een identieke mutatie in beide tumoren minder dan 1% en kan men concluderen dat de tumoren bij groep 3 klonaal verwant zijn en dat de patiënt een metastase heeft.

Op basis van groep 4 kan er geen uitspraak gedaan worden over de klonale verwantschap tussen tumoren, gezien er geen mutaties aanwezig zijn in beide tumoren.

Bij elke vergelijking van mutatie patronen moet er naast de twee tumoren ook een stuk benigne weefsel van de patiënt geanalyseerd worden, dit om eventuele polymorfismen in het *TP53* gen uit te sluiten.^{[13][15]}

2.7. *Het Core-domein van TP53*

Bij de p53 mutatie analyse wordt in het bijzonder gekeken naar exon 5 tot en met 8 van het *TP53* gen, deze exonen vormen het core-domein. Het core-domein codeert voor het DNA bindingsdomein van het p53 eiwit, welke er voor zorgt dat p53 kan binden aan het DNA. Na binding aan het DNA kan de transcriptie van target genen gestart worden.

Een puntmutatie in het gen dat codeert voor het core-domein kan er toe leiden dat er een verkeerd aminozuur ontstaat, wat weer invloed heeft op de structuur van het p53 eiwit. Als de structuur verandert kan mogelijk het p53 niet meer binden en is het niet meer in staat tot transcriptie van genen betrokken bij de apoptose of cel arrest. Tevens is het ook mogelijk dat er een deletie plaatsvindt, hierdoor valt er een of meerdere nucleotide weg en wordt de structuur van het eiwit veranderd of p53 wordt in zijn geheel niet meer gevormd.

Bij NSLC bevinden de meeste mutaties zich in het core-domein.^{[17][13]} In het artikel van *W.-M. Gao et al.* staat vermeld dat bij NSLC 89% van de p53 mutaties in het core-domein voorkomen bij ADC en bij SCC is dat 50%. Tevens vermeldt de auteur ook dat beide tumoren verschillende hotspots hebben. Voor ADC zou dit codon 248(31%) en 249(16%) zijn en voor SCC codon 267(15%), 249(8,8%), 259(8,8%) en 248(2,9%).^[17] Deze codons liggen voor een groot deel in exon 7(248, 249, en 259) en in exon 8 (267), om deze reden is het interessant om in eerste instantie exon 5 tot en met 8 op te zetten voor de p53 mutatie analyse.

Echter een studie van *Skaug. V et al.* meldt dat 88% van de mutaties in het core-domein aanwezig zijn, maar daarnaast bevinden zich nog 12% van de mutaties in exon 4 en 9.^[18] Dit betekent dat een deel van de mutaties gemist zal worden als de focus alleen ligt op exon 5 tot en met 8. De cijfers zijn gebaseerd op een screening van mutaties in exon 4 tot en met 9 in NSLC.

2.8. Immunohistochemische p53-kleuring als indicator

Naast het gebruik van de p53 mutatie analyse om mutaties aan te tonen in het *TP53* gen, kan de immunohistochemische p53-kleuring als indicator gebruikt worden.

Het p53-eiwit dient bij deze kleuring als epitoom voor een gelabeld antilichaam, welke met behulp van een lichtmicroscop waargenomen kan worden in de tumorcellen van het preparaat. De kleuring wordt alleen positief beschouwd indien de kern aankleurt, dit geeft aan dat het eiwit zijn functie als transcriptie factor uitvoert.

Normaal heeft het wild-type p53 eiwit een korte halfwaardetijd en is deze niet zichtbaar in de tumorcellen als er een p53-kleuring op is uitgevoerd. Echter kan er door een mutatie in het *TP53* gen een conformatie verandering plaats vinden in het eiwit, doordat het gemuteerde nucleotide voor een ander aminozuur codeert. Indien dit het geval is kan de halfwaardetijd verlengd worden en is het p53 eiwit wel zichtbaar in de kern van de tumorcellen met de p53-kleuring.

Bij patiënten met een dubbele longtumor kan het zijn dat de ene tumor p53 aankleurt en de andere tumor niet. Dit is mogelijk een indicatie dat beide tumoren een andere klonale oorsprong hebben, echter blijft het een indicatie gezien ook andere gemuteerde eiwitten de halfwaardetijd van het p53-eiwit kunnen verlengen. Er kan een binding ontstaan tussen het p53-eiwit en het gemuteerde eiwit, een voorbeeld hiervan is het *ras* oncogen eiwit.^[20]

3. Opzet strategie van de p53 mutatie analyse

Het opzetten van de p53 mutatie analyse bestaat uit de volgende drie punten, namelijk het weefselmateriaal uitzoeken en het DNA hier uit isoleren, het opzetten van de PCR en de sequentiereactie. (flowschema zie fig. 4) Via een trial-and-error methoden wordt de p53 mutatie analyse geoptimaliseerd, hierbij wordt er steeds één enkele factor in de procedure van de PCR of sequentiereactie veranderd. De factoren worden aangepast aan de hand van de website Bio-Rade PCR troubleshooting^[A], hierna wordt er bekeken of deze verandering een positief of negatief effect heeft op het resultaat.

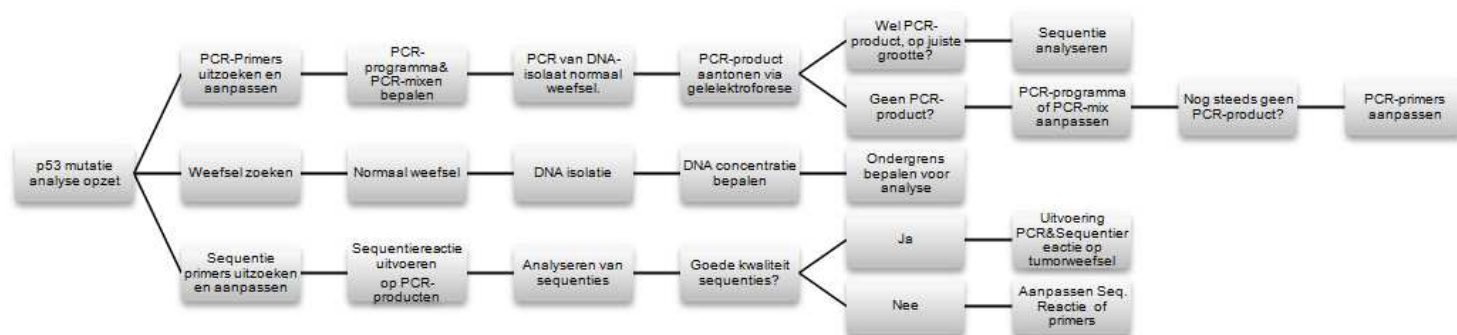


Fig. 4: Flowschema van de drie punten die zijn gebruikt voor het opzetten van de p53 mutatie analyse.

3.1. Opzet strategie p53 mutatie analyse: Weefsel/materiaal uitzoeken

Er is een bewaartermijn van 30 jaar voor het weefsel dat verwerkt wordt op de afdeling pathologie. Aangezien er vaak extra onderzoeken worden uitgevoerd op weefsels die tumoren bevatten is het materiaal erg kostbaar. Om deze reden is er besloten om de p53 mutatie analyse eerst op te zetten en te optimaliseren met benigne weefselmateriaal, wat in ruime mate aanwezig is op het laboratorium. Er worden weefsels geselecteerd waaruit veel DNA geïsoleerd kan worden, zoals lever of lymfklier. Daarnaast wordt er ook een stuk niet-maligne long meegenomen bij het opzetten, want uiteindelijk moet de analyse uitgevoerd worden op longweefsel.

Het uitgangspunt is dat de p53 mutatie analyse het juiste PCR-product en sequentie moet verkrijgen van exon 5 tot en met 8, waarvan de sequentie goed evalueerbaar zijn. Wanneer dit het geval is kan de p53 mutatie analyse getest worden op tumorweefsel. Dit zal uitgevoerd worden op tumorweefsel waar eerder een p53 mutatie analyse op uitgevoerd is in het UMCU, dit om de resultaten van de p53 mutatie analyse bij het AZN te vergelijken met de resultaten uit het UMCU. Op basis hiervan kan bepaald worden of de p53 mutatie analyse goed werkt.

3.2. Opzet strategie p53 mutatie analyse: PCR

Eerst wordt er een analyse opgezet voor het core-domein van het *TP53* gen, exon 5 tot en met 8. De reden voor deze keus is dat 88% van de mutaties gevonden wordt in het core-domein. Wanneer de analyse voor exon 5 tot en met 8 goed werkt wordt er gekeken om ook een analyse voor exon 4 en 9 op te zetten, waarmee de kans op het vinden van een mutatie wordt verhoogd met ongeveer 12%.

De primers die gebruikt gaan worden om de exonen van het core-domein te amplificeren zijn afkomstig uit het artikel van, *Van der Sijp. et al.* In het artikel wordt gemeld dat er fragmenten kleiner dan 200 bp geamplificeerd worden, omdat door de histologische verwerkingsprocedure van het weefsel het DNA vaak gefragmenteerd is. Hoe kleiner het PCR-product, hoe groter de kans op een PCR-product.

Alle exonen van het core-domein in het onderzoek van *Van der Sijp et al.* worden geamplificeerd met twee verschillende primerparen, waarbij de PCR-producten elkaar deels overlappen. Dit betekent dat er 24 PCRs en 48 sequentiereacties uitgevoerd moeten worden voor één patiënt, waarbij een benigne en twee tumorweefsel samples meegenomen worden. Het is praktisch gezien niet handig, maar aangezien het weefsel op de afdeling pathologie een vergelijkbare verwerkingsprocedure heeft als in het artikel wordt er voor deze primers en methode gekozen.^[19]

Indien het opzetten van de PCR middels deze methode niet lukt, zullen de primers uit het artikel van Angelopoulou et al. (zie tabel 1) getest worden. Deze primers hebben als voordeel dat met een primerpaar een heel exon geamplificeerd wordt en er de helft minder PCR en sequentiereacties uitgevoerd hoeven te worden in vergelijking met de primer van Van der Sijp et al. In bijlage IV is een overzicht gegeven, op welke positie in het exon de primers van zowel Van der Sijp als Angelopoulou gelegen zijn.

Als de PCR van het core-domein opgezet is op tumorweefsel, wordt de PCR voor exon 4 en 9 opgezet. Deze exonen vallen buiten het core-domein, echter zoals in hoofdstuk 2.7 vermeld is kan er 12% meer mutatie gevonden worden indien deze exonen in de p53 mutatie analyse worden opgenomen. Dit aan de hand van de primers afkomstig uit het artikel van Angelopoulou et al.^[21]

Tabel 1: Primers uit de artikelen van Van der Sijp et al. en Angelopoulou et al. Dit worden tevens de primers voor de sequentiereactie.

Primerset	Primerpaar	Sequentie	PCR-product grootte (bp)
Van der Sijp	5.1 F	CCT GAC TTT CAA CTC TGT CTC	158
	5.1 R	ACT GCT TGT AGA TGG CCA TG	
	5.2 F	CAG CTG TGG GTT GAT TCC AC	176
	5.2 R	CTG GGG ACC CTG GGC AAC	
	6.1 F	AGG CCT CTG ATT CCT CAC TG	127
	6.1 R	GCA CCA CCA CAC TAT GTC GA	
	6.2 F	CTC CTC AGC ATC TTA TCC GA	159
	6.2 R	CCA CTG ACA ACC ACC CTT	
	7.1 F	AGG CGC ACT GGC CTC ATC TT	141
	7.1 R	TCC AGT GTG ATG ATG GTG AGG	
	7.2 F	CAT GTG TAA CAG TTC CTG CAT G	135
	7.2 R	GAG GCA AGC AGA GGC TGG	
Angelopoulou	8.1 F	CCT TAC TGC CTC TTG CTT CTC	130
	8.1 R	CTT GCG GAG ATT CTC TTC CTC	
	8.2 F	TTG TGC CTG TCC TGG GAG AG	127
	8.2 R	CTC CAC CGC TTC TTG TCC T	
	5 F	TGTTCACTTGTGCCCTGACT	268
	5 R	CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG	
	6 F	CTGGGGCTGGAGAGACGACA	247
	6 R	GGAGGGCCACTGACAACCA	
	7 F	CTCCCCTGCTTGCCACA	245
	7 R	AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA	
	8 F	ACAAGGGTGTTGGGAGTAGATG	320
	8 R	GCAAGGAAAGGTGATAAAAGTGAA	

3.3. Opzet strategie p53 mutatie analyse: sequencing

Als er via gelelektroforese is aangetoond dat er daadwerkelijk PCR-producten zijn ontstaan tijdens de amplificatie, kan de sequentie van de PCR-producten bepaald en geanalyseerd worden, er wordt hierbij met name gekeken naar de dekking van het exon en of er wel of niet achtergrondruis aanwezig is.

Voor de sequentiereactie worden eerst de primers gebruikt die tijdens de amplificatie gebruikt zijn, de reden hiervoor is dat de PCR-producten redelijk klein zijn voor het vinden van andere goede interne primers en bij het gebruik van interne primers kan er slechts maar een deel van het exon gesequenced worden.

Lukt de sequentie reactie niet met dezelfde primers van de PCR kunnen er alsnog nieuwe primers ontworpen worden. Indien de p53 mutatie analyse naar behoren werkt op het normale weefsel materiaal, kan de PCR en sequentiereactie getest worden op tumorweefsel.

4. *Materiaal en methoden*

Naast de primers was ook het PCR-programma en de PCR-mix over genomen uit het artikel van *Van der Sijp et al.*, echter wegens enkele onduidelijkheden in het artikel zijn sommige factoren niet overgenomen. Voor deze factoren was een gemiddelde waarde gekozen, gebaseerd op de informatie van Bio-Rade PCR troubleshooting^[A] Deze factoren waren de magnesiumchloride (MgCl₂), de primer concentratie en in het PCR-programma de eerste denaturatiestap.

Het gebruikte PCR-programma bestaat uit een denaturatie stap van 95°C voor 5 min, gevolgd door denaturatie bij 95°C voor 30 sec, annealing bij 55°C voor 45 sec en elongatie bij 72°C voor 30 sec. de laatste drie stappen werden 35x herhaald. Het PCR-programma eindigde met een laatste elongatie bij 72°C voor 10 min en dan terug gebracht naar kamertemperatuur (KT).

Voor de primerset van *Angelopoulou et al.* werd dezelfde PCR-mix en PCR-programma gebruikt als hierboven beschreven uitgezonderd de annealingstemperatuur, deze is 58°C in plaats van 55°C vanwege de hogere melting temperatuur van de primers *Angelopoulou et al.*

Naar aanleiding van het testen en optimaliseren op benigne materiaal is er besloten om met de primerset van *Angelopoulou et al.* de p53 mutatie analyse uit te voeren op tumormateriaal. Aan de hand van de resultaten die verkregen werden bij de optimalisatie werd er een werkwijze opgesteld, welke in paragraaf 4.1 tot en met 4.8 beschreven is.

Tabel 2: De inhoud van de PCR-mix waarmee gestart is voor het opzetten en optimaliseren van de P53 mutatie analyse. Dit voor de primerset Van der Sijp en Angelopoulou.

Bestandsdeel PCR-mix	Concentratie	Hoeveelheid aan de mix toegevoegd (µl)
PCR Buffer	10x	2
Magnesiumchloride	25 mM	1.25
dNTP's	4 x 25 µmol	2
Primer forward	25 pmol	1
Primer reverse	25 pmol	1
Taq polymerase	5 U/ µl	0.2

4.1. *Weefsel*

In de jaren 2012 en 2013 zijn er in het pathologisch laboratorium van het St. Antonius ziekenhuis in totaal 12 p53 mutatie analyses aangevraagd op materiaal van patiënten met zowel synchrone als metachrone longtumoren, welke zijn uitgevoerd door het pathologisch laboratorium van het UMCU.

Uit deze 12 patiënten werden er vijf geselecteerd, waarbij er nog voldoende tumormateriaal in het paraffineblokje aanwezig was voor het opzetten van de p53 mutatie analyse. Van deze vijf patiënten waren er twee patiënten met meerdere SCC en drie patiënten met meerdere ADC (zie tabel 3).

De weefsels zijn in 2012 en 2013 volgens de normale histologische procedure gefixeerd met formaline en vervolgens ingebed in paraffine. Van het paraffine materiaal zijn hematoxyline en eosine (HE) gekleurde preparaten gemaakt, waarop de patholoog het type tumor heeft gediagnosticeerd en het de tumorpercentage. Tevens is er een immunohistochemische kleuring voor p53 uitgevoerd.

Tabel 3 : De patiënten met meerdere longtumoren. Per patiënt zijn er drie samples gebruikt, één sample afkomstig van benigne longweefsel(N) en twee samples van longtumoren(T1 en T2). In het UMCU is er een p53 mutatie analyse uitgevoerd en een bijbehorende uitslag is gegeven of de tumor een tweede primair is of een metastase.

Pt	Weefsel	Type tumor	Dubbele longtumor	p53 expressie (verleden)	P53 mutatie analyse UMCU
1	N	Nvt.	Synchroon	Nvt.	Wt
	T1	ADC		+	Wt
	T2	ADC		+	Wt
2	N	Nvt.	Metachroon	Nvt.	Wt
	T1	SCC		+	(c.744G>C(p.R248P))
	T2	SCC		+	Wt
3	N	Nvt.	Rest tumor	Nvt.	Wt
	T1	SCC		+	(c.736A>G(p.M246V))
	T2	SCC		+	(c.736A>G(p.M246V))
4	N	Nvt.	Synchroon	Nvt.	Wt
	T1	ADC		-	Wt
	T2	ADC		+	(c. 716A>T (p.N239I))
5	N	Nvt.	Synchroon	Nvt.	Wt
	T1	ADC		+/-	(c.584T>C(p.I195T))
	T2	ADC		-	Wt

4.2. DNA isolaties

Voor de DNA isolatie werd er per sample 4 á 5 paraffinecoupes(PC) van 10 µm dikte gesneden met het microtoom, wanneer de patholoog het tumorpercentage in de HE coupe op meer dan 80% geschat had, werden de PC direct in een 1,5 ml epjes (Eppendorf) opgevangen.

