

# Analiza mutacij v kinazni domeni proteina BCR-ABL1 pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo in z nezadostnim odgovorom na zdravljenje z zaviralcem tirozinske kinaze

BCR-ABL1 kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukaemia patients with suboptimal response to tyrosine kinase inhibitors

Tadej Pajič, Nejc Lamovšek, Martina Fink, Irena Zupan Preložnik, Peter Černelč

Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, SI-1525 Ljubljana, Slovenija

## Korespondenca/ Correspondence:

asist. dr. Tadej Pajič, univ. dipl. ing. kem. inž., spec. med. biokem., Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, SI-1525 Ljubljana, Slovenija; tel: + 386 1 43 20 230, e-mail: tadej.pajic@kclj.si

## Ključne besede:

BCR-ABL1, sekvenciranje, mutacije, kronična mieloična levkemija

## Key words:

BCR-ABL1, sequencing, mutation, chronic myeloid leukaemia

## Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012; 81 supl 2: II-174–9

Prispelo: 16. apr. 2012, Sprejeto: 12. jul. 2012

## Izvleček

**Izhodišča:** Pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo (KML) lahko pridobljene mutacije v kinazni domeni proteina BCR-ABL1 prispevajo k neučinkovitemu zdravljenju z zaviralcem tirozinske kinaze (TK). Z našim delom želimo napraviti mutacijsko analizo v skupini bolnikov s KML, ki so jih zdravili z zaviralcem TK in ki niso dosegli glavnega molekularnega odgovora (MoO) v najmanj 18 mesecih ali pa so ga izgubili.

**Metode:** V raziskavo smo vključili 9 bolnikov s KML (7 žensk, 2 moška). Iz levkocitov periferne krvi smo osamili celotno RNA in pripravili komplementarno DNA (cDNA) z reverzno transkripcijo. V preurejenem alelu BCR-ABL1 smo z načinom vgnezdene verižne reakcije s polimerazo (PCR) pomnožili celotni odsek kinazne domene *ABL1*. Nukleotidno zaporedje pridelka PCR smo določili s sekvenciranjem, ki smo ga izvedli na napravi ABI Prism 310. Dobljeno zaporedje smo primerjali z nukleotidnim zaporedjem divjega tipa gena *ABL1*. Mutacijo T315I smo ugotavljali tudi z občutljivejšim načinom, z alelno specifičnim PCR. Mutacija T315I je odporna tako na imatinib, nilotinib in dasatinib.

**Rezultati:** S sekvenciranjem in ASO-PCR smo pri enem od 9 bolnikov s KML dokazali prisotnost mutacije T315I. Pri drugem bolniku smo s sekvenciranjem ugotovili tiho mutacijo p.Glu499Glu. Pri ostalih bolnikih mutacij nismo ugotovili.

**Zaključki:** Mutacije so najverjetneje redke pri bolnikih s KML, ki niso dosegli glavnega MoO najmanj po 18 mesecih ali so ga izgubili. Ugotovitev mutacije T315I, odporne na zaviralce TK (imatinib, nilotinib, dasatinib), v naši raziskavi

kaže, da je analizo mutacij v *BCR-ABL1* smiselno opraviti pri tej skupini bolnikov. Ugotovljena tiha mutacija, pri kateri ni prišlo do zamenjave aminokislina, je zavedena v glavnih podatkovnih bazah polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP, rs2227985). Vpliv polimorfizma na odpornost za zdravljenje z zaviralcem TK ni pojasnjena.

## Abstract

**Background:** The acquired mutations in the BCR-ABL1 kinase domain (KD) may contribute to resistance to tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in chronic myeloid leukemia (CML) patients. The aim of our work was to perform the BCR-ABL1 mutation analysis in a cohort of CML patients receiving TKIs, who did not achieve a major molecular response (MMR) by 18 months or more, or who lost MMR.

