

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program: Biologie a patologie buňky



**Mgr. Alena Kalfusová**

Komplexní molekulární diagnostika gastrointestinálních stromálních nádorů

Complex molecular diagnostics of gastrointestinal stromal tumors

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Roman Kodet, CSc.

Praha, 2023

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31.5.2023

Alena Kalfusová

.....

Podpis autora

## PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych chtěla moc poděkovat svému školiteli a vedoucímu práce, profesorovi MUDr. Romanu Kodetovi CSc. za inspirující a trpělivé vedení v průběhu celého doktorského studia, za cenné rady a podněty pro vypracování a sepsání autorských článků a rovněž při tvorbě disertační práce.

Dále bych chtěla poděkovat všem svým kolegům z Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN v Motole, kolegům patologům, zdravotním laborantkám na Bioptické stanici, nebo v Laboratoři imunohistochemie, bez kterých by nebyla možná vstupní fáze zpracování bioptických vzorků pro molekulární analýzu, společně s nevyhnutelnou histologickou revizí počtu nádorových buněk.

Obzvláště bych chtěla poděkovat vedoucí laboratoře RNDr. Lence Krskové, Ph.D., a všem svým kolegyním z Laboratoře molekulární patologie za kolegiální, rady a pomoc při řešení metodických problémů, za přátelskou podporu, příjemné pracovní prostředí a za kamarádsky přístup. Všem, skutečně všem patří moje vděčnost! Veliké poděkování patří kolegyním Terce Kalendové a Mgr. Jance Čopíkové, Ph.D za jejich nezištnou pomoc!

V neposlední řadě bych také ráda poděkovala svoji rodině. Mým nejbližším, manželovi Filipovi, synovi Jáchymovi a dceři Alexandře, a rovněž všem blízkým rodinným příslušníkům za jejich neustálou podporu trpělivost a neutichající pochopení.

Povzbuzování od kamarádů bylo potěšující a rovněž nepostradatelné!

Děkuji vám!

## ABSTRAKT

Většina gastrointestinálních stromálních nádorů (GIST) je charakterizována přítomností aktivačních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* (80 – 85 %). Ve skupině *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST (10 – 15 %) byly detekovány mutace v genech *BRAF*, *KRAS*, defekty v komplexu SDH nebo fúze *FGFR1::TACC1*, *ETV6::NTRK3*. Cílená terapie Imatinib mesylátem (IM) znamenala významný průlom v terapii GIST. Výrazným problémem cílené terapie je vznik primární nebo sekundární rezistence. Biologické chování GIST je nepředvídatelné. Stanovení proliferační aktivity vybraných markerů proliferace a senescence umožní objektivizovat riziko agresivního chování nádoru. Cílem první části naší práce byla mutační analýza genů *KIT* a *PDGFRA* a detekce sekundárních mutací u pacientů s progresí onemocnění. V 83.5 % vzorků jsme detekovali primární mutace v genech *KIT* a *PDGFRA*. U 16 pacientů s progresí onemocnění jsme prokázali přítomnost sekundárních mutací (v 29 progresivních ložiscích – 69 %). Potvrdili jsme výraznou intranádorovou a rovněž internádorovou heterogenitu sekundárních mutací. Cílem druhé části práce byla analýza alterací ve skupině *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST. V této skupině GIST jsme prokázali defekty v podjednotkách SDH komplexu, mutace v genech *BRAF* a *NF1* a alterace v genech *AKT1* a *ATR*. Předmětem poslední části práce bylo stanovení exprese mRNA hladin vybraných markerů proliferace a senescence. Zjistili jsme, že expresní hladiny vybraných markerů (Ki-67, TPX2, TOP2A a hTERT) jsou vhodnými markery pro stanovení proliferace nádoru a určení maligního potenciálu GIST. Navíc jsme zjistili korelaci mezi vyššími hladinami mRNA proliferačních markerů Ki-67, TPX2 a hTERT a kratším přežitím u pacientů s GIST (EFS a OS).

## KLÍČOVÁ SLOVA

GIST, mutace genů, rezistence k terapii, nádorová heterogenita, proliferační markery

## **ABSTRACT**

Most of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are characterized by activating mutations in the *KIT* and *PDGFRA* genes (80 – 85 %). Mutations in the *BRAF*, *KRAS*, defects in the SDH complex or *FGFR1::TACCI*, *ETV6::NTRK3* fusions were detected in the group of *KIT/PDGFRA* non-mutated GISTs (10 – 15 %). Targeted therapy with Imatinib mesylate (IM) marked a significant breakthrough in treating GISTs. A significant problem with targeted therapy is the formation of primary or secondary resistance. The biological behavior of the GIST is unpredictable. Determining the activity of selected markers for cell proliferation and senescence will enable the objectification risk of tumor behavior's aggressiveness. The aim of the first part of our work was the mutational analysis of the *KIT* and *PDGFRA* genes and the detection of secondary mutations in patients with disease progression. We detected primary mutations in *KIT* and *PDGFRA* genes in 83.5 % of samples. We also demonstrated the presence of secondary mutations in 16 patients with progression of disease (in 29 progressive lesions – 69 %). We confirmed significant intratumor and also intertumor heterogeneity of secondary mutations. The aim of the second part of the thesis was the analysis of alterations in the *KIT/PDGFRA* non-mutated GISTs. In this group of GISTs we demonstrated defects in the SDH complex subunits, mutations in the *BRAF* and *NF1* genes and alterations in the *AKT1* and *ATR* genes. The purpose of the last part of this work was the determination of mRNA expression levels of selected markers of proliferation and senescence. We found that expression levels of selected markers (Ki-67, TPX2, TOP2A and hTERT) are suitable markers for determining tumor proliferation and malignant potential of GIST. Additionally, we found a correlation between higher mRNA levels of proliferation markers Ki-67, TPX2 and hTERT and shorter survival in GIST patients (EFS and OS).

## **KEYWORDS**

GIST, genes mutations, therapy resistance, tumor heterogeneity, proliferation markers

## SEZNAM ZKRATEK

AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related protein
BL	Burkittův lymfom
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog 1
CSF-1	Colony-Stimulating Factor-1
DNA	kyselina deoxyribonukleová
ETV6	Ets variant 6
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FLK-3	FMS-like Tyrosine Kinase-3
hTERT	lidská telomerázová podjednotka
IGF1R	Insuline like growth factor 1 receptor
IHC	imunohistochemie
Ki-67	proliferační marker Ki-67
KIT	V-Kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene
LMS	leiomyosarkóm
MLPA	Multiplex Ligation – Dependent Probe Amplification
NF1	neurofibromatosis-1
NGS	sekvenování nové generace/masivní paralelní sekvenování
NTRK	Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGFRA	receptor pro růstový faktor podobný destičkovému faktoru
PIK3CA	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
RAS	Rat Sarcoma

RNA	kyselina ribonukleová
RQ RT PCR	kvantitativní Real Time PCR
SDH	sukcinát dehydrogenáza
TOP2A	topoizomeráza 2A
TPX2	TPX2, microtubule-associated, homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WHO	Světová zdravotnická organizace

## OBSAH

1. ÚVOD.....	10
1.1. Gastrointestinální stromální nádory (GIST).....	10
1.2. <i>KIT</i> a <i>PDGFRA</i> mutované GIST .....	13
1.2.1. Mutace v genech <i>KIT</i> a <i>PDGFRA</i> .....	15
1.2.2. Cílená terapie inhibitory RTK.....	17
1.2.3. Primární a sekundární rezistence.....	20
1.3. <i>KIT</i> a <i>PDGFRA</i> nemutované GIST .....	26
1.4. Prognostický význam markerů proliferace a senescence .....	34
1.4.1. Proliferační marker Ki-67.....	36
1.4.2. Proliferační marker TPX2 .....	37
1.4.3. Proliferační marker TOP2A.....	37
1.4.4. Marker senescence - hTERT .....	38
2. CÍLE PRÁCE .....	39
2.1. Primární a sekundární mutace v genech <i>KIT</i> a <i>PDGFRA</i> .....	39
2.2. Molekulární analýza <i>KIT/PDGFRA</i> nemutovaných GIST.....	39
2.3. Expresní analýza mRNA markerů proliferace a senescence.....	40
3. MATERIÁL A METODY.....	42
3.1. Materiál.....	42
3.2. Metody.....	43
3.2.1. Izolace nukleových kyselin .....	43
3.2.2. Kontrola kvality nukleových kyselin.....	43
3.2.3. Reverzní transkripce .....	44
3.2.4. Detekce přítomnosti mutací - sekvenování dle Sangera.....	44
3.2.5. Alelově specifická PCR.....	46
3.2.6. Analýza křivek tání s vysokým rozlišením - HRM.....	48
3.2.7. Mutační analýza prostřednictvím Sekvenování nové generace (NGS).....	50
3.2.8. Příprava plazmidů.....	51
3.2.9. Absolutní kvantifikace v reálném čase – RQ RT PCR.....	51
3.2.10. Statistická analýza .....	54
4. VÝSLEDKY.....	55
4.1. Molekulární analýza mutačního stavu GIST .....	55
4.1.1. Mutační analýza <i>KIT/PDGFRA</i> mutovaných GIST .....	55
4.1.2. Mutační analýza <i>KIT/PDGFRA</i> nemutovaných GIST .....	68



4.2. Expresní analýza markerů proliferace a senescence.....	73
4.2.1. Expresse markerů proliferace a senescence ve skupinách GIST, BL a LMS .....	73
4.2.2. Expresse markerů proliferace a senescence u benigních a maligních GIST.....	74
4.2.3. Expresse mRNA markerů proliferace a senescence ve vztahu k EFS a OS .....	75
5. DISKUZE .....	83
5.1. Metodické možnosti a limitace mutační analýzy .....	83
5.2. Molekulární analýza primárních mutací v genech <i>KIT</i> a <i>PDGFRA</i> .....	88
5.2.1. Molekulární analýza primárních mutací v genu <i>KIT</i> .....	88
5.2.2. Molekulární analýza primárních mutací v genu <i>PDGFRA</i> .....	91
5.3. Molekulární analýza sekundárních mutací v genech <i>KIT</i> a <i>PDGFRA</i> .....	92
5.3.1. Změna morfologie nádorových buněk u terapeuticky ovlivněných nádorů .....	96
5.4. Molekulární analýza <i>KIT/PDGFRA</i> nemutovaných GIST.....	97
5.4.1 Mutační analýza genu <i>BRAF</i> .....	97
5.4.2. Molekulární analýza defektů SDH komplexu .....	99
5.4.3. Molekulární diagnostika v genech signální dráhy RAS/NF1 .....	101
5.4.4. Fúze genů <i>NTRK</i> a <i>FGFR</i> .....	106
5.5. Expresní analýza proliferace a senescence.....	107
5.5.1. Proliferační marker Ki-67.....	108
5.5.2. Proliferační marker TPX2 .....	110
5.5.3. Proliferační marker TOP2A.....	111
5.5.4. Marker senescence hTERT.....	112
6. ZÁVĚR.....	114
7. SHRNUTÍ.....	115
7. SUMMARY .....	116
8. REFERENCE .....	117
9. SEZNAM PUBLIKACÍ .....	157
10. SEZNAM OBRÁZKŮ .....	161
11. SEZNAM TABULEK .....	162
12. SEZNAM ONLINE ZDROJŮ.....	164
13. SEZNAM PŘÍLOH .....	165
13.1. Seznam primerů.....	165
13.1.1. Mutační analýza.....	165
13.1.2. Expresní analýza.....	167
13.2. Seznam publikací.....	168

# 1. ÚVOD

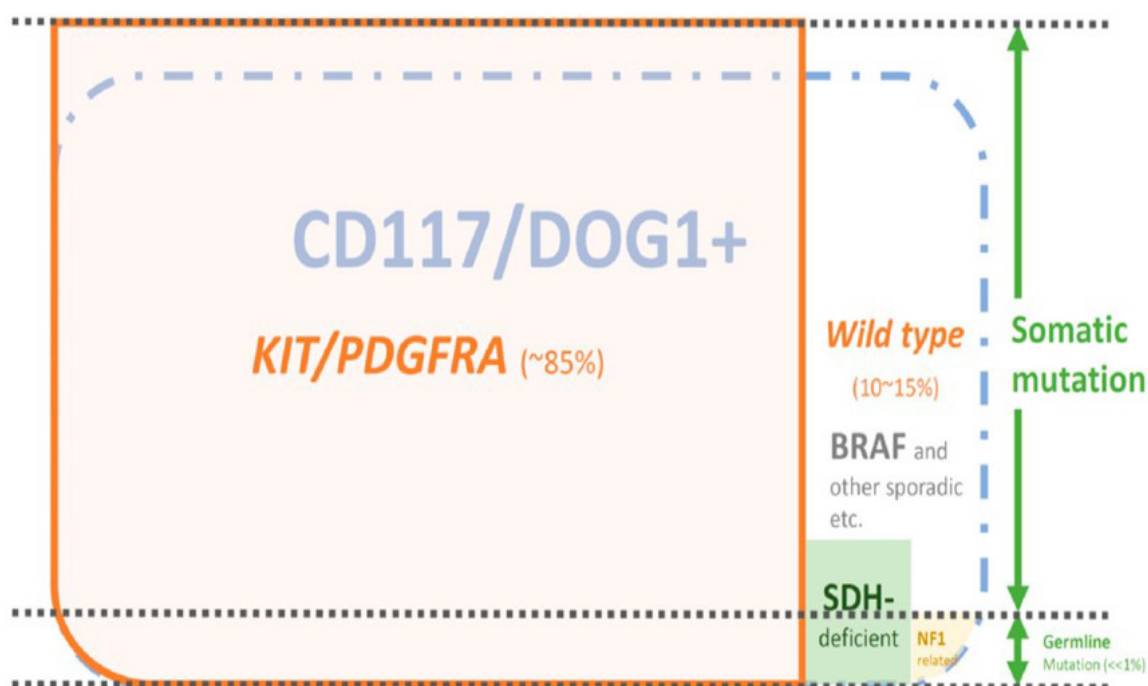
## 1.1. Gastrointestinální stromální nádory (GIST)

Gastrointestinální stromální nádory (GIST) tvoří skupinu mezenchymálních nádorů vznikajících v gastrointestinálním traktu (GIT) (Miettinen et al., 1999a). GIST tvoří nejpočetnější skupinu nádorů mezenchymálního původu v této lokalizaci (Hirota, Isozaki, 2006). Ze všech nádorů lokalizovaných v rámci GIT však GIST tvoří méně než 1 % (Gupta et al., 2008). Určení přesného původu těchto nádorů se podařilo objasnit s příchodem imunohistochemických (IHC) vyšetření a elektronové mikroskopie. Prostřednictvím těchto metod se ukázalo, že GIST vykazují ultrastrukturální znaky a expresi buněčných markerů typických pro Cajalovy intersticiální buňky (ICC) (Kindblom et al., 1998). ICC jsou buňky, které navozují a usměrňují převod vzruchu a následně kontrakce hladkých svalů v rámci GIT (Li, Raut, 2019).

Po stránce exprese proteinů jsou GIST nejlépe charakterizované expesí transmembránového proteinu KIT (CD117) (Heinrich et al., 2003a). Expese proteinu KIT je detekována až v 95 % GIST (Miettinen, Lasota, 2006). Skupina GIST s expesí povrchové molekuly CD117 zahrnuje jednak *KIT* mutované GIST, *KIT* nemutované a rovněž GIST s mutacemi v genu *PDGFRA*. Mutace v genu *KIT* neovlivňují expesi proteinu KIT, ale jeho funkci (Lasota, Miettinen, 2008). CD117 je citlivým a specifickým markerem GIST, jeho expese však není přítomna u všech GIST. Ve skupině GIST s mutacemi v genu *PDGFRA* je expese proteinu KIT slabá nebo fokální (Corless et al., 2005). Dalším specifickým diagnostickým markerem GIST je protein DOG1. Označení DOG1 je akronymem pro název „discovered on GIST 1“, tj. „objeven u GIST“ (Miettinen et al. 2009). Protein DOG1 je kódovaný genem *DOG1* a plní roli chloridového kanálu. U GIST se setkáváme s cytoplazmatickou a rovněž membránovou pozitivitou proteinu DOG1 (Ríos-Moreno et al., 2012). Kombinace obou diagnostických proteinů DOG1 a CD117 v IHC panelu umožňuje stanovit diagnózu u více než 98 % GIST (Wu et al., 2019).

Většina GIST vzniká na podkladě aktivačních mutací v genech *KIT* (75 – 85 %) nebo *PDGFRA* (10 – 15 %) (Li, Raut, 2019; Miettinen, Lasota, 2013). Nejčastěji (v 95 %) se setkáváme s tzv. sporadickými GIST. Sporadické GIST postihují převážně dospělé pacienty ve středním věku (nad 40 let). Mutace genů *KIT* a *PDGFRA* jsou v této skupině GIST získané. Vzácně se můžeme setkat s familiární formou GIST charakterizovanou

zárodečnými mutacemi genů *KIT* a *PDGFRA*. Mutace se pak vyskytují jak v nádorových buňkách, tak i ve všech ostatních buňkách organismu (Postow, Robson, 2012; Tornillo, Terracciano, 2006; Zhao, Yue, 2012). Familiární GIST jsou charakterizovány autozomálně dominantní dědičností s vysokou penetrancí. Prvotně byly zárodečné mutace identifikovány v exonu 11 genu *KIT*. Následně byly zárodečné mutace popsány i v dalších exonech genu *KIT* (13 a 17) a rovněž v genu *PDGFRA*, nebo v genech *NF1* (neurofibromatosis-1), případně v genech *SDH* komplexu. Pacienti s familiárním GIST se obvykle prezentují mnohočetnými primárními nádory v rámci GI traktu a dalším charakteristickým znakem – hyperpigmentací kůže (Steigen, Eide, 2009). Familiární GIST většinou vykazuje indolentní chování na rozdíl od sporadických GIST (Caram, Schuetze, 2011). Přehled IHC vyšetření a molekulární analýzy u GIST poskytuje Obr. 1.



**Obr. 1 Přehled imunohistochemického a molekulárního vyšetření u GIST.** Modrou přerušovanou čarou je označena skupina KIT/DOG1 pozitivních GIST. Plná oranžová čára určuje skupinu GIST s mutovanými geny *KIT* a *PDGFRA*. Šedé přerušované čáry vyznačují zastoupení GIST se somatickými a zárodečnými mutacemi.

Upraveno dle Wu et al., 2019

Vzácně je zaznamenán výskyt GIST v dětském věku. Vznik GIST u dětí (6 – 14 let) a mladých dospělých (15 – 24 let) bývá často spojen s jinými syndromy, většinou s neurofibromatózou typu I (von Recklinghausenova nemoc), nebo vznikají jako součást Carneyovy trias (GIST, chondrohamartom plíce a paragangliom), nebo syndromu Carney-

Stratakis (GIST a paragangliom) (Samelis et al., 2007). GIST postihující děti představují odlišnou klinicko-patologickou a molekulární skupinu nádorů s indolentním průběhem onemocnění a s mnohočetnými ložisky v žaludku (Agaram et al., 2008a; Cypriano et al., 2004). Charakteristickým znakem je také nižší výskyt mutací v genech *KIT* a *PDGFRA*, kolem 15 % (Janeway, Weldon, 2012).

Více než 80 % GIST je primárně lokalizovaných v GIT a vyskytují se v celém jeho rozsahu. Vzácněji se setkáváme s přítomností nádorů v extragastrointestinální lokalizaci, tj. v omentu, mesenteriu, retroperitoneu, ve žlučníku a v močovém měchýři (Miettinen et al., 1999b; Reith et al., 2000; Sakurai et al., 2001; Yamamoto et al., 2004; Zhao, Yue, 2012). Převážná část nádorů v rámci GI traktu se nachází v žaludku (60 %), obvykle ve fundu (Miettinen et al., 2005). Druhou nejčastější lokalizací je tenké střevo. Konkrétně ve 30 % je popsán výskyt GIST v oblasti jejunu a ilea, v menší míře v duodenu – 5 % (Miettinen, Lasota, 2013). Ve 4 % se setkáváme s přítomností GIST v tlustém střevu. Vzácný je GIST v jícnu nebo v apendixu (Zhao, Yue, 2012).

Mikroskopická struktura GIST je variabilní a v zásadě rozpoznáváme varianty vřetenobuněčné, epiteloidní – připomínající až epitelové nádory, a smíšené (Miettinen et al., 1999a; Zoundjiekpon et al., 2014). Vřetenobuněčné varianty se vyskytují nejčastěji (70 %). Ve většině se jedná o nádory s protáhlými vřetenitými buňkami, uniformní, téměř bez jaderných atypií. Epiteloidní varianty GIST (přítomny přibližně u 20 % GIST) jsou obvykle buněčné a jsou tvořené kohezivně rostoucími polygonálními buňkami s nezřetelnými buněčnými hranicemi. Menší část GIST (10 %) vykazuje znaky smíšeného typu, u kterých se společně vyskytují buňky vřetenité a epiteloidní. Z hlediska biologických vlastností se vřetenobuněčné a epiteloidní varianty zásadním způsobem neliší. V každé skupině prognóza onemocnění závisí především na proliferační aktivitě nádoru a na jeho velikosti.

Klinická prezentace GIST je široká. Přibližně 70 % pacientů s GIST je symptomatických. 20 % nevykazuje žádné příznaky a 10 % GIST je zjištěných náhodně při pitvě (Gupta et al., 2008). GIST mají tendenci odtlačovat přilehlé, sousedící struktury, aniž by došlo k jejich destrukci. V tomto ohledu mohou GIST narůst do velkých rozměrů dříve než se klinicky projeví některým z typických znaků (Gupta et al., 2008). Nejčastějším symptomem GIST je krvácení na základě ulcerace sliznice související s nádorem. Přibližně 10 – 30 % GIST má klinické znaky maligního nádorového onemocnění. Základním klinickým znakem je pak metastazování. GIST nejčastěji metastazují do jater (50 – 60 %)

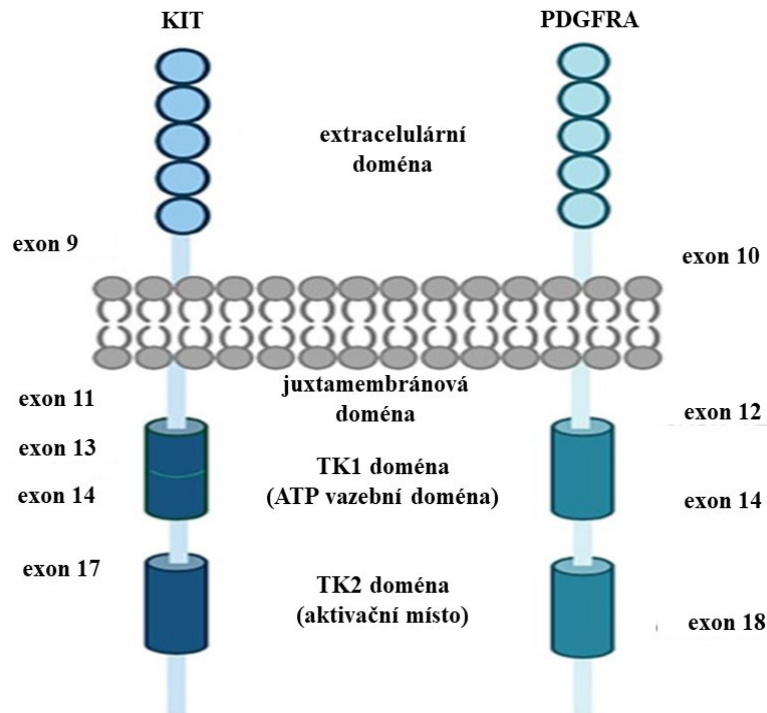
a/nebo na peritoneum (20 – 43 %). Vzácně mohou metastazovat i do regionálních lymfatických uzlin (10 %). Ve výjimečných případech metastazují do plic nebo do kostí (10 %) (Gupta et al., 2008).

## 1.2. *KIT* a *PDGFRA* mutované *GIST*

Proteiny *KIT* a *PDGFRA* (plateled derived growth factor receptor alpha) řadíme mezi transmembránové receptorové tyrozinkinázy (RTK). RTK jsou důležitými mediátory signalizačních drah, které přenášejí extracelulární signály do nitra buněk. Výsledkem přenosu signálu je aktivace intracelulárních procesů, které kontrolují buněčnou proliferaci, diferenciaci, přežívání a/nebo programovanou smrt buněk. Patologické změny genů, které kódují RTK – amplifikace, delece nebo mutace – vedou ke konstitutivní aktivaci receptorů a představují významný mechanismus nekontrolované RTK signalizace (Burger et al., 2005).

RTK *KIT* a *PDGFRA* jsou členy rodiny RTK proteinů podobných receptoru pro destičkový růstový faktor (PDGFR – plateled-derived growth factor receptor). Tato skupina RTK je také označována pořadovým číslem III. Společně s proteiny *KIT* a *PDGFRA* patří do této skupiny i proteiny *PDGFRB*, *CSF-1* a *FLK-3* (Daum et al., 2006; Fassunke et al. 2010; Heldin, Lennartsson, 2013; Judson, 2008; Lennartsson, Rönstrand, 2012; Wardelmann et al., 2004).

Zástupci RTK rodiny III. se vyznačují strukturální homologií sestávající ze tří základních částí: extracelulární, transmembránové a intracelulární. Extracelulární část tvoří 5 domén podobných molekule imunoglobulinu. Intracelulární část představuje juxtamembránová oblast a dvojice tyrosinkinázových (TK) domén propojených krátkým kinázovým inzertem (Daum et al., 2006; Heldin, Lennartsson, 2013; Lennartsson, Rönstrand, 2012; Wardelmann et al., 2004). TK1 je místem, kde se na intracelulární část proteinu váže ATP. TK1 doména se proto často označuje jako ATP vazební doména. Za přenos fosfátu zodpovídá TK2 doména. Přenosem fosfátu dochází k aktivaci proteinu, proto tuto doménu označuje rovněž jako tzv. aktivační místo. Extracelulární část je s intracelulární částí proteinu propojena sekvenčně jednoduchým hydrofobním transmembránovým úsekem (Lasota, Miettinen, 2008; Maleddu et al., 2009; Steigen, Eide, 2009). Přehled strukturálního složení RTK rodiny III. poskytuje obr. 2.



**Obr. 2 Přehled strukturálního složení RTK rodiny III.** Extracelulární část (doména) je u RTK KIT a rovněž u PDGFRA tvořená 5 imunoglobulinu-podobným doménami. Juxtamembránová oblast je lokalizovaná těsně pod buněčnou membránou. Tyrozinkinázové domény 1 (TK1) a 2 (TK2) jsou spojeny krátkým inzertem. TK1 doména je místem vazby ATP. TK2 doména představuje aktivační místo.