Wanneer er minder dan 80% tumor in het sample geschat was, werden de PC eerste opgevangen op preparaat glaasjes en het tumordeel gemarkeerd met een stift. Vervolgens werd de gemarkeerde tumordeel met behulp van een scalpelmesje er afgeschraapt en direct in een 1,5 ml epje opgevangen.

Het DNA werd vervolgens uit de PC geïsoleerd met de commerciële isolatiekit QIAamp DNA Mini Kit (Cat. No. 51304, QIAGEN, Hilden, Germany).

Aan het epje met weefselmateriaal werd 180 µl tissue lysis buffer (QIAamp DNA Mini Kit) toegevoegd en geïncubeerd voor 15 min. bij 98°C in de thermomixer (Thermomixer compact, eppendorf). Na kort centrifugeren en 5 min. afkoelen tot KT, werd er 20 µl proteinase K (QIAamp DNA Mini Kit) toegevoegd aan het lysaat en 15 sec. gevortex. Het lysaat werd vervolgens voor 60 min. geïncubeerd op 68°C en tegelijk geschud op 500 rounds per minute (rpm) in de thermomixer.

Na kort centrifugeren op maximale snelheid werd er 200 µl lysis buffer (QIAamp DNA Mini Kit) toegevoegd en geïncubeerd in de thermomixer op 70°C voor 10 min. Vervolgens werd er kort gecentrifugeerd op maximale snelheid, waarna 200 µl 100% ethanol werd toegevoegd en weer 15 sec. gevortex werd.

Het lysaat werd daarna overgebracht op een filterkolom (QIAamp DNA Mini Kit) met opvangbuisje en gecentrifugeerd op 14000 rpm. voor 1 min. De filterkolom werd vervolgens in een nieuw opvangbuisje geplaatst en een eerste maal gewassen met 500 µl wasbuffer 1 gevolgd door 500 µl wasbuffer 2 (QIAamp DNA Mini Kit). Na elke wasstap werd er gecentrifugeerd op 14.000 rpm voor respectievelijk 1 en 3 min.

Nadat de filterkolom in een 1,5 ml epje geplaatst was, werd er op het filter 50 µl elutiebuffer (QIAamp DNA Mini Kit) gepipetteerd en geïncubeerd voor 5 min. op KT. De kolomfilter met epje werd na incubatie voor 1 min bij 14000 rpm gecentrifugeerd.

Na isolatie werd er per sample de DNA concentratie bepaald met behulp van de NanoDrop (NanoDrop 2000 Thermo Scientific). Tevens werd er met de nanodrop de zuiverheid bepaald via de 260/280 absorptie ratio van het sample, indien de waarde hoger dan 1.80 was, werd het DNA als zuiver beschouwd.

4.3. TP53 PCR

Per exon werd er een PCR ingezet waarbij het totale volume van de PCR-mix 20 µl was, waarvan 10,55 µl H₂O (B. Braun melsungen Ag), 2 µl van 10x PCR Buffer II (Roche, Basel, Zwitserland) en 2 µl dNTP's (4 x 25 µmol, Invitrogen). Tevens werd er aan de mix 1,25 µl MgCl₂ (25 mM, Roche, Basel, Zwitserland) en 0,2 µl AmpliTaq® DNA Polymerase (5U/µl, Roche, Basel, Zwitserland) toegevoegd.

Per PCR-mix van exon 6 tot en met 8 werd 2 µl geïsoleerd DNA toegevoegd, ongeacht de DNA concentratie, of 2 µl H₂O (B. Braun melsungen Ag) als negatieve controle. Aan de PCR-mix van exon 5 werd een minimale DNA concentratie van 600 ng/µl toegevoegd.

De gebruikte primers zijn afkomstig uit het artikel van *Angelopoulou et al.* Per PCR-mix werd er 1 µl forward primer en 1 µl reverse primer (25 pmol, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) toegevoegd, de concentraties en de sequenties van de primers staan vermeld in tabel 1.

De PCR is uitgevoerd op de T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Berkeley, USA) met twee PCR-programma's een voor exon 5 en een voor exon 6 tot en met 8.

Het PCR-programma van exon 6 tot en met 8 begon met een denaturatie stap van 95 °C voor 10 min. Vervolgens ging een herhalende cyclus van 35 maal van start, waarbij er 30 sec. gedenateerd werd bij 95 °C, gevolgd door 45 sec. annealing bij 58 °C en de cyclus werd afgesloten met een elongatie stap van 30 sec. bij 72 °C.

Na de 35 cycli volgde er nog een laatste elongatie stap van 10 min. bij 72°C, waarna gekoeld werd tot een temperatuur van 10 °C.

Bij het PCR-programma van exon 5 was de annealing stap 62 °C op 30 sec. i.p.v. 58°C, de rest van het PCR-programma is gelijk aan dat van exon 6 tot en met 8.

4.4. Gelektroforese

De grootte van de PCR-producten zijn aangetoond op een 2% agarosegel, welke bestaat uit 2 gram agarose (Roche, 11 388 991, 500 g) en 100 ml 0,5X in Tris-borate-EDTA buffer. Aan de agarosegel werd 10 µl GelRed oplossing (10 mg/ml, Biotium) toegevoegd, waarmee de PCR-producten zichtbaar gemaakt kunnen worden met behulp van een ultraviolet lamp.

Aan 3 µl Orange G loading buffer werd 5 µl van het PCR-product toegevoegd en vervolgens op de agarosegel geladen. De PCR-producten zijn met het Owl model B2 elektroforese systeem (Thermo) over de agarose gel gerund voor 10 min. bij 100 volt. Er werd een 50 bp ladder DNA Molecular Weight Marker XIII (Roche, Basel, Switzerland) tijdens de elektroforese mee gerund, dit om de grootte van de PCR-producten te kunnen bepalen.

4.5. Zuivering met ExoSAP-IT

Voordat de sequentiereactie werd ingezet, werden eerst de storende elementen zoals dNTP's en losse primers er uit gezuiverd. Dit werd gedaan door 2 µl ExoSAP-IT (no. 78201, Affymetrix) toe te voegen aan 5 µl PCR-product, gepipetteerd in PCR-epjes (Bioplastic, landgraaf, Nederland). Deze epjes werden eerst gecentrifugeerd in een plaatcentrifuge (B4i, Juran) voor 1 min. bij 2000 rpm.

De epjes werden er vervolgens in de T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Berkeley, USA) geplaatst, waar het programma ExoSap PCR geselecteerd werd. Bij dit programma werd er geïncubeerd voor 15 min bij 37°C, gevolgd door 15 min bij 80°C.

4.6. Sequentie reactie

De sequence mix werd gemaakt in een 1,5 ml epje, waarbij per sequence reactie 3,5 µl H₂O (B. Braun melsungen ag), 1 µl Ready Reaction mix en 1,5 µl 5x sequencing buffer afkomstig uit de BigDye kit (BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit, Applied Biosystems, Foster City, USA) toegevoegd werd.

Na kort mixen met de vortex en afdraaien met behulp van een mini centrifuge (Mini Star Silverline, VWR, Rochester, USA), werd de mix uitverdeeld in een 96-wells plaat. Per well werd er 6 µl sequence reactie mix toegevoegd en 2 µl forward of reverse primer, welke ook gebruikt waren voor de PCR-reactie. Aan de mix werd per well 2 µl gezuiverd PCR-product gevoegd.

De 96-wells plaat werd vervolgens afgedraaid in de plaatcentrifuge voor 2 min. op 2000 rpm en in de T100 Thermal geplaatst. Het programma dyetermi werd geselecteerd, hierbij werden de volgende stappen 25x uitgevoerd. Eerst 96°C voor 10 sec., gevolgd door 50°C voor 5 sec. en 60°C voor 4 min. Als afsluiting van het programma was de temperatuur 10°C voor oneindig.

4.7. 3500 gen analyzer.

Voordat de sequentievolgorde bepaald kon worden, werd het sequentieproduct gezuiverd met behulp van de BigDye XTerminator Purification Kit (no. 4376486, Applied Biosystems, Foster City, USA). Per reactie/well werd er 55 µl SAM-XT oplossing toegevoegd, welke gemaakt werd door 49.5 µl SAM en 11 µl XT te mengen in een epje van 2 ml en vervolgens te vortexen.

De 96-wells plaat werd voor 15 min op ongeveer 1800 rpm gevortext, gevolgd door centrifugatie voor 2 min. op 2200 rpm in de plaatcentrifuge.

De plaat werd vervolgens geplaatst in de 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA), waarbij ingesteld werd om de sequentie te bepalen voor fragment met een grootte van 500bp.

4.8. Sequentie analyse.

De sequenties werden geanalyseerd met behulp van het programma SeqScape (versie 2.7, Applied Biosystems, Foster City, USA), waarin de genomische sequentie (NCBI Reference Sequence: NC_000017.11) van het *TP53* gen was ingeladen afkomstig uit Genbank van het National Center for Biotechnology Information (NCBI). De verkregen sequenties werden vervolgens met de genomische sequentie vergeleken. Dit om te controleren of het juiste exon gesequenced was en of er eventueel mutatie aanwezig zijn.

Een mutatie werd afgegeven wanneer er in de forward en reverse sequentie van een exon op dezelfde locatie een nucleotide aanwezig was die niet overeen kwam met de genomische sequentie. Ook werd de sequentie dan vergeleken met de sequentie van het benigne weefsel van dezelfde patiënt, zodat polymorfismen niet voor een mutatie beschouwd werden.

De sequentie werden als niet evalueerbaar beschouwd als er veel achtergrondruis aanwezig was, waardoor een mutatie niet zichtbaar meer was. Als 1 sequentie niet evalueerbaar was en er in de andere een mutatie aangetroffen werd, dan werd dit beschouwd als aanwijzing voor een mogelijke mutatie.

5.

Resultaten

In totaal waren er drie soorten weefsels gebruikt voor het opzetten en optimaliseren van de p53 mutatie analyse, namelijk lever, lymfklier en long. Hiervan was na DNA-isolatie uit het weefsel de DNA-concentratie bepaald. In tabel 4 staat vermeld welke weefsels gebruikt waren voor de opzet en optimalisatie van de p53 mutatie analyse. Het DNA-isolaat werd gebruikt om de exonen 5 tot en met 8 te amplificeren, welke was uitgevoerd met behulp van de primersets *Van der Sijp* en *Angelopoulou*.

Tabel 4: weefsels met gemeten DNA concentratie in ng/μl en 260/280 ratio.

Sample	weefsel	DNA conc. (ng/μl)	260/280 ratio
1	Lever	184.4	1.99
2	Lymfklier	129.1	1.92
3	Long	208.6	1.99
4	Lever	602.5	2.00
5	Lymfklier	129.1	1.98
6	Long	250.9	2.06

Na amplificatie met behulp van de primerset Van der Sijp, werden de PCR-producten aangetoond via elektroforese op een 2% agarosegel. Voor de primerparen 5.1, 5.2, 6.2, 7.1 en 7.2 was er een bandje zichtbaar van ±150 bp bij alle samples. Een bandje van ±125 bp was zichtbaar bij de primerparen 6.1, 8.1 en 8.2. Sample 5 vertoonde echter een zwak bandje bij primerpaar 8.1 en 8.2. Primerpaar 5.2 had bij alle samples een bij-bandje van ±100 bp. (zie fig. 5)

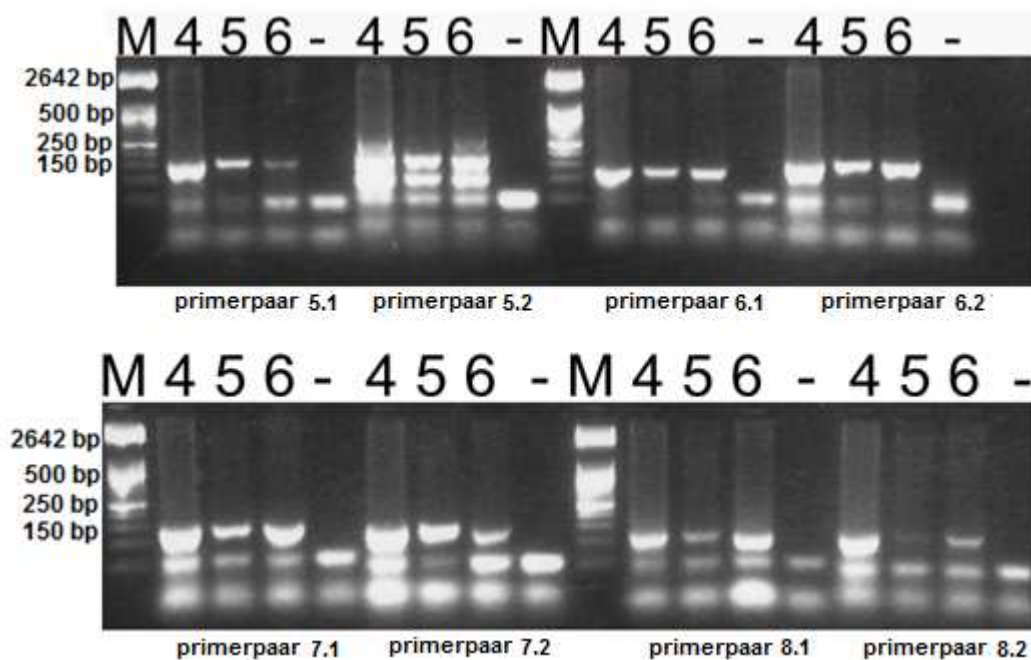


Fig. 5: De primerparen uit de primerset Van der Sijp tegen elkaar uitgezet in de vorm van aangetoond PCR-product, met een grootte van ±150 bp en ±125 bp, afhankelijk van het gebruikte primerpaar. Er is een 50 bp ladder mee gerund(M) om de grote van de PCR-producten te bepalen, welke links van de foto vermeld staan in bp. De nummers van de gerund samples staan vermeld aan de bovenzijde van de foto. De negatieve controle (-), was negatief bij alle PCRs. De bandjes onder de 50 bp zijn primerdimers met daaronder het front (loadingbuffer).

Bij de primerset van Angelopoulou vertoonden de primerparen 6 en 8 bij alle samples een bandje van ± 250 bp en bij primerpaar 7 een van ± 300 bp. Voor primerpaar 5 werd er bij sample 4 en 5 een licht bandje zichtbaar van ± 250 bp en bij sample 6 geen bandje. (zie fig. 6) Bij sample 5 was een zwak bandje zichtbaar bij zowel primerpaar 6 als 8.

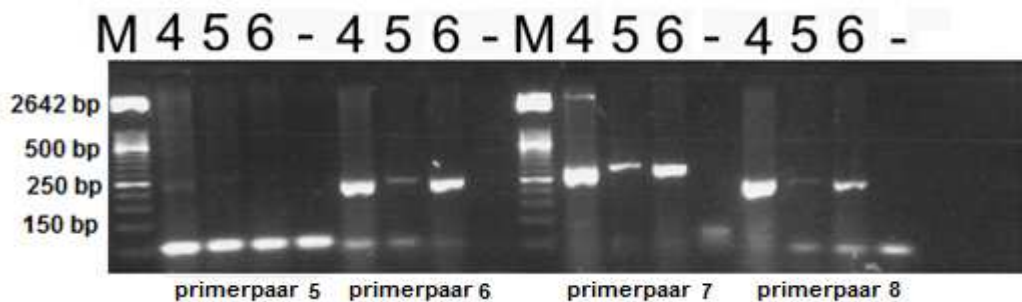


Fig. 6: De primerparen uit de primerset Angelopoulou tegen elkaar uitgezet in de vorm van aangetoond PCR-product, met een grootte van ± 250 bp en ± 300 bp, afhankelijk van het gebruikte primerpaar. Er is een 50 bp ladder mee gerund(M) om de grote van de PCR-producten te bepalen, welke links van de foto vermeld staan in bp. De nummers van de gerund samples staan vermeld aan de bovenzijde van de foto. De negatieve controle (-), was negatief bij alle PCRs. De bandjes onder de 50 bp zijn primerdimers met daaronder het front (loadingbuffer).

Aangezien alle samples bij primerset Van der Sijp een PCR-product vertoonden, werd elk sample gesequenced. De sequentie van exon 7 en 8 werd bij alle samples volledig gesequenced met behulp van de forward en reverse primers uit de primerset van der Sijp, respectievelijk primers 7.1-7.2 en 8.1 -8.2. Tevens was er bij de baseline van de sequentie van exon 7 en 8 geen achtergrond ruis zichtbaar.

De PCR-producten van exon 5 en 6 werden niet volledig gesequenced door de forward en reverse primers uit de primerset Van der Sijp, dit zijn de primers 5.1-5.2 en 6.1-6.2. De 5.2 primer sequentie, zowel forward als reverse, miste in het midden van de sequentie ongeveer 21 tot 25 nucleotiden van exon 5. Bij sample 5 miste de forward en reverse sequentie van 6.1 en 6.2 aan het begin van exon 6 19 nucleotiden, samples 4 en 6 miste bij de forward en reverse sequentie 3 nucleotiden aan het einde van exon 6 (Zie fig. 7). Op de baseline van de sequentie van primerpaar 5.2 was veel achtergrond ruis zichtbaar en de forward primer van 6.2 vertoonde een dubbele pieken patroon in de sequentie bij alle samples.

Bij de primerset van Angelopoulou was alleen sample 4 gesequenced, aangezien dit sample als enige bij alle exonen een duidelijk bandje in de agarosegel gaf van het correcte aantal bp. De primerparen 5, 7 en 8 verkregen de volledige sequentie van de target exonen en er was een strakke baseline waarin geen achtergrondruis aanwezig was. De forward sequentie van exon 6 was niet optimaal te beoordelen vanwege achtergrond ruis, echter was de reverse sequentie wel goed te analyseren.