**Methods:** Nine CML patients (7 female, 2 male) were included in the study. Total RNA was extracted from peripheral blood leukocytes and used to prepare complementary DNA (cDNA) by reverse transcription. The entire *ABL1* kinase domain of the rearranged *BCR-ABL1* allele was amplified using a nested PCR. The PCR products were analyzed using an ABI Prism 310 sequencer. Sequences were compared with the wild-type *ABL1* sequence. In addition, the T315I mutation detection was carried out by the more sensitive method-allele specific oligonucleotide-polymerase chain reaction (ASO-PCR). It is a highly-resistant mutation to imatinib, nilotinib and dasatinib.

**Results:** The T315I mutation was detected in one out of nine CML patients by direct sequencing and ASO-PCR. The silent mutation p.Glu499Glu

was detected in another CML patient by direct sequencing. No mutation was found in the rest of the cohort of CML patients.

**Conclusions:** It seems that the *BCR-ABL1* mutations are rare in patients who do not achieve a MMR by 18 months or more or who have lost MMR. The T315I mutation detected in one patient in our cohort of CML patients indicates

that the *BCR-ABL1* mutation analysis could be recommended in these cases. The silent mutation detected did not lead to amino acid change, however, it is listed in major single nucleotide polymorphisms databases (SNP, rs2227985). The role of the SNP in the resistance to TKIs is not clear.

## Uvod

Zaviralec tirozinske kinaze imatinib mesilat (IM) je prvo zelo učinkovito zdravilo za zdravljenje bolnikov s kronično mieloično levkemijo *BCR-ABL1* pozitivno. (KML).<sup>1,2</sup> Kot zdravili prve izbire zdravljenja bolnikov s KML lahko uporabimo zaviralca druge generacije, nilotinib in dasatinib.<sup>3-7</sup> Kljub temu se nekateri bolniki s KML ne odzivajo na zdravljenje ali pa bolezen napreduje kljub zdravljenju z IM; redkeje to pri nilotinibu in dasatinibu.<sup>8</sup> V teh primerih se odločimo za povečanje odmerka zdravila (IM), drugo obliko zaviralca tirozinske kinaze (TKI), presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC) ali drugo raziskovalno zdravljenje.<sup>8-11</sup>

Vzrokov za pojav odpornosti na zdravljenje s TKI je več. Klonska evolucija in pojav točkovnih mutacij sta najpomembnejša dejavnika, ki sta medsebojno povezana.<sup>12</sup> Mutacije odkrijemo pri bolnikih v pospešenem poteku bolezni ali blastni krizi (preobrazbi). Pri bolnikih s KML, odporno na zdravljenje z IM, so ugotovili že več kot 90 točkovnih mutacij, ki povzročajo spremembe aminokislilin na 57 mestih v genu *ABL1*.<sup>8</sup> Med njimi so nekatere, ki močno vplivajo na odzivnost na zdravljenje s TKI. Takšna mutacija je tudi zamenjava treonina za izolevcin na mestu 315 (T315I) aminokislinskega zaporedja beljakovine *BCR-ABL1*, ki povzroči pojav klona, ki je odporen na učinek imatiniba, nilotiniba in dasatiniba. Za nilotinib in dasatinib je manj odpornih mutacij in se med seboj ne pokrivajo, razen mutacije T315I.<sup>8</sup>

Priporočajo, da opravimo mutacijsko analizo *BCR-ABL1* v posebnih primerih, ko je zdravljenje s TKI neučinkovito.<sup>8</sup> Med njimi je tudi skupina bolnikov s KML, zdravljenih s TKI, ki niso dosegli glavnega molekularnega odgovora (MoO) najmanj po 18