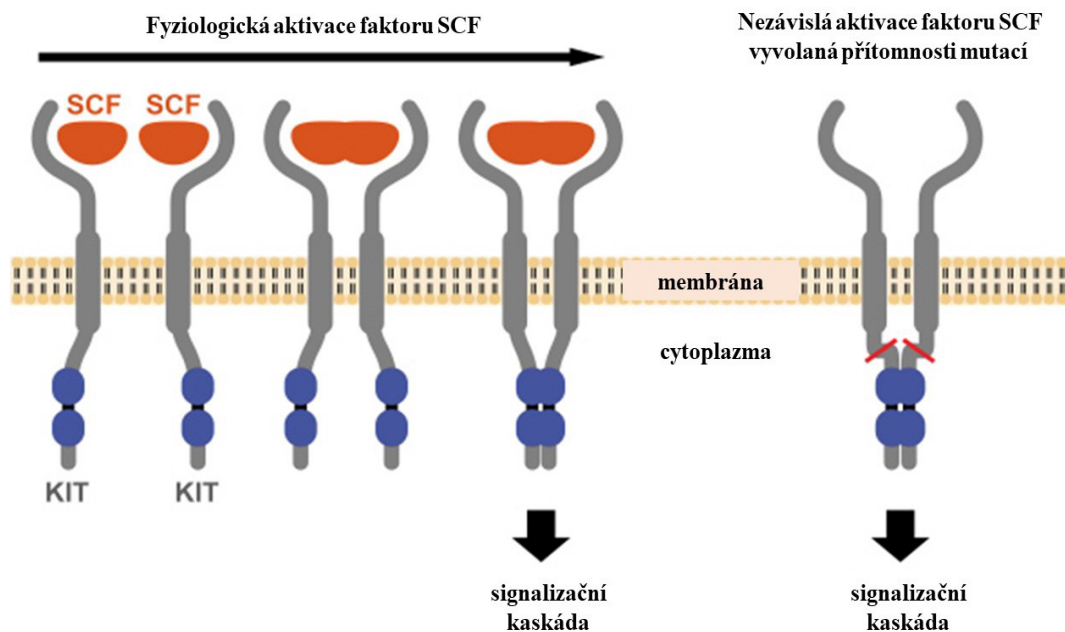
Upraveno dle Bauer et al., 2021

I když celkový mechanismus aktivace rodiny RTK III. třídy a jejich příslušných signálních drah je podobný, jednotlivé receptory jsou exprimovány v rozdílných typech buněk a s tím souvisí i jejich rozdílná funkce (Heldin, Lennartsson, 2013).

RTK KIT je důležitým receptorem při vývoji melanocytů, zárodečných buněk, žírných buněk, hematopoetických kmenových buněk a ICC (Hornick, Fletcher, 2007). Receptor PDGFRA zprostředkovává proliferaci a diferenciaci mezenchymálních buněk a podpurných buněk glie v CNS.

Aktivace proteinů KIT a PDGFRA probíhá za fyziologických podmínek prostřednictvím ligandů, tedy příslušných růstových faktorů. Ligandem pro protein KIT je růstový faktor kmenových buněk (SCF – stem cell factor) (Ali, Ali, 2007; Li, Raut, 2019), pro protein PDGFRA je to růstový faktor PDGF (platelet derived growth factor).

Systém receptorů a ligandů PDGFR/PDGF zahrnuje 2 receptory (PDGFRA a PDGFRB) a 4 ligandy (PDGFA, PDGFB, PDGFC, a PDGFD). Obecné schéma aktivace RTK KIT prezentuje Obr. 3.



**Obr. 3 Schéma aktivace RTK KIT.** RTK KIT je aktivována vazbou specifického ligandu, tj. vazbou ligandu SCF (Stem cell factor). Navázáním ligandu SCF dochází k dimerizaci proteinů KIT. Přiblížení proteinů vede k aktivaci (prostřednictvím autofosforylace) intracelulárních domén (označených modře) a k následnému spuštění přenosu signálu do jádra buňky. Aktivační mutace v genu *KIT* (eventuálně v genu *PDGFRA* u receptoru PDGFRA) způsobí konstitutivní aktivaci receptoru, nezávislou na přítomnosti ligandu.

Volně upraveno dle [www.gistsupport.org](http://www.gistsupport.org)

### 1.2.1. Mutace v genech *KIT* a *PDGFRA*

V roce 1998, Hirota et al. (1998) zjistili, že podstatná část nádorů označovaných jako GIST obsahuje mutace v genu *KIT*. V roce 2003 byla ve skupině GIST bez přítomnosti mutací v genu *KIT* zjištěna přítomnost aktivačních mutací v genu *PDGFRA* kódujícího příbuznou receptorovou tyrozin kinázu PDGFRA (Heinrich et al., 2003b).

Mutace v genech *KIT* a *PDGFRA* jsou vzájemně exkluzivní. Nádory s mutacemi v genu *KIT* nemají mutován gen *PDGFRA* a naopak (Samelis et al., 2007). Existují ovšem výjimky. Typy mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* jsou u GIST značně variabilní. Zahrnují delece, substituce (bodové mutace), duplikace (často ve smyslu interních tandemových duplikací – ITD), inzerce a složitější delece-inzerce, duplikace-inzerce a delece s inzerací invertovaných komplementárních sekvencí, tzv. delece-inverze (Lasota, Miettinen, 2008). Onkogenetické mutace genů *KIT* a *PDGFRA* aktivují prostřednictvím konstitutivní fosforylace příslušné RTK KIT a PDGFRA. Kontinuální, na přítomnosti ligandu nezávislá aktivace RTK KIT a PDGFRA vede k neregulovanému spuštění signálních drah

RAS/RAF/MAPK, JAK/STAT3 a PI3K/AKT/mTOR, které podporují nádorovou proliferaci nebo přežívání buněk (Lasota, Miettinen, 2008).

Mutace v genech *KIT* a *PDGFRA* můžeme rozdělit z několika hledisek. Podle lokalizace mutací v uvedených genech rozlišujeme mutace regulačních domén receptorů (extracelulární a juxtamembránová doména) a mutace enzymatických domén (TK1 a TK2) (Lasota, Miettinen, 2008). Z hlediska předpovědi chování se nádoru na cílenou terapii inhibitory TK, se nádory s mutacemi v regulačních doménách receptorů považují za senzitivní na terapii. Nádory s mutacemi v enzymatických doménách jsou méně citlivé, případně rezistentní. Podle času a způsobu vzniku dále rozdělujeme mutace v genech *KIT* a *PDGFRA* do dvou kategorií. Do první kategorie patří mutace diagnostikované u primárních nádorů před zahájením terapie Imatinib mesylátem (IM). Tyto mutace označujeme jako primární mutace, a souvisí s patogenezí vzniku a rozvoje GIST. Druhou kategorií tvoří mutace detekované v průběhu léčby pacienta s GIST a podílejí se na vzniku získané rezistence těchto nádorů na terapii IM (sekundární *KIT* nebo *PDGFRA* mutace). Sekundární mutace detekujeme většinou ve vzorcích metastáz nebo u nádorů lokálně recidivujících. Primární i sekundární mutace postihují stejnou alelu (Lasota, Miettinen, 2008).

Frekvence mutací v genu *KIT* u GIST je 80 – 85 % (Antonescu, 2011; Bauer et al., 2021; Corless et al., 2004). Gen *KIT* tvoří 21 exonů a mutace mohou vzniknout v kterémkoliv z těchto exonů. Typická je však kumulace mutací v exonech 9, 11, 13 a 17. Exon 9 kóduje extracelulární část proteinu KIT, exon 11 intracelulární juxtamembránovou oblast, exon 13 první intracelulární tyrozinkinázovou doménu (TK1) a exon 17 kóduje druhou intracelulární tyrozinkinázovou doménu (TK2) (Bombac et al., 2020). Mutace genu *PDGFRA* se kumulují v exonech 12, 14 a 18, které jsou homologní s exony 11 (juxtamembránová oblast), 13 a 17 (intracelulární TK1, respektive TK2 domény) genu *KIT* (Daum et al., 2010; Rubin, 2006). Výskyt mutací v genu *PDGFRA* u pacientů s GIST se pohybuje v rozpětí 5 – 8 % (Corless et al., 2005). Nejčastějším místem výskytu mutací v genu *PDGFRA* je TK2 doména, konkrétně exon 18. Bodová záměna p.D842V, která je typicky přítomna v exonu 18 je nejčastěji detekovanou mutací. Vyskytuje se v přibližně 65 % nádorů s mutací v genu *PDGFRA* (Szucs et al., 2017). Mutace, které jsou lokalizované v exonech 12 (kóduje juxtamembránovou doménu) a v exonu 14 (kóduje ATP-vazebnou doménu, tj. TK1 doménu), jsou méně časté. Přehled frekvence výskytu a lokalizací mutací v genech *KIT/PDGFRA* přehledně znázorňuje Tab. 1.



**Tab. 1 Přehled frekvence a lokalizace mutací v genech *KIT* a *PDGFRA***

PŘÍTOMNOST MUTACÍ	KODOVANÁ OBLAST	FREKVENCE VÝSKYTU	TYP PRIMÁRNÍCH MUTACÍ	ANATOMICKÁ LOKALIZACE
<i>KIT/PDGFR</i>	MUTOVANÉ	80 – 85 %		
<i>KIT</i>		60 – 70 %		
exon 9	extracelulární	9 - 10 %	duplikace A502_Y503	tenké a tlusté střevo
exon 11	juxtamembránová	60 %	delece/delece-inzerce delece 557-558 agresivnější substituce duplikace	gastrointestinální trakt
exon 13	TK1	>1 %	K642E E653K	všechny lokality
exon 17	TK2	> 1 %	D820Y N822K N822H	všechny lokality
<i>PDGFRA</i>		10 – 15 %		
exon 12	juxtamembránová	2 %	D561V delece/delece-inzerce duplikace, inzerce	všechny lokality
exon 14	TK1	<1 %	N659K	žaludek
exon 18	TK2	D842V 9-10 % ostatní 1-2 %	D842V, D846V delece	žaludek (D842V) jiné mutace (všechny lokality)
<i>KIT/PDGFR</i>	NEMUTOVANÉ	15 – 20 %		

Volně upraveno dle Brčić et al., 2021; Lasota, Miettinen 2008; Mathias – Machado et al., 2022

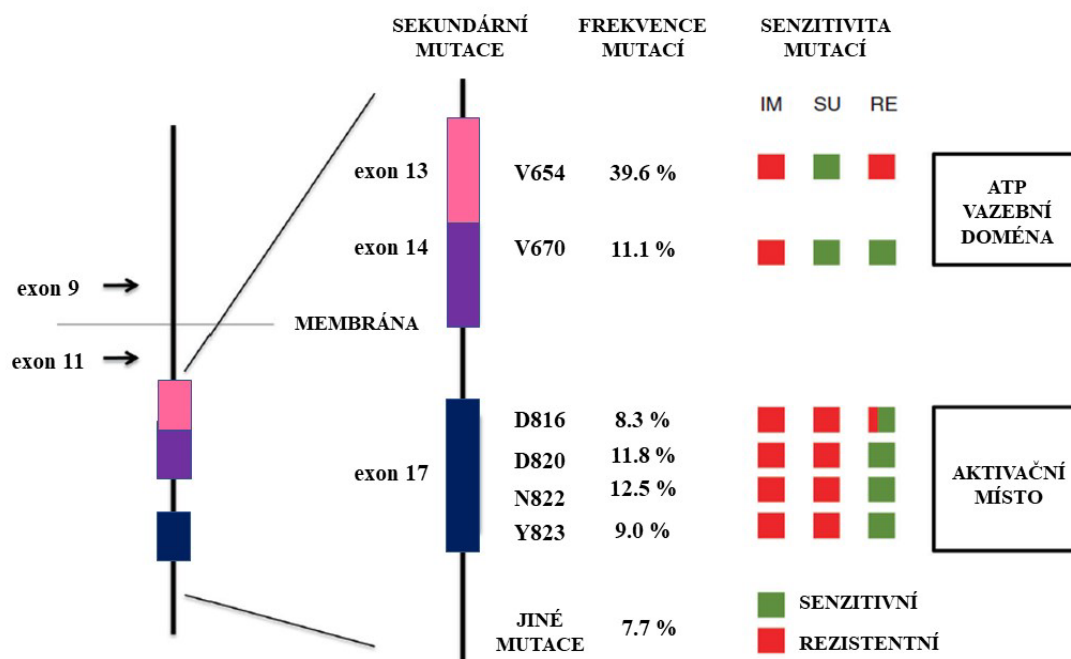
### 1.2.2. Cílená terapie inhibitory RTK

Imatinib mesylát (IM) je selektivním inhibítozem tyrozin kináz ABL, BCR-ABL, KIT a PDGFR (Demetri et al., 2002). IM jako cílený inhibitor RTK KIT a PDGFRA neinhubuje aktivační místo kináz, ale interaguje s ATP vazebným místem těchto proteinů (Antonescu, 2008; Bauer et al., 2021; Serrano et al., 2019). IM byl prvním inhibítozem tyrozin-kináz použitým v klinické praxi, konkrétně v terapii refrakterní chronické myeloidní leukémie, CML (Druker et al., 1996). Následně byl IM aplikován v terapii pokročilého GIST (Breccia, Alimena, 2009; Joensuu et al., 2001). Na základě úspěšné klinické odpovědi se IM stal terapeutikem první volby u léčby neoperabilních, recidivujících a metastatických GIST (Blanke et al., 2001; Demetri et al., 2002; van Oosterom et al., 2001; Wang et al., 2009). Terapeutická odpověď pacientů na IM závisí na mutačním stavu genů *KIT* a *PDGFRA* (Antonescu et al., 2005; Debiec-Rychter et al., 2005; Saponara et al., 2015).

Pacienti s mutacemi v exonu 11 genu *KIT* odpovídají na terapii nejcitlivěji. Pacienti navíc po klinické stránce vykazují delší dobu do další progresse (EFS) a celkové přežívání v porovnání s pacienty s mutacemi v exonu 9 genu *KIT*, nebo s nemutovanými geny *KIT/PDGFR* je delší (Heinrich et al., 2006). Naproti tomu, pacienti s aktivační mutací p.D842V v exonu 18 genu *PDGFRA*, jsou na terapii IM primárně rezistentní (Heinrich et al., 2006). Molekulární klasifikace GIST s ohledem na predikci terapeutické odpovědi IM je tedy nevyhnutná pro identifikaci pacientů, kteří mohou profitovat z cílené léčby (Saponara et al., 2015).

U pacientů s progresí onemocnění na terapii IM, je doporučeno zvýšení terapeutické dávky IM ze 400 mg/den na 800 mg/den. V roce 2006 byl v II. linii léčby metastatického nebo recidivujícího GIST zaveden širokospektrý inhibitor TK Sunitinib malát (SM, Sutent, SU11248, Pfizer Inc., New York, NY, USA), který inhibuje receptory KIT, PDGFRA, PDGFRB, VEGFR, FLT3, a RET (Bauer et al., 2021; Kikuchi et al., 2012). SM byl aplikován v případě intolerance IM, při výskytu vážných nežádoucích účinků na terapii IM, nebo při neustupujícím onemocnění způsobeným rezistencí na terapii IM. Účinnost SM závisí na lokalizaci primárních a sekundárních mutací, podobně jako je tomu u IM. SM je efektivní u GIST s mutacemi exonu 9 genu *KIT*, nebo u GIST s nemutovanými geny *KIT* a *PDGFRA* (Lasota, Miettinen, 2008). V případě přítomnosti sekundárních mutací je SM účinnější v terapii GIST se sekundárními mutacemi v exonech 13 nebo 14 genu *KIT* (TK1 doména, ATP vazebné místo), než se sekundárními mutacemi v exonu 17 genu *KIT* (TK2 doména, aktivační místo) (Kikuchi et al., 2012; Serrano et al., 2019). Dalším inhibitorem TK je Regorafenib (RE, BAY 73-4506, Stivarga®) (George et al., 2012). Jedná se o multikinázový inhibitor se širokým spektrem účinnosti (Etrich, Seufferlein, 2018). Blokuje RTK KIT, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, TIE2, FGFR1, RET, RAF1, BRAF a receptory PDGFR (Liu et al., 2020). Byl zaveden ve III. linii terapie u pacientů s progresí onemocnění GIST na IM, nebo SM (Wilhelm et al., 2011). V případě výskytu sekundárních mutací je účinnější při mutacích v exonu 17, eventuálně 18 genu *KIT* (Napolitano, Vincenzi, 2019). Inhibiční účinek RE u pacientů s GIST je výsledkem přímé inhibice receptorů KIT a PDGFRA, ale rovněž inhibice signálních drah RAF/ERK/MEK. Charakteristickým znakem TK inhibitorů I., II. a III. linie je specifická účinnost jen na určitou skupinu sekundárních mutací (Serrano et al., 2019). Heterogenita sekundárních mutací a jejich selektivní inhibice pomocí výše uvedených TK inhibitorů tvoří molekulární základ selhání terapie u pacientů s progresí onemocnění (Serrano, George, 2020).

Schematický přehled senzitivity nebo rezistence jednotlivých vybraných sekundárních mutací na terapii SU nebo RE po selhání terapie prostřednictvím IM poskytuje Obr. 4.



**Obr. 4 Schéma citlivosti TK inhibitorů po selhání terapie IM.** Schematický přehled typických sekundárních mutací po selhání terapie IM s jejich frekvencí a předpovídanou aktivitou na imatinib mesylát (IM), sunitinib malát (SM) nebo regorafenib (RE). Zelené čtverce prezentují senzitivitu a červené rezistenci na podávané terapeutikum. Mutace p.D816 u regorafenibu (RE), u které je čtverec zbarvený společně červeně a zeleně indikuje přítomnost rezistentní aminokyselinové záměny (např. mutace p.D816V je vysoce rezistentní na všechny TKI).

Upraveno dle Serrano et al. 2019

TK inhibitory IM, SM a rovněž RE inhibují kinázovou aktivitu KIT u jednotlivých imatinib-rezistentních subklonů jenom částečně v souvislosti s jejich příslušným inhibičním profilem (Serrano, George, 2020). Recentně jsou tedy v terapii pokročilého eventuálně neoperabilního GIST zavedeny nové cílené inhibitory Ripretinib a Avapritinib (Al-Share et al., 2021; Blay et al., 2021). Ripretinib (RI, DCC-2618, Qinlock<sup>®</sup>) je tzv. „switch-controle“ inhibítoem kináz KIT a PDGFRA, který inhibuje plné spektrum mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* (Serrano, George, 2020). V terapii heterogenně rezistentních nádorů je to významný a inovativní přístup. Ripretinib se reverzibilně váže na dvě domény (switch control), které kontrolují přechod mezi neaktivní a aktivní konformaci kinázy. Konkrétně se jedná o inhibiční místo na juxtamembránové doméně (kódované exonem 11 genu *KIT* a exonem 12 u genu *PDGFRA*) a aktivačním přepínačem na aktivačním místě (kódovaným exony 17 a 18 genu *KIT* a exony 18 a 19 genu *PDGFRA*) (Schaefer et al.,

2022). Vazbou na obě domény současně udržuje kinázy KIT nebo PDGFRA v neaktivní formě a dosahuje inhibici širokého spektra primárních a sekundárních mutací spojených s rezistencí. Avapratinib (AV, BLU-285, Aykavit®) je kinázový inhibitor I. třídy (Schaefer et al., 2022). TK inhibitory II. třídy (IM, SM, RE a RI) se vážou na KIT/PDGFRA kinázy v jejich neaktivní formě. U Avapratinibu je to přesně naopak, váže se na aktivní formu kinázy (Kelly et al., 2021). Avapratinib byl schválen pro terapii pacientů s neoperabilním nebo metastatickým GIST nesoucím mutace v genu *PDGFRA*, zahrnující rovněž primárně rezistentní mutaci p.D842V v exonu 18 genu *PDGFRA* (Bauer et al., 2021). Přehled recentně indikovaných TK inhibitorů schválených pro léčbu GIST společně s mechanismem účinku poskytuje Tab. 2.

**Tab. 2 Přehled TK inhibitorů používaných v léčbě GIST**

TERAPEUTIKUM	MECHANIZMUS ÚČINKU	LINIE TERAPIE	DÁVKA
IMATINIB	tyrozin kinázový inhibitor s aktivitou proti KIT, PDGFRA a PDGFRB	I. linie u neoperabilního a/nebo metastatického onemocnění	400 mg/den event. 800 mg/den
SUNITINIB	širokospektrální tyrozin kinázový inhibitor s aktivitou proti KIT, PDGFR, VEGFR1-3, FLT3, CSF-1R	II. linie u progresu nebo intoleranci imatinibu	50 mg/den event. 37.5 mg
REGORAFENIB	inhibitor na membránu vázaných a intracelulárních kináz s aktivitou proti KIT a PDGFRA	III. linie pro pacienty dříve léčených imatinibem nebo sunitinibem	160 mg/den
AVAPRITINIB	kinázový inhibitor s aktivitou proti mutaci D842V v exonu 18 genu <i>PDGFRA</i>	IV. linie u pacientů s neoperabilním a/nebo metastatickým GIST s přítomnou mutací D842V v exonu 18 genu <i>PDGFRA</i>	300 mg/den
RIPRETINIB	inhibitor KIT a PDGFRA kináz s mutacemi v aktivačním místě	III. linie výsledky porovnatelné s sunitinibem	150 mg/den

Volně upraveno dle Al-Share et al., 2021

### 1.2.3. Primární a sekundární rezistence

Primární a sekundární rezistence na terapii IM se staly hlavním klinickým problémem v onkologické léčbě GIST (Gupta et al., 2008) GIST jsou obecně rezistentní na chemoterapii a rovněž na radioterapii. Z tohoto důvodu až do zavedení IM jako cíleného inhibitoru RTK, nebyla pro pacienty s neoperabilním nebo metastatickým GIST dostupná žádná efektivní terapie (Gupta et al., 2008). Nicméně, u mnohých pacientů podstupujících terapii IM, se objevuje rezistence na uvedenou terapii (Bickenbach et al., 2007). Medián

vzniku rezistence na terapii IM s následnou progresí onemocnění je přibližně 24 měsíců (Verweij et al., 2004).

Z hlediska klasifikace rezistence rozeznáváme dvě formy. Časnou rezistenci, nazývanou také primární, a pozdní, nebo-li, získanou (sekundární) rezistenci (Wang et al., 2009). Primární rezistence je definována jako progresí onemocnění v průběhu prvních 3 – 6 měsíců od začátku terapie IM (Nishida et al., 2016a). Vyskytuje se přibližně 15 – 20 % pacientů (Heinrich et al., 2006). Hlavním důvodem vzniku této formy rezistence je mutační stav genů *KIT* nebo *PDGFRA* (typ mutace a/nebo lokalizace primární mutace) (Gounder, Maki, 2011).

S primární rezistencí nejčastěji souvisí mutace v exonu 9 genu *KIT*, mutace v genu *PDGFRA* (zejména mutace p.D842V v exonu 18), nebo naopak absence mutací jak v genu *KIT*, tak v genu *PDGFRA* (Gounder, Maki, 2011; Nishida et al. 2016a). Exon 9 genu *KIT* kóduje extracelulární doménu, která za normálních okolností inhibuje dimerizaci receptoru KIT. Mutace v exonu 9 způsobí sterickou překážku, která nedovolí IM pevně se navázat na katalytickou doménu receptoru (TK1 doména). V případě genu *PDGFRA* exon 18 kóduje aktivační „smyčku“ (TK2 doména). Bodová mutace p.D842V v exonu 18 vede k substituční záměně na tomto místě a ke vzniku stabilně aktivní konformace proteinu. Uvedená aktivní konformace receptoru na vazbu IM a jeho inhibiční vlastnosti neodpovídá.

Sekundární rezistence vzniká v průběhu terapie u pacientů, kteří prvotně na terapii odpovídali, případně u nich došlo ke stabilizaci onemocnění. V průběhu několika měsíců na terapii u nich následně dochází ke vzniku rezistence a progresi onemocnění. Časové rozmezí vzniku sekundární rezistence se pohybuje v rozpětí 6 až 24 měsíců od začátku terapie IM. Existuje několik mechanismů odpovědných za vznik sekundární rezistence (Bickenbach et al., 2007).

Hlavním mechanismem vzniku získané rezistence je přítomnost sekundárních mutací (Guo et al., 2009). Sekundární mutace se vyskytují u 50 – 70 % pacientů s progresí onemocnění (Antonescu et al., 2005; Liegl et al., 2008). SM vznikají v průběhu léčby pacienta s GIST a prezentují se ve formě jednoduchých substitucí. Přítomnost sekundárních mutací zjišťujeme u pacientů, kteří měli detekovány primární mutace v genu *KIT*, v menší míře také u těch, kteří měli primární mutace lokalizovány v genu *PDGFRA*. Důvodem nižšího výskytu sekundárních mutací v genu *PDGFRA* je méně častá přítomnost

primárních mutací v genu *PDGFRA*. U pacientů s nemutovanými geny *KIT/PDGFR*A sekundární mutace nebyly prokázány (Liegler et al., 2008). Stručný přehled mutací zodpovědných za sekundární rezistenci poskytuje Tab. 3.

**Tab. 3 Přehled sekundárních mutací**

DOMÉNA	KODON	EXON	SEKUNDÁRNÍ MUTACE
ATP VAZEBNÍ DOMÉNA	654	13	p.V654A
	670	14	p.T670I, p.T670E
AKTIVAČNÍ SMYČKA	816	17	p.D816E, p.D816G
	820	17	p.D820Y, p.D820E
	822	17	p.N822K
	823	17	p.D823Y

Upraveno dle Heinrich et al., 2008

Sekundární mutace se téměř výhradně vyskytují ve stejném genu a na stejné alele jako primární mutace (Antonescu et al., 2005; Chen et al., 2005; Ordog et al., 2015). Typicky se nevyskytují ve vzorcích nádorů před terapii IM nebo u primárně rezistentních nádorů (Antonescu, 2008).

Rozlišujeme dva možné mechanismy vzniku rezistence na terapii IM. Při prvním mechanismu, sekundární mutace specificky interferují s vazbou IM, aniž by ovlivnily konformaci RTK KIT. Uplatnění uvedeného mechanismu je charakteristické pro první TK doménu proteinu KIT (TK1) (Gramza et al., 2009). Při druhém mechanismu dochází na základě přítomnosti sekundárních mutací ke stabilizaci aktivní konformace proteinu KIT. Aktivní konformace následně zabraňuje vazbě IM. Stabilizace proteinu v aktivní konformaci je typická pro sekundární mutace lokalizované ve druhé TK doméně (TK2) proteinu KIT (Antonescu, 2008). Výsledkem je kumulace sekundárních mutací v TK doménách (TK1 a TK2).

Sekundární mutace ATP vazebného místa přímo inhibují vazbu IM na intracelulární část proteinu KIT. Sekundární mutace p.V654A (exon 13 genu *KIT*) vede ke snížení vazebné aktivity IM na základě změny a následné modifikace trojrozměrné konformace ATP vazebného místa receptoru (Bertucci et al., 2006; Lim et al., 2008; Tamborini et al., 2006). Sekundární mutace v exonu 14 genu *KIT*, konkrétně p.T607I, je často označovaná jako „strážce brány“ – gatekeeper. Tato mutace je zodpovědná za tvorbu sterické překážky pro

vazbu IM (Nishida et al., 2008). Nejčastěji se sekundární mutace vyskytují v aktivačním místě kinázy (TK2). Mutace v tomto aktivačním místě (exon 17 genu *KIT*) destabilizují inaktivní formu RTK (protein *KIT* je konstitutivně aktivován) (Nishida et al., 2008).