Tevens is er gesequenced met de primerparen Van der Sijp als interne primers op de PCR-producten die verkregen zijn met de primers van Angelopoulou. Hiervan werd de reverse primer van het eerste primerpaar van een exon gecombineerd met de forward van het tweede primerpaar voor hetzelfde exon. Deze primers verkregen niet de volledige sequentie van de exonen. De forward en reverse primers gaven achtergrond ruis in de sequenties van exon 6 en bij de reverse primer van zowel exon 7 als 8.

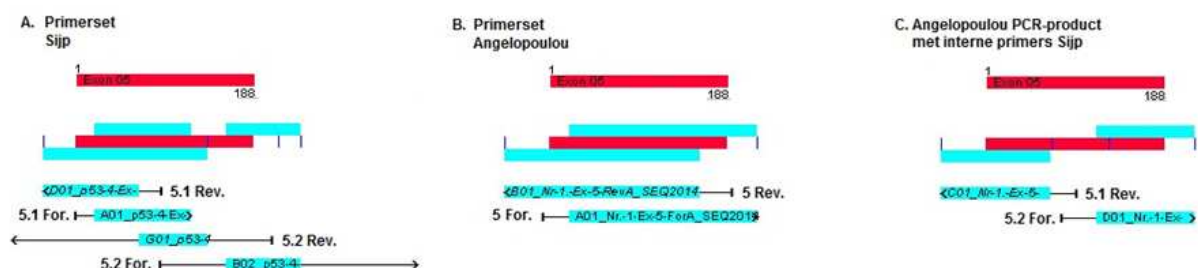


Fig. 7: De sequentie dekking van exon 5 bij sample 4: De rode streep stelt het volledige exon voor en de blauwe strepen de sequentie die verkregen zijn tijdens het sequencen. **A.** De verkregen sequenties (blauw) met behulp van primerpaar 5.1-5.2 (forward en reverse) Van der Sijp, dekken tezamen niet het volledige exon (rood). **B.** De primerset Angelopoulou gaf een volledige sequentie (blauw) dekking van exon 5 (rood). **C.** De primer set Van der Sijp als interne primers voor de sequentiereactie op PCR-producten verkregen met de primerset Angelopoulou, hierbij dekte de verkregen sequenties (blauw) het exon (rood) niet volledig.

5.1. Resultaten optimalisatie primerpaar 5.2 van der Sijp

Naar aanleiding van het bij-product dat ontstond bij de PCR met primerpaar 5.2, uit de primerset Van der Sijp, werd er een optimalisatie uitgevoerd. Hierbij waren diverse factoren van zowel de PCR-mix als PCR-cyclus aangepast. Per test werd er een factor veranderd en een voor een toegepast. Indien een veranderde factor een positief effect had, werd dit in het protocol opgenomen. In tabel 5 is een overzicht van de factoren, de veranderingen hiervan en het resultaat. Bij elke test is er een negatieve controle meegenomen, welke allemaal negatief waren. Samples 4 tot en met 6 waren gebruikt voor de optimalisatie stappen, met uitzondering van de $MgCl_2$ concentratie reeks hiervoor zijn sample 1 tot en met 3 gebruikt. Een compleet overzicht van de resultaten berekening en tussenconclusie staat vermeld in bijlage I.

Tabel 5: Overzicht van de factoren, de aanpassing die zijn toegepast op de factoren en het effect hiervan om de PCR van primerpaar 5.2 van de primerset Van der Sijp te optimaliseren.

Factor	Aanpassing	Resultaat
$MgCl_2$	Aflopende concentratie reeks van 1.25, 0.94 en 0.63 mM	De concentratie 1.25 mM toonde voor één van de drie samples een bandje van ± 150 bp zonder een bij-bandje van ± 100 bp. De rest van de samples vertoonde dit bij-bandje wel. Bij lagere concentraties $MgCl_2$ waren er geen bandjes zichtbaar bij alle samples.
Annealingstemperatuur	Verhoogd van 55°C naar 58 en 61°C	Twee van de drie samples vertoonde bij 58°C een zwak bandje zonder bij-bandje. Bij 61°C vertonen alle drie de samples een bij-bandje.
Primer concentratie	Verdunningsreeks van 1.25 pmol naar 0.65 pmol. Waarbij er steeds 0.15 pmol minder toegevoegd werd.	Bij alle concentraties werd er een bandje van ± 150 bp en een bij-bandje van ± 100 bp geconstateerd.
DNA concentratie	Er was een aflopende concentratiereeks gemaakt van 62.5, 25, 16.6 en 12.5 ng/ μ l DNA van een sample.	Bij alle concentraties werd er een bandje van ± 150 bp en een bij-bandje van ± 100 bp geconstateerd.
Touch-down PCR	Begon met een annealingstemperatuur van 63°C en werd met steeds met 1°C per cyclus verlaagd tot 58°C. Hierna is de cyclus nog 29 maal herhaald.	Alle samples toonden een bandje van ± 150 bp en een bij-bandje van ± 100 bp.
BSA	Er werd een hoeveelheid van 2 μ l BSA aan de PCR mix toegevoegd.	Alle samples toonden een bandje van ± 150 bp en een bij-bandje van ± 100 bp.
Taq Gold Polymerase	In plaats van Taq Polymerase werd er Taq Gold Polymerase toegevoegd	Alle samples toonden een bandje van ± 150 bp en een bij-bandje van ± 100 bp.
Grotere PCR producten	De forward primers van het eerste primerpaar Van der Sijp is gecombineerd met de reverse van het tweede primerpaar Van der Sijp. Dit om het gehele exon in eenmaal te PCRen.	Alle samples toonden bij exon 8 een bandje zonder bij-band. Bij exon 6 was dit het geval bij twee van de drie samples. Bij exon 5 en 7 hadden alle samples een bij-bandje naast het gewenste bandje.

5.2. Optimalisatie exon 5 primerset Angelopoulou

Doordat er zwak bandje tot geen bandje, geen PCR-product, zichtbaar waren bij de amplificatie van exon 5 met de primers uit de primerset Angelopoulou, was er een optimalisatie uitgevoerd.

Voor deze optimalisatie waren er bij drie factoren veranderingen toegepast aan de PCR-mix en PCR-cyclus. De toegepaste verandering en het effect hiervan is weergegeven in tabel 6.

Bij elke test was er een negatieve controle ingezet, welke allemaal negatief waren. De samples 4 tot en met sample 6 zijn gebruikt voor de optimalisatie stappen en een uitgebreider overzicht van de resultaten, berekening en tussenconclusie is te vinden in bijlage II.

Tabel 6: Overzicht van de factoren, de aanpassing die zijn toegepast op de factoren en het effect hiervan om de PCR van primerpaar 5 van de primerset Angelopoulou te optimaliseren.

Factor	Aanpassing	Effect
MgCl ₂	Aflopende concentratiereeks van 2.50, 2.19 en 1.87 mM ingezet.	Een van de drie samples vertoonden bij alle concentraties een bandje van ±250 bp, waarvan het bandje bij 2.50 mM het zwakste was. De rest van de samples toonde bij alle concentraties geen bandje, uitgezonderd bij 2.19 mM, hier toonde een ander sample ook een licht bandje.
Annealingstemperatuur	Verhoogd van 55°C naar 60 en 62°C	Bij 60°C vertoonde een van de drie samples een bandje van ±250 bp. Twee van de drie samples toonden bij 62°C een bandje van ±250 bp.
DNA concentratie	Aflopende concentratiereeks van 400, 300, 200, 100 en 50 ng/μl van een enkel sample	Bij de concentratie van 400 en 300 ng/μl is er een bandje zichtbaar van ±250 bp. 200 ng/μl toonde een zwak bandje en 100 tot en met 50 ng/μl toonde geen bandje

5.3. P53 mutatie analyse op tumormateriaal

Op het materiaal van vijf patiënten met metachrone of synchrone longtumoren werd een p53 mutatie analyse uitgevoerd. Van elke patiënt was er één benigne longweefsel en twee longtumoren geanalyseerd.

Per sample werd er een schatting gemaakt van het percentage tumormateriaal ten opzichte van het normale weefsel in de HE-gekleurde coupe, dit varieerde van 30% tot 95% per sample (zie tabel 7).

Na isolatie van het DNA werd de concentratie en de zuiverheid bepaald van het isolaat, welke voor alle samples boven de 2.00 lag. Vervolgens werd er een PCR uitgevoerd voor exon 5 tot en met 8 met de primerset Angelopoulou. Hierbij is een foute concentratie $MgCl_2$ toegevoegd aan de PCR-mix namelijk 1,56 mM in plaats van 2,19.

Na de PCR werd er via gelelectroforese gecontroleerd of er een PCR-product aanwezig was (zie fig. 8). Indien dit het geval was werden de samples gesequenced en vervolgens werd de sequentie geanalyseerd op de aanwezigheid van een eventuele mutatie in zowel de forward als reverse sequentie reactie (zie tabel 8). De sequenties van normaal en tumorweefsel werden vergeleken met de genomische sequentie uit de database. In de onderstaande tekst is per patiënt beschreven welke samples een PCR-product vertoonde en of er in de verkregen sequenties een mutatie aanwezig was. (zie tabel 8) Tevens wordt er vermeld of de sequentie goed beoordeelbaar was en of deze de gehele sequentie bevat van het desbetreffende exon. Deze laatste resultaten zijn te vinden in bijlage III.

Tabel 7: Per patiënt zijn er drie samples, 1 benigne en 2 tumor materialen, hiervan is het tumorpercentage geschat en na isolatie van het DNA uit het weefsel in de DNA concentratie bepaald en de zuiverheid van het DNA.

Patiënt	weefsel	Tumor %	DNA conc.(ng/μl)	260/280 ratio
1	N	Nvt	55,2	2.15
	T1	30	379,6	2.05
	T2	40-60	304,1	2.09
2	N	Nvt	142,5	2.05
	T1	20-40	210,2	2.03
	T2	20-40	221,9	2.05
3	N	Nvt	83,0	2.07
	T1	20-40	60,2	2.16
	T2	20-40	401,1	2.06
4	N	Nvt	148,1	2.05
	T1	>60	100,3	2.05
	T2	>60	247,2	2.04
5	N	Nvt	72,2	2.04
	T1	95	262,1	2.03
	T2	30-60	172,7	2.05

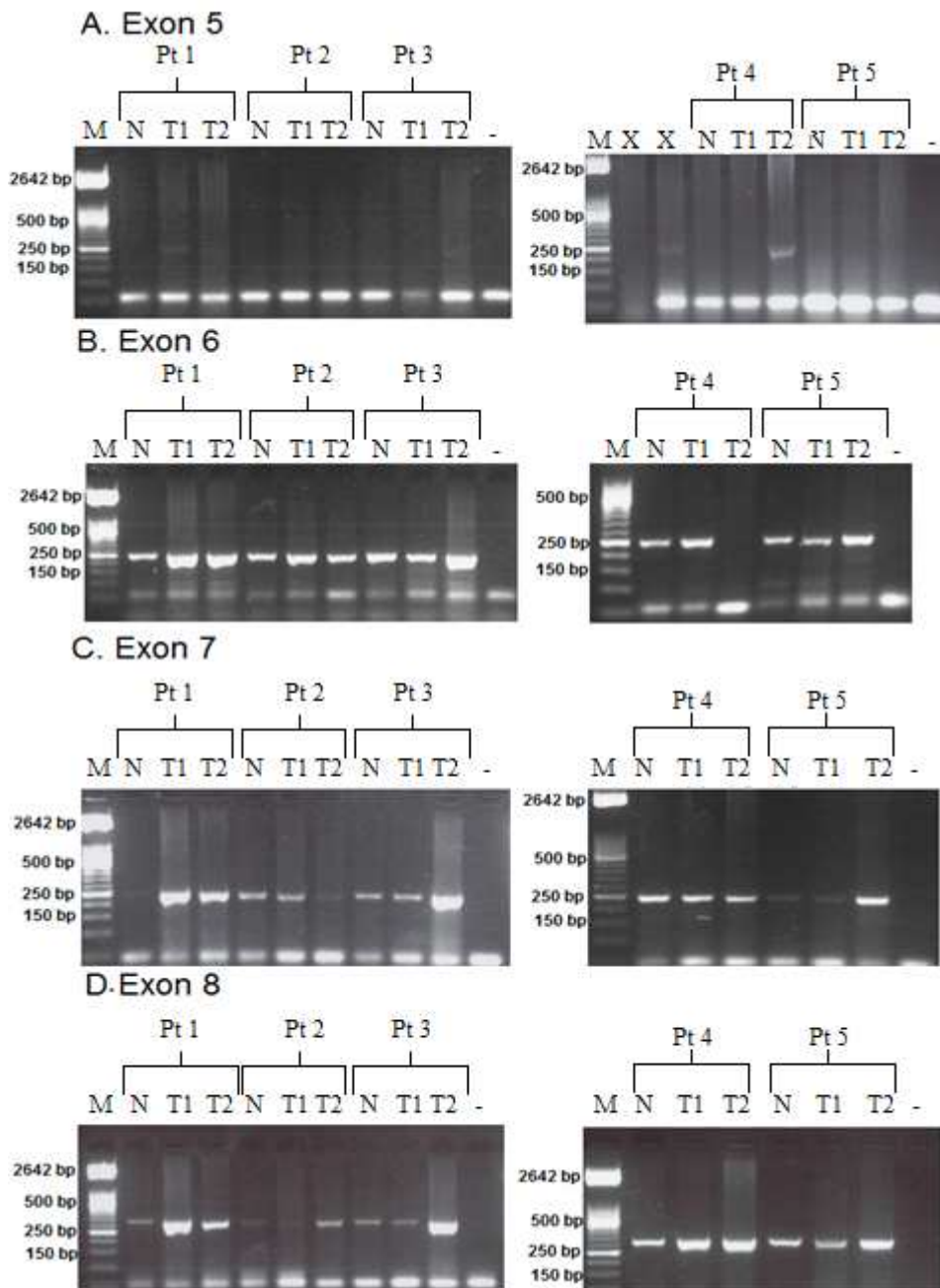


Fig. 8: M is de 50 bp ladder, waarvan links in baseparen(bp) vermeld staat was de grootte van het fragment uit de ladder is. Per patiënt(Pt) was er een normaal (N) en twee tumor weefsels(T1 en T2) geanalyseerd. De negatieve controle (-) is bij alle PCRs negatief. A. De PCR van exon 5, waarbij de X aangeeft dat deze monsters niet bij het experiment horen. B. De PCR van exon 6. C. De PCR van exon 7. D. De PCR van exon 8.

5.3.1. Patiënt 1

Het normale weefsel vertoonde bij exon 5 geen PCR-product en bij exon 6 tot en met 8 wel. Bij zowel Tumor 1 als 2 werd er bij alle exonen, 5 tot en met 8, een PCR-product aangetoond. Bij exon 5 waren dit echter lichte bandjes. Bij de PCR van exon 6 ontstond naast het PCR-product van ± 250 bp nog een bij-product van ± 100 bp. Dit ontstond bij alle weefsels en ligt als bandje vlak boven het primer-dimer bandje van ± 75 bp in de agarosegel.(zie fig. 8C)

De verkregen sequenties van de exonen met een PCR-product dekten het volledige exon (zie bijlage III) en vertoonde geen mutatie in deze sequenties. Echter was de forward sequentie van exon 6 bij alle drie de weefsels niet evalueerbaar, deze vertoonde namelijk veel achtergrondruis bij de sequentie.(zie fig. 9) Hetzelfde gold voor exon 8 bij tumor 1. De resultaten van het UMCU vertoonden ook geen mutatie in alle drie de weefsels van patiënt 1.

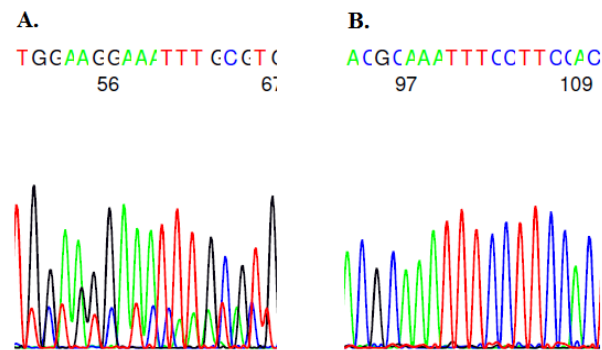


Fig. 9: Bij het normale weefsel van patiënt 1 is de forward sequentie van exon 6 is niet evalueerbaar(A) in vergelijking met hetzelfde deel van de reverse sequentie(B), welke wel evalueerbaar is.

5.3.2. Patiënt 2

Bij alle drie de weefsels van patiënt 2 werd er een PCR-product aangetoond bij de exonen 6 tot en met 8. Waarvan het normale weefsel en tumor 1 een zwak bandje vertoonden bij exon 8 en tumor 2 bij exon 7. Geen enkel weefsel toonde een PCR-product bij exon 5. Vanwege het ontbreken van een PCR-product bij exon 5 waren deze weefsels niet gesequenced.

De verkregen sequenties dekten exon 7 en 8 bij tumor 2 volledig. Het normale weefsel en tumor 1 verkregen geen sequentie bij exon 8, maar wel bij exon 7.

Exon 6 werd alleen door de reverse sequentie gedekt, dit was het geval bij alle drie de weefsel. De reverse sequentie vertoonde geen mutatie bij alle drie de weefsels en de forward sequentie was niet evalueerbaar. In de forward en de reverse sequenties van exon 7 was geen mutatie gevonden , dit was bij alle drie de weefsels het geval. Dit gold ook voor de sequentie van exon 8 en bij het normale weefsel en tumor 1 waren zowel de forward als reverse sequentie niet evalueerbaar van exon 8.