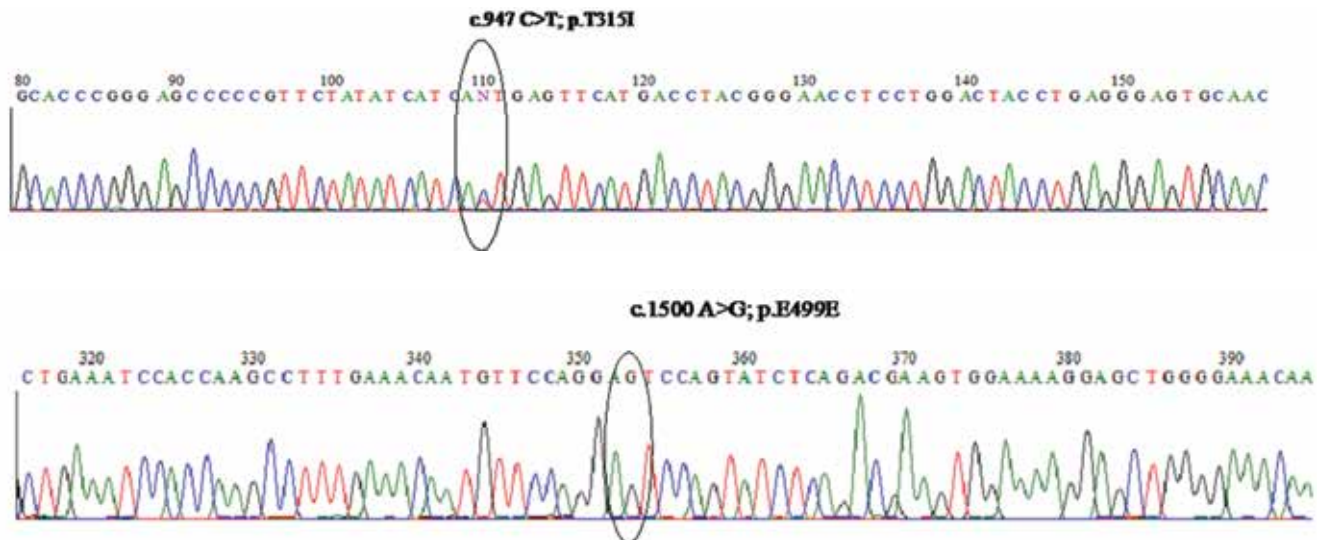
mesečih ali pa so ga izgubili. Glavni MoO (0,1 %) ustreza zmanjšanju za 3 desetiške logaritme od začetne standardne vrednosti (100 %) (*angl.* log reduction).<sup>9-11,13</sup> Začetna standardna vrednost je bila v raziskavi IRIS določena kot mediana vrednosti razmerja *BCR-ABL1* prepisa in kontrolnega prepisa *BCR 30* nezdravljenih bolnikov v kroničnem obdobju bolezni.<sup>9,10,13</sup> Pomen glavnega MoO se kaže v tem, da imajo bolniki, ki dosežejo glavni MoO po 12 ali 18 mesečih zdravljenja z IM, zelo veliko verjetnost, da bolezen v 5 letih ne bo napredovala.<sup>9,10,13</sup> Določitev ravni *BCR-ABL1* prepisa na mednarodnem merilu opravimo z obratnim prepisovanjem (RT) in s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) ter ob upoštevanju konverzijskega faktorja, ki si ga je laboratorij pridobil z izmenjavo vzorcev z referenčnim laboratorijem. Dobljeno vrednost razmerja med številom kopij *BCR-ABL1* in *ABL1* vzorca v odstotkih pomnožimo s konverzijskim faktorjem.<sup>13</sup>

Mutacije so najverjetneje redke pri bolnikih s KML, ki niso dosegli glavnega MoO najmanj po 18 mesečih ali so ga izgubili, vendar je podatkov o tem malo.<sup>8</sup> Zato je bil namen našega dela mutacijska analiza *BCR-ABL1*, s katero bi ugotovili smiselnost njenega izvajanja pri tej skupini bolnikov.

## Bolniki in metode dela

V raziskavo smo vključili 9 bolnikov s KML, *BCR-ABL1* pozitivno (7 žensk, 2 moška, Tabela 1), zdravljenih z zaviralcem TK, ki niso dosegli glavnega molekularnega odgovora (MoO) najmanj 18 mesečih ali so ga izgubili.

Vzorci periferne krvi bolnikov smo odvezli v ambulanti Kliničnega oddelka za



**Slika 1:** Elektroferograma nukleotidnega zaporedja, dobljenih iz aparata ABI 310 (Applied Biosystems) za:

A. odsek PCR segmenta BCR-ABL1 bolnika s kronično mieloično levkemijo, ki vsebuje mutacijo p.T315I (c.947 C>T ref zap NM\_005157.4; p.T315I ref zap NP\_005148.2).