U jedné třetiny pacientů rezistentních na terapii se sekundární mutace neprokáží. Na mechanismu vzniku sekundární rezistence se tedy podílí i jiné molekulární principy (Antonescu, 2008; Antonescu, 2011; Bickenbach et al., 2007). Kromě již uvedených sekundárních mutací patří mezi časté mechanismy sekundární rezistence amplifikace genu *KIT* a/nebo *PDGFRA* a následující nadměrná exprese daných proteinů. Jedním z dalších mechanismů získané rezistence je aktivace alternativních RTK, např. *AXL* (Gounder, Maki 2011).

Mimo uvedené mechanismy změn struktury nebo funkce receptorů *KIT* a *PDGFRA*, patří k mechanismům získané rezistence také chromozomální modifikace, histologická modifikace nádoru, popřípadě změny ve farmakokinetice IM ovlivněné dostupností IM v organismu (Maleddu et al., 2009). Přehled mechanismů vzniku sekundární rezistence poskytuje Tab. 4.

**Tab. 4 Přehled mechanismů sekundární rezistence**

MECHANIZMY SOUVISEJÍCÍ S RECEPTORY KIT A PDGFRA
AMPLIFIKACE GENU <i>KIT</i> , NADMĚRNÁ EXPRESE PROTEINU KIT
ZTRÁTA EXPRESE PROTEINU KIT, AKTIVACE ALTERNATIVNÍHO RECEPTORU
AKTIVACE ALTERNATIVNÍ KIT SIGNÁLNÍ DRÁHY
<b>SEKUNDÁRNÍ MUTACE:</b>
3D KONFORMAČNÍ ZMĚNY RECEPTORU – MUTACE V EXONU 13 GENU <i>KIT</i>
STRUKTURÁLNÍ ZMĚNY RECEPTORU – MUTACE V EXONU 14 GENU <i>KIT</i>
KONSTITUTIVNÍ AKTIVACE RECEPTORU – MUTACE V EXONU 17 GENU <i>KIT</i>
MECHANIZMY ODLIŠNÉ NEBO NESOUVISEJÍCÍ S RECEPTORY KIT A PDGFRA
HISTOLOGICKÁ MODIFIKACE NÁDORU
CHROMOZOMÁLNÍ ALTERACE
SNÍŽENÍ DOSTUPNOSTI IM V ORGANIZMU – ZMĚNA FARMAKOKINETIKY IM

Upraveno dle Maleddu et al., 2009

Nepříznivým znakem sekundární rezistence je také velká heterogenita sekundárních mutací (Antonescu et al., 2005). Sekundární mutace se mohou u jednoho pacienta lišit co do počtu, nebo typu jednak v rámci jednoho nádorového ložiska, či metastázy, ale mohou se lišit i mezi jednotlivými metastázami i ve stejném orgánu (Ordog et al., 2015). Rozdílné sekundární mutace v rozdílných metastázách u stejného pacienta poukazují na rozdílnou klonální evoluci sekundárních mutací (Wardelmann et al., 2005). Heterogenita rezistentních mutací nádorové populace v jedné jednotlivé metastáze a v rámci mnohotných metastáz, tedy „mezi“ metastázami (tj. každá nádorová léze může podstoupit individuální klonální evoluci) může být u jednotlivých pacientů značná. Heterogenita může kolísat od dvou do pěti sekundárních mutací v rozdílných metastázách, nebo i vznikem dvou rozdílných mutací v jedné metastáze (Liegl et al., 2008; Wardelmann et al., 2006).

Molekulárně-genetická analýza provedená z jednoho metastatického ložiska tak nemusí představovat skutečný mutační stav nádoru (Gramza et al., 2009). Důvodem výrazné heterogenity sekundárních mutací je dlouhotrvající terapie IM, která vede ke klonální selekci rozdílných rezistentních nádorových subklonů. Uvedený proces nazýváme rovněž „získaná polyklonální rezistence“ (Antonescu, 2011). Přerušení terapie při aktivní progresi onemocnění může vést k akceleraci nádorového růstu (citlivé klony jsou eliminovány) (Antonescu, 2011).

Komplexnost sekundárních mutací, tj. variabilita množství i lokalizace sekundárních mutací (u jednoho pacienta mohou být přítomny mutace v exonu 13 a rovněž i v exonu 17 genu *KIT*) je závažným problémem pro cílenou biologickou léčbu s ohledem na jejich rozdílnou senzitivitu. Terapeutické nasazení jednotlivého kinázového inhibitoru naráží na neschopnost terapeutického zásahu na všechny mutované klony.

Pacienti, u kterých byla zjištěna primární (mimo mutaci p.D842V) nebo sekundární rezistence, mohou být zařazeni k terapii vyšší dávkou IM (pokud vyšší dávkování IM nebylo aplikováno již předtím). Následně při progresi na terapii IM a u sekundárních mutací v exonu 13 genu *KIT* je doporučeno podání inhibitoru II. generace (SM). V III. linii, při progresi nebo intoleranci IM eventuálně SM, je schváleno podání RE (Caram, Schuetze, 2011).

U RE byla potvrzena citlivost při přítomnosti sekundárních mutací v exonu 17 genu *KIT*. Recentně byl pro velkou škálu sekundárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* zaveden switch-pocket inhibitor ripretinib. Pro mutace v genu *PDGFRA* včetně primárně rezistentní



mutace p.D842V je aktuálně schválen inhibitor I. třídy, avapritinib. Přehled terapeutického účinku jednotlivých inhibitorů na specifické sekundární mutace poskytuje Tab. 5.

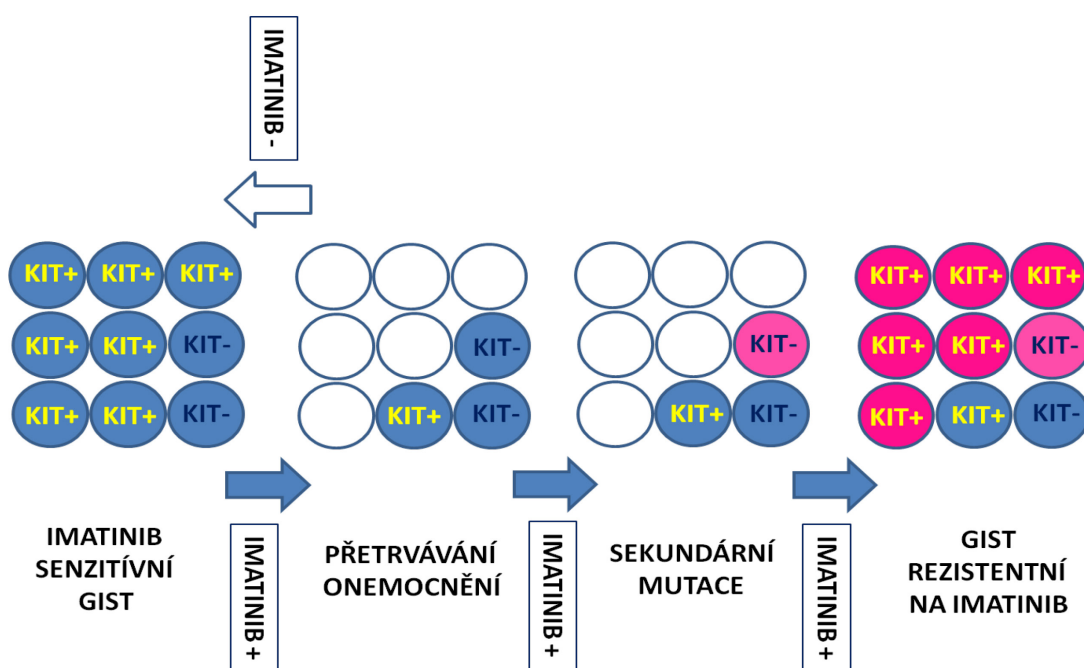
**Tab. 5 Přehled senzitivity sekundárních mutací na TK inhibitory**

MUTACE	IMATINIB	SUNITINIB	REGORAFENIB	RIPRETINIB	AVAPRATINIB
<b>MUTACE <i>KIT</i></b>					
exon 9	✓	-	-	-	-
exon 11	✓	-	-	-	-
exon 13 (V654)	x	✓	x	✓	-
exon 14 (T670)	x	✓	✓	✓	-
exon 17 (D816)	x	x	✓ / x	✓ / x	-
exon 17 (D820)	x	x	✓	✓	-
exon 17 (N822)	x	x	✓	✓	-
exon 17 (N823)	x	x	✓	✓	-
<b>MUTACE <i>PDGFRA</i></b>					
exon 12	✓	✓	✓	✓	✓
exon 14	x	x	x	x	x
exon 18 (V842D)	x	x	x	x	✓
exon 18 (jiné než V842D)	✓	✓	✓	✓	✓

Upraveno dle Mathias – Machado et al., 2022

Problémem progresu onemocnění je kromě primární a sekundární rezistence také selhání úplné eradikace nádorových buněk v nádorovém ložisku, popřípadě eradikace kmenových nádorových buněk. Ke kompletní eradikaci nádorových buněk nedochází ani při dlouhotrvající terapii inhibitory RTK. Inhibitory RTK selhávají v eradikaci nádorových buněk v 95 – 97 % případů. Rozpětí redukovaných nádorových buněk může totiž kolísat od více než 90 % až po méně než 10 %. Absolutní eradikace nádorových buněk dosud nebylo nikdy dosaženo (Corless, 2014; Ordog et al., 2015). Přežívající nádorové buňky jsou metabolicky v klidovém stadiu a neproliferují. Jejich výstup z buněčného cyklu je však reverzibilní (Ordog et al., 2015). Přetrvávání nádorových buněk navzdory pokračující terapii pomocí inhibitorů RTK umožňuje selekci klonů se sekundárními, na terapii rezistentními mutacemi. Přežívání nádorových buněk i u imatinib-senzitivních mutací je

umožněno přítomnosti skupiny buněk s nízkou expresí proteinu KIT, nebo buněk, u kterých vznikla ztráta exprese proteinu KIT (označení KIT-low/KIT-). Ačkoliv inhibitory RTK mohou kontrolovat diferenciaci, přežívání či proliferaci KIT+ buněk, nemohou odstranit imatinib-rezistentní KIT-low/KIT- kmenové buňky. Tyto buňky se následně stávají zdrojem relapsu onemocnění. Vznik sekundárních mutací rezistentních na IM v přežívajících prekurzorech může umožnit jejich diferenciaci v KIT+ buňky a tím jejich nekontrolovatelný růst. Předpokládaný model procesu přetrvávání nádorových buněk a klonální selekce buněk se získanými mutacemi uvádíme na Obr. 5.



**Obr. 5 Model klonální selekce buněk se získanými mutacemi.** KIT+ nádorové buňky s expresí proteinu KIT a senzitivitou na terapii. KIT- představují buňky s nízkou expresí, nebo se ztrátou exprese proteinu KIT, které neodpovídají na terapii. Pokračující terapie ovlivní vznik sekundárních mutací v části perzistujících buněk (růžově značený kruh s KIT- buňkami). Tyto KIT- imatinib-rezistentní buňky se mohou diferencovat v KIT+ buňky a nekontrolovatelně růst. Stávají se tak následně zdrojem relapsu onemocnění.

Upraveno dle Ordog et al., 2015

### 1.3. KIT a PDGFRA nemutované GIST

Z terapeuticko-indikačního hlediska byl donedávna nejvýznamnější a nejčastěji sledován mutační stav genů *KIT* a *PDGFRA*. Molekulární identifikace přítomnosti a lokalizace primárních mutací, výskyt sekundárních mutací při progresi onemocnění (s tím spojená primární a/nebo získaná rezistence na cílenou terapii IM), byly dlouhodobě důležitým cílem molekulárně-genetické analýzy GIST. V posledních letech se velice zajímavou a

z terapeutického hlediska otevřenou kapitolou stávají GIST, u kterých nebyly zjištěny mutace v genech *KIT/PDGFRA*.

GIST bez přítomnosti mutací v genech *KIT/PDGFRA* tvoří u dospělých přibližně 10 – 15 % případů (Antonescu, 2011; Astolfi et al., 2020; Nannini et al., 2014; Pitsava et al., 2021; Wang et al., 2015). U mnohem vzácnějších pediatrických GIST je převážná většina nádorů *KIT/PDGFRA* nemutovaných (85 %) (Boikos et al., 2016).

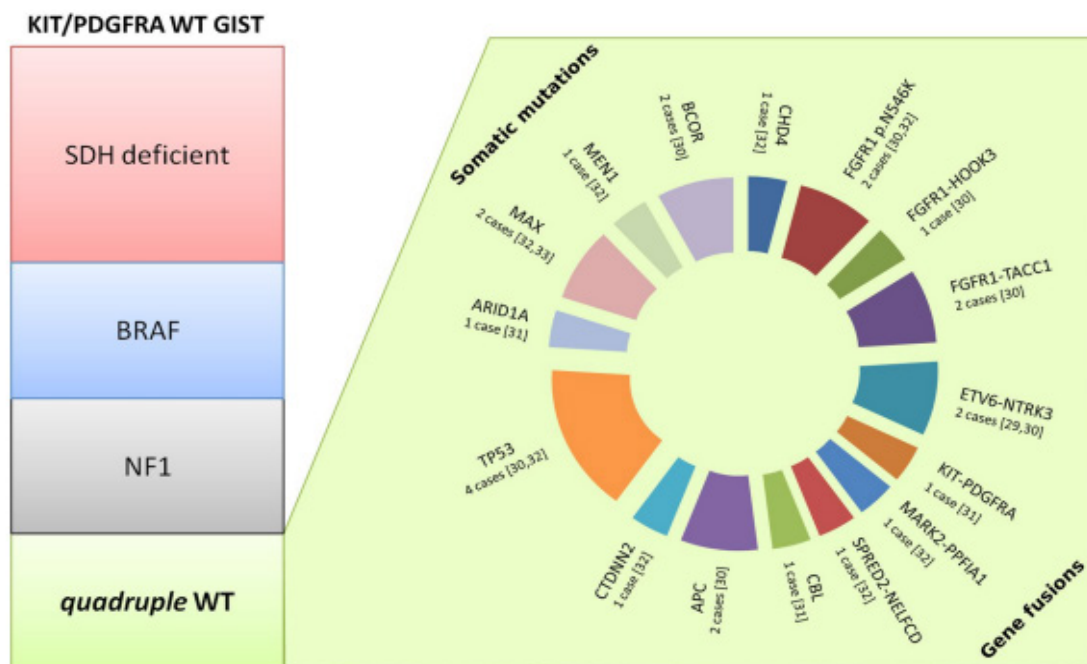
Dospělí pacienti s GIST s nemutovanými geny *KIT/PDGFRA* reprezentují heterogenní skupinu bez konkrétního vztahu k anatomické lokalizaci nebo ke klinické prezentaci. Pediatrické GIST reprezentují odlišnou klinicko-patologickou a rovněž molekulární skupinu nádorů s charakteristickou lokalizací v žaludku, multifokálním výskytem, rozvojem převážně u dívek a s nemutovanými geny *KIT/PDGFRA* (Antonescu, 2011).

Historicky se GIST bez přítomnosti mutací v genech *KIT/PDGFRA* označují jako wild-type (WT, *KIT*<sup>WT</sup>/*PDGFRA*<sup>WT</sup>, nebo *KIT/PDGFRA* nemutované) (Astolfi et al., 2020; Nannini et al., 2014). Obecně jsou pacienti s *KIT/PDGFRA* nemutovanými geny méně senzitivní k terapii inhibitory TK (Antonescu, 2011). Molekulární biologie skupiny *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST je různorodá a svědčí o přítomnosti heterogenních podskupin s rozdílnými molekulárními odchylkami (Nannini et al., 2014; Nishida et al., 2016a).

20 – 40 % pacientů s nemutovanými geny *KIT/PDGFRA* vykazuje ztrátu funkce některé z podjednotek SDH komplexu. Označované jsou následně jako GIST s defektem SDH komplexu (Astolfi et al., 2020; Wang et al., 2015). 15 % GIST ze skupiny *KIT/PDGFRA* nemutovaných vykazuje přítomnost mutací v genech *BRAF/RAS* nebo v genu *NF1* (Li, Raut, 2019). Označení této skupiny jako RAS-P mutované GIST je odkazem na RAS-signální dráhu (RAS-pathway).

Zbývající skupina GIST je označovaná jako *KIT/PDGFRA/SDH/RAS-P* nemutované, nebo taky „quadruple“ WT (qWT), tj. „čtyřnásobně“ nemutované GIST. Tato specifická skupina GIST se vyznačuje transkripčním profilem, který se výrazně liší od jiných typů GIST. Konkrétně, qWT vykazují nadměrnou expresi NTRK2 a rodiny ETS-transkripčních faktorů (ERG), které mohou hrát roli v patogeneze této skupiny GIST. Popsány byly přestavby genu *NTRK*, konkrétně *NTRK3::ETV6*, nebo *FRGR1* (*FGFR1::HOOK3* a *FGFR1::TACCI*) (Brenca et al., 2016; Shi et al., 2016). Mimoto byly u této skupiny GIST identifikovány somatické mutace v genech *TP53*, *MEN1*, *MAX*, *CHD4*, *FGRI*, *CTDNN2*,

*CBL*, *ARID1A*, *BCOR* a *APC* (Brčić et al., 2021). Pro úplnost a zpřehlednění problematiky heterogenity *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST slouží Obr. 6.



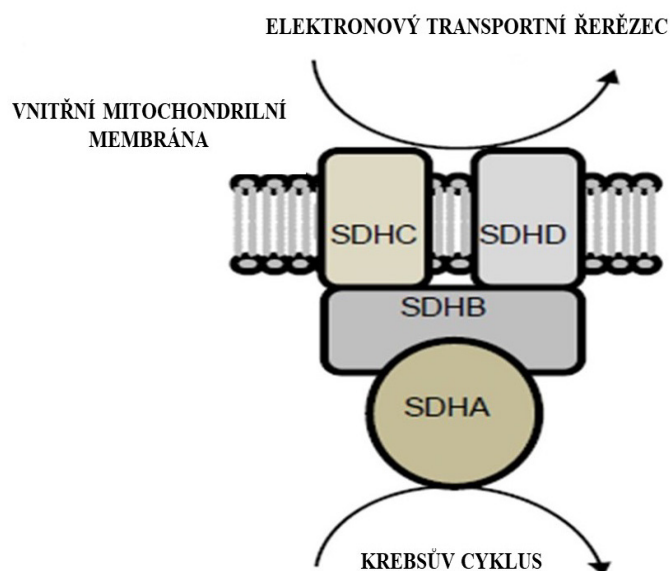
**Obr. 6** Přehled *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST. Nejpočetnější skupinu *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST tvoří podskupina GIST s defektem v některé z podjednotek SDH komplexu. V dalších podskupinách se setkáváme s přítomností mutací v genech pro intracelulární molekuly z MAPK signální dráhy (mutace v genech *BRAF*, *NF1*, nebo ze skupiny *RAS*). V části *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST, bez alterací v předchozích skupinách, označovaných rovněž jako „quaduple“ (čtyřnásobně) nemutované GIST byly identifikované mutace případně fúze v široké škále genů.

Upraveno dle Nannini et al., 2017

Přibližně jedna třetina až polovina všech *KIT/PDGFR*A nemutovaných sporadických GIST je spojena s poruchou v některé z podjednotek sukcinátdehydrogenázového komplexu (SDH) (Mou et al., 2018, Wang et al., 2015). GIST s defektem SDH zahrnují většinu pediatrických GIST (mladší než <18 let) a malou část GIST diagnostikovaných u mladých dospělých (rozpětí věku 18 – 30) (Gill et al., 2011). GIST, které jsou součástí syndromů CT (Carneyho triada) nebo CSS (Carney-Stratakis syndrom) reprezentují specifickou skupinu GIST s defektem SDH komplexu (Carney et al., 1977; Carney 1999; Carney, Stratakis, 2002; Stratakis, Carney, 2009).

SDH komplex (SDH, succinate-coenzyme Q reductase, nebo mitochondrial complex II) tvoří 4 proteinové podjednotky: SDHA, SDHB, SDHC a SDHD, které jsou kódovány příslušnými geny, a dva faktory (SDHAF1 a SDHAF2) (Ravegnini, Ricci, 2019; Wang et al., 2015). Podjednotky SDHA a SDHB představují hlavní katalytickou doménu SDH.

Podjednotky SDHC a SDHD utvářejí komponentu pro ukotvení a zachycení celého komplexu na vnitřní membránu mitochondrie (Wu et al., 2019). SDH komplex se účastní na procesech Krebsova cyklu prostřednictvím své podjednotky A (SDHA), která zodpovídá za proměnu sukcinátu na fumarát (Niinuma et al., 2018).



**Obr. 7 SDH komplex.** SDH komplex je součástí Citrátového cyklu (Krebsův cyklus, cyklus trikarboxylových kyselin) a současně se účastní přenosu elektronů v rámci dýchacího řetězce v mitochondriích.

Upraveno dle Niinuma et al., 2018

Přítomnost inaktivačních mutací, nebo poškození kterékoliv z podjednotek SDH komplexu (SDHA, SDHB, SDHC, nebo SDHD) způsobí ztrátu proteinové exprese podjednotky SDHB (Beadling et al., 2013; Ibrahim, Chopra, 2020; Miettinen et al., 2011). Všechny mutace v podjednotkách SDH komplexu jsou tedy spolehlivě detekovány ztrátou exprese SDHB podjednotky (Gill et al, 2011; Miettinen et al, 2011). Zatímco ztráta proteinové exprese SDHB (IHC SDHB-) může být ovlivněna defektem v kterékoliv z podjednotek SDH komplexu, proteinová exprese podjednotky SDHA (pozitivita/negativita) je ovlivněna změnou pouze v genu *SDHA* (s přítomností inaktivačních mutací v genu *SDHA*) (Schaefer, Fletcher, 2018). Mutace v genu *SDHA* se vyskytují u přibližně 30 % SDHB negativních GIST (Mou et al., 2018; Pitsava et al., 2021). Alterace v SDH komplexu, které nejsou ovlivněny přítomností mutací v genech *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, nebo *SDHD*, mohou mít utlumenou aktivitu epigenetickým mechanismem. Jedním z těchto mechanismů je hypermetylace promotorů genů SDH komplexu (Ibrahim, Chopra, 2020; Pantaleo et al., 2014). U Carneyho triády byla prokázána hypermetylace promotoru genu *SDHC*, která je

považována za epigenetický mechanismus vzniku nádoru u tohoto syndromu (Gill, 2018; Pantaleo et al., 2015; Settas et al., 2018).

Mutace v genech *SDH* komplexu kromě nádorové transformace vedou rovněž k poruše funkce mitochondriálního komplexu II (v řetězci transportu elektronů), a následně k narušení oxidativní fosforylace. Ovlivnění fyziologických mechanismů oxidativní fosforylace způsobí hromadění sukcinátu (je znemožněno jeho odbourávání se na fumarát) v rámci Krebsova cyklu. Nahromaděný sukcinát inhibuje degradaci HIF1 $\alpha$  (Hypoxia inducible factor alpha) a tak vzniká efekt pseudohypoxie i za normálních podmínek oxidace tkání (Selak et al., 2005). Nadměrná akumulace HIF1 $\alpha$  spouští v jádrech buněk u *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST transkripci růstových faktorů IGF1R a VEGFR (Tornillo, 2014; Wang et al., 2015). Zvýšená exprese IGF1R je tak přítomná u všech GIST s defektem SDH komplexu (na rozdíl od *KIT/PDGFR*A mutovaných GIST) (Chou et al., 2012; Mou et al., 2018). Tato skupina GIST je v důsledku vysoké hladiny IGF1R méně citlivá na terapii IM. Na druhou stranu, nadměrná aktivace růstových faktorů IGF1R a VEGFR je slibným terapeutickým cílem skupiny GIST s defektem SDH komplexu (Tarn et al., 2008; Wang et al., 2015).

Skupina *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST bez defektu SDH komplexu zahrnuje GIST s mutacemi v genech *BRAF*, *RAS* a *NFI*. GIST s mutacemi v uvedených genech *BRAF/RAS* nebo *NFI* můžeme definovat jako „RAS-signální dráhy“ mutované GIST (Ravegnini, Ricci, 2019).

S mutacemi v genu *BRAF* se setkáváme u přibližně 4 – 13 % *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST (Mathias-Machado et al. 2022). Protein BRAF je intracelulární kinázou, která hraje důležitou roli v signální dráze RAS-RAF-MEK-ERK (Davies et al., 2002). Pacienti s mutacemi v genu *BRAF* jsou molekulární skupinou GIST, která profituje z terapie selektivními inhibitory BRAF (Huang et al., 2013). *BRAF* mutované nádory jsou totiž rezistentní na inhibici prostřednictvím IM. Substituce p.V600E byla rovněž identifikována u pacienta se získanou rezistencí na terapii IM a absencí definovaného mechanismu jejího vzniku (Agaram et al., 2008b). Sekundární mutace v genu *BRAF* tak mohou představovat alternativní mechanismus rezistence na terapii IM (Antonescu, 2011).

Mutace v genu *KRAS* (eventuálně v genech *NRAS*, *HRAS*) se u pacientů s GIST vyskytují ve výrazně nižší míře než je tomu ve skupině GIST s mutacemi v genu *BRAF*. Frekvence mutací se pohybuje v rozpětí přibližně 1 – 11 % *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST.

Celkově jsou ovšem mutace v genu *KRAS* jedním z nejčastěji (30 %) mutovaných onkogenů v nádorech. Prevalence výskytu mutací v genu *KRAS* se ovšem v rámci jednotlivých typů nádorů výrazně liší (Wang et al., 2022).

Další podskupinou *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST s alteracemi v RAS signální dráze jsou pacienti, u kterých se GIST vyvine v souvislosti s onemocněním neurofibromatózou typu 1 (NF1). Podle očekávání mají buď somatické mutace v genu *NF1* nebo ztrátu nemutované NF1 alely. Výsledkem obou těchto molekulárních změn je aktivace signálních drah prostřednictvím MAP kinázové dráhy (Antonescu, 2011; Corless, 2014). GIST asociované s NF1 se typicky vyskytují v tenkém střevě a jsou často nízkého rizika s klinicky indolentním průběhem (Caram, Schuetze, 2011; Daum et al., 2010; Nishida et al., 2016b; Zhao, Yue, 2012). Ačkoliv pacienti s metastatickým GIST, které jsou součástí syndromu NF1 typicky exprimují povrchovou molekulu CD117, z terapeutického hlediska se u nich setkáváme s horší odpovědí na terapii IM (Mathias-Machado et al. 2022; Ylä-Outinen et al., 2019). Pro přehled uvedené problematiky je v Tab. 6 uveden přehled molekulárních skupin *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST.