Het resultaat van patiënt 2 komt niet overeen met die van het UMCU, welke een mutatie hadden gevonden in exon 7 op codon 248 in tumor 2. Hierbij werd de nucleotide guananine vervangen voor cytosine.(zie Fig. 10)

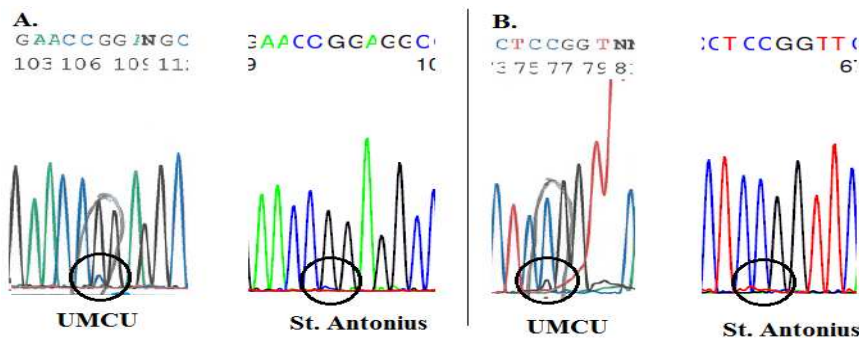


Fig. 10: A. De forward sequentie van exon 7 van tumor 2, is bij het UCMU een duidelijke blauwe piek te zien, welke ontbreekt bij de sequentie van het AZN(zie cirkel). Hetzelfde geldt voor de reverse sequentie (B).

5.3.3. Patiënt 3

Bij tumor 2 van patiënt 3 werd er een PCR-product bij alle exonen verkregen, waarbij exon 5 een zwak bandje vertoonde. Het normale weefsel en tumor 1 miste een PCR-product bij exon 5, maar vertoonde wel PCR-producten bij exon 6 tot en met 8. De drie weefsels van patiënt 3 vertoonden bij exon 6 echter ook een bij-product in de agarosegel van ± 100 bp, net als bij patiënt 1. (zie fig 8C)

Van alle exonen werd de volledige sequentie verkregen bij het sequencen (Bijlage III). Echter werd de forward sequentie van exon 6 niet gedekt bij het normale weefsel en tumor 1, welke dan ook niet evalueerbaar was. Bij exon 7 werd er bij tumor 1 en 2 in de sequentie dezelfde mutatie aangetroffen in codon 246, waar de nucleotide adenine voor cytosine vervangen werd. (zie fig. 11) De mutatie was ook bij het UCMU aangetroffen bij tumor 1 en tumor 2f.

Voor exon 8 werd in de sequentie van het normale weefsel en tumor 1 geen mutatie gevonden. De forward sequentie van exon 8 was bij tumor 2 niet evalueerbaar, waarin de reverse sequentie wel beoordeelbaar was en geen mutatie in is gevonden.

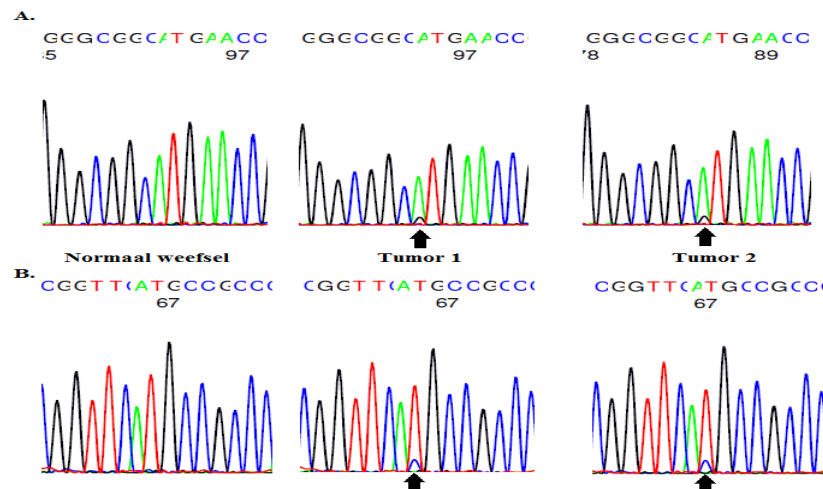


Fig. 11: A. De forward sequentie van exon 7 bij de weefsel van patiënt 3. Te zien is dat het normale weefsel geen mutatie vertoont en dat zowel tumor 1 als tumor 2 een mutatie vertoont bij codon 246, waaronder de adenine piek een kleine guanine piek zichtbaar is (zie zwarte pijl). B. Is hetzelfde exon maar dan de reverse sequentie van de weefsels.

5.3.4. Patiënt 4

Alle drie de weefsel van patiënt 4 vertoonden een PCR-product bij exon 7 en 8. Het normale weefsel en tumor 1 vertoonden ook een PCR-product bij exon 6, maar tumor 2 miste dit PCR-product. Andersom was het geval bij exon 5 waar het normale weefsel en tumor 1 geen PCR-product vertoonde en tumor 2 wel, dit in de vorm van een zwak bandje in de agarosegel. (zie fig. 8A) Er werd bij tumor 1 een bij-product waargenomen van ± 100 bp bij de PCR van exon 6. (zie fig 8B)

De verkregen forward en reverse sequenties dekten de exonen volledig met uitzondering van exon 8 bij het normale weefsel, waar alleen de reverse sequentie het exon dekte. Bij tumor 1 en 2 werden er geen mutaties in de sequenties van de exonen aangetroffen. De forward sequentie van exon 6 was bij zowel bij het normale weefsel als tumor 1 niet evalueerbaar en alleen bij tumor 1 was de forward sequentie van exon 8 niet evalueerbaar.

Tumor 2 vertoonde een mutatie in exon 7 op codon 239, waarbij er een adenine vervangen werd door een thyamine. (zie fig. 12 en tabel 8) De rest van de exonen bij tumor 2 vertoonden geen mutatie in de sequentie. De mutatie is dezelfde die bij het UCMU gevonden was in tumor 2.

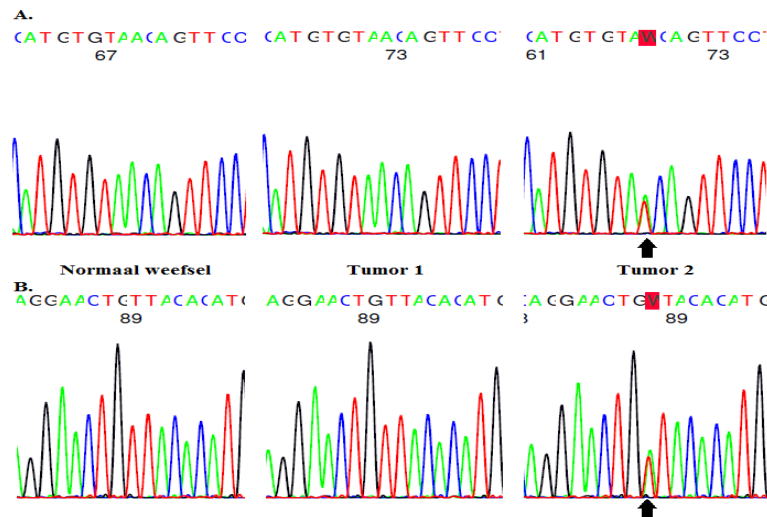


Fig. 12: A. De forward sequentie van exon 7 van alle drie de weefsels van patiënt 4. Te zien is dat het normale weefsel en tumor 1 geen mutatie vertoont. Echter tumor 2 vertoont een mutatie op codon 239, waarbij adenine voor thyamine wordt vervangen. (zie zwarte pijl) B. Is hetzelfde exon maar dan de reverse sequentie van de weefsels.

5.3.5. Patiënt 5

Alle drie de weefsels van patiënt 5 vertoonden geen PCR-product bij de PCR van exon 5, echter bij de rest van de exonen werd er wel een PCR-product aangetoond bij alle drie de weefsels (zie fig. 8A t/m D). Bij de PCR van exon 7 vertoonden het normale weefsel en tumor 1 wel een zwak bandje in de agarosegel. Tevens is er bij de PCR van exon 6 ook een bij-bandje zichtbaar van ± 100 bp bij alle drie de weefsels.

Bij tumor 1 is in de reverse sequentie van exon 6 een mutatie gevonden op codon 195, waarbij de nucleotide thymine vervangen werd door guanine. Echter was de forward sequentie van exon 6 niet evalueerbaar en werd de mutatie niet bevestigd. (zie fig. 13) De sequenties van de andere exonen bij tumor 1 vertoonden geen mutatie. Het UMCU vertoont dezelfde mutatie in exon 6 bij tumor 1. Het normale weefsel en tumor 2 vertoonden beide geen mutatie in de sequenties van exon 6, 7 en 8, echter was de forward sequentie van exon 6 niet evalueerbaar.

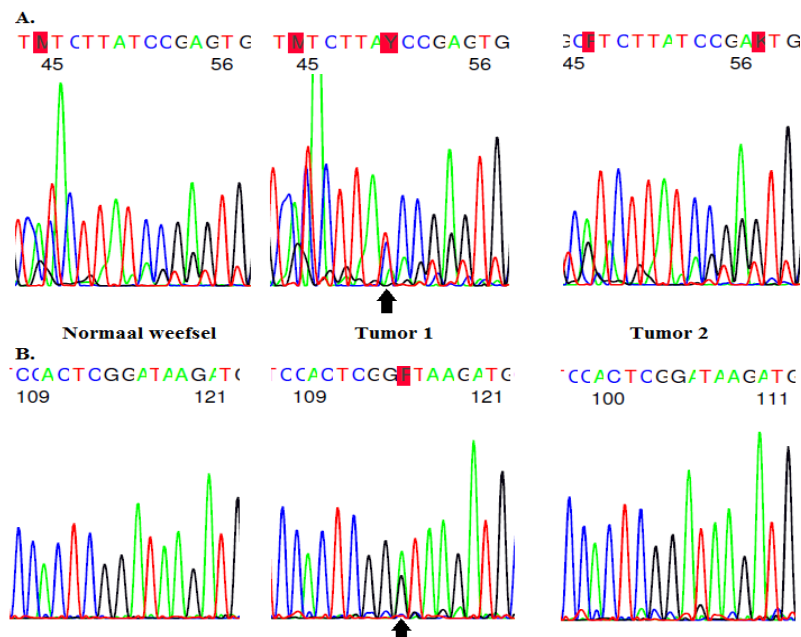


Fig. 13: A. De forward sequentie van exon 6 bij alle drie de weefsels niet evalueerbaar zijn wegens de hoge pieken van het achtergrondruis. Bij tumor 1 is echter wel een even grote thymine als cytosine piek aanwezig. (zie zwarte pijl) B. Is hetzelfde exon maar dan de reverse sequentie van de weefsels. Hierbij is duidelijk te zien dat er bij tumor 1 een guanine piek (zwarte piek) verschijnt onder de adenine piek (groen), wat aan duid op een mutatie in codon 195, waar thymine vervangen wordt door cytosine.

Tabel 8: Resultaten van de beoordeelde mutatie in de forward (forw.) en reverse (rev.) sequentie van exon 5 tot en met 8. (-) wild type sequentie, (N.e.) sequentie niet evalueerbaar, bij (Gp):geen PCR product verkregen en een zichtbare mutatie wordt benoemd. Er zijn per patiënt drie weefsel geanalyseerd één normaal(N) en twee tumoren (T1 en T2).De aangetroffen mutatie in de weefsels worden aangegeven.

Patiënt	weefsel	Exon 5		Exon 6		Exon 7		Exon 8	
		Forw.	Rev.	Forw.	Rev.	Forw.	Rev.	Forw.	Rev.
1	N	Gp	Gp	N.e.	-	-	-	-	-
	T1	-	-	N.e.	N.e.	-	-	-	-
	T2	-	-	N.e.	-	-	-	-	-
2	N	Gp	Gp	N.e.	-	-	-	-	-
	T1	Gp	Gp	N.e.	-	-	-	N.e.	N.e.
	T2	Gp	Gp	N.e.	-	-	-	-	-
3	N	Gp	Gp	N.e.	N.e.	-	-	-	-
	T1	-	-	N.e.	N.e.	c.738A>G	c.738A>G	-	-
	T2	-	-	N.e.	N.e.	c.738A>G	c.738A>G	N.e.	-
4	N	Gp	Gp	N.e.	-	-	-	N.e.	-
	T1	-	-	N.e.	-	-	-	-	-
	T2	Gp	Gp	Gp	Gp	c.717A>C	c.717A>C	-	-
5	N	Gp	Gp	N.e.	-	-	-	-	-
	T1	Gp	Gp	N.e.	c.585T>G	-	-	-	-
	T2	Gp	Gp	N.e.	-	-	-	-	-

Op het pathologisch laboratorium van het AZN, wordt momenteel een onderzoek opgezet om de klonale verwantschap tussen dubbel tumoren uitgaande van de long te bepalen. Dit is van belang voor de verdere behandeling van de patiënt.

Men wil het verschil of verwantschap tussen de tumoren aantonen door gebruik te maken van NGS, waarbij ongeveer 50 verschillende genen in twee tumoren gesequenced worden en op basis hiervan wordt een mutatiepatroon opgesteld. Wanneer het mutatiepatroon van de NGS in beide tumoren exact hetzelfde is kan men suggereren dat de tumoren klonaal verwant aan elkaar zijn en betreft het een metastase. Als de mutatiepatronen niet overeenkomen zijn de tumoren waarschijnlijk allebei van een andere oorspong en dus twee primaire tumoren.

De resultaten verkregen bij dit onderzoek wil men vergelijken met de resultaten van de p53 mutatie analyse, die tot op heden als gouden standaard wordt gebruikt, echter is deze analyse momenteel niet operationeel in het AZN. De doestelling van deze studie is om een p53 mutatie analyse op te zetten om de klonale verwantschap tussen longtumoren te bepalen. De p53 mutatie analyse zal dan later in een andere studie worden ingezet om deze te vergelijken met de NGS resultaten.

De analyse is eerst opgezet op benigne weefselmateriaal waarbij er gebruik is gemaakt van gepubliceerde methoden die in onze studie verder zijn geoptimaliseerd, waarna de test is toegepast op een geselecteerde patiënten groep.

Om te zien of de p53 mutatie analyse naar behoren werkt zijn er samples gebruikt die eerder door het UMCU gebruikt zijn voor een p53 mutatie analyse. De resultaten van het UMCU en AZN zijn vergeleken om zo uit te kunnen maken of de analyse in het AZN goed werkt

6.1.

Opzet en optimalisatie op benigne weefselmaterialen: Van der Sijp primerset

Met de primers uit het artikel *Van der Sijp et al.* is een PCR uitgevoerd op exon 5 tot en met 8 van het *TP53* gen. De ontstane PCR-producten zijn gesequenced, waarbij exon 5 en 6 slecht beoordeelbaar zijn vanwege dubbele signalen en veel achtergrondruis in de sequenties.

Een oorzaak voor deze slechte sequentie van exon 5 is waarschijnlijk het aspecifieke PCR-product dat ontstaat tijdens de PCR met primerpaar 5.2. Deze wordt naast het target PCR-product mee gesequenced en veroorzaakt zo mogelijk de dubbele signalen en het achtergrondruis in de sequentie.

In het artikel van *Van der Sijp et al.* wordt niets vermeld over een aspecifieke bij-product bij de PCR van exon 5. Echter wordt er door de toenmalige onderzoeksleider PhD. Winand N.M. Dinjens, na mail contact, wel bevestigd dat er bij-producten waren en dat men hier weinig hinder van ondervond.

De reden hiervoor is dat ze bij de studie van *Van der Sijp et al.* gebruik maakten van de techniek Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) om mutaties aan te tonen.^[19] Bij de SSCP methode worden de PCR-producten gedenateerd, waardoor er enkelstrengs DNA ontstaat. Dit enkelstrengs DNA neemt een identieke conformatie aan en vertoont na migratie door polyacrylamide gel een specifiek migratiepatroon.

Als er een mutatie aanwezig is in het *TP53* gen verandert de conformatie van het enkelstrengs DNA en zal het specifieke migratiepatroon ook veranderen. Als de migratiepatronen van het benigne weefsel verschillen met dat van het tumorweefsel kan men zeggen dat er een mutatie aanwezig is in het tumorweefsel.^[22]

Indien deze patronen gelijk zijn in hetzelfde exon van beide tumoren werd dit gezien als een sterke aanwijzing voor dezelfde mutatie.

Er werd bij de studie van *Van der Sijp et al.* niet exacte de sequenties van de exonen bepaald en een mogelijk bij-product zou dan ook niet storend zijn. Anders dan bij deze studie waar de exacte sequentie wel bepaald wordt en waar een bij-product de sequentie mogelijk wel kan verstoren.

Bij exon 6 is er moeilijk een verklaring te vinden voor de slechte sequenties, gezien er geen specifiek bij-product zichtbaar is in de agarosegel. Mogelijk ontstaat er toch een klein, niet zichtbaar, specifiek bij-product dat de sequentie stoort of is de gebruikte primer niet specifiek genoeg tijdens de sequentiereactie, waardoor deze op de verkeerde plek aan het PCR-product bindt en er achtergrondruis ontstaat. Het laatste is mogelijk omdat er alleen bij de forward primer 6.2 een slechte sequentie verkregen wordt.

Naar aanleiding van het aspecifieke bij-product dat ontstaat bij de PCR met primerpaar 5.2 is er een optimalisatie uitgevoerd. Er zijn hierbij verschillende veranderingen toegepast aan factoren van de PCR cyclus en PCR-mix. Bij een factor wordt er een zeer gering positief effect opgemerkt na aanpassing. Deze factor is het verhogen van de annealingstemperatuur. Een hogere annealingstemperatuur zorgt ervoor dat primers minder snel aspecifiek binden aan het DNA en hierdoor wordt de PCR specifiek.

De factoren die ook veranderd zijn maar helemaal geen effect hadden zijn het verlagen van de DNA concentratie, het verlagen van de $MgCl_2$ concentratie, het uitvoeren van een touch-down PCR, het verlagen van de primer concentratie, het vervangen van taq polymerase voor Taq gold polymerase en het toevoegen van BSA aan de PCR-mix. De beredenering voor de aanpassing van bovengenoemde factoren en een tussenconclusie staan vermeld in bijlage I.