B. odsek PCR segmenta BCR-ABL1 bolnika s kronično mieloično levkemijo, ki vsebuje tiho mutacijo p.E499E (c.1500 A>G ref zap NM\_005157.4; p.E499E ref zap NP\_005148.2).

hematologijo, UKC Ljubljana. Meritve smo opravili na vzorcih RNA, shranjenih pri temperaturi -80 °C v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana.

Iz levkocitov periferne krvi smo osamili celotno RNA in pripravili komplementarno DNA (cDNA) z reverzno transkripcijo. V preurejenem alelu BCR-ABL1 smo z načinom vgnezdene verižne reakcije s polimerazo (PCR) pomnožili celoten odsek kinazne domene ABL1.<sup>14</sup> Nukleotidno zaporedje pridelka PCR smo določili s sekvenciranjem, ki smo ga izvedli na napravi ABI Prism 310. Dobljeno zaporedje smo primerjali z nukleotidnim zaporedjem divjega tipa gena ABL1 (referenčna sekvenca NM\_005157.4). Mutacijo T315I (c.947C>T, NM\_005157.4; T315I NP\_005148.2) smo ugotavljali tudi z občutljivejšim načinom, z alelno specifičnim PCR.<sup>15</sup> Izvedli smo dve ločeni reakciji PCR. V prvo reakcijo PCR smo dodali smerni začetni oligonukleotid, s katerim ugotovimo normalni preiskovani alel (divji tip, *angl.* wild type, W). V drugo reakcijo PCR smo dodali smerni začetni oligonukleotid, ki zazna spremenjen, mutirani alel (mutiran, *angl.* mutated, M). V obe reakciji smo dodali tudi ustrezen protismerni začetni oligonukleotid, ki je enak za obe reakciji (W in M). Nastale produkte reakcije PCR smo analizirali z agrarozno gelsko elektroforezo, velikost pridelka PCR pa je 157 bp.<sup>15</sup> Hkrati smo pomnožili negativno kontrolo, vzorec brez mutacije in kontrolo brez prisotnosti

nukleinskih kislin, ki nam služi kot kontrola onesnaženja s pridelki prejšnjih reakcij PCR.

Izvedeni postopki so bili v skladu z načeli Helsinške deklaracije o biomedicinskih raziskavah na človeku (1975).

## Rezultati

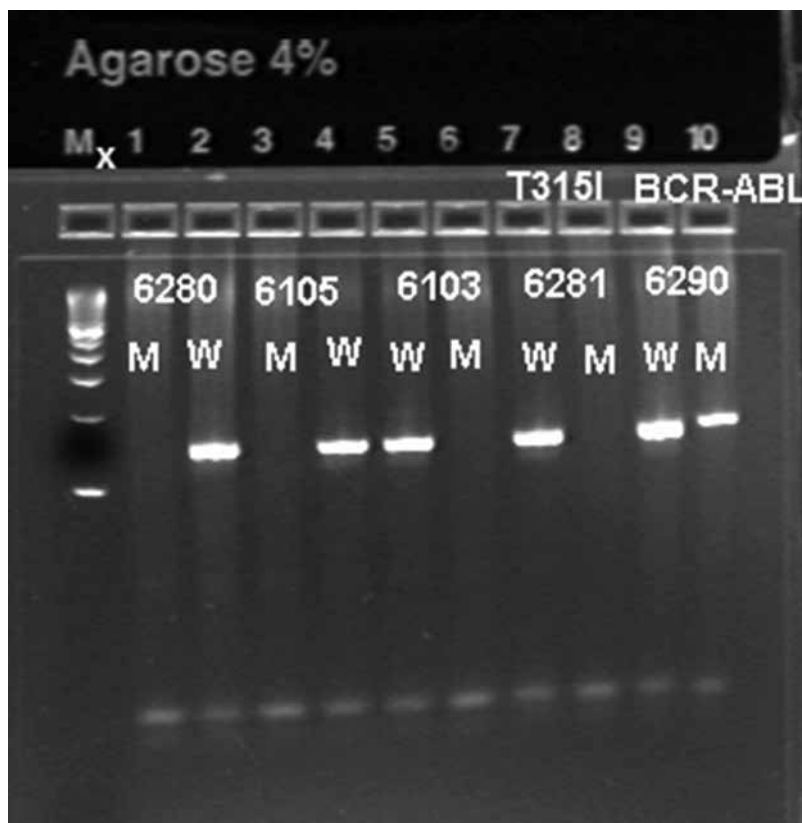
### Sekvenčna analiza odseka cDNA BCR-ABL1