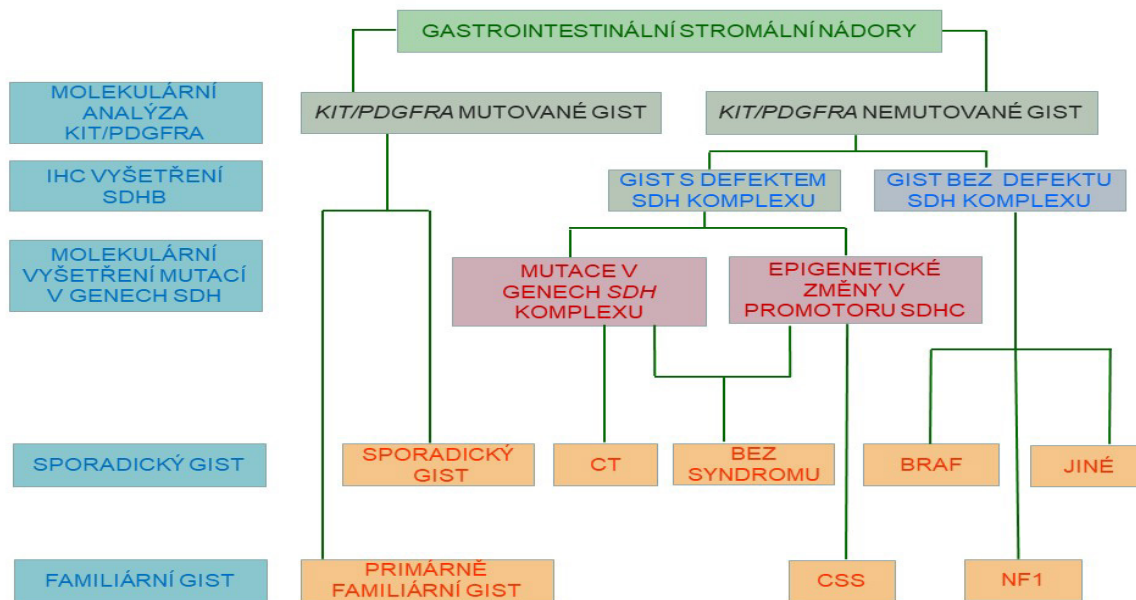
**Tab. 6 Molekulární skupiny *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST**

MOLEKULÁRNÍ SKUPINY	KLASIFIKACE	MOLEKULÁRNÍ ZMĚNA
GIST s defektem SDH komplexu	sporadický GIST	somatické mutace v genech <i>SDH</i>
	Carneyho triáda	hypermetylace promotoru genu <i>SDHC</i>
	Carney-Strakatis syndrom	inaktivační mutace v genech <i>SDH</i> komplexu
GIST bez defektu SDH komplexu	v souvislosti s NF1	inaktivační mutace v genu <i>NF1</i>
	BRAF mutované	mutace V600E v genu <i>BRAF</i>
	KRAS, NRAS mutované	mutace v genech <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i>
	PIK3CA mutované	mutace v genu <i>PIK3CA</i>
	jiné	fúze <i>ETV6::NTRK3</i> , mutace v genech <i>MAX</i> , <i>CBL</i> , <i>CHD3</i> , <i>TP53</i> , <i>APC</i> , <i>MEN1</i> , <i>FGFR1</i> , <i>ARID1A</i> , <i>BCOR</i>
quadropole nemutované GIST	bez mutací v genech <i>KIT</i> , <i>PDGFR</i> A, <i>SDH</i> a <i>RAS</i>	

Upraveno dle Liu et al. 2020

Algoritmus molekulární diagnostiky pacientů s GIST zahrnuje mutační analýzu genů *KIT* a *PDGFR*A. Následné IHC vyšetření exprese SDHB podjednotky umožňuje ve skupině *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST rozlišit 2 podskupiny GIST. GIST s defektem SDH komplexu, eventuálně bez defektu SDH komplexu. Vyšetřením přítomnosti mutací,

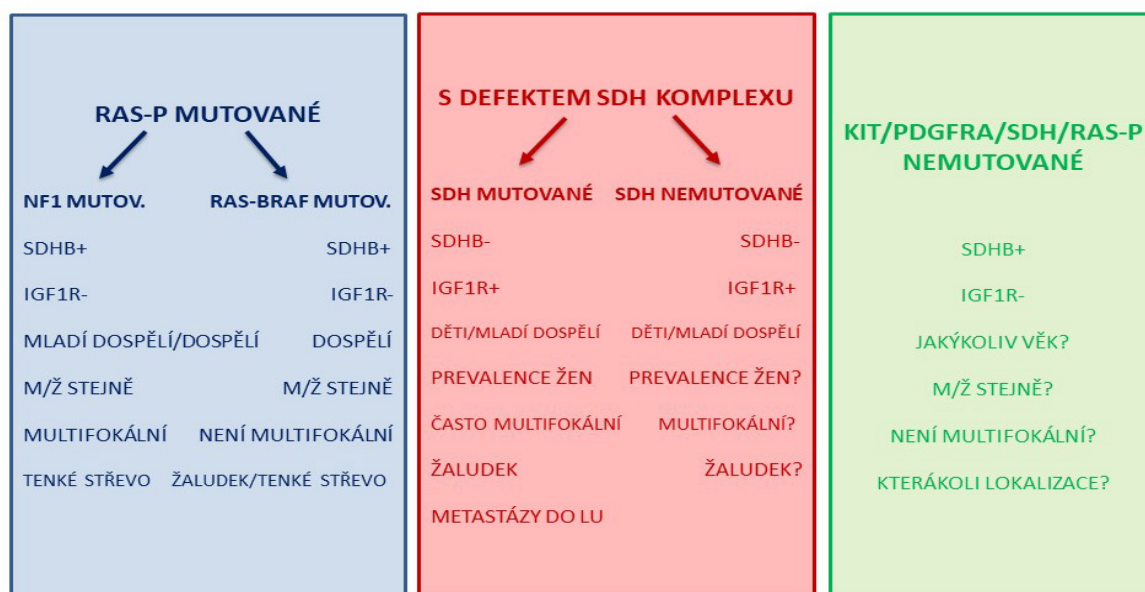
případně epigenetických změn v podjednotkách SDH komplexu definujeme další podskupiny GIST, nebo syndromy. Přehledné schéma algoritmu vyšetření a klasifikace GIST poskytuje Obr. 8.



**Obr. 8** Schéma vyšetření a klasifikace GIST. CT – Carneyho triáda, CSS – Carney Stratakis syndrom.

Volně upraveno dle Brčić et al., 2021

Jednotlivé molekulární skupiny GIST s nemutovanými geny *KIT* nebo *PDGFRA*, jsou definovány svými specifickými klinicko-patologickými charakteristikami. Názorný přehled jednotlivých histopatologických a klinických znaků v daných podskupinách *KIT/PDGFR A* nemutovaných GIST poskytuje Obr. 9.





### **Obr. 9 Klinicko-patologické znaky *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST.**

Označení SDHB+/- označuje IHC pozitivitu nebo negativitu. Rovněž je tomu tak u IHC IGF1R+/-.

Charakteristiky označené otazníkem určují znaky, u kterých aktuálně chybí dostatečné množství informací pro přesnou definici.

Upraveno dle Pantaleo et al., 2015

Recentně se skupina *KIT/PDGFRA/SDH/RAS* nemutovaných GIST stává velice zajímavou z molekulárního, klinického i terapeutického hlediska. Navíc se jedná důležitou skupinou z pohledu výzkumného zaměření. Prostřednictvím mutační analýzy a technik NGS byly detekované již výše uvedené mutace a fúzní transkripty (Obr. 6). Přehled alterací u *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST je ovšem značně rozsáhlý a zahrnuje navíc geny *FGFR1*, *ARID1A*, *ARID1B*, *SUFU*, *ATR*, *LTK*, *PARK2*, a *ZNF217* (Boikos et al., 2016; Brčić et al., 2021; Tang et al., 2016). Celkově s fúzními transkripty *NTRK3::ETV6*, *FGFR1::HOOK3*, *FGFR1::TACCI* (Brenca et al., 2016), somatickými mutacemi v genech *TP53*, *CHD4*, *CTDNN2*, *CBL*, *BCOR*, *NTRK2*, *COL22A1*, *APC* (Pantaleo et al., 2017; Shi et al., 2016), eventuálně v genech *MEN1* a *MAX* (Pantaleo et al., 2017) můžeme definovat více než 20 molekulárně-genetických podtypů GIST (Mou et al., 2018). Význam a role těchto genů v patogeneze vzniku GIST musí být ovšem ještě vymezeny. Nicméně, u některých *KIT/PDGFRA/SDH/RAS* nemutovaných GIST mutace, nebo epigeneticky podmíněné změny ještě detekovány nebyly.

V literatuře se setkáváme s návrhem na vhodnější označení skupiny tzv. „nemutovaných“ GIST, které jsou tvořené přibližně 20 podtypy jako „neklasifikované“ GIST. Historicky používaný termín „nemutované“ GIST v souvislosti s poznatky o přítomnosti mutací ve všech výše uvedených genech neodpovídá skutečnosti, že se jedná o nemutované GIST. Přesnějším a vhodnějším termínem pro uvedenou skupinu by bylo označení „neklasifikovaný“ GIST.

Kromě identifikace těchto skupin GIST má navíc zjištění příslušných molekulárních alterací v jednotlivých skupinách „neklasifikovaných“ GIST výrazný dopad na prognózu pacienta. Důležitým aspektem identifikace alterací je možnost poskytnutí potencionálního terapeutického cíle v rámci personalizované a precizní terapie (Alkhuziem et al., 2017). Přehled možných terapeutických cílů u jednotlivých molekulárních alterací shrnuje Tab. 7. Tabulka poskytuje jednak souhrn terapeutik používaných u GIST a mimo terapii GIST a jednak podle současných znalostí dostupných klinických studií zahrnujících GIST.

**Tab. 7 Přehled terapeutických cílů**

GEN	SIGNÁLNÍ DRÁHA	TERAPEUTIKA		KLIN. STUDIE ZAHRNUJÍCE GIST
		U GIST	POUŽÍVANÁ MIMO TERAPII GIST	
<i>ARID1A</i>	remodelace chromatinu/ PI3K/AKT/mTOR		inhibitory mTOR	inhibitory PI3K
<i>ARID1B</i>	remodelace chromatinu/ PI3K/AKT/mTOR		inhibitory mTOR	inhibitory PI3K
<i>ATR</i>	oprava DNA		chemoterapeutika inhibitory PARP radioterapie	
<i>BRAF</i>	MAPK	RE	inhibitory BRAF inhibitory MEK	inhibitory BRAF inhibitory MEK
<i>ETV6::NTRK3</i>	MAPK PI3K/AKT/mTOR JAK/STAT		inhibitor TKI	inhibitory TRK
<i>FGFR1</i>	FGF	RE	inhibitory FGFR	inhibitory FGFR
<i>HRAS</i>	MAPK		inhibitory MEK	
<i>KIT</i>	MAPK PI3K/AKT/mTOR JAK/STAT	IM (I. linie) SU (II. linie) RE (III. linie)	inhibitory TKI	inhibitory TKI

Legenda: IM – imatinib mesylát, SU – sunitinib malát, RE – regorefenib,

Upraveno dle Alkhuziem et al., 2017

#### 1.4. Prognostický význam markerů proliferace a senescence

GIST vykazuje širokou škálu rozdílného biologického chování v rozsahu od benigního po maligní. Předpovědět maligní potenciál onemocnění pouze na základě klinického projevu nádoru a patologických nálezů kromě metastáz je obtížné. Jeden faktor, nebo dokonce kombinace dvou faktorů pro spolehlivé předpovídání maligního potenciálu nedostačuje. Při odhadu biologického chování nádoru se v rámci patologického zhodnocení využívá několik parametrů. Mezi dva nejdůležitější prognostické faktory patří velikost nádoru a mikroskopickým vyšetřením stanovená mitotická aktivita (Bertolini et al., 2008; Miettinen, Lasota, 2001). Nádory o velikosti menší než 5 cm jsou obvykle benigní, zatímco nádory větší než 5 cm se považují za rizikové nebo za maligní. Nicméně i nádory menší než 5 cm mohou metastazovat (Koon et al., 2004). Mitotická aktivita pod 5 mitóz/5 mm<sup>2</sup> je běžně považována jako limit pro předpoklad benigního chování nádoru. Odhad má však svá rizika, protože malé procento mitoticky neaktivních nádorů později metastazuje. Vysoký mitotický index naopak předurčuje maligní chování nádoru, nízký mitotický index nezaručuje příznivou prognózu (Miettinen, Lasota, 2001). V průběhu let byly několikrát

navržené a revidované kritéria pro kategorizaci a hodnocení biologického rizika GIST (Fletcher et al., 2002; Joensuu et al., 2015; Miettinen, Lasota, 2006; WHO klasifikace nádorů měkkých tkání a kostí, 5. vydání – WHO, 2020). Rozdíly mezi jednotlivými klasifikacemi v souhrnu prezentují Tab. 8. a Tab. 9.

**Tab. 8 Přehled klasifikací prognostického rizika u GIST**

MALIGNÍ POTENCIÁL	NIH KLASIFIKACE (2002)	AFIP KLASIFIKACE (2006)	SKUPINA AFIP	MODIFIKOVANÁ NIH KLASIFIKACE (2008)
VELMI NÍZKÝ	< 2 cm a < 5 MI	žaludek, <2-5 cm a ≤ 5 MI	SKUPINA 1	jakýkoliv, <2 cm a ≤ 5 MI
NÍZKÝ	2-5 cm a < 5 MI	žaludek, >5-10 cm a ≤ 5 MI mimo žaludek >2-5 cm a ≤ 5 MI	SKUPINA 2	jakýkoliv, >2-5 cm a ≤ 5 MI
STŘEDNÍ	< 5 cm a 6-10 MI	žaludek, >10 cm a ≤ 5 MI nebo >2-5 cm a > 5 MI mimo žaludek >5-10 cm a ≤ 5 MI	SKUPINA 3a	žaludek, ≤ 5 cm a >6-10 MI nebo >5-10 cm a ≤ 5 MI
VYSOKÝ	5-10 cm a < 5 MI nebo >5 cm a >5 MI nebo >10 cm nebo >10 MI	mimo žaludek >10 cm a ≤ 5 MI nebo <2 cm a >5 MI nebo >2-5 cm a >5 MI jakýkoliv >5-10 cm a >5 MI nebo >10 cm >5 MI	SKUPINA 3b, 4, 5, 6a, 6b	mimo žaludek <5 cm a >5 MI nebo >5-10 cm a ≤ 5 MI jakýkoliv >5 cm a >5 MI nebo >10 cm nebo >10 MI nebo ruptura nádoru

Legenda: NIH – National Institutes of Health, AFIP – Armed Forces Institute of Pathology, MI – mitotický index, cm - centimetr

Volně upraveno dle Joensuu et al., 2015 a Zhang, Liu, 2020

**Tab. 9 Prognostické znaky u GIST dle WHO 2020**

KATEGORIE	VELIKOST cm	MITOTICKÝ INDEX mitózy/5 mm <sup>2</sup>	ŽALUDEK	TENKÉ STŘEVO
1	≤ 2	≤ 5	0	0
2	> 2 až ≤ 5	≤ 5	1.9 %	4.3 %
3a	> 5 až ≤ 10	≤ 5	3.6 %	24 %
3b	>10	≤ 5	12 %	52 %
4	≤ 2	> 5	0	50 %
5	> 2 až ≤ 5	> 5	16 %	73 %
6a	> 5 až ≤ 10	> 5	55 %	85 %
6b	>10	> 5	86 %	90 %

Legenda: čísly s procenty je označena početnost progresu onemocnění (metastázy nebo úmrtí) u jednotlivých parametrů v daných lokalizacích zjištěných při dlouhodobém sledování.

Upraveno dle Miettinen, Lasota, 2006 a WHO 2020

Recentně rovněž pozorujeme snahu o rozšíření kritérií a klasifikace GIST o zahrnutí stanovení specifického mutačního genotypu nádoru (Brinch et al., 2022; Hølmekbakk, 2021; Rutkowski et al., 2021). Navzdory propracovanému systému prediktivního hodnocení GIST se setkáváme s případy, které svým chováním neposkytují možnost predikce biologického chování. Rozhodující je určení biologického chování a možné predikce rizika zejména u případů hodnocených ve skupině nízkého a velmi nízkého rizika. Nevyhnutnou se tedy stává cesta ke standardizaci jednotlivých faktorů proliferace nádoru, případně procesů maligní progresu. Jednou z cest je objektivizace biologického rizika GIST s využitím molekulárně-genetických metod.

Vyšetření proteinové exprese proliferčních markerů v histopatologickém vyšetření tak mohou doplnit vysoce citlivé a reprodukovatelné metody kvantitativní RT PCR, které poskytnou objektivní hodnocení predikce biologických vlastností GIST. Kvantitativní metody, založené na sledování expresních hladin mRNA vybraných proliferčních markerů v reálném čase, umožňují zjistit jejich přesné počty kopií nebo koncentrace.

Stanovili jsme si za cíl zjistit mRNA expresní hladiny proliferčních markerů Ki-67, TPX2, TOP2A a telomerázové podjednotky hTERT ve skupině GIST v porovnání s onemocněními s předpokládanou nízkou, respektive vysokou proliferční aktivitou (leiomyosarkom vs. Burkittův lymfom) a ve skupinách benigních a maligních GIST s ohledem na určení rizika agresivního chování se nádoru.

#### ***1.4.1. Proliferační marker Ki-67***

Protein Ki-67 je široce využívaným markerem pro zjišťování proliferční aktivity nádorových buněk. Protein Ki-67 plní důležitou roli jednak v průběhu mitotického dělení buněk, ale rovněž v interfázi buněčného cyklu. V průběhu buněčného cyklu se jeho distribuce v buňce dramaticky mění. Lokalizace Ki-67 koreluje s jeho rozdílnou funkcí v těchto fázích. Při mitotickém dělení je protein Ki-67 nezbytný pro formaci perichromozomální vrstvy (PCL). Jedná se o ribonukleoproteinovou vrstvu, která obaluje kondenzované chromozomy. Na druhé straně, je protein Ki-67 v průběhu interfáze nezbytný pro normální distribuci heterochromatinu (Sun, Kaufman, 2018).

Expresí proteinu Ki-67 je úzce spojena s proliferací nádorových buněk (Li et al. 2022). Slouží pro zjišťování odhadu biologického chování nádorů a rovněž predikce subpopulace pacientů, kteří budou odpovídat na terapeutický zásah. Po klinické stránce, exprese Ki-67 koreluje s metastatickým postižením. Navíc exprese Ki-67 je významně vyšší u maligních nádorů s nízkou diferencovanými nádorovými buňkami (Li et al., 2014).

Studie zabývající se expresí proliferačního markeru Ki-67 u pacientů s GIST uvádějí jeho nezastupitelnou roli v predikci nepříznivé prognózy tohoto onemocnění, horší odpovědi na cílenou terapii IM a rovněž zvýšeného rizika rekurence nádoru (Kadado et al., 2022; Pyo et al., 2016; Zhao et al., 2014).

#### **1.4.2. Proliferační marker TPX2**

Protein TPX2 (Targeting protein for *Xenopus* kinesin-like protein 2) je dalším proteinem, který je úzce spojený s procesy buněčného cyklu (Heidebrecht et al., 1997). TPX2 patří do rodiny proteinů spojených s tvorbou mikrotubulů (Wang et al., 2020). Všichni členové této rodiny obsahují konzervovaný TPX2 motiv, kterým interagují s mikrotubuly (Zou et al., 2018a). Protein TPX2 plní zásadní roli při mitotickém dělení buňky a sestavování dělicího vřeténka. Dělicí vřeténko je nepostradatelné pro normální průběh dělení (Wittmann et al., 2000). Zvýšená exprese TPX2 byla pozorována u rozdílných typů nádorů, indikovala růst nádoru a tvorbu metastáz a korelovala s nepříznivou prognózou onemocnění (Wei et al., 2013; Huang et al., 2014; Liu et al., 2018; Brizova et al., 2010).

Enzym Aurora kináza A (AURKA), kterého aktivita je závislá na fosforylaci a na přítomnosti proteinu TPX2 (Bayliss et al., 2003), byl identifikován jako nezávislý nepříznivý prognostický znak pro riziko progresu pokročilého GIST a rekurence lokalizovaného nádoru u pacientů s GIST (Cheng et al., 2021; Yeh et al., 2014). Expresní hladiny TPX2 byly rovněž hodnoceny jako ukazovatel prognózy GIST ve studii autorů Chen et al. (2018a). Navíc podle uvedené studie může exprese TPX2, společně s dalšími geny, sloužit pro predikci adjuvantní terapie.

#### **1.4.3. Proliferační marker TOP2A**

Gen *TOP2A* kóduje enzym DNA topoizomerázu, která kontroluje a upravuje topologický stav dvoušroubovice DNA v průběhu transkripce. Protein TOP2A je v maximálních hladinách exprimován ve fázích G2 a M buněčného cyklu (Nielsen et al., 2020), a je nutný pro replikaci DNA a segregaci chromozomů v průběhu mitotického dělení buňky (Earnshaw et al., 1985). Podle několika studií souvisí vysoké hladiny TOP2A s horší

prognózou onemocnění v řadě maligních nádorů (An et al., 2018; Chen et al., 2015; Pei et al., 2018; Zhao et al., 2020; Zhou et al., 2018). Podle několika studií byly vyšší hladiny exprese TOP2A významně spojeny se skupinou GIST vyššího rizika (Bertucci et al., 2012; Nowak et al., 2022).

#### ***1.4.4. Marker senescence - hTERT***

Telomeráza reguluje *de novo* syntézu telomér, konců eukaryotických chromozomů, čímž je chrání před ztrátou, fúzí a degradací. Teloméry se skládají z tisíců kopií jednoduchých hexanukleotidových opakování TTAGGG. S každým buněčným dělením dochází ke zkracování konců chromozomů, až po dosažení kritické délky, kdy dochází k apoptóze buňky.

Mnoho typů nádorových buněk udržuje integritu svých telomér reaktivací enzymu telomerázy. Obnovení aktivity enzymu telomerázy vede k prodlužování konců chromozomů, což ovlivňuje životnost buňky. Jedná se tedy o jeden z mechanismů, který zaručuje přežití zejména silně proliferující tkáň, jako je tomu u maligních nádorů (Günther et al., 2000). Malá část nádorových buněk získává výhodu přežívání prostřednictvím alternativního mechanismu prodlužování telomér. Mezi mechanismy udržování délky telomér patří genetické mechanismy, jakými jsou mutace v promotoru, amplifikace, zárodečné genetické variace, přestavby, nebo epigenetické mechanismy v podobě metylace DNA, případně nekodujících RNA (Gaspar et al., 2018).

Vyšetření telomerázové aktivity u GIST jako první zjišťovali Sakurai et al. (1998). Autoři zjistili spojení mezi telomerázovou aktivitou a stupněm diference těchto nádorů. Všechny GIST, které vykazovaly aktivitu enzymu telomerázy, byli nádory s vysokým stupněm rizika, velkých rozměrů a špatnou prognózou. Přítomnosti mutací v promotoru genu *TERT* u pacientů s GIST se zabývala práce autorů Campanella et al. (2015). Autoři v uvedené studii zjistili přítomnost mutací v promotoru genu *TERT* u GIST s nižší frekvencí (4 %), na rozdíl od nádorů močového měchýře (85 %), gliomů (50 %), nádorů štítné žlázy (15 %), nebo melanomů (22 – 85 %).

## 2. CÍLE PRÁCE

### 2.1. Primární a sekundární mutace v genech *KIT* a *PDGFRA*

V současné době se setkáváme s velkým rozmachem cílené léčby pomocí nízkomolekulárních inhibitorů, protilátek proti specifickým receptorům nebo prostřednictvím check-point inhibitorů (inhibitory molekul CTLA-4, PD-1, PD-L1). Novotvary GIST jsou nejpočetnější skupinou mezenchymálních nádorů, které jsou definovány rezistencí na radioterapii a chemoterapii. Pochopení patogeneze onemocnění GIST prostřednictvím aktivačních mutací v genech pro receptorové kinázy *KIT* a *PDGFRA* vedlo k použití cílené biologické terapie pro pacienty s metastatickým postižením, nebo s neoperabilními, případně rekurentními nádory. GIST jsou skupinou solitárních nádorů, u kterých byla poprvé použita cílená terapie pomocí inhibitorů RTK. Terapeutická odpověď pacientů na tuto léčbu je závislá na lokalizaci primárních mutací. Molekulární analýza mutačního stavu genů *KIT* a *PDGFRA* je součástí terapeuticko-indikační patologie. Predikuje citlivost nádoru na cílenou léčbu. Sekundární mutace jsou nejčastějším mechanismem získané rezistence. Jejich detekce je klíčová. Pro splnění tohoto účelu jsme si vytyčili následující cíle:

- zavést a optimalizovat molekulární vyšetření mutačního stavu genů *KIT* a *PDGFRA* u pacientů s GIST
- analyzovat spektrum a lokalizaci primárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA*
- zavést a optimalizovat metodu pro efektivní skrínig mutací, konkrétně ověřit metodu analýzy křivek tání s vysokým rozlišením (HRM - High Resolution Melting Curve Analysis)
- potvrdit mechanismus získané rezistence pacientů na terapii inhibitory RTK a detekovat sekundární mutace
- v rámci mutační analýzy ověřit platnost teorie, že nádory u jednoho jedince mohou vykazovat významnou intranádorovou a internádorovou heterogenitu sekundárních mutací

### 2.2. Molekulární analýza *KIT* /*PDGFRA* nemutovaných GIST

Skupina GIST s nemutovanými geny *KIT* a *PDGFRA* je výrazně heterogenní. Na jejich vzniku se podílí několik genových alterací (mutace v genech *BRAF*, *RAS*, změny v genech *SDH* komplexu, fúzní geny *ETV6::NTRK3*, případně *FGFR1::TACCI*, apod.). Náš zájem o

tuto skupinu GIST byl podporován nižší terapeutickou odezvou pacientů na inhibitory RTK a rozdílným patomechanizmem vzniku navzdory stejné morfologii s mutovanými *KIT* nebo *PDGFRA*. Pro detekci nových změn je nutné zavést několik laboratorních metod. Rozšíření mutační analýzy u pacientů s GIST s nemutovanými geny *KIT* a *PDGFRA* umožňuje identifikovat nové terapeutické cíle (inhibitory BRAF, MEK, PI3K/mTOR, IGF1R). Naším dalším cílem bylo ve skupině GIST s nemutovanými geny *KIT* a *PDGFRA* provést molekulární vyšetření alterací v dalších genech pro signální molekuly, případně fúzních genů pro demonstraci heterogenity této skupiny GIST. Konkrétně bylo naším cílem:

- zavést a optimalizovat alelově specifickou PCR (AS PCR), která nám umožní detekovat bodovou záměnu v kodonu 600 genu *BRAF* (p.V600E)
- pokračovat ve spolupráci při detekci mutací a defektů v genech *SDH* komplexu ve skupině nemutovaných GIST, popřípadě změn v genu *NFI*
- ve skupině GIST s nemutovanými geny *KIT* a *PDGFRA* bez mutací v genu *BRAF*, bez defektů či mutací v genech *SDH* komplexu, nebo genu *NFI* zavést a optimalizovat metodiku a následně provést mutační analýzu v dalších vybraných genech, konkrétně v genech ze skupiny *RAS* (*KRAS* a *NRAS* – v exonech 2, 3 a 4), v genu *AKT1* (exon 2), *ATR* (exon 43)
- rozšíření analýzy *KIT* nebo *PDGFRA* nemutovaných GIST o detekci fúzních genů, konkrétně *ETV6::NTRK3* a *TACC1::FGFR1* ve vzorcích cDNA (komplementární DNA) pacientů, tj. zavedení a optimalizace metody kvalitativní RT PCR na detekci výše uvedených fúzních transkriptů.