Om de specificiteit van de PCR te verhogen en de hoeveelheid arbeid te verminderen is er getracht om de forward primer van primerpaar 1 en de reverse van primerpaar 2 te combineren in één PCR om zo grotere PCR-producten te krijgen. Echter in deze PCR vertonen nu alle exonen, op exon 8 na, meerdere bij-producten. De gecombineerde primers zijn bij elkaar niet specifiek genoeg en vormen bij-producten.

Ondanks de geringe verbetering bij de verhoging van de annealingstemperatuur is de PCR met primerpaar 5.2 nog steeds aspecifiek. Om deze reden is er ook geprobeerd om de analyse op te zetten met behulp van de primers uit het artikel van *Angelopoulou et al.* Een gunstige bijkomstigheid is dat er ook minder PCRs en sequentiereacties ingezet hoeven te worden. Deze primers geven per exon één PCR-product, in plaats van 2 overlappende PCR-producten met 2 primerparen per exon wat bij de primerset van *Van der Sijp et al.* wel het geval is.

6.2. Opzet en optimalisatie op benigne weefselmaterialen: *Angelopoulou*

Net als bij *Van der Sijp et al.* is er in de forward sequentie van exon 6, verkregen met de primers van *Angelopoulou et al.*, achtergrondruis aanwezig. Aangezien de forward primer 6 van *Angelopoulou* een anderen target sequentie heeft dan de forward primer 6.2 van *Van der Sijp*, is hier moeilijk een verband tussen te leggen (zie bijlage IV: target sequenties primers).

Een mogelijke oorzaak is dat de annealingstemperatuur van de sequentiereactie niet hoog genoeg is. De meltingtemperatuur van de forward primer 6 is 63°C, terwijl er bij de sequentiereactie een annealingstemperatuur gebruikt wordt van 55°C. Door deze te verhogen kan er mogelijk wel een goede sequentie ontstaan. Ditzelfde geldt voor de PCR van exon 6 hier is de annealingstemperatuur 58°C, door deze te verhogen kan het zijn dat voor het oog onzichtbare bij-producten niet meer gevormd worden. Dit gaat niet op voor de forward primer van *Van der Sijp*, gezien deze primer een meltingtemperatuur heeft van 56°C, welke dicht in de buurt ligt van de annealingstemperatuur die gebruikt wordt in zowel de PCR als sequentiereactie.

Door het tijdschema om de scriptie tijdig af te ronden zijn de resultaten van een hogere annealingstemperatuur niet opgenomen in het scriptieverslag.

Aangezien er bij de PCR van exon 5 niet altijd een PCR-product wordt gevormd is er een optimalisatie uitgevoerd. Omdat de meltingtemperatuur van de primerpaar gemiddeld 60°C is, is de annealingstemperatuur verhoogd naar 62°C wat een lichte verbetering geeft in het vormen van een PCR-product. Ook werd de concentratie $MgCl_2$ verhoogd van 1,56 mM naar 2.19 mM, wat er voor zorgt dat een extra sample een PCR-product verkrijgt.

Wat echter opviel was dat het sample met de hoogste DNA concentratie bij zowel de opzet als optimalisatie steeds een PCR-product vertoonde. Dit geeft mogelijk aan dat de PCR een minimum hoeveelheid DNA nodig heeft. Om deze reden is er een DNA concentratie reeks ingezet en daarbij is het omslag punt van wel of geen PCR-product 400 ng DNA per 20 µl PCR-mix. Omdat er bij deze concentratie een zwak PCR-product zichtbaar is, is de minimum DNA concentratie gesteld op 600 ng DNA per 20 µl PCR-mix, waar nog wel duidelijk een PCR-product aanwezig is.

6.3. PCRen met *Angelopoulou* en sequenzen met *Van de Sijp*

Bij het sequencen wordt altijd aan het begin van de sequentie een deel gemist door onduidelijke en onregelmatige pieken, waardoor er een deel van het intron gemist wordt in de sequentieanalyse. Echter er staat in het artikel *Angelopoulou et al.* vermeld dat zich in de overgangen van intron naar exon ook mutaties kunnen bevinden.^[21] Om deze reden is er geprobeerd om zo veel mogelijk intron sequentie mee te sequencen. Dit is getracht door te PCRen met de primers uit het artikel van *Angelopoulou et al.* en de PCR-producten die hier uit ontstaan te sequencen met de reverse primers uit paar 1 en de forward primers uit paar 2, van de primerset *Van der Sijp*. Op deze manier zijn de sequenties van de intron/exon overgang van het PCR-product verkregen.

Een probleem is alleen dat de sequenties in het midden nu niet beoordeelbaar zijn. Het is echter belangrijker om de sequentie van het middelste deel van het exon te verkrijgen dan de intron/exon overgang. Een mutatie in het exon kan direct van invloed zijn op het functioneren van het eiwit. Introns daarin tegen coderen niet voor het eiwit en zullen bij een puntmutatie geen invloed hebben op het functioneren van het eiwit. Om deze reden zal deze manier van sequenzen niet toegepast worden bij de p53 mutatie analyse op tumormateriaal.

Wat echter wel opvalt is dat er bij de forward sequentie van exon 6.2 uit de primerset Van der Sijp dezelfde achtergrondruis aanwezig is als bij de PCR-producten verkregen met de primers van Van der Sijp. Dit bevestigt nogmaals dat de primer mogelijk niet specifiek genoeg is voor PCR of sequenzen.

6.4. *p53 mutatie analyse op tumormateriaal uitvoeren met Angelopoulou primerset*

De primersets uit beide artikelen verkrijgen moeilijk een PCR-product of goed beoordeelbare sequenties bij exon 5 en 6, waarbij exon 7 en 8 dit wel verkrijgen. Omdat *Angelopoulou et al.* betere resultaten verkrijgt bij de sequentie van exon 5 is er voor gekozen om de primerset uit dit artikel te gebruiken voor de p53 mutatie analyse op tumormateriaal.

Ondanks dat de optimalisatie van exon 5 nog niet volledig is afgerond en de forward primer van exon 6 een matige beoordeelbare sequenties geeft is er wegens het tijdschema, dat voor dit project staat, besloten om de p53 mutatie analyse uit te voeren op tumormateriaal en de optimalisatie zal in de komende maanden verder uitgevoerd worden.

6.5. *De p53 mutatie analyse op tumormateriaal*

De p53 mutatie analyse is op een totaal van vijf patiënten met dubbele longtumoren uitgevoerd, waarbij er per patiënt één benigne longweefsel en twee longtumoren zijn geanalyseerd. Bij vier van de vijf patiënten is hetzelfde resultaat verkregen als bij het UMCU.

Tumor 1 van patiënt 2 kwam niet overeen met het resultaat van het UMCU, waarbij er een mutatie gemist was. Een reden hiervoor kan zijn dat het percentage tumorcellen aanwezig in het weefsel te laag was, ten aanzien van het percentage benigne cellen in hetzelfde weefsel.

In het artikel van *A.J.J. Smits et al.* wordt vermeld dat er een tumorpercentage van ongeveer 25% aanwezig moet zijn om de sequenties, verkregen via direct sequenzen, goed te kunnen interpreteren. Dit betekent dat indien er een lager tumorpercentage dan 25% aanwezig is, de sequentie van de tumorcellen mogelijk onderdrukt worden door de sequentie van de benigne cellen en de mutatie in de tumorcellen gemist wordt.

Aangezien het tumorpercentage van patiënt 2 in tumor 1 tussen de 20 en 40% geschat is, kan het zo zijn dat de sequentie van de benigne cellen de mutatie onderdrukt van tumor 1, zodat deze niet zichtbaar is in de sequentie.^[23]

Bij patiënt 5 is er een mutatie in de reverse sequentie van exon 6 waargenomen, bij tumor 1. Echter kan deze mutatie niet met zekerheid worden bepaald, omdat de forward sequentie niet evalueerbaar is wegens het aanwezige achtergrondruis. De reden om niet met zekerheid een mutatie af te geven is, omdat DNA dubbelstrengs is en indien er een puntmutatie aanwezig is deze in beide DNA-strengen zichtbaar moet zijn. Het probleem van achtergrondruis was al bekend bij de opzet met de Angelopoulou primers bij het benigne weefselmateriaal, echter zijn er nu bij enkele samples bij-producten zichtbaar in de agarosegel, bij de PCR van exon 6. Het verklaart waarom de sequentiereactie steeds achtergrondruis geeft en is mogelijk ook de reden waarom enkele reverse sequenties van exon 6 niet evalueerbaar zijn.

Weinig weefsels verkrijgen een PCR-product bij de PCR van exon 5, echter als er een product aanwezig is geeft deze een goed analyseerbare sequentie. Mogelijk zijn de condities van de PCR-mix of PCR-cyclus voor dit exon nog niet optimaal. Om deze te verbeteren wordt er momenteel gekeken naar de primer concentratie, welke nu 1,25 pmol/µl is in de PCR-mix. De concentratie van de primers horen ongeveer tussen de 0.2 en 1 pmol liggen, zowel een te hoge als te lage primer concentratie kan er voor zorgen dat er geen PCR-product ontstaat. De resultaten van deze aanpassing zijn door het tijdschema van het scriptieverslag niet in het verslag verwerkt.

Door het sporadisch vormen van een PCR-product bij exon 5 en de slechte beoordeelbare sequentie reactie van exon 6 kunnen er ook mutaties gemist worden. Het is dan ook van groot belang om deze PCR en sequentiereactie van exon 5 en 6 verder te optimaliseren. Ook zou er meer weefsel geanalyseerd moeten worden waarbij de spreiding van de mutaties groter is, in deze studie zijn alleen weefsel getest met een mutatie in exon 6 en 7.

Bij exon 8 heeft een groot deel van de weefsels een sequentie verkregen, echter niet bij enkele weefsel is dit het geval. Een reden hier is dat er mogelijk geen PCR-product toegevoegd is aan de sequentiereactie. Er is getracht deze reactie opnieuw uit te voeren, echter door een niet goed werkend capillair in de Genetic Analyzer en de deadline van het verslag zijn deze resultaten niet opgenoemd in dit verslag.

6.6. *P53 mutatie analyse naast andere methodes*

Aanzien de resultaten na optimalisatie van de p53 mutatie analyse nog niet geheel naar wens zijn, valt er te concluderen dat de p53 mutatie analyse moeilijk op te zetten is. Er zijn echter alternatieve methodes om klonale verwantschap aan te tonen in tumoren, zoals de loss of heterozygosity analyse (LOH).

De LOH analyse toont aan of er verlies is van heterozygotie in een chromosomen paar. Een oorzaak van verlies kan een deletie zijn in een van de 2 chromosomen of het verlies van een geheel chromosoom. Een dergelijk verlies komt vaak voor in tumoren. Wanneer er een verschil in LOH patroon is tussen twee tumoren kan dit een aanwijzing zijn dat het 2 verschillende tumoren betreft. Overeenkomst in LOH duidt erop dat de tumoren genetisch verwant zijn en dat het derhalve om een metastase gaat.

In het artikel Van der Sijp wordt de LOH analyse vergeleken met die van de p53 mutatie analyse, welke precies dezelfde resultaten gaven bij dezelfde patiënten.^[19] Het opzetten van een LOH analyse zou ook overwogen kunnen worden, indien de p53 mutatie analyse onvoldoende blijft werken.

Naar alle waarschijnlijkheid zullen deze conventionele methodes vervangen worden door de NGS. Het uiteindelijke doel is aantonen dat NGS betere resultaten genereert dan de conventionele methoden. Dit wordt al deels aangetoond in een artikel uit 2014, waarin *Uji et al.* vermeld dat van 27 mutatie gevonden bij 115 borstkanker samples 20 gevonden zijn met de p53 mutatie analyse en 27 met de NGS. Wat betekent dat de NGS 7 mutaties meer gevonden heeft dan de p53 mutatie analyse. Men komt in het artikel dan ook tot de conclusie dat de NGS gevoeliger is dan de p53 mutatie analyse.^[24]

Ondanks dat het artikel niet gaat over het aantonen van klonale verwantschap tussen twee tumoren, kan men zich voorstellen dat het sequencen van 50 verschillende genen meer informatie oplevert over het verschil of overeenkomst van tumoren dan het sequencen van alleen het *TP53* gen.

6.7. *Conclusie*

Gezien de resultaten van deze studie kan men concluderen dat de p53 mutatie analyse nog niet volledig opgezet is binnen het AZN. Hierbij werkt de PCR van exon 5 niet volledig en zijn de verkregen sequenties van exon 6 slecht te beoordelen. Voor exon 7 werkt de PCR goed en worden goed beoordeelbare sequenties verkregen; deze kunnen dan ook gebruikt worden voor de p53 mutatie analyse. De PCR van exon 8 werkt ook naar behoren, maar moet nog enkele aanvullende sequentiedata verkrijgen om er zeker van te zijn of de analyse volledig gelukt is op het tumorweefsel.

De gevoeligheid van de p53 mutatie analyse is nog niet naar wens, van de vijf patiënten komen er vier overeen met de resultaten van het UMCU en één patiënt niet. Mogelijk was het tumorpercentage bij deze patiënt te laag. Voor een optimalere gevoeligheid bij de p53 mutatie analyse dient kritisch gekeken te worden naar het tumorpercentage in het weefsel.

6.8. *Advisering voorzetting opzet p53 mutatie analyse*

Hieronder staan enkele punten vermeld, waar nog niet of onvoldoende naar gekeken is en mogelijk zou kunnen bijdragen aan een beter resultaat voor de p53 mutatie analyse:

- **Tumor verrijking via lase capture microdisectie:** Via een microscoop kan er met behulp van een laser zeer precies tumorcellen verkregen worden uit weefselmateriaal. Doordat alleen de tumorcellen uit het weefsel gehaald worden kan hier mee het tumorpercentage verhoogd worden voor de analyse, hierdoor ontstaat er minder kans op onderdrukking van de tumorsequentie door de sequentie van het benigne weefselmateriaal.

- **Verder optimaliseren van exon 5:** Er zou gekeken kunnen worden naar de primerconcentratie, deze is met 1.25 pmol/ μ l aan de hoge kant is, gezien deze normaal tussen de 0,2 en 1 pmol/ μ l ligt. Een te hoge primer concentratie zou inhiberend kunnen werken in de PCR. Ook moet er een herhaling op tumormateriaal uitgevoerd worden met de juiste concentratie $MgCl_2$ toegevoegd aan de PCR-mix.
- **Optimaliseren van exon 6:** Bij de analyse op tumorweefsel waren er bij dit exon bij-producten te zien. Een PCR optimalisatie zou er voor kunnen zorgen dat deze bandjes niet meer gevormd worden. Een idee om dit te bereiken is om de annealingstempertuur te verhogen, zodat de primer specifieker kan binden. Ook zou een verlaging van de primerconcentratie kunnen bijdragen, gezien deze met 1.25 pmol relatief hoog is, dit geldt voor zowel de PCR als sequentiereactie.
- **Signal/Noise ratio:** Dit is de ratio die vermeld wordt bij de sequentie data, het geeft aan hoeveel signalen er zijn te opzichten van de ruis signalen in de sequentie. Een sequentie met een S/N ratio tussen de 100 en 1000 is betrouwbaar. Mogelijk vallende niet evalueerbare sequenties buiten deze range, waardoor ze niet betrouwbaar zijn en er geen conclusie aangegeven mag worden. Hier is nog onvoldoende naar gekeken.
- **Split sample validatie:** Gezien er nu gezocht werd naar een bekende mutatie wordt deze ook sneller gevonden. Om deze factor weg te halen voor de validatie zou er een split sample procedure gebruikt kunnen worden. Hierbij wordt in het AZN de p53 mutatie analyse uitgevoerd, maar wordt een deel van het DNA ook opgestuurd naar het UMCU. Als de uitslagen van een vooraf bepaald aantal samples overeenkomen, kan geconcludeerd worden dat de p53 mutatie analyse in het AZN werkt.

Artikelen:

1. Larsen JE, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: Clinical implications. *Clin Chest Med* 2011 Dec;32(4):703-40.
2. Mitchard JR, Jenkins PJ, Shepherd NA. Pathology of lung tumours. *Surgery (Oxford)* 2004 5/1;22(5):iii-vii.
3. Stellman SD, Muscat JE, Hoffmann D, Wynder EL. Impact of filter cigarette smoking on lung cancer histology. *Prev Med* 1997 7;26(4):451-6.
4. Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 2002 3;23(1):65-81.
5. Mountzios G, Dimopoulos M, Soria J, Sanoudou D, Papadimitriou CA. Histopathologic and genetic alterations as predictors of response to treatment and survival in lung cancer: A review of published data. *Crit Rev Oncol* 2010 8;75(2):94-109.
6. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999 Jul 21;91(14):1194-210.
7. Improgo MR, Tapper AR, Gardner PD. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated mechanisms in lung cancer. *Biochem Pharmacol* 2011 Oct 15;82(8):1015-21.
8. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: Growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 2009 Oct;9(10):749-58.
9. Mogi A, Kuwano H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:583929.
10. Efeyan A, Serrano M. P53: Guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 2007 May 2;6(9):1006-10. 14
11. Soussi T, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001 Dec;1(3):233-40.
12. Loughery J, Meek D. Switching on p53: an essential role for protein phosphorylation? *Biodiscovery* 2013; 8:
13. van Rens MT, Eijken EJ, Elbers JR, Lammers JW, Tilanus MG, Slootweg PJ. P53 mutation analysis for definite diagnosis of multiple primary lung carcinoma. *Cancer* 2002 Jan 1;94(1):188-96.
14. Geurts TW, van Velthuysen ML, Broekman F, van Huysduynen TH, van den Brekel MW, van Zandwijk N, van Tinteren H, Nederlof P, Balm AJ, Brakenhoff RH. Differential diagnosis of pulmonary carcinoma following head and neck cancer by genetic analysis. *Clin Cancer Res* 2009 Feb 1;15(3):980-5.
15. Matsuzoe D, Hideshima T, Ohshima K, Kawahara K, Shirakusa T, Kimura A. Discrimination of double primary lung cancer from intrapulmonary metastasis by p53 gene mutation. *Br J Cancer* 1999 Mar;79(9-10):1549-52.
16. Rozemuller EH, Kropveld A, Kreyveld E, Leppers FG, Scheidel KC, Slootweg PJ, Tilanus MG. Sensitive detection of p53 mutation: Analysis by direct sequencing and multisequence analysis. *Cancer Detect Prev* 2001;25(2):109-16.
17. Gao WM, Mady HH, Yu GY, Siegfried JM, Luketich JD, Melhem MF, Keohavong P. Comparison of p53 mutations between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: Unique spectra involving G to A transitions and G to T transversions in both histologic types. *Lung Cancer* 2003 May;40(2):141-50.
18. Skaug V, Ryberg D, Kure EH, Arab MO, Stangeland L, Myking AO, Haugen A. P53 mutations in defined structural and functional domains are related to poor clinical outcome in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000 Mar;6(3):1031-7.
19. van der Sijp JR, van Meerbeeck JP, Maat AP, Zondervan PE, Sleddens HF, van Geel AN, Eggermont AM, Dinjens WN. Determination of the molecular relationship between multiple tumors within one patient is of clinical importance. *J Clin Oncol* 2002 Feb 15;20(4):1105-14.