V preurejenem alelu BCR-ABL1 smo z načinom vgnezdene verižne reakcije s polimerazo (PCR) pomnožili celoten odsek kinazne domene ABL1 v treh ločenih reakcijah PCR. Nukleotidna zaporedja fragmentov, ki se med seboj delno pokrivajo, ustrezajo aminokislinskemu zaporedju ABL1 od 207. do 517. mesta (referenčno nukleotidno zaporedje NM\_005157.4; referenčno proteinsko zaporedje NP\_005148.2).

S sekvenciranjem smo pri enem od 9 bolnikov s KML dokazali prisotnost mutacije T315I (Slika 1, A). Pri drugem bolniku smo s sekvenciranjem ugotovili tiho mutacijo p.E499E (c.1500 A>G ref zap NM\_005157.4; p.E499E ref zap NP\_005148.2) (slika 1, B). Pri ostalih bolnikih mutacij nismo ugotovili (Tabela 1).

### Alelno specifični PCR določanja mutacije T315I

Mutacijo T315I smo ugotavljali tudi z občutljivejšim načinom z ASO PCR.<sup>15</sup> Pri bolniku, pri katerem smo s sekvenciranjem



**Slika 2:** Prikaz agarozne gelske elektroforeze pridelkov alelnospecifične verižne reakcije s polimerazo (ASO-PCR) določanja mutacije T315I pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo, BCR-ABL1 pozitivno (KML).

*Mx, označevalec DNA velikosti od 100 do 1000 baznih parov (bp). M, mutiran alel T315I; W, normalni, nemutiran alel (divji tip); vrstica 1–2, vzorec z oznako 6280–ni mutacije; vrstica 3–4, vzorec z oznako 6105–ni mutacije; vrstica 5–6, vzorec z oznako 6103–ni mutacije; vrstica 7–8, vzorec z oznako 6281–ni mutacije; vrstica 9–10, vzorec z oznako 6290–mutacija T315I prisotna. Velikost madežev je 157 bp. E-gel 4 %, Invitrogen, ZDA.*

ugotovili mutacijo T315I, smo jo dokazali tudi z ASO-PCR (Slika 2, vzorec 6290). V reakciji PCR, pri kateri smo ugotavljali prisotnost mutacije, smo z agarozno gelsko elektroforezo zaznali pridelek PCR velikosti 157 bp. Pri drugih bolnikih mutacije nismo zaznali. Prisotnost pridelka PCR, v katerem ugotavljamo normalni alel, je znak ustrezne kakovosti vzorca cDNA in nam služi kot kontrola kakovosti naših rezultatov (Slika 2).

## Razpravljanje

Pri bolnikih s KML lahko pridobljene mutacije v kinazni domeni proteina BCR-ABL1 prispevajo k neučinkovitemu zdravljenju z zaviralcem tirozinske kinaze (TKI). Priporočajo, da opravimo mutacijsko analizo BCR-ABL1 v posebnih primerih, ko zdravljenje s TKI ni učinkovito.<sup>8</sup>