### **2.3. Expresní analýza mRNA markerů proliferace a senescence**

Určení prognózy onemocnění GIST je založeno na zjištění mitotické aktivity nádoru, proliferačním indexu (detekovaného IHC vyšetřením proliferačního markeru Ki-67) a lokalizace nádoru. Morfologické určení mitotické aktivity a IHC vyšetření proliferačního indexu je objektivně zatíženo intrapersonální a interpersonální interpretací. Naším cílem je molekulárně zpřesnit prognózu onemocnění a predikovat biologické vlastnosti nádoru na základě vyšetření exprese vybraných proliferačních markerů zahrnutých do procesů buněčného cyklu a telomerázové aktivity podjednotky hTERT na hladinách mRNA těchto markerů, prostřednictvím velice senzitivní a reprodukovatelné metody absolutní



kvantifikace v reálném čase (RQ RT PCR). Při vyšetření exprese vybraných proliferačních markerů jsme se zaměřili na dobře popsané a známé procesy v jednotlivých etapách buněčného cyklu a specifickou expresí jednotlivých proliferačních markerů v těchto etapách. Naším dalším cílem byla:

- příprava plazmidů, ředění a definice standardní řady pro následní změření a sestrojení kalibračních křivek proliferačních markerů Ki-67, TPX2, TOP2A a telomerázové podjednotky hTERT
- změření a sestrojení kalibrační křivky provozního (tzv. „housekeeping“) genu *ABL*
- analýza expresních hladin vybraných proliferačních markerů a telomerázové podjednotky hTERT v skupině GIST, a ve skupinách nádorů s nízkou a vysokou proliferační aktivitou (leiomyosarkom vs. Burkittův lymfom), jako kontrolních skupin pro určení proliferační aktivity
- zjištění expresních hladin mRNA proliferačních markerů a telomerázové podjednotky v definovaných skupinách maligních vs. benigních GIST s úmyslem stanovení objektivního rizika maligního chování se nádoru
- analýza křivek přežití

### **3. MATERIÁL A METODY**

#### **3.1. Materiál**

Vzorky pro molekulární analýzu GIST jsme analyzovali v Laboratoři molekulární patologie, která je součástí Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnici v Motole v rámci jejich komplexní diagnostiky. Kromě těchto vzorků jsme dále molekulárně vyšetřovali externí vzorky (z Oddělení patologie Fakultní Thomayerově nemocnici v Krči, Patologie Mladá Boleslav, Patologie České Budějovice, z Masarykova onkologického ústavu v Brně, Patologie Liberec, Patologie Mělník, Patologie České Budějovice), které byly na náš ústav zaslány v rámci konzultačních biopsií.

Molekulární analýzu vzorků jsme ve velké většině provedli z primárních nádorů lokalizovaných v rámci trávicího traktu. V menší míře jsme vyšetřovali vzorky primárních nádorů uložených mimo trávicí trubici (extragastrointestinálně). Kromě primárních nádorů jsme molekulárně vyšetřili odebraný materiál po recidivě onemocnění a vzorky z metastáz.

Primární diagnóza GIST se opírala o komplexní morfologické vyšetření a následní imunofenotypové vyšetření pomocí imunohistochemie (IHC). Pro molekulární vyšetření jsme tedy použili vzorky od pacientů s morfologicky a IHC verifikovanou diagnózou GIST.

Molekulární vyšetření mutačního stavu jsme analyzovali jak na archivním materiálu Ústavu patologie a molekulární medicíny, tak na materiálu od nově diagnostikovaných pacientů.

Klinická data od pacientů na terapii v I., II., nebo III. linii cílené biologické léčby jsme získali ve spolupráci s primářem MUDr. Zdeňkem Linkem z Onkologické kliniky na 2. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnici v Motole. Molekulární analýza rozsáhlejších delecí pomocí metody MLPA a detekci delecí, případně substitucí v genech SDH komplexu (MLPA eventuálně NGS technologie) byla provedena ve spolupráci s MUDr. Alešem Víchou, PhD. Z Kliniky dětské hematologie a onkologie na 2. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnici v Motole.

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Izolace nukleových kyselin

Celkovou DNA a RNA ze vzorků zmrazené tkáně jsme izolovali trizolovou metodou. V prvním kroku jsme k 10 řezům zmrazené tkáně o šířce 5 µm přidali 1 ml TRI Reagentu™ (Invitrogen Ltd., Carlsbad, CA, USA). Následní postup jsme provedli podle doporučených instrukcí výrobce.

Nukleové kyseliny (DNA a RNA) pro molekulární analýzu u archivních vzorků fixovaných ve formolu a zalitých do parafinu (FFPE – formaline-fixed paraffine-embedded) jsme izolovali použitím komerčních kitů firmy Qiagen podle protokolu výrobce. Konkrétně jsme použili kit QIAamp DNA Tissue FFPE Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) pro izolaci celkové DNA a kit QIAamp RNA Tissue FFPE Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) pro izolaci celkové RNA. Podle velikosti vyšetřovaného vzorku tkáně 5 řezů o šířce 5 µm, nebo v případě jehlových biopsií (např. punkce jaterních metastáz) 10 řezů o šířce 5 µm.

### 3.2.2. Kontrola kvality nukleových kyselin

Kvalitu a integritu izolované DNA (u vzorků získaných z archivních vzorků FFPE se setkáváme s degradací NK) a její schopnost amplifikovat se v průběhu reakcí jsme zjišťovali jednak měřením koncentrace DNA pomocí spektrofotometrické metody na NanoDropu ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a jednak testováním amplifikace úseků definovaných exonů vybraných genů dle publikace van Dongen et al., (2003). Rovněž jsme kontrolovali schopnost amplifikace cDNA (komplementární DNA) pomocí amplifikace specifického produktu kontrolního genu *ABL*. Sekvence primerů pro amplifikaci PCR produktu genu *ABL* jsou uvedeny v Příloze 13.1.

Výsledky amplifikace specifického PCR produktu (jednak z kontroly kvality a integrity izolované DNA a jednak z kontroly schopnosti amplifikace cDNA) jsme vizualizovali na 1.5 % agarosovém gelu. Na přípravu 1.5 % agarosového gelu používáme tablety TopVision Agarose tablets (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 10x TBE pufr (Tris-borát EDTA) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Na vizualizaci všech specifických PCR produktů jsme použili GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., Fremont, CA, USA). Reakční podmínky (teploty, doba trvání a počty cyklů) kontroly amplifikace úseků DNA a cDNA jsou uvedeny v Tab.10.

**Tab. 10 Přehled reakčních podmínek kontroly integrity DNA a cDNA**

REAKČNÍ PODMÍNKY AMPLIFIKACE CTRL	KROK	TEPLOTA °C	DOBA TRVÁNÍ hod:min:sek	POČET CYKLŮ
PREDENATURACE	1	95	0:02:00	1
		95	0:00:45	
AMPLIFIKACE	2	60	0:00:45	35
		72	0:01:30	
DOSYNTETIZOVÁNÍ	3	72	0:10:00	1
CHLAZENÍ	4	15	∞	1

REAKČNÍ PODMÍNKY ABL	KROK	TEPLOTA °C	DOBA TRVÁNÍ hod:min:sek	POČET CYKLŮ
PREDENATURACE	1	95	0:03:00	1
		94	0:01:00	
AMPLIFIKACE	2	57	0:01:00	35
		72	0:01:00	
DOSYNTETIZOVÁNÍ	3	72	0:10:00	1
CHLAZENÍ	4	4	∞	1

### 3.2.3. Reverzní transkripce

Reverzní transkripci jsme použili na převedení jednovláknové RNA na dvouvláknovou komplementární DNA (cDNA). cDNA jsme syntetizovali použitím 10 µl izolované RNA v celkovém objemu reakce 20 µl. Reakční směs dále obsahovala 5x koncentrovaný reakční pufr pro reverzní transkriptázu, 0.1 M roztok dithiothreitolu (DTT), roztok náhodných hexamerních primerů (250 pM), směs deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP) (100mM) a 200 jednotek enzymu MMLV reverzní transkriptázy (Invitrogen Ltd., Carlsbad, CA, USA). Reakční směs jsme následně inkubovali při 37°C po dobu 1 hodiny (Kalfusova et al. 2016).

### 3.2.4. Detekce přítomnosti mutací - sekvenování dle Sanger

Mutační analýzu genů *KIT* a *PDGFRA* jsme uskutečnili amplifikací a sekvenováním exonů 9, 11, 13 a 17 genu *KIT* a exonů 12, 14 a 18 genu *PDGFRA*. Sekvence primerů jednotlivých exonů jsme použili z publikace autorů Daum et al. (2007). Mimoto jsme

vyšetření mutačního stavu genů *KIT* a *PDGFRA* u některých vzorků rozšířili o amplifikaci exonu 8 genu *KIT*, kde se mutace mohou rovněž v menší míře vyskytovat. Navíc jsme analýzu obohatili o amplifikaci exonů 14 a 18 genu *KIT*. V exonech 14 a 18 genu *KIT* se mohou vyskytovat sekundární mutace.

Kromě toho, molekulární analýzu GIST s nemutovanými geny *KIT* a *PDGFRA* jsme rozšířili o vyšetření přítomnosti mutací v exonech 11 a 15 genu *BRAF*, exonech 2, 3 a 4 genů *KRAS* a *NRAS*, exonech 9 a 20 genu *PIK3CA*, v exonu 2 genu *AKT1*, exonu 43 genu *ATR*, a fúzních transkriptů *FGFR1::TACCI* a *ETV6::NTRK*.

U všech výše uvedených genů jsme použili Master Mix PCR BIO HS Taq Mix Red (PCR Biosystems Ltd., London, UK) za reakčních podmínek uvedených v Tab. 11.

**Tab. 11 Přehled reakčních podmínek**

REAKČNÍ PODMÍNKY	KROK	TEPLOTA °C	DOBA TRVÁNÍ hod:min:sek	POČET CYKLŮ
PREDENATURACE	1	95	0:02:00	1
		95	0:00:15	
AMPLIFIKACE	2	60/56*/62 <sup>a</sup>	0:00:15	40
		72	0:01:00	
DOSYNTETIZOVÁNÍ	3	72	0:10:00	1
CHLAZENÍ	4	4	∞	1

Tab. 11 Teplota hybridizace (komplementárního nasednutí primerů) se u jednotlivých exonů lišila. Při teplotě 60°C docházelo k hybridizaci primerů pro exony genů *KIT*, *PDGFRA*, *KRAS*, *NRAS*, *AKT1*, *ATR*, *PIK3CA*, *BRAF*, a fúzní transkripty *FGFR1::TACCI* a *ETV6::NTRK3*. Teplota 56°C byla optimalizována pro amplifikaci exonu 2 genu *KRAS*. V případě hybridizace primerů pro exon 4 genů *KRAS* a *NRAS* jsme použili hybridizační teplotu 62°C.

Sekvence primerů všech výše uvedených exonů uvádíme v Příloze 13.1. Specifické PCR amplifikační produkty jsme přečistili pomocí GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit (GENEAID Biotech Ltd., New Taipei, Taiwan) podle instrukcí výrobce.

Asymetrickou PCR amplifikovaných produktů jsme provedli prostřednictvím BigDye® Terminator v1.1, nebo v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Reakční podmínky sekvenační reakce jsou uvedeny v Tab. 12.

**Tab. 12 Přehled reakčních podmínek sekvenační reakce dle Sangera**

REAKČNÍ PODMÍNKY SEKVENAČNÍ REAKCE DLE SANGERA	KROK	TEPLOTA °C	DOBA TRVÁNÍ hod:min:sek	POČET CYKLŮ
		96	0:00:10	
AMPLIFIKACE	1	50	0:00:05	30
		60	0:04:00	
CHLAZENÍ	2	4	∞	1

Sekvenační produkty jsme následně přečistili pomocí NucleoSEQ® Columns (Macherey-Nagel GmbH&Co. KG, Düren, Germany) na základě doporučení výrobce. Pořadí nukleotidů jsme detekovali pomocí kapilární elektroforézy na Genetickém analyzátoru 3130 nebo 3500 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Zjištěné mutace jsme analyzovali porovnáním sekvence pacientovy vzorky s referenční sekvencí exonů uvedených genů získanou z databáze <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Všechny vyšetřené mutace jsme u každého vzorku pacienta potvrdili opětovným (nezávislým) provedením analýzy, tj. opětovnou amplifikací daného exonu a jeho sekvenací (Kalfusova et al. 2019).

Při určování pořadí nukleotidů a detekci mutací dle Sangera se setkáváme s limitací metody ve vztahu k množství nádorových buněk ve vzorku. Citlivost metody sekvenace dle Sangera se pohybuje v rozmezí minimálně 15 – 25 % nádorových buněk ve vzorku (de Leng et al., 2016; Smits et al., 2014). Všechny námi vyšetřované vzorky prošly proto histologickou revizí a u všech jsme vybrali ty, které obsahovaly více než 20 % nádorových buněk.

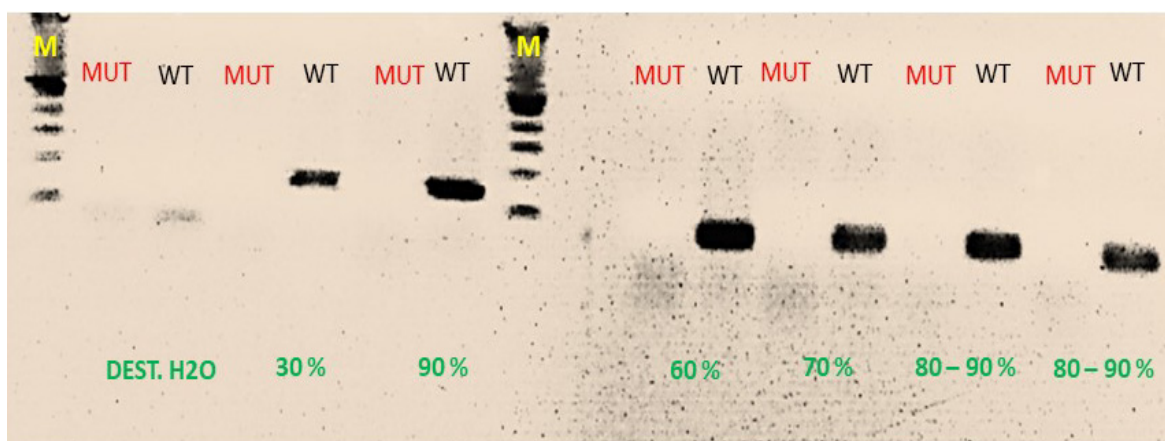
### 3.2.5. Alelově specifická PCR

Kromě amplifikace exonu 15 genu *BRAF* a určení jeho mutačního stavu jsme zavedli a optimalizovali alelově specifickou PCR pro cílenou detekci mutace p.V600E (jedná se o nejčastější substituční záměnu v genu *BRAF*). Oligonukleotidové sekvence příslušných primerů pro alelově specifickou PCR uvádíme rovněž v Příloze 13.1. Reakční podmínky alelově specifické PCR uvádíme v Tab. 13. Pro reakční směs jsme použili Master Mix PCR BIO HS Taq Mix Red (PCR Biosystems Ltd., London, UK).

**Tab. 13 Reakční podmínky alelově specifické PCR**

REAKČNÍ PODMÍNKY ALELOVĚ SPECIFICKÉ PCR	KROK	TEPLOTA °C	DOBA TRVÁNÍ hod:min:sek	POČET CYKLŮ
PREDENATURACE	1	95	0:10:00	1
		95	0:00:40	
AMPLIFIKACE	2	66	0:01:00	38
		72	0:00:20	
DOSYNTETIZOVÁNÍ	3	72	0:10:00	1
CHLAZENÍ	2	4	∞	1

Specifitu alelově specifické PCR (amplifikaci mutačně specifického primeru) jsme zjišťovali na vzorcích nádorů bez mutace p.V600E. Použili jsme počty vyšetřovaných buněk bez mutace p.V600E ve zvolených procentech 30 %, 60 %, 70 %, 80 – 90 % a 90 % (Obr. 10).



**Obr. č. 10 Specifita alelově specifické PCR.** Specifitu alelově specifické PCR jsme stanovovali ve vzorcích DNA bez přítomnosti mutace p.V600E v exonu 15 genu *BRAF*. Pro určení specifity alelově specifické PCR jsme zvolili vzorky s histopatologicky verifikovanými procenty vyšetřovaných buněk bez mutace: 30 %, 60 %, 70 %, 80 – 90 %, a 90 %. Zkratkou WT označujeme amplifikovaný produkt bez přítomnosti mutace (v uvedené reakci jsme použili primer k nemutované alele). Zkratkou MUT je označená reakce, kde jsme použili primer k mutované alele. M označuje velikostní marker a sterilní voda je v reakci použita jako negativní kontrola.

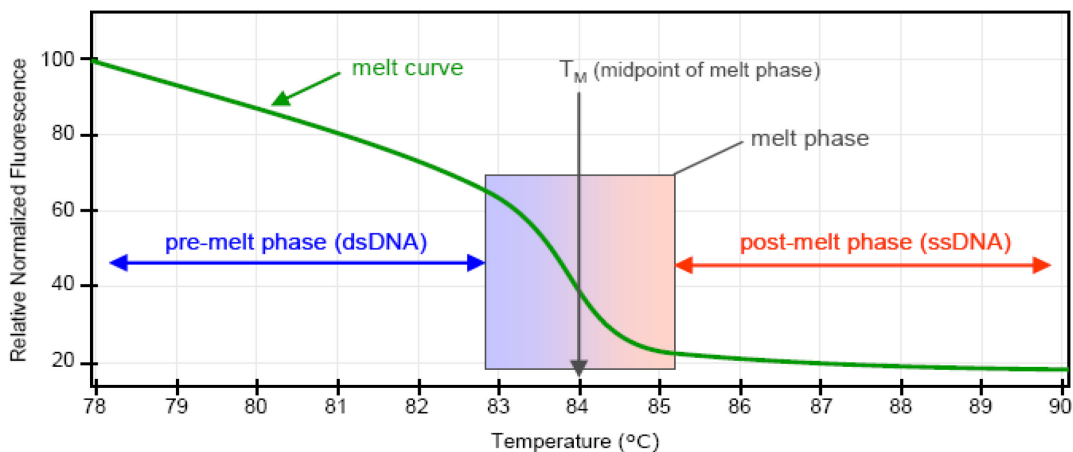
Senzitivitu alelově specifické PCR ve smyslu určení procenta buněk s mutací p.V600E v exonu 15 genu *BRAF* jsme stanovili na hodnotu 1 % mutovaných buněk (Obr. 11).



**Obr. 11 Senzitivita alelově specifické PCR.** Senzitivitu alelově specifické PCR jsme stanovovali ve vzorcích DNA s přítomností mutace p.V600E v exonu 15 genu *BRAF*. Pro určení senzitivity alelově specifické PCR jsme cíleně zvolili vzorek s histopatologicky verifikovaným počtem nádorových buněk o hodnotě 20 % a následně jsme DNA tohoto vzorku naředili, pro dosažení procenta buněk s mutací p.V600E o hodnotách 10 %, 5 %, 2.5 % a 1 %. Rovněž jako je tomu u Obr. 10, zkratkou WT označujeme amplifikovaný produkt bez přítomnosti mutace (použitý primer k nemutované alele) a zkratkou MUT označujeme amplifikovaný mutovaný produkt (použitý primer k mutované alele). Zkratka M označuje velikostní marker a negativní kontrolou je sterilní voda.

### 3.2.6. Analýza křivek tání s vysokým rozlišením - HRM

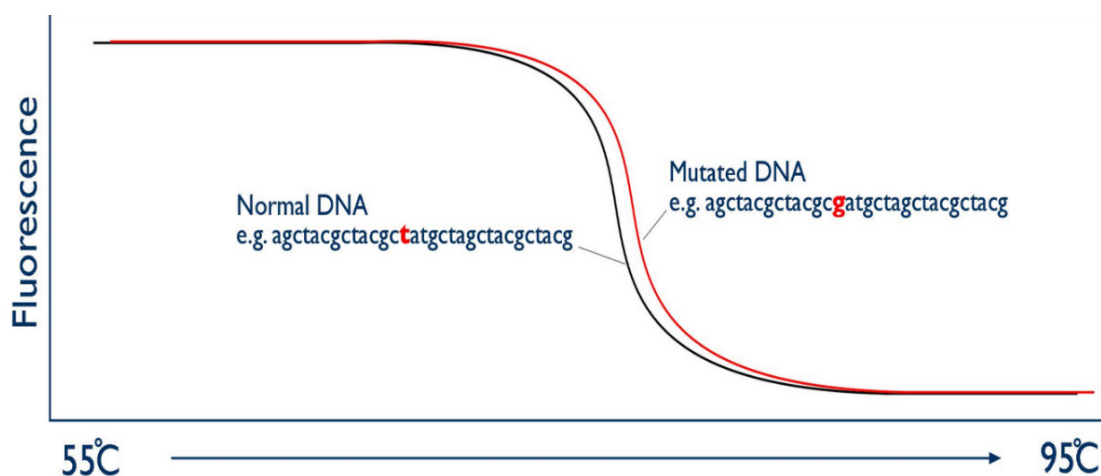
Analýza křivek tání s vysokým rozlišením (HRM – High Resolution Melting) je vysoce senzitivní a rychlou metodou pro skrínig jednonukleotidových i vícenukleotidových změn v DNA v heterozygotním i homozygotním stavu. Základním principem HRM je analýza křivek tání s vysokým rozlišením. V průběhu PCR dochází k inkorporaci fluorescenčního barviva, které je součástí reakční směsi, do dvouvláknové DNA. Postupným zahříváním, tj. zvyšováním teploty vzniklé dvouvláknové DNA dochází k meltingu (denaturaci) dvouvláknové DNA na jednovláknovou DNA a postupnému uvolnění fluorescenčního barviva. Intenzita uvolněného barviva je snímána fluorescenčním detektorem. Výsledkem je křivka tání (Obr. 12), která popisuje závislost intenzity fluorescence na teplotě.





**Obr. 12 Křivka tání.** Křivka tání se skládá z tzv. pre-denaturační (pre-melting) fáze, v průběhu které je v reakci přítomna pouze dvouvláknová DNA (dsDNA) a intenzita fluorescence je nejvyšší. Při postupném zvyšování teploty dochází k denuraci dsDNA a poklesu intenzity fluorescence, tzv. „melt fáze“, tj. fáze tání. Tm je teplota tání, která je potřebná pro dosažení disociace dvouvláknové DNA na jednovláknovou (na obrázku teplota 84°C). V průběhu tzv. post-melt fáze je v reakční směsi přítomna jednovláknová DNA (ssDNA) a intenzita fluorescence je nízká (minimální).

Přítomnost změny v sekvenci DNA (mutace, SNP, krátké delece, inserce) má za následek výskyt „nekomplementárních“ bází. Taková molekula DNA je méně stabilní a denaturuje při nižší teplotě. Tvar křivky tání se v případě přítomnosti alterace v molekule DNA mění vůči tvaru křivky nemutované DNA. Přibližný průběh křivek tání mutované a nemutované DNA znázorňuje Obr. 13.



**Obr. 13 Průběh křivky tání mutované a nemutované DNA.** Průběh křivky tání se liší již při jednonukleotidové záměně v sekvenci DNA.

Pro vysokorozlišovací analýzu křivek tání jsme v našem případě použili reakční směs obsahující LightCycler® 480 High Resolution Melting Master Mix (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), 200nM každého z primerů, 5µL DNA o koncentraci 25 ng/ul (doporučené rozmezí 5-30 ng/ul DNA) v celkovém objemu 20µL.

Pro amplifikaci a následní analýzu křivek tání jednotlivých exonů jsme použili primerů využívaných na amplifikaci specifických PCR produktů a pro následní určení pořadí nukleotidů pomocí Sangera. Analýza křivek tání probíhala na přístroji LightCycler® 480 II System (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). Reakční podmínky (teplota, doba trvání jednotlivých cyklů a počet cyklů) analýzy křivek tání (HRM) jsou přehledně uvedeny v Tab. 14.

**Tab. 14 Reakční podmínky analýzy křivek tání s vysokým rozlišením**

REAKČNÍ PODMÍNKY ANALÝZY HRM	KROK	TEPLOTA °C	DOBA TRVÁNÍ hod:min:sek	POČET CYKLŮ
PREDENATURACE	1	95	0:10:00	1
		95	0:00:20	
AMPLIFIKACE	2	60	0:00:30	45
		72	0:00:40	
		95	0:01:00	
ANALÝZA KŘIVEK TÁNÍ	3	40	0:01:00	1
		65	0:00:01	
		95	KONTINUÁLNĚ	
CHLAZENÍ	4	40	0:00:01	1

### 3.2.7. Mutační analýza prostřednictvím Sekvenování nové generace (NGS)

Určení mutačního statusu prostřednictvím metody Sekvenování nové generace (NGS) jsme použili u několika pacientů. Konkrétně pro ověření přítomnosti primárních a sekundárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* v některých vzorcích, nebo pro detekci přítomnosti fúze *NTRK* u pacienta s progresí onemocnění na terapii inhibitory TK. Ve spolupráci s MUDr. Alešem Víchou, Ph.D. se pomocí metody NGS detekovala přítomnost mutací v genech *SDH* komplexu.

Metoda NGS využívá principu paralelizace procesu sekvenování, při kterém dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně. Výsledkem je rychlé získání velkého množství osekvenovaných vzorků najednou.

Detekci mutačních variant jsme provedli prostřednictvím panelu TruSight® Tumor 26 (Illumina® Inc. San Diego, CA, USA), nebo speciálního uživatelského panelu genů NimbleGen Custom panel (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). Recentně v rámci personalizované medicíny používáme somatický panel VariantPlex® HS Solid tumor kit (Archer™ Boulder, CO, USA). Pro diagnostické určení přítomnosti fúzního transkriptu *ETV6::NTRK3* a/nebo terapeutickou indikaci inhibitorů *NTRK* jsme použili platformu Archer® FusionPlex® Lung V2 kit (Archer™, Boulder, CO, USA). Portfolio testovaných genů zahrnovalo fúzní geny *ALK*, *BRAF*, *EGFR*, *FGFR1*, *FGFR3*, *MET*, *NRG1*, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *RET*, a *ROS1*. Získaná data z výše zmíněných panelů jsme analyzovali pomocí softwaru Illumina Variant Studio™ 3.0 (Illumina® Inc. San Diego, CA, USA),

NextGENe V2.4.2.2 od společnosti SoftGenetics (SoftGenetics, PA, USA), nebo recentně softwaru ArcherDX (Archer™, Boulder, CO, USA). Získané sekvence byly zvoleným softwarem vztaženy k referenční sekvenci GRCh37. Všechny nalezené varianty jsme anotovali s variantami v příslušných databázích.