20. Melhem MF, Law JC, el-Asgmawy k, Johnson JT, Landeneau RJ, Srivastava S, Whiteside TL, Assessment of sensitivity and specificity of immunohistochemical staining of p53 in lung and head and neck cancers. *Am J Pathol.* 1995 Mei 146(5): 1170–1177.
21. Angelopoulou K, Diamandis EP, Identification of deletions and insertions in the p53 gene using multiplex PCR and high-resolution fragment analysis: Application to breast and ovarian tumor. *J Clin Lab Anal*, 1998; 12:250-256.
22. Beheshti I, Hanson NQ, Copeland KR, Garg U, Tsai MY, Single-strand conformational polymorphisms(SCCP): Studies of the genetic polymorphisms of exon 4 of apolipoprotein C III. *Clin Biochemistry* 1995; 23(3):303-307.
23. Smits AJJ, Kummer AJ, de Bruin PC, Bol M, van den Tweel JG, Selderijk KA, Willems SM, Offerhaus GJA, de Wegener RA, van Diest PJ, Vink A, The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologist is not accurate, *Modern pathology* 2014 27; 168-174.
24. Uji K, Naoi Y, Kagara N, Shimoda M, Shimomura A, Maruyama N, Shimazu K, Kim SJ, Noguchi S, Significance of TP53 mutations determined by next-generation “deep” sequencing in prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Letters* 2014 342: 19-26.

Websites:

- A. Bezocht op 04-05-2014: <http://www.bio-rad.com/en-nl/applications-technologies/pcr-troubleshooting>, Bio rad.

Bijlagen scriptieverslag
p53 mutatie analyse; Het bepalen van de
klonale verwantschap tussen longtumoren

A. *Bijlage I : Optimalisatie PCR met primerpaar 5.2 uit primerset Van der Sijp*

1. *Magnesiumchloride concentratiereeks*

Reden: Door het verlagen van de concentratie $MgCl_2$ wordt de Taq polymerase minder actief, waardoor er mogelijk specifiekere PCR-producten ontstaan.

Er werd een concentratie reeks ingezet met $MgCl_2$ van 1.25 mM, 0.94 mM en 0.63 mM. Bij een concentratie van 1.25 mM toonden sample 5 en 6, naast het bandje van ± 150 bp, een bij-bandje van ± 100 bp in de agarosegel.

Sample 3 toonde hier een zwak bandje bij ± 150 bp en geen bij-bandje.

De concentratie 0.94 en 0.63 mM vertoonden beide geen bandjes of bij-bandjes bij alle samples. (zie tabel 1)

Tabel 1: Resultaten concentratie reeks van $MgCl_2$, waarbij 150 bp staat voor het bandje van het PCR-product en 100 bp voor het bandje van het bij-product. De (+) staat voor een duidelijk bandje/bij-bandje, (+/-) staat voor een zwak bandje/bij-bandje en (-) staat voor geen bandje of bij-bandje.

Sample	MgCl ₂ 1,25 mM		MgCl ₂ 0,94 mM		MgCl ₂ 0,63 mM	
	150 bp	100 bp	150 bp	100 bp	150 bp	100 bp
1	+	+	+/-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-
3	+/-	-	-	-	-	-

Tussenconclusie: Het verlagen van de $MgCl_2$ concentratie voorkomt vorming van het bij-product niet. Een te lage concentratie $MgCl_2$ zorgt er zelfs voor dat er geen product ontstaat.

2. *Annealingstemperatuur.*

Reden: Door het verhogen van de annealingstemperatuur zouden primers minder specifiek binden aan het template DNA, waardoor de PCR specifiek kan worden.

De originele cyclus heeft een annealingstemperatuur van 55°C, voor de optimalisatie is een annealingstemperatuur van 58°C en 61°C toegepast. Bij een annealingstemperatuur van 58°C vertoonden samples 4 en 6 een licht bandje van ± 150 bp groot zonder bij-bandje. Sample 5 vertoonde bij deze annealingstemperatuur een bandje van ± 150 met bij-bandje van ± 100 bp.

Een annealingstemperatuur van 61°C vertoonde bij samples 4, 5 en 6 zowel een bandje van ± 150 bp als een bij-bandje van ± 100 bp. (zie tabel 2)

Tabel 2: Resultaten verschillende annealingstemperaturen, waarbij 150 bp staat voor het bandje van het PCR-product en 100 bp voor het bandje van het bij-product. De (+) staat voor een duidelijk bandje/bij-bandje, (+/-) staat voor een zwak bandje/bij-bandje en (-) staat voor geen bandje of bij-bandje.

Sample	Temp. 58°C		Temp. 61°C	
	150 bp	100 bp	150 bp	100 bp
4	+/-	-	+	+
5	+	+/-	+	+/-
6	+/-	-	+	+/-

Tussenconclusie: Een annealingstemperatuur van 58°C lijkt een verbeterend effect te hebben op het tegengaan van bij-producten, een hogere temperatuur van 61°C geeft een minder goed effect.

3. Primer concentratiereeks

Reden: Door een lagere primer concentratie te gebruiken kunnen deze minder binden aan het DNA, dit zou er voor kunnen zorgen dat de primers specifieker worden.

De primer concentratie in de PCR-mix is 1.25 pmol per primer. Er werd een concentratiereeks ingezet met de concentraties 1.10, 0.95, 0.80 en 0.65 pmol, elke stap 0,15 pmol minder.

Bij de gehele concentratiereeks vertoonden samples 4, 5 en 6 een bandje met een grootte van ± 150 bp en een bij-bandje van ± 100 bp. (zie tabel 3)

Tabel 3: Resultaten van primer concentratiereeks, waarbij 150 bp staat voor het bandje van het PCR-product en 100 bp voor het bandje van het bij-product. De (+) staat voor een duidelijk bandje/bij-bandje, (+/-) staat voor een zwak bandje/bij-bandje en (-) staat voor geen bandje of bij-bandje.

Sample	Primer 1,10 pmol		Primer 0,95 pmol		Primer 0,80 pmol		Primer 0,65 pmol	
	150 bp	100 bp	150 bp	100 bp	150 bp	100 bp	150 bp	100 bp
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-

Tussenconclusie: Het verlagen van de concentratie primer lijkt geen invloed te hebben op het wel of niet ontstaan van een bij-product bij primerset 5.2.

4. DNA concentratiereeks.

Reden: Door minder DNA aan te bieden in de PCR mix hebben primers de voorkeur om specifieker te binden aan het template DNA.

Van sample 6 werd een aflopende verdunningsreeks gemaakt met de DNA concentraties van 62.5, 25, 16.6 en 12,5 ng/ μ l. Alle verdunningen gaven een bandje van ± 150 bp groot en bij-bandje van ± 100 bp. (Zie tabel 4)

Tabel 4: Resultaten van DNA concentratiereeks, waarbij 150 bp staat voor het bandje van het PCR-product en 100 bp voor het bandje van het bij-product. De (+) staat voor een duidelijk bandje/bij-bandje, (+/-) staat voor een zwak bandje/bij-bandje en (-) staat voor geen bandje of bij-bandje.

Sample	DNA 62,5 ng/ μ l		DNA 25 ng/ μ l		DNA 16,6 ng/ μ l		DNA 12,5 ng/ μ l	
	150 bp	100 bp	150 bp	100 bp	150 bp	100 bp	150 bp	100 bp
6	+	+	+	+	+	+	+	+

Tussenconclusie: Het verdunnen van DNA geeft niet het gewenste effect om het bij-product te verwijderen.

5. Touch-down PCR, BSA en Taq gold DNA polymerase.

Reden: De bij-producten van exon 5.2 kunnen mogelijk ontstaan door het hoge GC-gehalte van de reverse primer. Er zijn nog twee opties om het ontstane bij-product te verminderen namelijk:

1. **BSA:** Zou de specificiteit verhogen van de PCR, door de polymerase in een stroperiger milieu te brengen.
2. **Touch-down PCR:** Door een hogere annealingstemperatuur te gebruiken dan de melting temperatuur van de primers en dit per cyclus af te bouwen zouden er specifiekere PCR-producten ontstaan.
3. **Taq polymerase:** Taq gold polymerase wordt pas na 10 min bij 95°C geactiveerd, doordat een gebonden enzym inactief wordt. Hierdoor begint de PCR later wat er voor kan zorgen dat er geen specifieke bindingen kunnen plaats vinden voor dat de PCR begonnen is. Tevens heeft Taq gold proofreading van 5'-3' wat er voor zorgt dat er fout ingebouwde nucleotiden opgemerkt worden en herstelt worden door het ezym.

Het touch-down(Td) PCR programma heeft een begin annealingstemperatuur van 63°C, welke vervolgens per cyclus werd afgebouwd met 1°C tot uiteindelijk een annealingstemperatuur van 58°C. Bij 58°C werd de cyclus 29 maal herhaald. De Td werd uitgevoerd met en zonder bovine serum albumine(BSA). Beide combinaties gaven een bandje van ±150 bp met een bij-bandje van ±100 bp . Ook met het originele PCR-programma in combinatie met BSA vertoonden ditzelfde resultaat.

Het vervangen van polymerase voor Taq Gold polymerase leverde bij alle samples een bandje op ±150 bp met een bij-bandje. (zie tabel 5)

Tabel 5: Resultaten van Td, toevoeging BSA en Taq gold polymerase. Hierbij staat 150 bp voor het bandje van het PCR-product en 100 bp voor het bandje van het bij-product. De (+) staat voor een duidelijk bandje/bij-bandje, (+/-) staat voor een zwak bandje/bij-bandje en (-) staat voor geen bandje of bij-bandje.

Sample	Td PCR + 2 µl BSA		Td PCR + 0 µl BSA		PCR + 2 µl BSA		Taq gold polymerase	
	150 bp	100 bp	150 bp	100 bp	150 bp	100 bp	150 bp	100 bp
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-
6	+	+	+	+	+	+	+	+

Tussenconclusie: Zowel BSA, de Td PCR en de combinatie van beide zorgt niet voor het verwijderen van het bij-product. Tevens laat het gebruik van Tag gold polymerase ook geen verbeterend effect zien op het verminderen van bij-producten.

6. Grotere PCR-producten

Reden: Door de forward 1 en reverse 2 primers van elk exon in een PCR-mix te gebruiken, wordt getracht om het aantal PCRs te verminderen (van 8 naar 4) en het verminderen van bij-producten.

Uit de primerset Van der Sijp werden de forward primers van primerparen 5.1, 6.1 , 7.1 en 8.1 gekoppeld aan de reverse primers 5.2, 6.2 , 7.2 en 8.2. Door deze primers te combineren ontstaan er grotere PCR-producten die het gehele exon bevatten.

Bij primerpaar 5.1 forward en 5.2 reverse ontstonden er meerdere PCR-producten bij alle drie de samples, ditzelfde was het geval bij het primerpaar 7.1 forward en 7.2 reverse. Primerpaar 6.1 forward en 6.2 reverse vertoonde bij zowel sample 4 als 5 een enkel PCR-product van de verwachte grootte van ±200 bp, Sample 6 vertoonde echter wel meerdere PCR-producten.

Primerparen 8.1 forward en 8.2 reverse vertoonden bij alle samples een enkel bandje van ±200 bp grootte.

Tabel 6: Resultaten van grotere PCR-producten. De (+) staat voor een duidelijk bandje/bij-bandje, (+/-) staat voor een zwak bandje/bij-bandje en (-) staat voor geen bandje of bij-bandje. Bij elk exon staat vermeld of er een bandje ontstaan is van de juiste grootte en of er bij-bandjes aanwezig zijn.

Sample	Primers exon 5		Primers exon 6		Primers exon 7		Primers exon 8	
	±280 bp	Bij-bandje	±200 bp	Bij-bandje	±210 bp	Bij-bandje	±200 bp	Bij-bandje
4	-	+	+	+	+	+	+	-
5	-	+	+	+	+	+/-	+	-
6	-	+	+	+	+	+	+	-

Tussenconclusie: Alleen de PCR van exon 8 toont geen aspecifieke producten. De PCR van grotere producten geeft op deze manier geen voordeel.

B. *Bijlage II: Optimalisatie PCR met primerpaar 5 van Angelopoulou primerset*

1. *Annealingstemperatuur.*

Reden: Gezien de meltingtemperatuur van het primerpaar gemiddeld 60 °C is en de gebruikte annealingstemperatuur 55 °C is kan het zijn dat de primers niet goed binden. Om deze reden is de annealingstemperatuur hoger ingesteld.

Er is gekozen voor de annealingstemperaturen 60°C en 62 °C. Sample 4 vertoonde een bandje van ±250 bp bij beide temperaturen en sample 5 vertoonde bij beide temperaturen geen bandje. Een licht bandje van ±250 bp was zichtbaar bij 62°C voor sample 6, deze vertoonde echter bij 60°C geen bandje.(zie tabel 7)

Tabel 7: Resultaten verschillende annealingstemperaturen. (+) staat voor een bandje van ±250 bp (+/-) staat voor een zwak bandje van ±250 bp en (-) staat voor geen bandje.

Sample	Temp. 60°C	Temp. 62°C
4	+	+
5	-	-
6	-	+/-

Tussenconclusie: Een verhoging van annealingstemperatuur lijkt een gering effect te hebben bij 62 °C, waarbij twee van de drie samples een PCR-product vertoont.

2. *Magnesiumchloride concentratiereeks*

Reden: : Door het verhogen van de concentratie $MgCl_2$ wordt de Taq polymerase actiever, waardoor er mogelijk PCR-producten ontstaan.

De concentratiereeks $MgCl_2$ loopt af met stappen van ongeveer 0,32 mM, beginnend bij 2,50 mM en eindigend met 1,87 mM.

Sample 4 vertoonde bij alle concentraties een bandje van ±250 bp, echter bij de concentratie 2,50 mM is dit bandje zwak. Sample 5 vertoonde bij geen enkele concentratie een bandje en sample 6 vertoonde een zwak bandje van ±250 bp bij de concentratie 2,19 mM. Bij de rest van de concentraties toonde sample 6 geen bandjes.(zie tabel 9)

Tabel 9: Resultaten verschillende $MgCl_2$ concentraties. (+) staat voor een bandje van ±250 bp (+/-) staat voor een zwak bandje van ±250 bp en (-) staat voor geen bandje.

Sample	$MgCl_2$ 2,50 mM	$MgCl_2$ 2,19 mM	$MgCl_2$ 1,87 mM
4	+/-	+	+
5	-	-	-
6	-	+/-	-

Tussenconclusie: Een verhoging van $MgCl_2$ lijkt gering te werken bij een concentratie van 2,19 mM, waarbij twee van de drie samples een PCR-product vertoont.

1. DNA concentratiereeks

Reden: Sample 4 heeft een hoge DNA concentratie en vertoont steeds een PCR-product, mogelijk heeft de PCR een minimale hoeveelheid DNA nodig om te werken

Aangezien sample 4 een DNA concentratie van 602,5 ng/μl heeft, is dit sample gebruikt voor een verdunningsreeks. De concentratiereeks die getest werd was van 400 tot 50 ng/μl DNA.

De concentraties 400 en 300 ng/μl vertoonden een duidelijk bandje met een grootte van ±250 bp. De sterkte van het bandje neemt af bij 200 ng/μl en het bandje was niet meer zichtbaar vanaf 100 ng/μl. (Zie tabel 8)

Tabel 8: Resultaten verschillende DNA concentraties. (+) staat voor een bandje van ±250 bp (+/-) staat voor een zwak bandje van ±250 bp en (-) staat voor geen bandje.

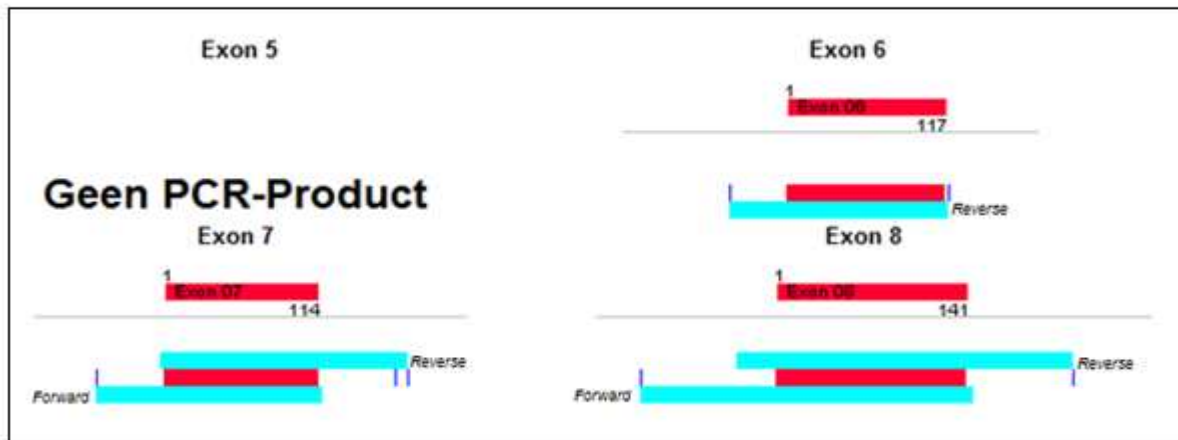
Sample	DNA 400 ng/μl	DNA 300 ng/μl	DNA 200 ng/μl	DNA 100 ng/μl	DNA 50 ng/μl
4	+	+	+/-	-	-

Tussenconclusie: Er is een omslag bij 200 ng/ μl, waar een zwak PCR-product zichtbaar is. Dit houdt in dat er minimaal 400 ng DNA toegevoegd moet worden in de PCR-mix van 20 μl, gezien er aan de mix 2 μl DNA wordt toegevoegd. Voor de zekerheid wordt deze grens op 600 ng gesteld omdat hier een duidelijk PCR-product zichtbaar is.