Med njimi je tudi skupina bolnikov s KML, zdravljenih z zaviralcem TK, ki niso dosegli glavnega molekularnega odgovora (MoO) najmanj po 18 mesecih ali so ga izgubili.<sup>8–10</sup> V našo raziskavo smo vključili devet takšnih bolnikov in samo pri enem bolniku s KML ugotovili prisotnost mutacije, in sicer mutacijo T315I. Prisotnost te mutacije

večinoma pomeni odpornost na zdravljenje tako z imatinib mesilatom kot nilotinibom in dasatinibom.<sup>8</sup> V tem primeru je odločitev o nadaljnjem zdravljenju težka. Vključuje tudi premislek o presaditvi krvotvornih matičnih celic, če je ta mogoča. Vse mutacije ne vplivajo enako na odpornost na zdravljenje s TKI, zato je za odločitev o izbiri nadaljnjega zdravljenja, večinoma o izbiri naslednjega TKI, pomembno poznati vrsto pridobljene mutacije v BCR-ABL1. Dosedanje klinične raziskave so pokazale, da je za nekatere mutacije učinkovitejši nilotinib, za druge dasatinib. Tako npr. je verjetno v primeru prisotnosti ene izmed mutacij V299L, T315A ali F317L/V/I/C nilotinib bolj učinkovit kot dasatinib. V primeru prisotnosti mutacij Y253H, E255K/V ali F359V/C/I je verjetno dasatinib bolj učinkovit kot nilotinib. Pri kateri koli drugi mutaciji, razen T315I, sta nilotinib in dasatinib podobno učinkovita.<sup>8</sup>

Priporočeni način za ugotovitev mutacij BCR-ABL1 je način direktnega sekvenciranja. Ta zaznava mutacije, če so prisotne v 20 celicah ali več s preureditvijo BCR-ABL1 oziroma s prisotnim kromosomom Philadelphia. Ta način lahko kombiniramo z drugim presejalnim načinom, npr. z denaturacijo in visokoločljivo tekočinsko kromatografijo (D-HPLC).<sup>8</sup> Prisotnost odpornih mutacij, ki so jih ugotovili z občutljivejšimi načini, ne pomeni vedno, da bo odgovor na zdravljenje s TKI neučinkovit. Ker je mutacija T315I med pogostejšimi, klon s to mutacijo pa odporen na zdravljenje z imatinib mesilatom, nilotinibom in dasatinibom, se odločimo najprej za določitev prisotnosti mutacije T315I z ASO-PCR, čemur sledi direktno sekvenciranje. Na tak način hitro prepoznamo najbolj odporne mutacije za zdravljenje s TKI.

Pri enem izmed bolnikov smo ugotovili tiho mutacijo p.E499E. Tiha mutacija, pri kateri ni prišlo do zamenjave aminokislina, je uvedena v glavnih podatkovnih bazah polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP, rs2227985). Vpliv polimorfizma na odpornost za zdravljenje z zaviralcem TK ni pojasnjena, vendar raziskave kažejo, da lahko takšne mutacije vplivajo na izražanje proteinov ali spremembo stabilnosti infor-

**Tabela 1:** Podatki in rezultati mutacijske analize *BCR-ABL1* bolnikov s kronično mieloično levkemijo, *BCR-ABL1* pozitivno.

Bolnik	Starost (spol)	Datum odvzema	TKI	Raven <i>BCR-ABL1</i> (% IS)	Sekvenciranje	ASO-PCR mutacija T315I	Razlog analize
					Izsledak	Izsledak	
bolnik 1	58 (Ž)	18.04.2011	imatinib/nilotinib	6.49	ni mutacije	ni mutacije	ni glavni MoLO
bolnik 2	62 (Ž)	12.04.2011	imatinib/nilotinib	22.9	ni mutacije	ni mutacije	ni glavni MoLO
bolnik 3	70 (Ž)	16.11.2011	imatinib/dasatinib	35.8	ni mutacije	ni mutacije	ni glavni MoLO
bolnik 4	81 (Ž)	18.08.2010	imatinib/nilotinib	6.38	ni mutacije	ni mutacije	ni glavni MoLO
bolnik 5	59 (Ž)	05.12.2011	imatinib/nilotinib	0.27	ni mutacije	ni mutacije	izguba glavnega MoLO
bolnik 6	57 (Ž)	08.09.2011	imatinib/nilotinib	0.519	ni mutacije	ni mutacije	ni glavni MoLO
bolnik 7	70 (Ž)	26.09.2011	imatinib	7.47	ni mutacije	ni mutacije	ni glavni MoLO
bolnik 8	76 (M)	27.09.2011	imatinib/dasatinib	0.553	mutacija tiha c.1500A>G;p.E499E	ni mutacije	ni glavni MoLO
bolnik 9	71 (M)	22.09.2011	imatinib/dasatinib	4.55	mutacija c.947 C>T; p.T315I	mutacija c.947 C>T; p.T315I	ni glavni MoLO