### **3.2.8. Příprava plazmidů**

Plazmidy genů Ki-67, TOP2A, TPX2, a telomerázové podjednotky hTERT jsme získali klonováním specifických produktů (cDNA jednotlivých transkriptů) uvedených genů do pCR®-2.1 TOPO vektoru. Výslední konstrukt jsme následně transformovali do TOP10 kompetentní bakterie *Escherichia coli* prostřednictvím TOPO®TA klonovacího kitu (Invitrogen Ltc, Carlsbad, CA, USA). Po namnožení transformovaných bakterií *E. coli* jsme purifikovali jednotlivé plazmidy použitím Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, Löhne, Germany) podle instrukcí výrobce (Kalfusova et al., 2016). Plazmid pro kontrolní gen *ABL* byl připraven podle postupu autorů Willasch et al. (2009).

Po izolaci plazmidů jednotlivých genů jsme změřili jejich koncentraci prostřednictvím spektrofotometrické metody na NanoDropu ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Na základě znalosti délky rekombinantních plazmidů a jejich spektrofotometricky změřené koncentrace jsme získali standardní vzorky plazmidů o známém počtu kopií. Pro účely absolutní kvantifikace jsme následně vykonali logaritmické ředění plazmidů za účelem sestrojení standardních kalibračních křivek. Plazmidy jsme naředili do 1 % Salmon Sperm (nízkomolekulární DNA z lososích spermií, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) pro stabilizaci plazmidové DNA (Kalfusova et al. 2016).

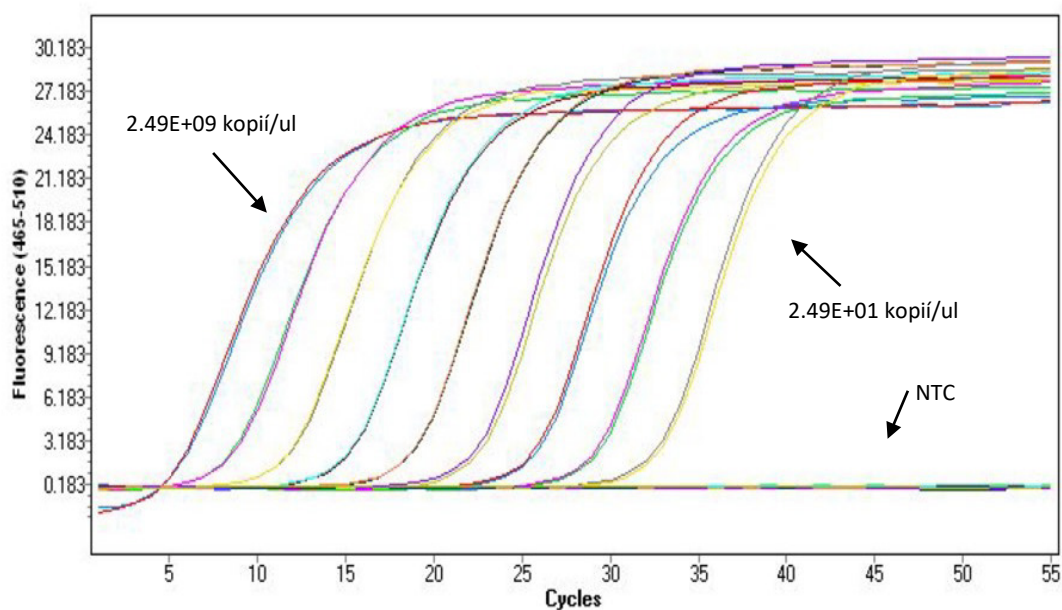
### **3.2.9. Absolutní kvantifikace v reálném čase – RQ RT PCR**

Pro stanovení genové exprese proliferačních markerů Ki-67, TPX2, TOP2A a telomerázové podjednotky hTERT jsme použili metodu reverzní kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RQ RT PCR). Uvedená metoda umožňuje detekci amplifikovaného PCR produktu v každém cyklu PCR. U kvantitativní RQ RT PCR hodnotíme tzv. „Crossing point“ (Cp), nebo-li „Cycle threshold“ (Ct), tj. cyklus u kterého fluorescence amplifikovaných produktů přesáhne fluorescenci pozadí. Nejnižší hodnota Cp (nebo Ct) koreluje s nejvyšší expresní hladinou vzorku.

Konkrétně jsme pro určení přesného počtu kopií proliferačních markerů a telomerázové podjednotky hTERT použili metodu absolutní kvantifikace, u které expresní hladiny

vyšetřovaného vzorku vztahujeme k sestrojené standardní křivce naředené plazmidové řady daného markeru.

Standardní křivky mRNA transkriptů proliferačních markerů Ki-67, TPX2, TOP2A, telomerázové podjednotky hTERT a kontrolního genu *ABL* jsme připravili z desetinásobného ředění příslušných plazmidů. Koncentrační rozpětí plazmidů kontrolního genu *ABL* představovalo koncentrace od  $2.5E+07$  kopií/ $\mu$ l do  $2.5E+01$  kopií/ $\mu$ l. Rozpětí koncentrace naředených plazmidů proliferačního markeru Ki-67 bylo od  $1.45E+10$  kopií/ $\mu$ l do  $1.45E+01$  kopií/ $\mu$ l. U proliferačního markeru TPX2 koncentrace naředených plazmidů prezentovaly hodnoty  $2.49E+09$  kopií/ $\mu$ l až  $2.49E+01$  kopií/ $\mu$ l, u TOP2A hodnoty  $7.83E+09$  kopií/ $\mu$ l až  $7.83E+04$  kopií/ $\mu$ l a u telomerázové podjednotky hTERT hodnoty  $1.8E+10$  kopií/ $\mu$ l až  $1.8E+01$  kopií/ $\mu$ l (Kalfusova et al., 2016). Obr. 14 znázorňuje amplifikační křivky naředených standardů proliferačního markeru TPX2.



**Obr. 14 Standardní křivky proliferačního markeru TPX2.** Obrázek prezentuje standardní kalibrační křivky naředených plazmidů proliferačního markeru TPX2. Plazmidy byly naředeny do 1 % Salmon Spermum v desetinásobném ředění. Každé ředění plazmidu jsme provedli v duplikátu. Křivky nalevo představují plazmid proliferačního markeru TPX2 o počtu  $2.49E+09$  kopií/ $\mu$ l. Křivky úplně napravo prezentují počet kopií plazmidu TPX2  $2.49E+01$ . NTC, tj. No Template Control představuje negativní kontrolu amplifikace, kterou je v našem případě sterilní voda.

S ohledem na rozdílné množství vstupního materiálu (rozdílné množství buněk, nukleových kyselin) je potřebné získané expresní hladiny mRNA proliferačních markerů normalizovat k expresním hodnotám tzv. provozního genu (kontrolního, případně

„housekeeping“ genu). V rámci naší expresní analýzy jsme použili kontrolní gen *ABL*. Exprese genu *ABL* reprezentuje spolehlivý kontrolní gen pro diagnostické vzorky a rovněž vzorky pro sledování minimální reziduální nemoci (MRD) na základě doporučení Evropského kodexu proti rakovině (ECAC) (Willasch et al., 2009). Provozní geny jsou charakterizovány stabilní expresí (není extrémně nízká, ani extrémně vysoká) a neobsahují pseudogeny.

Nezbytnou součástí absolutní kvantifikace jsou kritéria a parametry, které musí standardní kalibrační křivky splňovat. Důvodem je kontrola reprodukovatelnosti a efektivity amplifikace. Při přesné amplifikační reakci dosáhneme efektivity 2, tj. množství cílových nukleových kyselin (vzorku) by se mělo zdvojnásobit v každém amplifikačním cyklu. Sklon křivky („slope“) při ideální amplifikaci nabývá hodnotu -3.3. Reálně, amplifikační reakce vykazuje efektivitu nižší než 2. Pro splnění podmínek správnosti a přesnosti kvantifikovaného výsledku by hodnoty efektivity neměly být nižší než 1.98.

Absolutní kvantifikace v reálném čase jsme provedli prostřednictvím detekčního systému LightCycler 480 (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). Stanovení expresních hladin proliferačních markerů Ki-67, TPX2, TOP2A a telomerázové podjednotky hTERT jsme uskutečnili pomocí softwaru Universal Probe Library – UPL (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Oligonukleotidové sekvence adekvátních sond a primerů uvádíme v Příloze 13.1.

Reakční směs pro zjištění expresních hladin proliferačních markerů Ki-67, TPX2, TOP2A a telomerázové podjednotky hTERT zahrnovala FastStart TaqMan Probe Master Mix (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) 500nM každého sense a antisense primeru, 100nM příslušné LNA sondy a 1  $\mu$ l cDNA vzorku v konečném objemu 20  $\mu$ l. Reakční směs pro kvantifikaci provozního genu *ABL* obsahovala 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), 375 nM každého sense a antisense primeru, 250nM hydrolyzační fluorescenční sondy *ABL* a 1  $\mu$ l cDNA vzorku v konečném objemu 20  $\mu$ l (Kalfusova et al. 2016).

Reakční podmínky pro amplifikaci proliferačních markerů Ki-67, TPX2, TOP2A, telomerázové podjednotky hTERT a provozního genu *ABL* přehledně shrnuje Tab. 15.

**Tab. 15 Reakční podmínky kvantitativní PCR v reálném čase (RQ RT PCR)**

REAKČNÍ PODMÍNKY KVANTITATIVNÍ RQ RT PCR	KROK	TEPLOTA °C	DOBA TRVÁNÍ hod:min:sek	POČET CYKLŮ
INKUBACE	1	50	0:02:00	1
PREDENATURACE	2	95	0:10:00	1
AMPLIFIKACE	3	95	0:00:15	55
		60	0:01:00	
CHLAZENÍ	4	40	0:02:00	1

Normalizované expresní hladiny Ki-67, TPX2, TOP2A, telomerázové podjednotky hTERT byly stanoveny jako poměr expresních hladin Ki-67, TPX2, TOP2A a telomerázové podjednotky hTERT k expresním hladinám kontrolního genu *ABL* (Kalfusova et al. 2016). V rámci RQ RT PCR jsme všechny ředění plazmidů Ki-67, TPX2, TOP2A, hTERT a kontrolního genu *ABL*, negativní kontroly, stejně tak kvantifikaci expresí Ki-67, TPX2, TOP2A, hTERT a *ABL* příslušných vzorků jsme vždy prováděli v duplikátech (Kalfusova et al. 2016).

### 3.2.10. Statistická analýza

Statistickou analýzu jsme provedli pomocí softwaru JMP IN 5.1. (SAS Institute, Cary, NC, US). Pro zjištění rozdílu mRNA expresních hladin molekulárních markerů ve skupinách vzorků GIST, Burkittových lymfomů (BL) a leiomyosarkomů a mezi vzorky maligních a benigních GIST jsme použili Kruskal-Wallis neparametrický test. Pro univariatní analýzu celkového přežití (OS – Overall Survival) a přežití do progresu (EFS – Event Free Survival) ve spojení expresních hladin mRNA molekulárních markerů a benigního, případně maligního potenciálu GIST jsme uplatnili Kaplan-Meierovi křivky přežití. Za statisticky významnější jsme pokládali *P* hodnoty menší jako 0.05.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Molekulární analýza mutačního stavu GIST

#### 4.1.1. Mutační analýza KIT/PDGFRA mutovaných GIST

V rámci molekulární diagnostiky vyšetřili 334 vzorků od 289 pacientů. Základní klinicko-patologické údaje o analyzovaných vzorcích v přehledném souhrnu poskytuje Tab. 16.

**Tab. 16 Přehled základních klinicko-patologických údajů**

POHLAVÍ	POČET PACIENTŮ	PROCENTA (%)
MUŽI	155	53.6
ŽENY	134	46.4
MATERIÁL	POČET VZORKŮ	PROCENTA (%)
PARAFINOVÉ ŘEZY	284	85.0
ZMRAŽENÉ REZY	50	15.0
MORFOLOGIE	POČET VZORKŮ	PROCENTA (%)
VŘETENOBUNĚČNÁ	246	73.7
EPITELOIDNÍ	62	18.6
SMÍŠENÁ	26	7.7
LOKALIZACE	POČET VZORKŮ	PROCENTA (%)
ŽALUDEK	135	40.4
TENKÉ STŘEVO	65	19.5
HRUBÉ STŘEVO	8	2.3
JÍCEN	5	1.5
EXTRAGASTROINTESTINÁLNÍ	21	6.3
METASTÁZY	80	24.0
BEZ ÚDAJŮ O LOKALIZACI	20	6.0

V případě morfologického hodnocení jsme se u 4 (1.2 %) vzorků setkali s nemožností určení vzhledu analyzovaného materiálu z důvodu nekrotického rozpadu buněk. V převážné většině se nádory vyskytovali v rámci gastrointestinálního traktu (žaludek, tenké střevo, tlusté střevo, jícen). V menší míře byly nádory distribuovány mimo gastrointestinální trakt, tj. na místech tzv. extragastrointestinální lokalizace (mesenterium,

omentum, retroperitoneum). Mimo již výše uvedené oblasti v omentu, mesenteriu a retroperitoneu jsme zaznamenali přítomnost nádoru v ovariu. Významný podíl vyšetřovaných vzorků tvořili vzorky metastáz (nejčastěji se jednalo o metastázy z jater nebo z oblasti břišní dutiny).

#### 4.1.1.1. Primární mutace v genech *KIT* a *PDGFRA*

Prostřednictvím molekulární analýzy mutačního stavu genů *KIT* a *PDGFRA* jsme zjistili přítomnost primárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* v 279 vzorcích nádorů od 239 pacientů. Tab. 17 a 18 poskytují přehled přítomnosti primárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* a v celkově vyšetřených vzorcích.

**Tab. 17 Přehled přítomnosti primárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA***

GEN	POČET PACIENTŮ	PROCENTA (%)	POČET VZORKŮ	PROCENTA (%)
<i>KIT</i>	198	82.8	235	84.2
<i>PDGFRA</i>	41	17.2	44	15.8
MUTOVANÉ CELKEM	239	100.0	279	100.0

**Tab. 18 Celkový přehled přítomnosti mutací v genech *KIT/PDGFRA***

GENY <i>KIT/PDGFRA</i>	POČET PACIENTŮ	PROCENTA (%)	POČET VZORKŮ	PROCENTA (%)
MUTOVANÉ	239	82.7	279	83.5
NEMUTOVANÉ	50	17.3	55	16.4
CELKEM	289	100.0	334	100.0

Nejčastěji jsme zjistili přítomnost primárních mutací v exonu 11 genu *KIT*. Výskyt mutací v exonu 11 genu *KIT* jsme detekovali v 210 vzorcích (75.2 %) od 182 pacientů (76.2 %). V případě exonu 9 genu *KIT* jsme ve všech analyzovaných vzorcích shodně detekovali duplikaci kodonů 502-503. Mutační analýza mutací v exonu 13 genu *KIT* odhalila ve všech vzorcích substituční záměnu v kodonu 642 (p.K642E). U exonu 17 se jednalo se o substituci v kodonu 822 (p.N822K). V rámci genu *PDGFRA* jsme nejčastěji stanovili mutace v exonu 18. V 75 % jsme v uvedeném exonu detekovali substituční záměnu v kodonu 842 (p.D842V) vedoucí k primární rezistenci nádoru na cílenou terapii inhibitory



RTK. Přehled detekovaných mutací v jednotlivých exonech genů *KIT* a *PDGFRA* zobrazuje Tab. 19.

**Tab. 19 Přehled primárních mutací v jednotlivých exonech genů *KIT* a *PDGFRA***

GEN	LOKALIZACE PRIMÁRNÍCH MUTACÍ	POČET PACIENTŮ	PROCENTA (%)	POČET VZORKŮ	PROCENTA (%)
<i>KIT</i>	exon 9	11	4.6	16	5.7
	exon 11	182	76.2	210	75.2
	exon 13	4	1.6	8	2.9
	exon 17	1	0.4	1	0.4
<i>PDGFRA</i>	exon 12	5	2.1	5	1.8
	exon 14	2	0.8	2	0.7
	exon 18	34	14.3	37	13.3
CELKEM		239	100.0	279	100.0

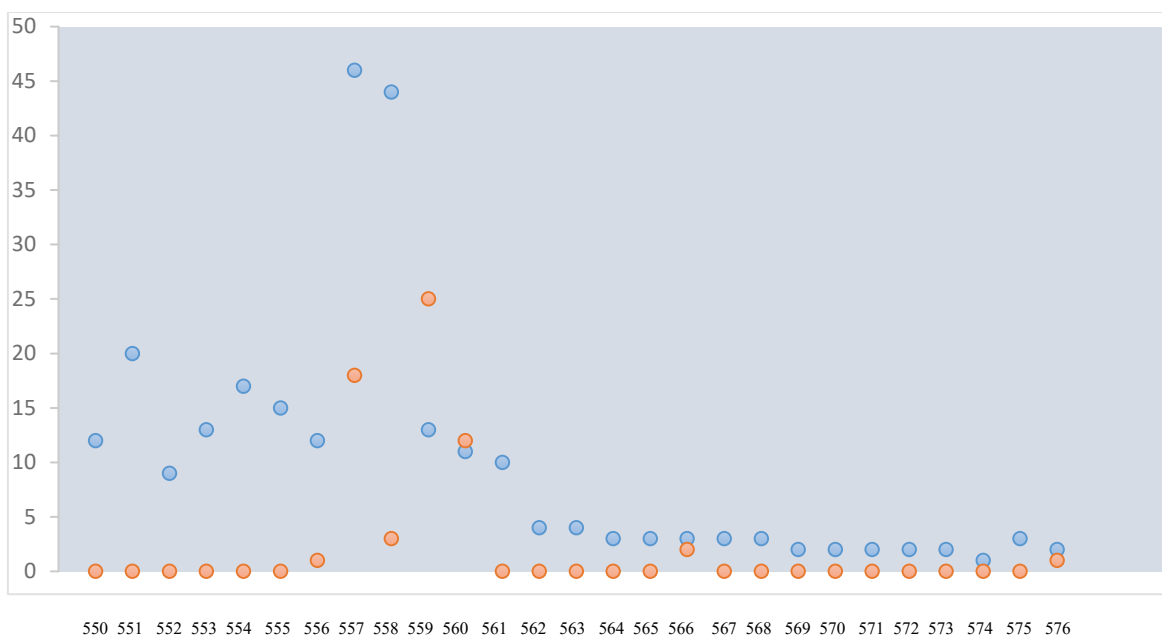
V exonu 11 genu *KIT* jsme v souladu s literárními zdroji detekovali nejvyšší variabilitu mutací. Nejčastěji jsme zjistili přítomnost jednoduchých delecí a jednoduchých substitucí. Přehled výrazné variability primárních mutací v genu *KIT* poskytuje Tab. 20.

**Tab. 20 Přehled variability primárních mutací v exonu 11 genu *KIT***

TYP PRIMÁRNÍ MUTACE	POČET PACIENTŮ	PROCENTO (%)	POČET VZORKŮ	PROCENTO (%)
DELECE	62	34.1	81	38.6
SUBSTITUCE	55	30.2	57	27.1
ITD	13	7.1	13	6.2
SUB/DEL	27	14.9	31	14.8
INZERCE	3	1.6	3	1.4
INDEL	12	6.6	15	7.1
SLOŽENÉ	10	5.5	10	4.8
CELKEM	182	100	210	100.0

Všechny uvedené jednoduché substituce, delece, inserce nebo složitější delece a substituce nukleotidů jsme zjistili převážně v proximální oblasti exonu 11 genu *KIT*. Interní tandemové duplikace (ITD) byly detekovány v distální části exonu 11. Jednoduché delece

v exonu 11 jsme identifikovali v rozsahu od jednoho kodonu (3 nukleotidů) až po 17 kodonů (51 nukleotidů). Nejčastěji, u 31 vzorků, jsme detekovali ztrátu 2 kodonů, konkrétně kodonů 557 a 558. Substitute, druhé nejčastěji identifikované mutační varianty, prokazovaly tendenci shlukovat se v oblasti kodonů 557, 559 a 560. Substitute v těchto 3 kodonech jsme zjistili v 94 % vzorků. Pouze u 3 vzorků jsme detekovali substitute v odlišném kodonu než ve výše uvedených kodonech. Přehled rozložení delecí a substitucí v exonu 11 genu *KIT* poskytuje Obr. 15.



**Obr. 15 Přehled rozložení delecí a substitucí v exonu 11 genu *KIT*.** Vodorovně jsou umístěny čísla kodonů exonu 11, svisle počty vyšetřených případů. Oranžové body znázorňují vzorky s detekovanou substitucí, modré s detekovanou delecí. Nejčastěji jsme detekovali delece v kodonech 557 a 558 (46, respektive 44 vzorků). Z důvodu přehledného zobrazení graficky zobrazujeme proximální část exonu 11. V distální části (kodony 577 – 591) jsme delece ani substitute nedetekovali.

#### 4.1.1.2. Sekundární mutace v genech *KIT* a *PDGFRA*

Sekundární mutace v genech *KIT* a *PDGFRA* jsme identifikovali u 16 pacientů z celkového počtu 156 analyzovaných pacientů (10.3 %) na cílené terapii inhibitory RTK v I., II., nebo III. linii. Souhrnně jsme od uvedených 16 pacientů vyšetřili 42 vzorků v průběhu progresu onemocnění. Přítomnost sekundárních mutací jsme zjistili v 29 (69 %) ložiscích. Sekundární mutace jsme detekovali v exonech 13 a 17 genu *KIT* a v exonu 18 genu *PDGFRA*. Shrnutí detekovaných sekundárních mutací a klinicko-patologických dat u pacientů se získanou rezistencí v přehledu poskytují Tab. 21 a Tab. 22.

**Tab. 21 Přehled histopatologických dat u pacientů se sekundárními mutacemi**

POČET PACIENTŮ	POHLAVÍ ROK NAROZENÍ	LOKALIZACE NÁDORU	MORFOLOGIE NÁDORU	DATUM ANALÝZY	POČET VYŠETŘENÝCH VZORKŮ	DETEKOVANÉ SEKUNDÁRNÍ MUTACE
1.	Ž 1950	primární nádor (peritoneální dutina)	vřetenobuněčná morfologie vysoká mitotická aktivita	09/2009	1	-
		relaps onemocnění (vzorek z retroperitonea)	vřetenité buňky s kruhovým jádrem, fokálně epiteloidní buňky s perimukleární vakuolizací cytoplazmy a velkým jádrem	04/2016	3	p.D820Y -
2.	M 1938	primární nádor (žaludek)	vřetenité buňky s vakuolizací cytoplazmy/ část nádorových buněk epiteloidního vzhledu	06/2006	1	-
		relaps onemocnění vzorek ze žaludku	část nádoru vřetenité buňky/část nádoru s velkými polygonálními buňkami nádor nekrotický a mitoticky aktivní	04/2009	1	p.V654A
3.	M 1954	metastáze do podkoží	vřetenobuněčná morfologie, jaderné atypie a vysoká mitotická aktivita	02/2007	1	-
		2 vzorky z nekrotického materiálu	vřetenobuněčná morfologie	06/2008	2	p.N822K p.N822K
4.	M 1947	relaps nádoru v tenkém střevě	vřetenobuněčná morfologie fokálně vakuolizace nádorových buněk	02/2007	1	p.V654A
5.	M 1942	relaps onemocnění	vřetenobuněčná morfologie	08/2007	1	p.V654A
6.	M 1965	primární tumor (peritoneální dutina)	vřetenobuněčná morfologie/ fokálně buňky s epiteloidní morfologií mitoticky aktivní buňky	10/2002	1	-
		metastáze do jater	vřetenobuněčná morfologie fokálně buňky s epiteloidní morfologií	12/2008	1	p.V654A

**Tab. 21 Pokračování**

POČET PACIENTŮ	POHLAVÍ ROK NAROZENÍ	LOKALIZACE NÁDORU	MORFOLOGIE NÁDORU	DATUM ANALÝZY	POČET VYŠETŘENÝCH VZORKŮ	DETEKOVANÉ SEKUNDÁRNÍ MUTACE
7.	M 1946	vzorek z abdominální dutiny	vřetenobuněčná morfológie s fokální jadernou atypii vysoce mitoticky aktivní	10/2014	1	p.D820E/p.N822K
8.	M 1963	relaps onemocnění (tlusté střevo) relaps onemocnění (rektum)	polygonální buňky s oválným jádrem a jadérkem polygonální buňky s epitelooidní morfológií nádor fokálně mitoticky aktivní	03/2011 04/2012	1 1	p.Y823D p.Y823D
9.	Ž 1956	residuum po chemoterapii relaps onemocnění metastáze v břišní stěně metastáze v peritoneu	smíšená morfológie (vřetenobuněčná/epitelooidní) epitelooidní morfológie vřetenobuněčná morfológie vřetenobuněčná morfológie	05/2005 05/2005 10/2008 10/2008	1 1 1 1	- - p.N822K p.D820G
10.	M 1922	metastáze v retroperitoneu expanze v omentu	vřetenobuněčná morfológie, nepatrná atypie jádra, vysoká mitotická aktivita epitelooidní morfológie s fokálním výskytem buněk s vřetenobuněčnou morfológií, atypie jádra mitoticky aktivní	05/2009 09/2013	1 1	p.D820A p.D846H
11.	M 1963	nádor v malé pánvi (resekce 2013) ložisko v mezenteriu	polygonální buňky epitelooidního vzhledu mitotická aktivita epitelooidní morfológie fokálně mají buňky perinukleární vakuolu mitoticky aktivní, ojediněle atypické mitózy	06/2017 11/2018 02/2022	1 B1/1 1 B1/2 1 B1/3 1 Z B2 1 B2/1 1 B2/2 1 B2/3 1 B2/4 1 B2/5 1 B2/6 1	- p.V654A - p.D820Y p.D820Y p.V654A p.V654A p.V654A p.V654A p.V654A p.V654A p.D820Y

**Tab. 21 Pokračování**

POČET PACIENTŮ	POHLAVÍ ROK NAROZENÍ	LOKALIZACE NÁDORU	MORFOLOGIE NÁDORU	DATUM ANALÝZY	POČET VYŠETŘENÝCH VZORKŮ	DETEKOVANÉ SEKUNDÁRNÍ MUTACE
12.	M 1955	resektát omenta	smíšená morfologie (vřetenobuněčná/epiteloidní) buňky s nepravidelnými jádry, vysoká mitotická aktivita nekróza nádorového ložiska	11/2018	1	p.V654A
13.	M 1948	resektát žaludku (primodiagnóza 2013) na systémové terapii	smíšená morfologie (vřetenobuněčná/epiteloidní) jaderné a celulární atypie, mitotická aktivita, angioinvaze, místy nekróza	07/2020	2	p.V654A
14.	M 1943	recidiva nádoru v peritoneální dutině	vřetenobuněčná morfologie výrazná mitotická aktivita	07/2019	1	p.C809G
15.	M 1971	metastáze v játrech	vřetenobuněčná morfologie mitotická aktivita 3 mitózy/50 HPF	12/2013	1	-
		metastáze v oblasti peritonea	vřetenobuněčná morfologie výrazná mitotická aktivita (18 mitóz/50 HPF)	05/2016	2	-
16.	M 1953	metastáze v blízkosti stěny tenkého střeva	vřetenobuněčná morfologie ložisko o velikosti 25x18x18 mm	05/2021	1	p.N822T
		konzultační biopsie	vřetenobuněčná morfologie	10/2021	1	p.D820Y

Vysvětlivky: D – kyselina asparagová, T – threonin, Y – tyrozin, C – cystein, G – glycin, V – valin, A – alanin, H – histidin, K – lysin