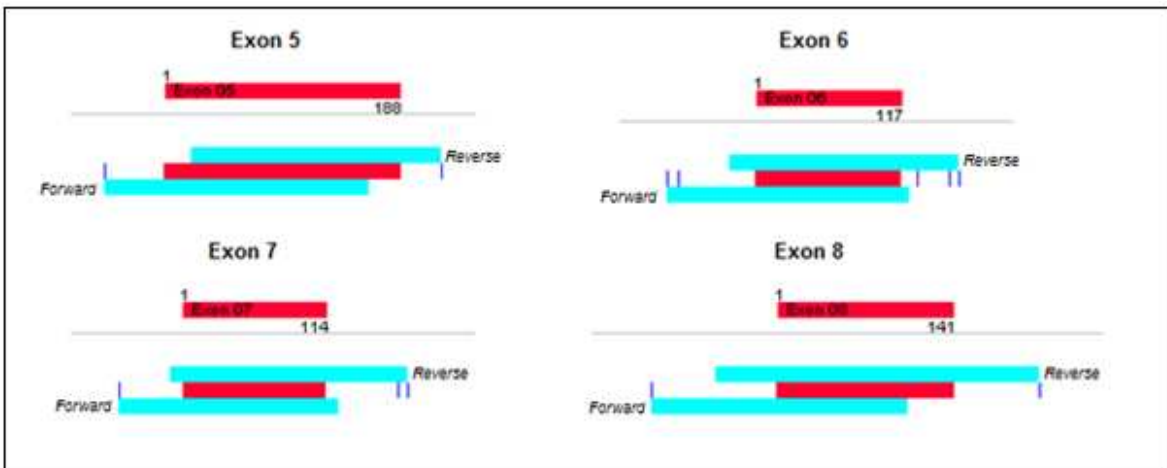
C. *Bijlage III: Sequentie dekking van exon bij p53 mutatie analyse op tumormateriaal*

Patiënt 1:

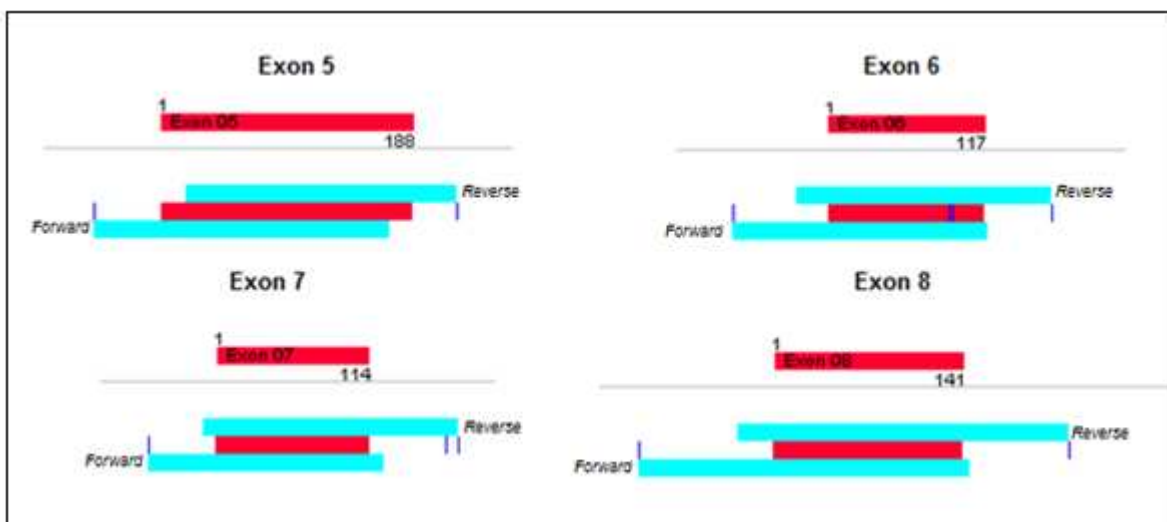
benigne longweefsel



Tumor 1: ADC

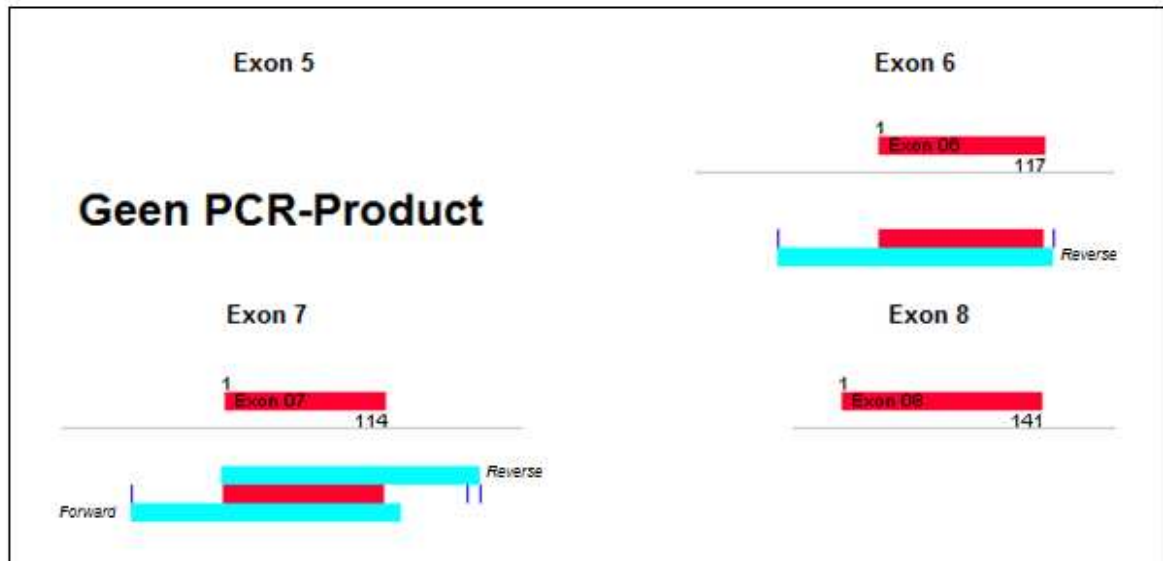


Tumor 2: ADC

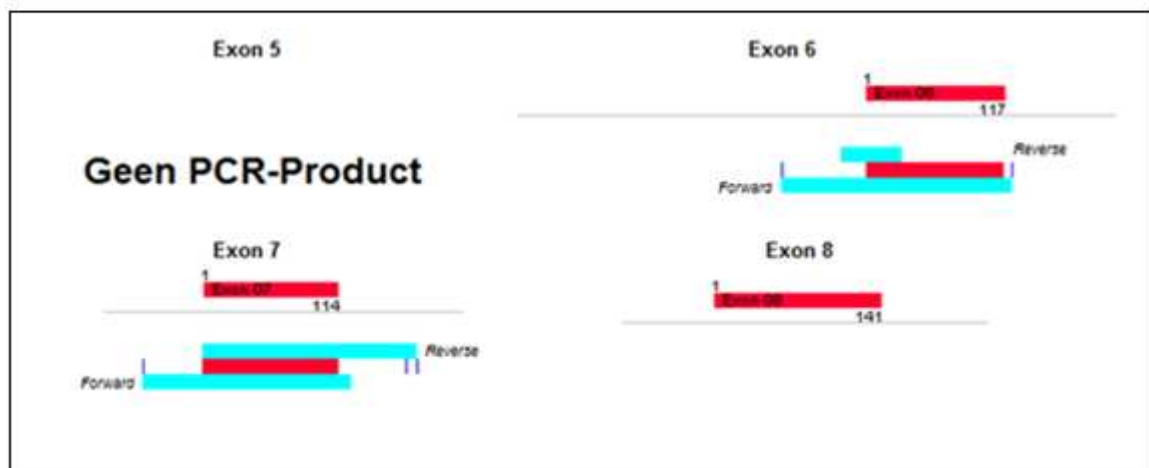


Patiënt 2:

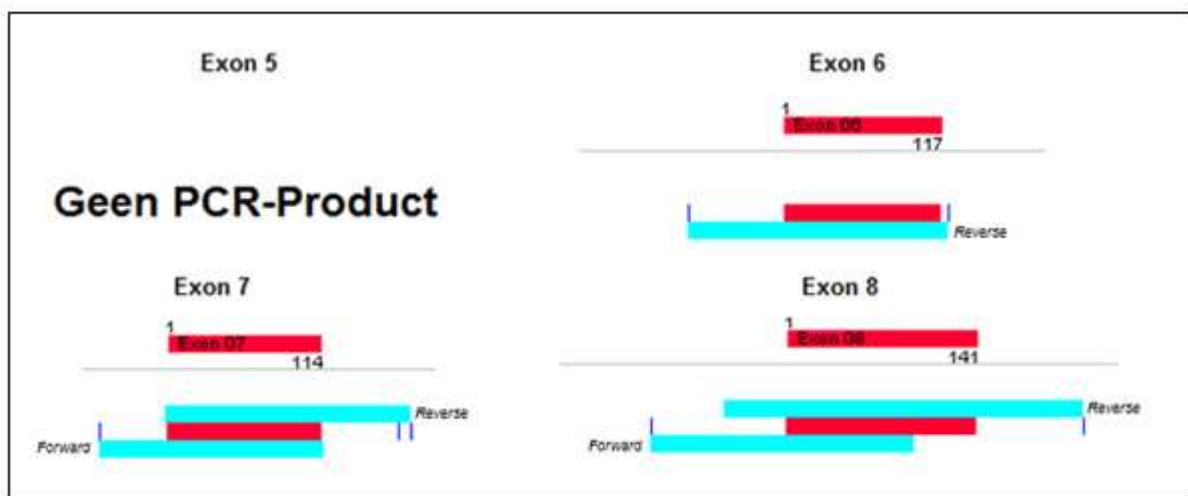
Benigne longweefsel



Tumor 1: SCC

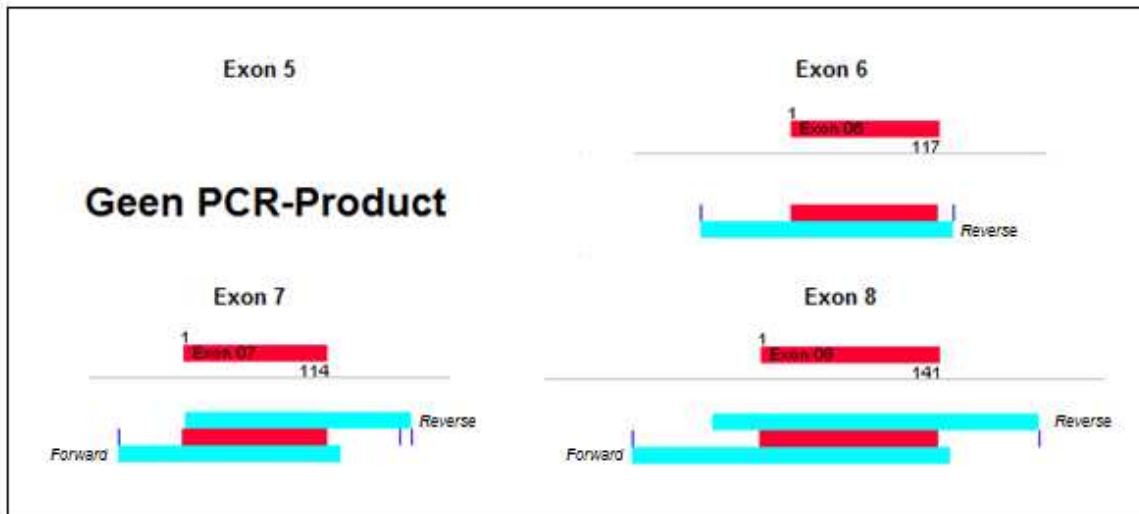


Tumor 2: SCC

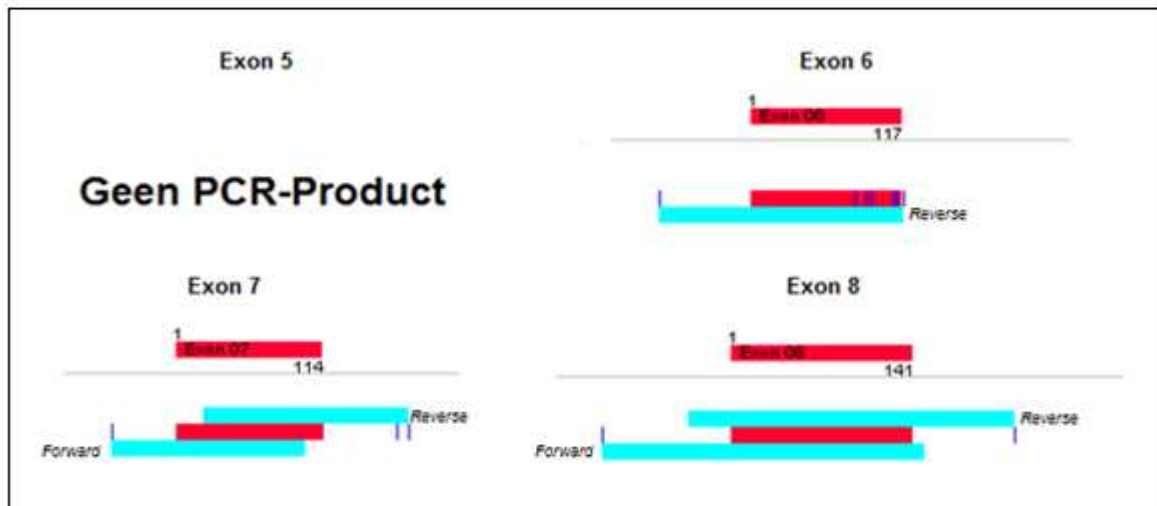


Patiënt 3:

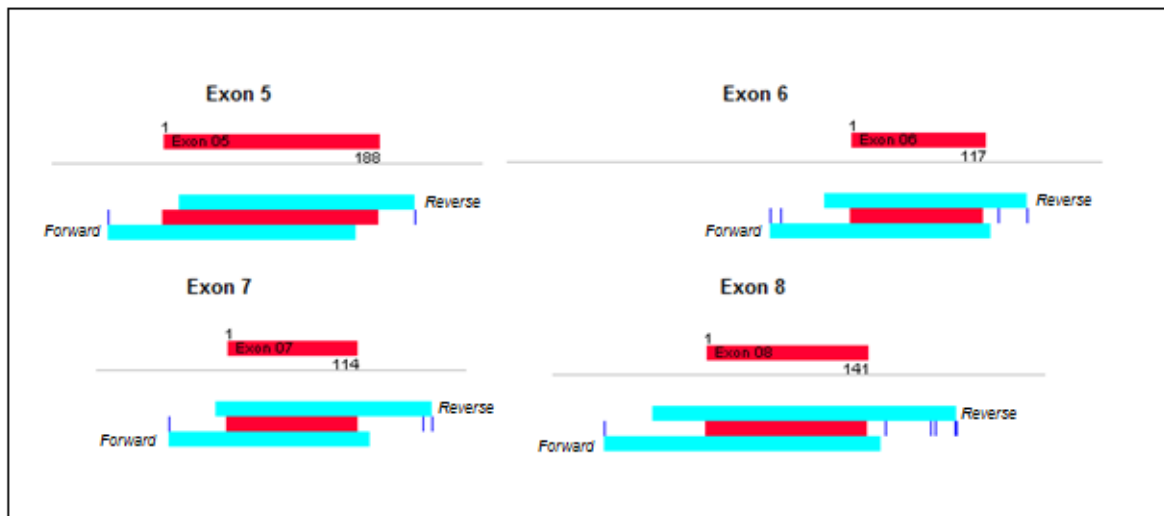
Benigne longweefsel



Tumor 1: SCC

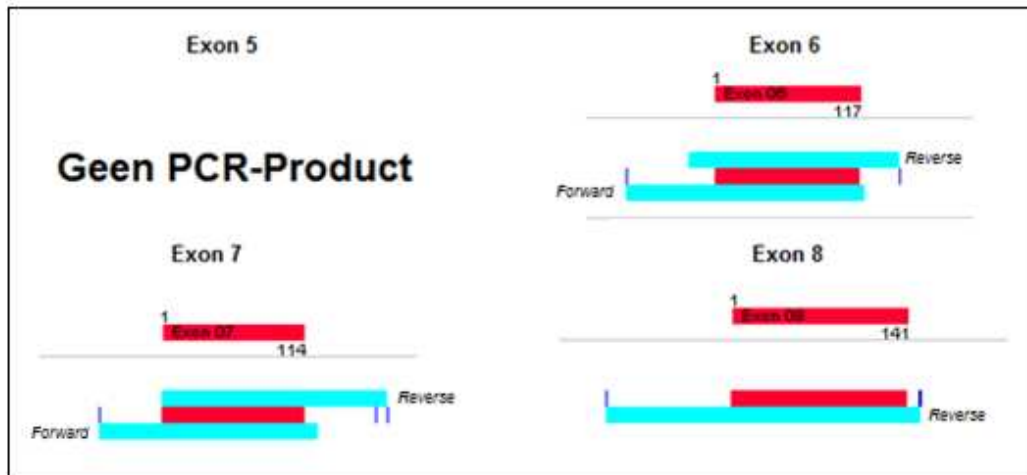


Tumor 2: SCC

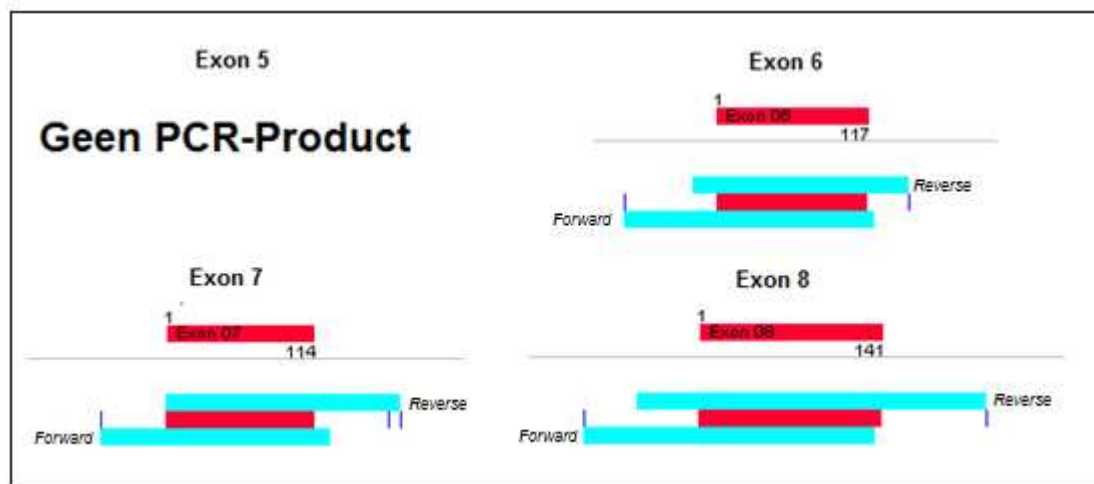


Patiënt 4:

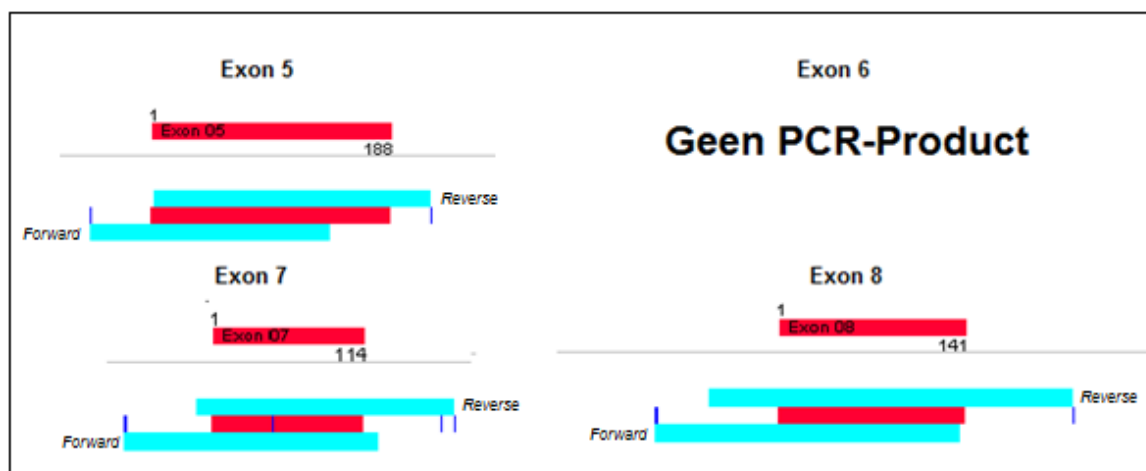
Benigne longweefsel



Tumor 1: ADC

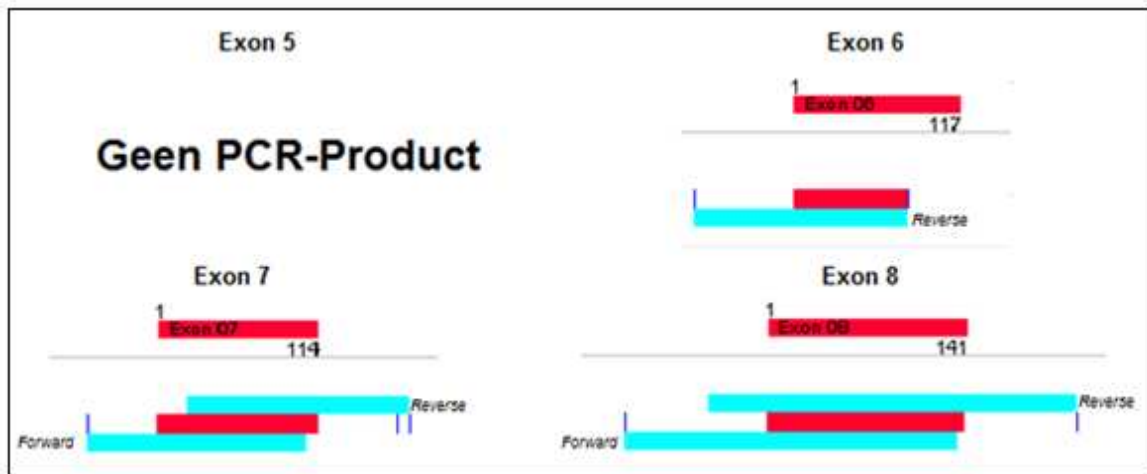


Tumor 2: ADC

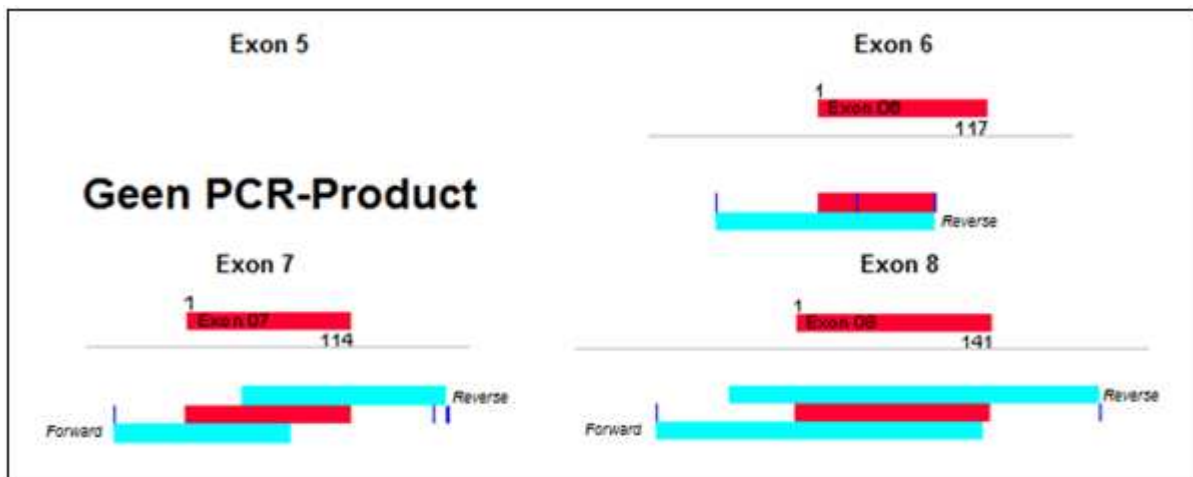


Patiënt 5:

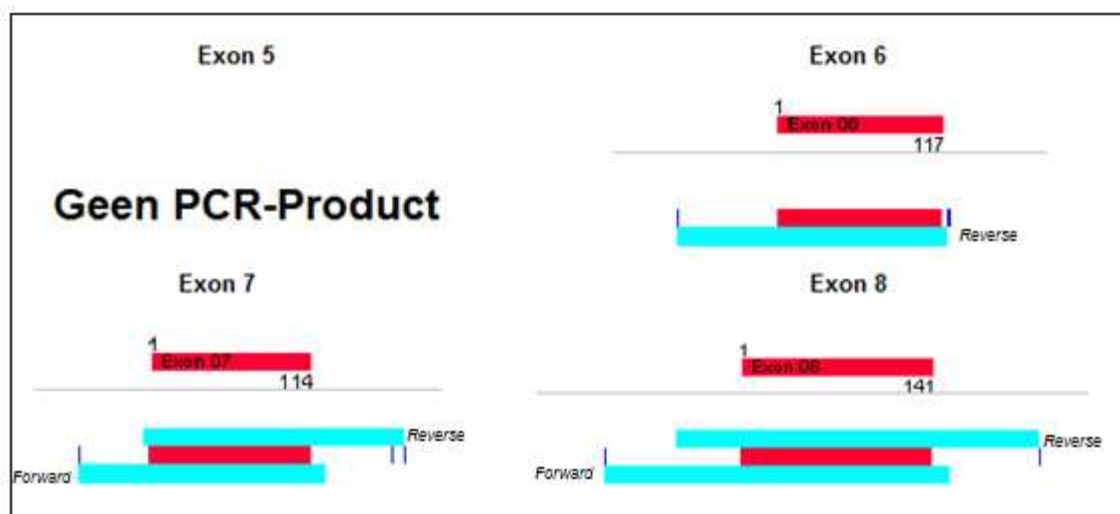
Benigne longweefsel



Tumor 1: ADC



Tumor 2: ADC



D. *Bijlage VI: primersequentie Van der Sijp en Angelopoulou*

25. *Primerset Van der Sijp.*

Reference Sequence: NC_000017.11

Dik gedrukte, schuin en onderstreepte tekst is het target exon.

1.2. *Exon 5: Nucleotiden 12241 tot en met 12600.*

tagctcgcta gtgggttgca ggaggtgctt acgcatgttt gtttctttgc tgccgtcttc
cagttgcttt atctgttcac ttgtgc **cctg** **actttcaact** **ctgtctc** ctt cctcttccta
126 129 132 135 139 142
cag **tactccc** **ctgccctcaa** **caagatgttt** **tgccaactgg** **ccaagacctg** **ccctgtg** **cag**
145 149 152 155 159 162
ctgtgggttg **attccacacc** **cccgcccggc** **acccgcgtcc** **ggcccatggc** **catctacaag**
165 169 172 175 179 182
cagtacacagc **acatgacgga** **ggttgtgagg** **cgctgcccc** **accatgagcg** **ctgctcagat**
186
agcgatggtg agcagctggg gctggagaga cgacagggt **ggttgcccag** **gggtccccag**
gaaggaaatt tgcgtgtgga gtatttgat gacagaaaca cttttcgaca tagtgtggtg

5 forw 1	CCT GAC TTT CAA CTC TGT CTC	158 bp
5 rev 1	ACT GCT TGT AGA TGG CCA TG	
5 forw 2	CAG CTG TGG GTT GAT TCC AC	182 bp
5 rev 2	CTG GGG ACC CTG GGC AAC	

1.2. *Exon 6: Nucleotiden 12541 tot en met 12901.*

agcgatggtg agcagctggg gctggagaga cgacagggt gggtgcccag ggtcccc**agg**
188 192 195
cctctgattc **ctcactg** **att** **gctcttaggt** **ctggccc** **ctc** **ctcagcatct** **tatccga** **gtg**
198 200 205 208 212 215
gaaggaaatt **tgcgtgtgga** **gtatttgat** **gacagaaaca** **cttttcgaca** **tagtgtgtg**
218 222 224
gtgccctatg **agccgcctga** **ggctctggtt** gcaactgggg tctctgggag **ga** **gggggttaa**
gggtggttgt **cagtggccct** ccaggtgagc agtagggggg ctttctcctg ctgcttattt
gacctcccta taaccccatg agatgtgcaa agtaaaggg tttaactatt gcacagttga

6 forw 1	AGG CCT CTG ATT CCT CAC TG	127 bp
6 rev 1	GCA CCA CCA CAC TAT GTC GA	
6 forw 2	CTC CTC AGC ATC TTA TCC GA	159 bp
6 rev 2	CCA CTG ACA ACC ACC CTT	

1.3. Exon 7: Nucleotiden 13141 tot en met 13500.

gcgacagagc gagattccat ctcaaaaaa aaaaaaaaag gcctccccctg cttgccacag
 226
 gtctcccaa **ggcg**cactgg **cctcatctt**g ggctgtgtt atctcct**agg** **ttggctctga**
 229 232 236 239 242 246
ctgtaccacc atccactaca actacatgtg taacagttcc tgcattggcg gcatgaaccg
 249 252 256 259260
gaggcccatc ctcaccatca tcacactgga agactccagg tcaggagcca cttgc**a**acc
 tgcacactgg cctgctgtgc c**ccagcctct gcttgccctct** gacccctggg cccacctctt

7 forw 1	AGG CGC ACT GGC CTC ATC TT	141bp
7 rev 1	TCC AGT GTG ATG ATG GTG AGG	
7 forw 2	CAT GTG TAA CAG TTC CTG CAT G	135 bp
7 rev 2	GAG GCA AGC AGA GGC TGG	

1.4. Exon 8: nucleotide 13681 tot en met 13980.

gatggagcct ggTTTTTTaa atgggacagg taggacctga ttt**ccttact** **gcctcttgct**
 261 265 268 271
tctcTTTTTcc tatcctgagt **agtggtaatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgcgtg**
 275 278 281 285 288 291
tttgtgcctg tcttgggaga gaccggcgca cagaggaaga gaatctccgc aagaaagggg
 295 298 301 306
agcctcacca cgagctgccc ccagggagca ctaagcgagg taagcaagca **ggacaagaag**
cggtggagga gaccaagggt gcagttatgc ctcagattca cttttatcac ctttccttgc

8 forw. 1	CCT TAC TGC CTC TTG CTT CTC	130 bp
8 rev. 1	CTT GCG GAG ATT CTC TTC CTC	
8 forw. 2	TTG TGC CTG TCC TGG GAG AG	127 bp
8 rev. 2	CTC CAC CGC TTC TTG TCC T	

2. Primerset Angelopoulou.

Reference Sequence: NC_000017.11

Dik gedrukte, schuine en onderstreepte tekst is het target exon.

2.1. Exon 5: Nucleotiden 12241 tot en met 12600.

tagctcgcta gtgggttgca ggaggtgctt acgcatgttt gtttctttgc tgccgtcttc
 cagttgcttt atc**tgttcac** **ttgtgccctg act**ttcaact ctgtctcctt cctcttccta
 126 129 132 135 139 142
 cag **tactccc ctgccctcaa caagatgttt tgccaactgg ccaagacctg ccctgtgcag**
 145 149 152 155 159 162
ctgtgggttg attccacacc cccgcccggc acccgcgctc **ggccatggc catctacaag**
 165 169 172 175 179 182
cagtcacagc acatgacgga ggttgtgagg cgctgcccc accatgagcg ctgctcagat
 186
agcgatggtg agcagctggg **gctggagaga cgacagggct** ggttgcccag ggtccccagg
 gaaggaaatt tgcgtgtgga gtatttggat gacagaaaca cttttcgaca tagtgtgggtg

5 forw.	TGTTCACTTGTGCCCTGACT	268 bp
5 Rev.	CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG	

2.2. Exon 6: Nucleotiden 12541 tot en met 12901.

agcgatggtg agcagctggg gctggagaga cgacagggct gggtgcccag ggtccccagg
 188 192 195
 cctctgattc ctcactgatt gctcttaggt ctggccccctc ctcagcatct tatccgagtg
 198 200 205 208 212 215
 gaaggaaatt tgcgtgtgga gtatttggat gacagaaaca cttttcgaca tagtgtgtg
 218 222 224
 gtgccctatg agccacctga ggtctggttt gcaactgggg tctctgggag gagggggtaa
 gggtggttgt cagtggccct ccagggtgagc agtagggggg ctttctcctg ctgcttattt
 gacctcccta taaccccatg agatgtgcaa agtaaattggg ttttaactatt gcacagttga

6 forw.	CTGGGGCTGGAGAGACGACA	274 bp
6 Rev.	GGAGGGCCACTGACAACCA	

2.3. Exon 7: Nucleotiden 12541 tot en met 12901.

gcgacagagc gagattccat ctcaaaaaaa aaaaaaaaag gcctccccctg cttgccacag
 226
 gtctcccaa ggcgactgg cctcatcttg ggcctgtgtt atctcctagg ttggctctga
 229 232 236 239 242 246
 ctgtaccacc atccactaca actacatgtg taacagttcc tgcattggcg gcatgaaccg
 249 252 256 259260
 gaggcccatc ctcaccatca tcacactgga agactccagg tcaggagcca cttgccacc
 tgcacactgg cctgctgtgc ccagccctct gcttgccctt gacccctggg cccacctctt

7 forw.	CTCCCCTGCTTGCCACA	245 bp
7 rev.	AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA	

2.4. Exon 8: nucleotide 13681 tot en met 13980.

tcctccacct acctggagct ggagcttagg ctccagaaag gacaaggggtg gttgggagta
 gatggagcct ggttttttaa atgggacagg taggacctga tttccttact gcctcttgc
 261 265 268 271
 tctcttttcc tatcctgagt agtggtatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgcgtg
 275 278 281 285 288 291
 tttgtgcctg tcctgggaga gaccggcgca cagaggaaga gaatctccgc aagaaagggg
 295 298 301 306
 agcctcacca cgagctgccc ccaggagga ctaagcgagg taagcaagca ggacaagaag
 cgggtggagga gaccaaggt gcagttatgc ctcagattca cttttatcac ctttccttgc
 ctcttttcta gcactgccca acaacaccag ctctcttccc cagccaaaga agaaaccact

7 forw.	ACAAGGGTGGTTGGGAGTAGATG	320 bp
7 rev.	GCAAGGAAAGGTGATAAAAGTGAA	