Legenda/Legend: TKI, zaviralec tirozinske kinaze; glavni MoLO, glavni molekularni odgovor; IS, mednarodno merilo; Ž, ženska; M, moški; ASO-PCR, aelnospecifična verižna reakcija s polimerazo; referenčna sekvenca za nukleotidno zaporedje: NM\_005157.4; referenčna sekvenca za proteinsko zaporedje: NP\_005148.2.

macijske RNA.<sup>16</sup> Morda vplivajo tudi na odzivnost na zdravljenje s TKI.

## Zaključki

Mutacije so verjetno redke pri bolnikih s KML, ki niso dosegli glavnega MoLO najmanj po 18 mesecih ali so ga izgubili. Ugotovitev odporne mutacije T315I na zaviralce TK (imatinib, nilotinib, dasatinib) kaže, da je analizo mutacij v *BCR-ABL1* smiselno opraviti pri tej skupini bolnikov. Tiha mutacija, pri kateri ni prišlo do zamenjave aminokisliline, je zavedena v glavnih podatkovnih bazah polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP, rs2227985). Vpliv polimorfizma na odpornost na zdravljenje z zaviralcem TK ni pojasnjena.

## Zahvala

Avtorji se zahvaljujemo Anici Mihajlović in Mariji Jedrt Mandelc Mazaj za pomoč pri zbiranju in evidentiranju vzorcev.

## Literatura

1. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006; 355: 2408–17.
2. Guilhot F, Druker B, Larson RA, Gathmann I, So C, Waltzman R, et al. High rates of durable response are achieved with imatinib after treatment with interferon alpha plus cytarabine: results from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) trial. *Haematologica* 2009; 94: 1669–75.
3. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 362: 2251–59.
4. Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, Bhalla K, Alimena G, Palandri F, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* 2007; 110: 3540–6.
5. Kantarjian HM, Hochhaus A, Saglio G, De Souza C, Flinn IW, Stenke L, et al. Nilotinib versus imatinib for the treatment of patients with newly diagnosed chronic phase, Philadelphia chromosome-positive, chronic myeloid leukaemia: 24-month minimum follow-up of the phase 3 randomised ENESTnd trial. *Lancet Oncol* 2011; 12: 841–51.
6. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 362: 2260–70.
7. Kantarjian HM, Shah NP, Cortes JE, Baccarani M, Agarwal MB, Undurraga MS, et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood* 2012; 119: 1123–9.
8. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 2011; 118: 1208–15.
9. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006; 108: 1809–20.
10. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6041–51.
11. Preložnik Zupan I, Pajič T. Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične mieloične levkemije. *Zdrav Vestn* 2008; 77: I-5–10.
12. Apperley JF. Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* 2007; 8: 1018–29.
13. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonising current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006; 108: 28–37.
14. Ernst T, Erben P, Müller MC, Paschka P, Schenk T, Hoffmann J et al. Dynamics of BCR-ABL mutated clones prior to hematologic or cytogenetic resistance to imatinib. *Haematologica* 2008; 93: 186–192.
15. Kang HY, Hwang JY, Kim SH, Goh HG, Kim M, Kim DW. Comparison of allele specific oligonucleotide-polymerase chain reaction and direct sequencing for high throughput screening of ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia resistant to imatinib. *Haematologica* 2006; 91: 659–62.
16. Ernst T, Hoffmann J, Erben P, Hanfstein B, Leitner A, Hehlmann R, et al. ABL single nucleotide polymorphisms may masquerade as BCR-ABL mutations associated with resistance to tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2008; 93: 1389–93.