Tab. 22 Přehled klinicko-patologických dat u pacientů se sekundárními mutacemi

PACIENT č.	STANOVENÍ DIAGNÓZY	TERAPIE I. LINIE	PROGRESE ONEMOCNĚNÍ	TERAPIE II./III. LINIE	SLEDOVÁNÍ
1.	09/2009 nádor peritoneální dutiny ●(PM)	10/2009-10/2010 adjuvantně IM	05/2011 relaps onemocnění 07/2011 paliativní podávání IM 04/2014 eskalace dávky IM (800mg/den) (parciální regrese) 11/2015 progresse onemocnění	12/2015 II. linie: SM (primární progresse onemocnění) 04/2016 relaps onemocnění ●●(PM a SeM) 05/2016 III. linie: regorafenib 05/2017 progresse onemocnění	zemřel 2017
2.	06/2006 neoperabilní nádor žaludku ●(PM)	09/2006 paliativní podávání IM: 400 mg/den regrese onemocnění do 05/2007	10/2007 progresse onemocnění podle PET/CT 02/2009 lokální relaps (radikální resekcce nádoru) ●●(PM a SeM) 06/2009 paliativní podávání IM (400 mg/den) snížení dávky IM (200 mg/den): renální insuficience 08/2009 přerušeni terapie IM		zemřel 01/2010
3.	04/2001 radikální resekcce nádoru (jejunum a ileum)	06/2004 iniciální dávka IM (400 mg/den) 06/2004-07/2006 stabilizace onemocnění	07/2006 progresse onemocnění 08/2006 eskalace dávky IM (800 mg/den) 02/2007 metastáze do podkoží ●(PM) 04/2007 progresse onemocnění	04/2007-06/2007 II. linie terapie: SM 07/2007 progresse onemocnění na terapii SM	zemřel 06/2008 ●●(PM a SeM)
4.	06/2001 chirurgická resekcce nádoru (tenké střevo) 02/2004 metastáze	05/2004 iniciální dávka IM (parciální remise)	01/2007 progresse onemocnění 01/2007 eskalace dávky IM (800 mg/den) 02/2007 relaps onemocnění ●(PM a SeM)		zemřel 02/2007

Tab. 22 Pokračování

PACIENT č.	STANOVENÍ DIAGNÓZY	TERAPIE I. LINIE	PROGRESE ONEMOCNĚNÍ	TERAPIE II./III. LINIE	SLEDOVÁNÍ
5.	10/2002 maligní GIST 07/2003 metastáze	08/2003 iniciační dávka IM (výrazná parciální remise) 06/2004 regrese nádoru			od 06/2004 ztráta kontaktu (dle posledních informací pacient zemřel) konz. biopsie z 08/2007 ● (PM a SeM)
6.	01/2001 chirurgická resekce nádoru (peritoneální dutina) 10/2002 regrese onemocnění (abdominální dutina) ●(PM)	01/2003 IM 400 mg/den 10/2003 300 mg/den (kvůli hepatotoxicitě) 11/2003 regrese onemocnění	01/2005-11/2005: 400 mg/den progrese onemocnění 11/2005-02/2006: 600 mg/den progrese onemocnění 02/2006-08/2006: 800 mg/den progrese onemocnění od 08/2006 podávání IM přerušeno	09/2006 II. linie terapie: SM 50 mg/den (4 týdny) 10/2006 redukce dávky SM 37.5 mg/den (hepatotoxicita) 3/2007 progrese onemocnění 05/2007-02/2008 III. linie terapie: nilotinib 02/2008 progrese onemocnění 03/2008-04/2009 IM 800 mg/den progrese onemocnění 12/2008 biopsie metastázy v játrech ●●● (PM a SeM) 05/2009 chemoterapie 08/2009 progrese onemocnění 08/2011 II. linie terapie: SM 50 mg/den 05/2013 progrese onemocnění 05/2013 začátek podávání III. linie terapie: regorafenib 10/2013 ukončení podávání regorafenibu (progrese onemocnění) 08/2014 „záchranná“ terapie IM 09/2014 přerušeni terapie IM 10/2014 paliativní chirurgická operace ● (PM a SeM)	od 09/2009 ztráta kontaktu (podle posledních informací pacient zemřel)
7.	10/2006 pokročilý GIST peritoneální dutiny (společně s metastázemi v játrech)	10/2006 IM 400 mg/den	03/2010 lokální progrese onemocnění 04/2010 eskalace dávky IM 800 mg/den 10/2010 lokální progrese onemocnění		zemřel 2014

Tab. 22 Pokračování

PACIENT č.	STANOVENÍ DIAGNÓZY	TERAPIE I. LINIE	PROGRESJE ONEMOCNĚNÍ	TERAPIE II./III. LINIE	SLEDOVÁNÍ
8.	03/2005 resekce nádoru (tlusté střevo)	06/2007 IM 400 mg/den	03/2011 lokální progresse onemocnění ●(PM a SeM) 04/2012 chirurgická resekce nádoru ●●(PM a SeM) 11/2012 remise onemocnění (PET/CT) 02/2013 subileózní stav 03/2013 selhávání ledvin neoperabilní GIST	03/2013 II. linie terapie: SM 50 mg/den masivní progresse onemocnění III. linie terapie: regorafenib	zenřtel 11/2013
9.	od roku 1991 bolesti břicha 1996 chirurgická operace 04/2005 druhý relaps ●(PM) 04/2006 třetí relaps ●●(PM)	09/2006 IM 400 mg/den (kompletní remise onemocnění) 10/2008 progresse onemocnění ●●●/●●●●●● (PM a SeM)/ (PM a SeM) 10/2013-12/2013 IM 400 mg/den 12/2013 IM 300 mg/den IM přerušeni terapie IM	05/2009 chirurgické odstranění metastázy ●●●●●(PM a SeM) 06/2009 zvýšení dávky IM (800 mg/den) progresse onemocnění	10/2009 II. linie terapie: SM (50 mg/den) progresse onemocnění 5/2010 „záchranná“ terapie IM (600 mg/den)	samovražda 07/2012
10.	09/2013 nádor omenta ●(PM a SeM)	02/2013 paliativní terapie IM	progresse onemocnění před terapií IM/prímámi progresse?	paliativní terapie	zenřtel 03/2014
11.	1/2013 GIST mesenteria (neoperabilní nádor a metastázy v játrech)	02/2013 paliativní terapie IM iniciální dávka 400mg/den	03/2017 progresse nádoru v pánevi 06/2017 recidiva generalizovaného GIST v malé pánvi (exstirpace) ●(PM a SeM) 11/2018 chirurgické odstranění progresse nádoru (diseminace nádoru po peritoneu a malé pánvi) ●●(PM a SeM) 01/2019 eskalace dávky IM 800mg/den 04/2019 parciální remise	11/2020 progresse 11/2020 II. linie terapie – SM (2. cykly) 02/2021 primární progresse na terapii SM toxická při terapii SM (kožní vyrážka, svědění chodidel, dlaní)	pacient žije



Tab. 22 Pokračování

PACIENT č.	STANOVENÍ DIAGNÓZY	TERAPIE I. LINIE	PROGRESE ONEMOCNĚNÍ	TERAPIE II./III. LINIE	SLEDOVÁNÍ
12.	2014 chirurgická resekce (diagnóza GIST) kompletní remise	09//2017 paliativní terapie IM (400mg/den) (pro vícečetné postužení břišní dutiny) 03/2018 výrazná parciální regrese ložisek	07/2018 progresse 2 ložisek 09/2018 paliativní resekce ložisek v břišní dutině 06/2019 progresse 06/2019 eskalace IM 08/2019 progresse na zvýšené dávce IM	09/2019 II. linie terapie – SM 10/2019 ileus tenkého střeva 10/2019 resekce omenta ●(PM a SeM) s mnohočetnými metastázami 11/2019 recidiva GIST malé pánve	pacient žije
13.	04/2013 slabost, trvající horečky, úbytek váhy – 18 kg/2 měsíce 06/2013 biopsie žaludku (pokročilý GIST žaludku s meta jater)	07/2013 I. linie terapie – IM 08/2019 trvající parciální regrese nádoru i plicních metastáz	02/2020 progresse nádoru 06/2020 proximální polová resekce žaludku s distální pankreatektomií a splenektomií ●(PM a SeM) 08/2020 hospitalizace (zvracení po každém jídle) 08/2020 infekce po vyjmutí drénu 08/2020 deprese		zemřel 09/2020
14.	2005 chirurgická resekce nádoru pro počáteční ileozní stav (peritoneální dutina) neoperabilní GIST	12/2005 paliativní terapie IM (400mg/den) 01/2018 kompletní remise 5/2013 resekce karcinomu SŽ 2/2014 resekce bazaliomu tváře 1/2018 resekce bazaliomu (krk) 06/2019 progresse onemocnění	06/2019 suspektní relaps v malé pánvi 06/2019 extirpace nádoru ● (PM a SeM) 07/2019 resekce lokální progresse ložisek v pánvi 10/19 nadále terapie IM (400mg/den)	11/2020 PET/CT kompletní remise	pacient žije

**Tab. 22 Pokračování**

PACIENT č.	STANOVENÍ DIAGNÓZY	TERAPIE I. LINIE	PROGRESE ONEMOCNĚNÍ	TERAPIE II./III. LINIE	SLEDOVÁNÍ
15.	květen 2013 chirurgické odstranění GIST v břišní dutině (velikost 310 mm, MA 5/50 HPF) metastázy v játrech	07/2013 IM (400 mg/den)	12/2013 resekce metastázy v játrech ●(PM) 04/2014 dle CT progresse na peritoneu 04/2014 IM 800 mg/den		pacient žije
16.	březen 2003 paliativní resekce primárního metastatického nádoru	04/2003 terapie IM (postupná kompletní remise metastatické choroby)	08/2016 progresse onemocnění – ložiska v játrech (po 13 letech) 10/2016 resekce játerních ložisek 12/2016 další progresse – eskalace IM 600mg/den (regrese nádoru do 02/2017)	09/2019 II.linie terapie – SM 10/2019 III. linie terapie – regorafenib parciální remise onemocnění, redukce terapeutika pro nežádoucí účinky ●(PM a SeM)	pacient žije

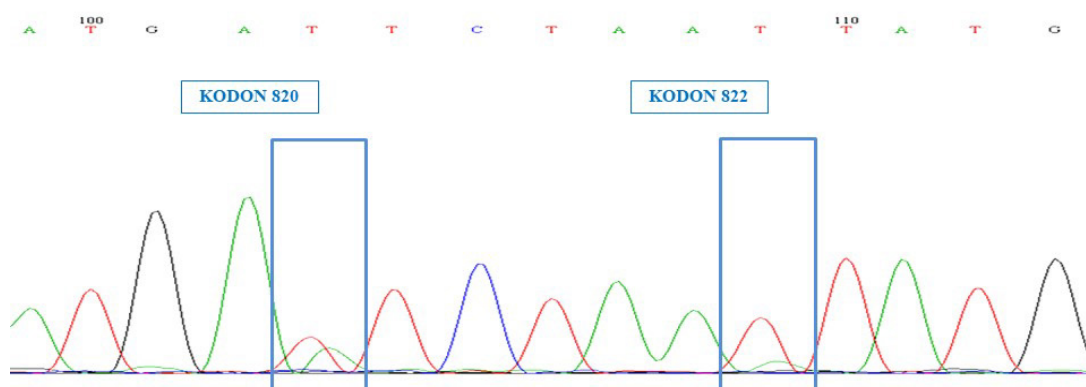
Tab. 22 Legenda: ● první molekulární analýza, ●● druhá molekulární analýza, ●●● třetí molekulární analýza, ●●●● čtvrtá molekulární analýza, ●●●●● pátá molekulární analýza, MA – mitotická aktivita

IM – imatinib mesylát, SM – sunitinib malát, PM – primární mutace, SeM- sekundární mutace

Poznámka: Při každé molekulární analýze kdy jsme zjistili sekundární mutace, jsme rovněž detekovali a potvrdili také primární mutace (PM a SeM)

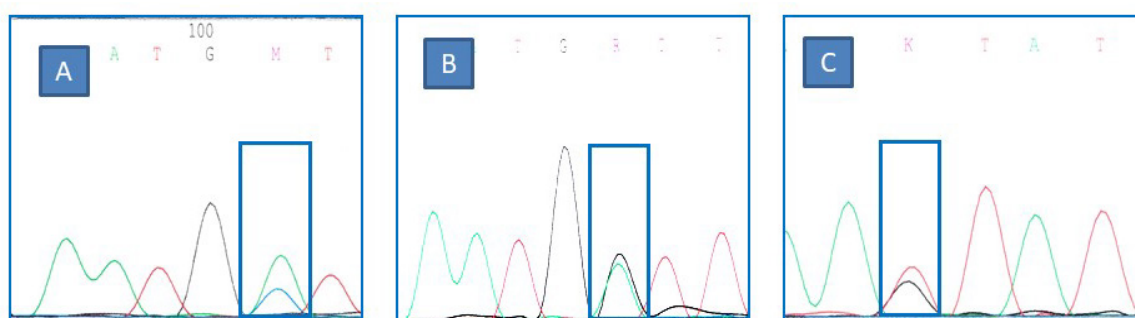
Podle dostupných informací 11 pacientů zemřelo na progresi nádoru, z toho jeden pacient s onemocněním GIST spáchal sebevraždu (pacient č. 9).  
Pět pacientů doposud žije.

U sekundárních mutací se setkáváme s výraznou heterogenitou v rámci jedné metastázy nebo nádorového ložiska (intranádorová heterogenita), a rovněž mezi jednotlivými metastázami (internádorová heterogenita). Významným klinickým dopadem intranádorové nebo internádorové heterogenity sekundárních mutací je rozdílná terapeutická odpověď na zvolený inhibitor RTK. Intranádorovou heterogenitu sekundárních mutací jsme identifikovali u pacienta č. 7 (Obr. 16). Přítomnost dvou rozdílných sekundárních mutací v jenom vyšetřovaném vzorku od pacienta č. 7 jsme ověřili rovněž analýzou DNA pomocí metody NGS.



**Obr. 16 Příklad intranádorové heterogenity sekundárních mutací.** U pacienta č. 7 jsme v jednom vzorku detekovali dvě rozdílné sekundární mutace v exonu 17 genu *KIT*. Konkrétně, substituci v kodonu 820 (p.D820E) a zároveň v kodonu 822 (p.N822K).

Významnou internádorovou heterogenitu jsme identifikovali u pacienta č. 9. V průběhu dvou let (v letech 2008 a 2009) jsme u pacienta vyšetřili 3 vzorky nádorů a detekovali přítomnost tří rozdílných sekundárních mutací v exonu 17 genu *KIT* (Obr. 17).



**Obr. 17 Příklad internádorové heterogenity sekundárních mutací.** Internádorovou heterogenitu sekundárních mutací jsme potvrdili u pacienta č. 9. V říjnu 2008 jsme vyšetřili 2 vzorky metastáz (z břišní stěny a z peritonea). O rok později, v květnu 2009 jsme analyzovali metastázu lokalizovanou v oblasti retroperitonea. Ve vzorku metastázy z břišní stěny jsme identifikovali substituci v kodonu 822 (p.N822K) v exonu 17 genu *KIT* (Obr. 17-A). V metastáze z peritonea jsme detekovali bodovou záměnu

v kodonu 820 (p.D820G) (Obr. 17-B). Ve třetím vzorku (květen 2009), jsme zjistili záměnu ve stejném kodonu 820 exonu 17 genu *KIT*, která ovšem vedla ke vzniku rozdílné aminokyseliny (p.D820A) (Obr. 17-C).

#### 4.1.2. Mutační analýza *KIT/PDGFR* nemutovaných *GIST*

U 55 vzorků (16.4 %) od 50 pacientů (17.3 %) jsme nedetkovali přítomnost mutací v genech *KIT* a *PDGFR*. V uvedené skupině *KIT/PDGFR* nemutovaných *GIST* jsme se rozhodli rozšířit molekulární vyšetření mutačního stavu o analýzu dalších genů. Souhrn analyzovaných genů společně s přehledem identifikovaných mutací a vyšetřených pacientů a vzorků předkládáme v Tab. 23.

**Tab. 23 Přehled detekce alterací ve skupině *KIT/PDGFR* nemutovaných *GIST***

GEN	VYŠETŘOVANÝ EXON	ALTERACE	POČET PACIENTŮ	PROCENTA (%)	POČET VZORKŮ	PROCENTA (%)
<i>BRAF</i>	15	p.V600E	2	4	2	3.6
<i>SDH KOMPLEX</i>	-	DELECE	8	16	10	18.2
<i>KRAS</i>	2-4	-	0	0	0	0
<i>NRAS</i>	2-4	-	0	0	0	0
<i>NFI</i>		SESTRÍHOVÁ VARIANTA	1	2.0	1	1.8
<i>AKT</i>	2	p. G16E	1	2.0	1	1.8
<i>ATR</i>	43	STOP KODON TGA→TAA	1	2.0	1	1.8
<i>PIK3CA</i>	9, 20		0	0	0	0
<i>FGFR1::TACC1</i>	-	-	0	0	0	0
<i>ETV6::NTRK3</i>	-	-	0	0	0	0
BEZ ALTERACE	-	-	37	74.0	40	72.8
CELKEM	-	-	50	100	55	100

V následujícím textu uvádíme podrobnější data a informace o zjištěných mutacích, případech alterací u pacientů s *GIST* bez přítomností mutací v genech *KIT/PDGFR*.

##### 4.1.2.1. Mutace v genu *BRAF*

Z analyzovaných 55 vzorků nádorů od 50 pacientů bez přítomnosti mutací v genech *KIT/PDGFR* jsme ve 2 vzorcích (3.6 %) od 2 pacientů (4 %) identifikovali mutaci p.V600E v genu *BRAF*. V krátkém souhrnu (Tab. 24) uvádíme přehled klinicko-

patologických údajů pacientů s detekovanými mutacemi v genu *BRAF* u *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST.

**Tab. 24 Přehled klinicko-patologických údajů u pacientů s mutací p.V600E**

PACIENT	POHLAVÍ	VĚK	LOKALIZACE NÁDORU	MORFOLOGIE	CD117	MUTACE V GENU <i>BRAF</i>
1.	MUŽ	77	TS	VŘETENOBUNĚČNÁ	POZITIVNÍ	p.V600E
2.	ŽENA	30	TS	SMÍŠENÁ	NEGATIVNÍ	p.V600E

Na průkaz získané rezistence jsme vyšetřovali přítomnost mutací v genu *BRAF* rovněž v souboru 76 pacientů s mutacemi v genech *KIT* nebo *PDGFR*A a bez přítomnosti sekundárních mutací, kteří byli léčeni IM. V uvedeném souboru pacientů jsme mutaci p.V600E v exonu 15 genu *BRAF* nedetekovali.

#### 4.1.2.2. Mutace v genech *SDH* komplexu

Ve skupině *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST jsme v 12 vzorcích DNA od 9 mladých pacientů analyzovali přítomnost mutací, nebo defektů v genech *SDH* komplexu (geny *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, a *SDHD*). Delece v genech *SDH* komplexu, ve smyslu rozsáhlejších delecí byly analyzovány prostřednictvím metody MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification). Menší delece nebo bodové záměny byly detekovány pomocí Sekvenování nové generace (NGS). Z analyzovaných 12 vzorků od 9 pacientů jsme delece v genech *SDH* komplexu detekovali v 10 (18.2 %) vzorcích u 8 (16 %) pacientů s *KIT/PDGFR*A nemutovaným GIST. Konkrétně jsme zjistili přítomnost delecí jednotlivých exonů nebo rozsáhlejší delece v genech *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, případně v kofaktorech *SDHAF1* nebo *SDHAF2*. U jednoho vzorku od pacientky č. 7 (11 let) jsme kvůli zhoršené kvalitě DNA nemohli provést analýzu alterací *SDH* komplexu. V případě pacienta č. 9 (66 let) jsme vyšetření provedli s ohledem na multifokální výskyt nádoru. Překvapivě byla u pacienta č. 9 současně s alteracemi v genech *SDH* komplexu (delece v genech *SDHB*, *SDHD* a kofaktoru *SDHAF1*) zjištěna přítomnost mutace v genu *NF1*. V případě pacientky č. 8 (45 let) jsme ani analýzou MLPA, ani metodou NGS přítomnost alterací (mutací, případně delecí) v genech *SDH* komplexu nezjistili. Přehled o zjištěných molekulárních změnách a histopatologických datech u pacientů s defektem genů *SDH* komplexu poskytuje Tab. 25.

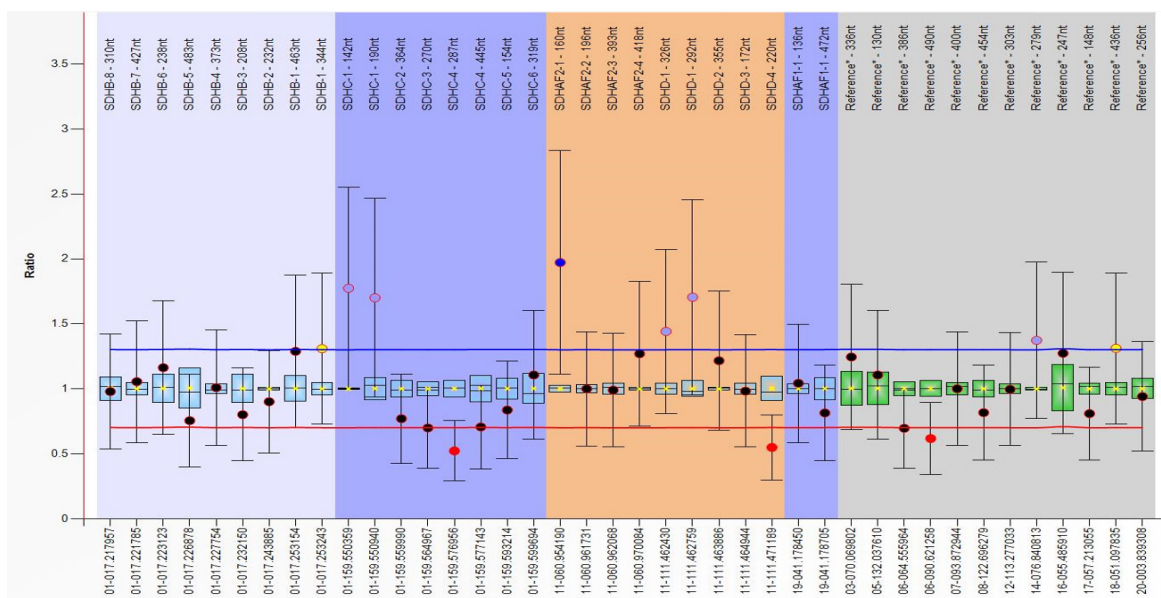
**Tab. 25 Přehled histopatologických dat pacientů s defektem SDH komplexu**

PACIENT	POHLAVÍ	VĚK	LOKALIZACE NÁDORU	MORFOLOGIE	GEN SDH KOMPLEXU	DEFEKT
1.	MUŽ	37	TENKÉ STŘEVO	EPITELOIDNÍ	<i>SDHB</i>	ZTRÁTA CELÉHO GENU
					<i>SDHC</i>	DELECE EXONŮ 2-4
					<i>SDHD</i>	DELECE EXONŮ 2-4
2.	ŽENA	33	POBRŠNICE (MALÁ PÁNEV)	VŘETENOBUNĚČNÁ (ANAPLASTICKÉ ZNAKY)	<i>SDHAF2</i>	DELECE EXONŮ 1-4
					<i>SDHD</i>	DELECE EXONŮ 1-4
3.	MUŽ	29	ŽALUDEK	VŘETENOBUNĚČNÁ	<i>SDHB</i>	DELECE CELÉHO GENU
4.	ŽENA	35	ŽALUDEK	VŘETENOBUNĚČNÁ	<i>SDHC</i>	DELECE EXONU 3
					<i>SDHD</i>	DELECE EXONU 4
5.	ŽENA	15	VZOREK 1 (2004) ŽALUDEK	VŘETENOBUNĚČNÁ	<i>SDHB</i>	DELECE EXONŮ 7-8
					<i>SDHC</i>	DELECE EXONU 1
			VZOREK 2 (2010) ŽALUDEK	VŘETENOBUNĚČNÁ	<i>SDHAF1</i>	DELECE EXONU 1
					<i>SDHAF2</i>	DELECE EXONU 1-3

**Tab. 25 - Pokračování**

PACIENT	POHLAVÍ	VĚK	LOKALIZACE NÁDORU	MORFOLOGIE	GEN SDH KOMPLEXU	DEFEKT
6.	ŽENA	15			<i>SDHB</i>	DELECE EXONU 1
					<i>SDHAF1</i>	DELECE
7.	ŽENA	11	VZOREK 1 (2003) TENKÉ STŘEVO	VŘETENOBUNĚČNÁ (ANAPLASTICKÉ ZNAKY)	<i>SDHAF1</i>	DELECE
			VZOREK 2 (2021) TENKÉ STŘEVO	VŘETENOBUNĚČNÁ	ZLÁ KVALITA DNA	BEZ MOŽNOSTI VYŠETŘENÍ
8.	ŽENA	45	ŽALUDEK	EPITELJODNÍ	NEDETEKOVALI	NEDETEKOVALI
9.	MUŽ	66	VZOREK 1 (2022) TENKÉ STŘEVO	VŘETENOBUNĚČNÁ	<i>SDHB</i> <i>SDHAF1</i> <i>SDHD</i>	DELECE DELECE EXON 4
			VZOREK 2 (2022) TENKÉ STŘEVO	VŘETENOBUNĚČNÁ	<i>SDHD</i>	EXON 4

Příklad výstupu z analýzy přítomnosti delecí v genech *SDH* komplexu pomocí metody MLPA u detské pacientky s *KIT/PDGFR*A nemutovanými geny a multifokálním výskytem nádoru následně poskytuje Obr. 18.



**Obr. 18** Analýza delecí v genech *SDH* komplexu pomocí metody MLPA

#### 4.1.2.3. Mutace v genu *NF1*

Mutaci v genu *NF1* jsme detekovali u pacienta (muž) s multifokálním výskytem nádoru ve stěně jejunu (2.0 % z *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST pacientů). Konkrétně jsme vyšetřili 2 vzorky rozsevu nádoru. V obou vzorcích byl zaznamenán nádor s vřetenobuněčnou morfológií, buňky byly uspořádané do fascikulů, bez mitóz a jaderných atypií. Molekulárním vyšetřením nebyla zjištěna přítomnost mutací v genech *KIT* a *PDGFR*A. Navzdory střednímu věku pacienta (66 let) byly obě vzorky s ohledem na multifokální výskyt nádoru vyšetřované na přítomnost defektů v *SDH* komplexu. S ohledem na finanční náročnost techniky NGS se diagnostické vyšetření DNA prostřednictvím metody NGS provádělo jenom z jednoho vzorku (konkrétní označení vzorku bylo 4D04). V uvedeném vzorku byla skutečně detekována mutace v genu *NF1* (1.8 % z *KIT/PDGFR*A nemutovaných vzorků). Konkrétně byla detekována sestřihová varianta c.5206-2A>G.

#### 4.1.2.4. Mutace v genech *AKT1* a *ATR*

Substituci v kodonu 16 (p. G16E) genu *AKT1* jsme detekovali u jednoho pacienta (muž, 83 let) (2.0 % z *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST pacientů). Nádor byl lokalizovaný v tenkém střevě. Morfologicky se jednalo o vřetenobuněčný nádor s mitotickou aktivitou



v počtu 5 mitóz na 5 mm<sup>2</sup>. Proliferační aktivita markeru Ki-67 byla stanovena na hodnotu 5 %. Při mutační analýze genu *ATR* jsme rovněž u jednoho pacienta (žena, 81 let) identifikovali substituční záměnu v exonu 43. Uvedená substituce nukleotidů vedla ke vzniku STOP kodonu TGA z původního STOP kodonu TAA. Nedošlo tedy k záměně STOP kodonu za jinou aminokyselinu. V tomto případě měla pacientka nádor lokalizovaný v žaludku. Morfologicky se jednalo o vřetenobuněčný nádor s vysokou mitotickou aktivitou (12 mitóz/5 mm<sup>2</sup>) o velikosti 130 mm. Expresí proliferačního markeru Ki-67 byla stanovena na 5 %.

#### 4.1.2.5. Přítomnost fúzních transkriptů *ETV6::NTRK* a *FGFR1::TACC1*

Fúzní transkripty *ETV6::NTRK* a *FGFR1::TACC1* jsme ve zbývajících 40 vzorcích od 37 pacientů s nemutovanými geny *KIT/PDGFR* nedetekovali ani v jednom případě.

## 4.2. Expresní analýza markerů proliferace a senescence

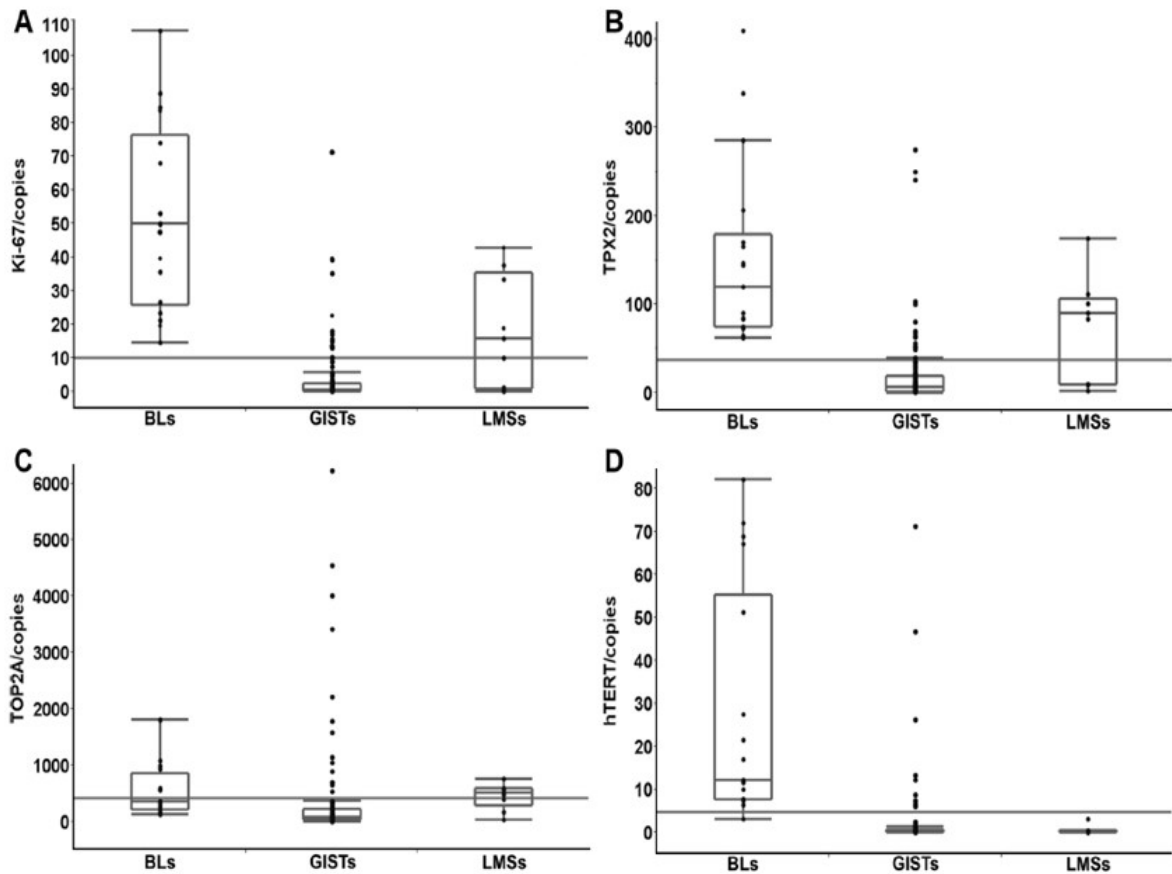
### 4.2.1. Expresí markerů proliferace a senescence ve skupinách GIST, BL a LMS

Kvantitativní analýzu expresních hladin mRNA Ki-67, TPX2, TOP2A a telomerázové podjednotky hTERT jsme provedli ve skupinách: 137 pacientů s GIST, 18 pacientů s Burkittovým lymfomem (BL) – kontrolní skupina s vysokou proliferační aktivitou a 9 pacientů s leiomyosarkomem (LMS). Hodnoty mediánů kopií naměřených expresních hladin mRNA vybraných molekulárních markerů v přehledu uvádí Tab. 26.

**Tab. 26 Hodnoty mediánů kopií hladin mRNA ve skupinách BL, GIST, a LMS**

MOLEKULÁRNÍ MARKER	POČTY KOPIÍ BL	POČTY KOPIÍ GIST	POČTY KOPIÍ LMS
KI-67	49.95	0.676	15.8
TPX2	120	6.88	90
TOP2A	355.5	78.5	517
hTERT	12,15	0.0556	0

Na základě statistického neparametrického Kruskal-Wallisova testu jsme zjistili nejvýznamnější rozdíly v kontrolní skupině pacientů s BL (Ki-67  $p < 0.0001$ , TPX2 ( $p < 0.0001$ ), TOP2A ( $p < 0.0001$ ), a hTERT ( $p < 0.0001$ ). Proliferační aktivita Ki-67, TPX2, TOP2A a aktivita hTERT u GIST a LMS byla významně nižší, než u BL (viz Obr. 19).



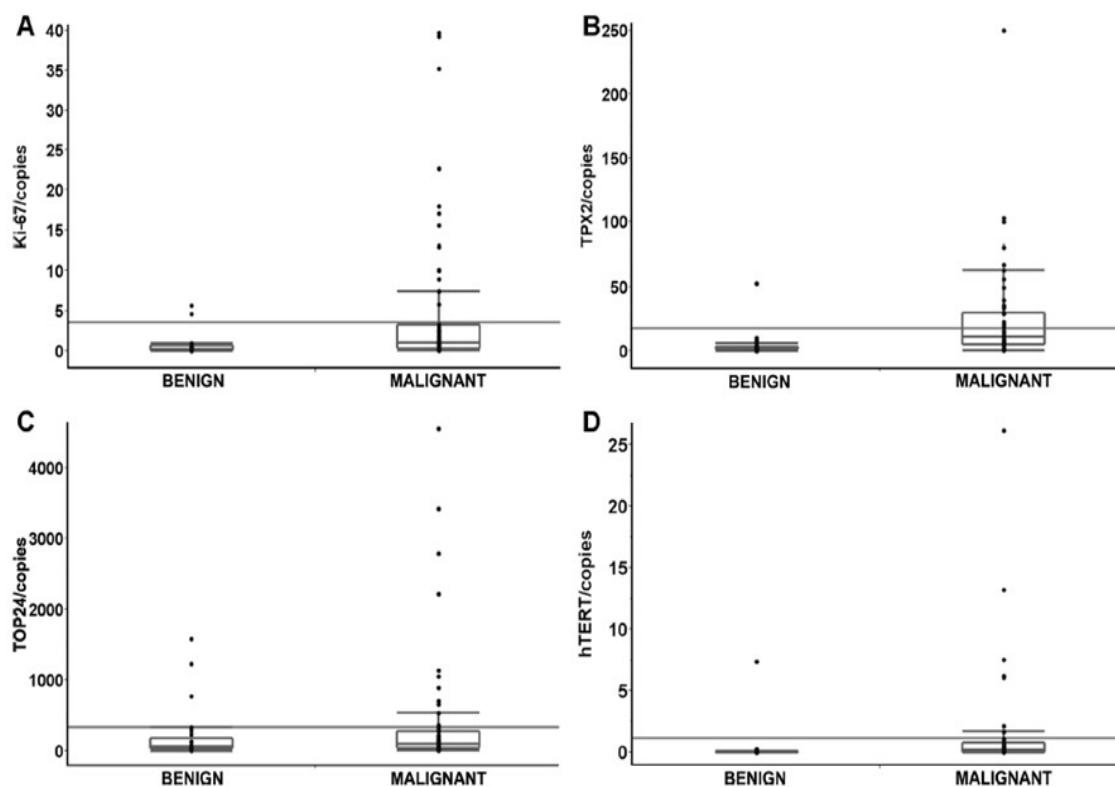
**Obr. 19** Normalizované hladiny mRNA markerů u GIST, BL, a LMS. Vertikální čáry Box-plot grafů zobrazují absolutní počty kopií hladin mRNA Ki-67 (A), TPX2 (B), TOP2A (C), a hTERT (D). Horizontální čáry reprezentují skupiny onemocnění (BL, GIST, a LMS). Krajní hodnoty boxů znázorňují 25. až 75. percentil. Hodnoty mediánů znázorňují vodorovné čáry v krabicových grafech. Spodní a vrchní podélné čáry vymezují 10. a 90. percentil. Jednotlivé body pak zobrazují odlehle hodnoty kopií.

#### 4.2.2. Exprese markerů proliferace a senescence u benigních a maligních GIST

Kompletní informace o mitotické aktivitě, anatomické lokalizaci a velikosti nádoru jsme byli schopni získat u 84 ze 137 pacientů s GIST. Na základě histopatologických kritérií stanovených WHO klasifikaci nádorů měkkých tkání a kostí (WHO, 2020) jsme pacienty rozdělili na skupiny s benigním potenciálem – 29 (34.5 %), a s maligním potenciálem – 55 (65.5 %). GIST s benigním chováním tvořily prognostické skupiny 1 (4 pacienti), 2 (13 pacientů), a 3a (12 pacientů) a GIST s maligním chováním prognostické skupiny 3b (3 pacienti), 5 (1 pacient), 6a (5 pacientů) a 6b (46 pacientů). V čase analýzy jsme neměli pacienty z prognostické skupiny 4. Rozdělení GIST do podskupin bylo dáno nízkým počtem pacientů pro statistické hodnocení.

Statistickým hodnocením jsme zjistili úzkou korelaci normalizovaných hladin mRNA exprese Ki-67 ( $p < 0.0001$ ), TPX2 ( $p < 0.0001$ ), a telomerázové podjednotky hTERT

( $p < 0.0001$ ) s maligním potenciálem GIST (prognostické skupiny 3b, 5, 6a, a 6b). Konkrétně, u pacientů s maligním potenciálem jsme prokázali vyšší hladiny mRNA Ki-67, TPX2 a hTERT než u pacientů ze skupiny s benigním potenciálem (prognostické skupiny 1, 2, a 3a). U normalizovaných hladin TOP2A jsme statistickou významnost mezi benigními a maligními nádory nezjistili ( $p < 0.1910$ ). Obr. 20 poskytuje přehled expresních hladin Ki-67, TPX2, TOP2A a hTERT ve skupinách benigních/maligních GIST.



**Obr. 20 Normalizované hladiny mRNA u benigních/maligních GIST.** Vertikální čáry Box-plot grafů zobrazují absolutní počty kopií hladin mRNA Ki-67 (A), TPX2 (B), TOP2A (C), a hTERT (D). Horizontální čáry reprezentují skupinu s benigním potenciálem (vlevo) a s maligním potenciálem (vpravo). Krajní hodnoty boxů znázorňují 25. až 75. percentil. Čáry v boxech reprezentují hodnoty mediánů. Spodní a vrchní podélné čáry vymezují 10. a 90. percentil. Jednotlivé body pak zobrazují odlehle hodnoty kopií. Mediány hodnot pro skupiny pacientů s benigním a maligním potenciálem byly následující: 0.168 a 1.05 u Ki-67, 1.89 a 11.1 pro TPX2, 61.2 a 96.7 pro TOP2A, a 0 a 0.193 pro hTERT.

#### 4.2.3. Exprese mRNA markerů proliferace a senescence ve vztahu k EFS a OS

Klinické informace, které jsme použili při vyhodnocování výsledků expresní analýzy, byly dostupné u 57 pacientů. Medián věku byl 65 let (rozmezí 22 – 91 let). Kompletní klinicko-patologické data pacientů s GIST společně s dobou přežívání do progresu a celkovým přežíváním jsou shrnuta v Tab. 27.

**Tab. 27 Přehled klinicko-patologických data a údaje o přežití**

PACIENT č.	VĚK POHLAVÍ	VELIKOST NÁDORU (mm)	MITOTICKÁ AKTIVITA 50 HPF	BIOLOGICKÉ CHOVÁNÍ	EFS měsíce	UDÁLOST	OS měsíce	SLEDOVÁNÍ
1.	62/Ž	50	<5	benigní	34	bez progresse	34	žije
2.	63/Ž	140	50	maligní	24	relaps	31	žije
3.	72/M	40	0	benigní	57	bez progresse	57	žije
4.	77/Ž	9	25	maligní	9	relaps	52	žije
5.	76/M	20	10	maligní	6	úmrť	6	úmrť
6.	73/M	50	45	maligní	49	úmrť	124	úmrť
7.	65/M	90	>5	maligní	14	progrese	43	úmrť
8.	65/Ž	metastázy v čase dg.	metastázy v čase dg.	maligní	9	metastázy	38	žije
9.	61/M	52	6-10	maligní	30	relaps	73	žije
10.	52/M	45	0	benigní	65	BP	65	žije
11.	85/Ž	18	0	benigní	2	ztráta kontaktu	2	ztráta kontaktu
12.	72/M	75	<5	benigní	27	bez progresse	27	žije

**Tab. 27 Pokračování**

PACIENT č.	VĚK POHLAVÍ	VELIKOST NÁDORU (mm)	MITOTICKÁ AKTIVITA 50 HPF	BIOLOGICKÉ CHOVÁNÍ	EFS měsíce	UDÁLOST	OS měsíce	SLEDOVÁNÍ
13.	61/Ž	30	5	benigní	68	bez progresse	68	žije
14.	64/M	metastázy v čase dg.	metastázy v čase dg.	maligní	45	metastázy	91	žije
15.	53/M	metastázy v čase dg.	metastázy v čase dg.	maligní	38	metastázy	86	úmrť
16.	77/M	metastázy v čase dg.	metastázy v čase dg.	maligní	5	úmrť	5	úmrť
17.	67/Ž	50	<5	benigní	102	progrese	105	úmrť
18.	69/Ž	neoper. nádor	neoper. nádor	maligní	4	metastázy	41	žije
19.	70/M	195	7	maligní	21	bez progresse	21	žije
20.	71/M	neoper. nádor	neoper. nádor	maligní	13	progrese	21	úmrť
21.	32/Ž	metastázy v čase dg.	metastázy v čase dg.	maligní	2	progrese	65	úmrť
22.	61/Ž	150	0	maligní	15	bez progresse	15	žije
23.	64/Ž	metastázy v čase dg.	metastázy v čase dg.	maligní	16	relaps	41	úmrť
24.	43/M	metastázy v čase dg.	metastázy v čase dg.	maligní	15	progrese	21	úmrť

**Tab. 27 Pokračování**

PACIENT č.	VĚK POHLAVÍ	VELIKOST NÁDORU (mm)	MITOTICKÁ AKTIVITA 50 HPF	BIOLOGICKÉ CHOVÁNÍ	EFS měsíce	UDÁLOST	OS měsíce	SLEDOVÁNÍ
25.	91/Ž	30	0	benigní	12	úmrť	12	úmrť
26.	31/M	60-100	>5	maligní	34	bez progresse	34	žije
27.	74/Ž	7	0	benigní	8	metastázy	15	úmrť
28.	71/Ž	190	<5	maligní	13	nedostupné	36	žije
29.	71/M	>100	nedostupné	maligní	15	relaps	41	úmrť
30.	62/M	45	<5	benigní	89	bez progresse	89	žije
31.	81/Ž	50	nedostupné	maligní	7	maligní	46	žije
32.	50/M	25	0	benigní	15	bez progresse	15	žije
33.	49/M	37	0	benigní	31	progrese	104	žije
34.	75/Ž	100	0	maligní	7	úmrť	7	úmrť
35.	66/Ž	40	3-4	benigní	1	ztráta kontaktu	1	ztráta kontaktu
36.	68/M	metastázy v čase dg.	metastázy v čase dg.	maligní	64	metastázy	116	žije

**Tab. 27 - Pokračování**

PACIENT č.	VĚK POHLAVÍ	VELIKOST NÁDORU (mm)	MITOTICKÁ AKTIVITA 50 HPF	BIOLOGICKÉ CHOVÁNÍ	EFS měsíce	UDÁLOST	OS měsíce	SLEDOVÁNÍ
37.	34/Ž	35	9	maligní	22	relaps	30	žije
38.	68/Ž	140	>5	maligní	36	bez progresse	36	žije
39.	51/Ž	20	NA	maligní	31	relaps	97	žije
40.	65/Ž	41	<5	benigní	15	metastázy	56	žije
41.	59/M	metastázy v čase dg.	metastázy v čase dg.	maligní	35	progrese	68	úmrť
42.	76/M	140	>5	maligní	12	nedostupné	33	žije
43.	61/Ž	25	165	maligní	23	relaps	24	žije
44.	45/M	70	<5	benigní	46	bez progresse	46	žije
45.	79/Ž	NA	5	benigní	5	metastázy	49	žije
46.	49/Ž	metastázy v čase dg.	metastázy v čase dg.	maligní	58	progrese	67	úmrť
47.	60/M	150	40	maligní	46	bez progresse	46	žije
48.	71/Ž	115	30	maligní	12	metastázy	52	žije

**Tab. 27 - Pokračování**

PACIENT Č.	VĚK POHLAVÍ	VELIKOST NÁDORU (mm)	MITOTICKÁ AKTIVITA 50 HPF	BIOLOGICKÉ CHOVÁNÍ	EFS měsíce	UDÁLOST	OS měsíce	SLEDOVÁNÍ
49.	44/M	nedostupné	25	maligní	14	progrese	105	ztráta kontaktu
50.	63/M	>10	>10	maligní	30	bez progrese	30	žije
51.	62/M	130	<50	maligní	60	bez progrese	60	žije
52.	53/M	nedostupné	29	maligní	8	metastázy	29	úmrtí
53.	69/M	150	52	maligní	1	relaps	15	úmrtí
54.	22/Ž	55	5	maligní	2	metastázy	83	žije
55.	72/Ž	15	3	benigní	7	relaps	18	úmrtí
56.	85/M	60-100	<5	benigní	19	úmrtí	19	úmrtí
57.	63/M	metastázy v čase dg.	metastázy v čase dg.	maligní	31	metastázy	32	úmrtí



Celkový přehled klinických údajů poskytuje Tab. 28.

**Tab. 28 Celkový přehled klinických dat**

POHLAVÍ	POČET PACIENTŮ	PROCENTA (%)
MUŽI	30	53
ŽENY	27	47
CELKEM	57	100
DOBA	POČET MĚSÍCŮ	MEDIÁN
EFS	1-102	16
OS	1-124	41
BIOLOGICKÝ POTENCIÁL	POČET PACIENTŮ	PROCENTA (%)
BENIGNÍ	18	31.6
MALIGNÍ	39	68.4

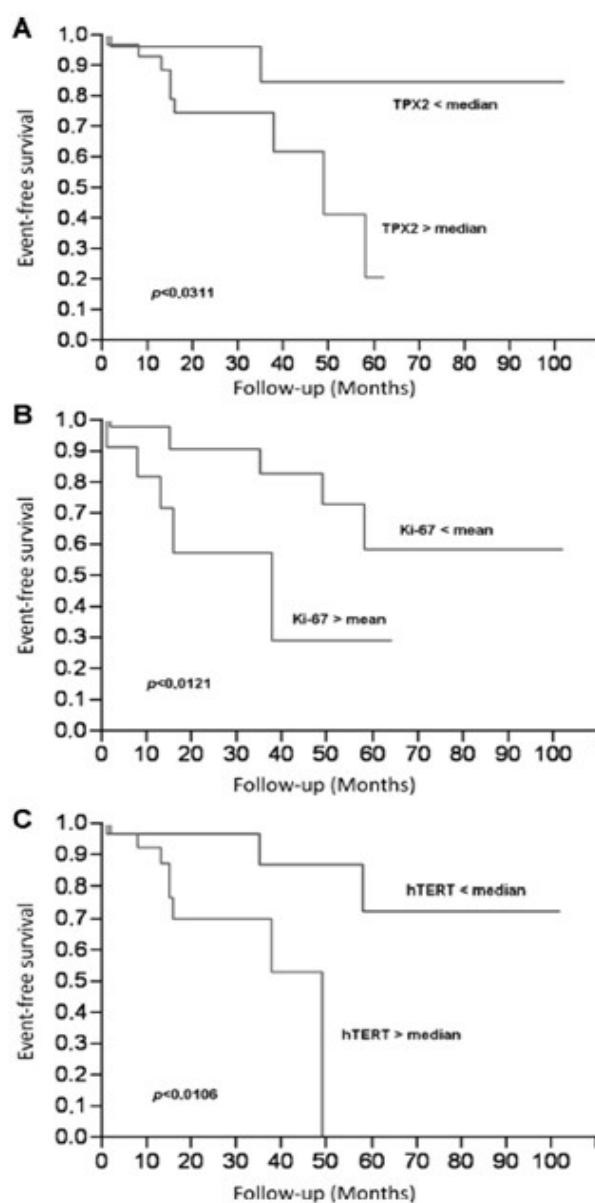
Expresní hladiny Ki-67, TPX2, TOP2A, hTERT pro sestrojení Kaplan-Meierových křivek přežití jsme hodnotili podle dvou kritérií. Prvním kritériem byla průměrná hodnota hladin mRNA. Druhým kritériem medián. Pacienti byli rozděleni do kategorií vysokého a nízkého rizika když hladiny mRNA byly vyšší/nížší, eventuálně rovné hodnotám průměru/mediánu. Rozpětí hodnot průměrů/mediánů shrnuje Tab. 29.

**Tab. 29 Přehled expresních mRNA hladin Ki-67, TPX2, TOP2A a hTERT**

MOLEKULÁRNÍ MARKER	ROZPĚTÍ HODNOT (POČTY KOPIÍ)	PRŮMĚR (POČTY KOPIÍ)	MEDIÁN (POČTY KOPIÍ)
Ki-67	0 – 71.3	<b>4.875</b>	<b>0.771</b>
TPX2	0 - 250	<b>23.837</b>	<b>7.01</b>
TOP2A	0 – 10 400	<b>625.483</b>	<b>84</b>
hTERT	0 – 71.2	<b>2.765</b>	<b>0.101</b>

Na základě průměrných hodnot jsme zjistili korelaci vyšších hladin mRNA Ki-67 a TPX2 s kratším EFS a rovněž s kratším OS ( $p < 0.0121$  a  $p < 0.0304$  pro Ki-67, a  $p < 0.0003$  a  $p < 0.0030$  pro TPX2). V případě, že jsme expresní hladiny mRNA rozdělili podle hodnot mediánů, korelovali s kratším EFS vyšší hladiny proliferačního markeru TPX2

( $p < 0.0311$ ) a telomerázové podjednotky hTERT ( $p < 0.0106$ ). Průběh EFS pomocí Kaplan-Meierových křivek zaznamenává Obr. 21.



**Obr. 21 Kaplan-Meierovy křivky** A) průběh EFS podle mediánu mRNA TPX2 ( $p < 0.0311$ ), B) průběh EFS rozdělené podle průměru mRNA Ki-67 ( $p < 0.0121$ ), C) průběh EFS rozdělené podle mediánu hTERT ( $p < 0.0106$ ).

Normalizované hladiny mRNA Ki-67, TPX2, TOP2A, a hTERT jsou vhodnými markery detekce proliferační aktivity a aktivity enzymu telomerázy. Pro stanovení prognózy, tj. rozlišení benigního a maligního potenciálu GIST, je vhodným a užitečným nástrojem stanovení expresních hladin mRNA Ki-67, TPX2 a hTERT.

## 5. DISKUZE

### 5.1. Metodické možnosti a limitace mutační analýzy

Mutační analýza vzorků solitárních nádorů skýtá několik úskalí, která mohou komplikovat správnou interpretaci výsledku identifikovaných molekulárních změn. Kontaminace vzorku nádoru nenádorovými buňkami, například buňkami hladkého svalstva, lymfocyty, nebo jinými zánětlivými buňkami může vést k relativnímu snížení nádorové DNA v analyzovaném vzorku (Sihto et al., 2005). Snížení počtu nádorových buněk při mutační analýze založené na technice amplifikace DNA pomocí PCR může následně způsobit falešně negativní výsledek. Důvodem falešné negativity výsledku je přednostní amplifikace nemutované alely vůči mutované alele (Lasota, Miettinen, 2008). Nezbytná je tedy histopatologická revize nádorové populace vzorku určeného pro mutační analýzu. Při diagnostickém vyšetření byly všechny námi analyzované vzorky podrobeny histologické revizi patologem.

V rámci mutační analýzy se s nižší citlivostí detekce změn v DNA setkáváme u FFPE vzorků nádorů. Vysvětlením uvedeného stavu je probíhající degradace nádorové DNA v archivních parafinových blocích. Bioptickým zpracováním parafinových bloků dochází k degradaci DNA v průběhu jednotlivých technologických postupů (Lasota, Miettinen, 2008). Konkrétně, formol užívaný jako fixační roztok, způsobuje fragmentaci DNA a tvorbu příčných vazeb mezi DNA a proteiny. Fragmentovaná DNA a vytvořené příčné vazby mohou narušit proces amplifikace specifického PCR produktu. Zhoršená kvalita DNA a míra její fragmentace stoupá s prodlužujícím se časem fixace a se stářím parafinových bloků (Greer et al., 1994; Merkelbach-Bruce et al., 2010). Fragmentace DNA je rovněž ovlivněna typem použitého pufru a hodnotou jeho pH. Obzvláště kritickou se pro FFPE vzorky stává extrakce DNA a amplifikace úseku DNA o délce přesahující 300 párů bází. Z důvodu standardizace metody se při izolaci DNA z FFPE vzorků doporučuje používání komerčních extrakčních kitů před individuálně vyvinutými postupy.

Archivní FFPE vzorky indikované k mutační analýze genů *KIT* a *PDGFRA* tvoří podstatnou část námi analyzovaných vzorků (85.0 %). Pro izolaci DNA, respektive RNA, jsme u všech vyšetřených FFPE vzorků použili certifikované kity (CE-IVD). Koncentraci izolované DNA (v ng/ul) jsme u všech vzorků měřili pomocí spektrofotometru NanoDrop ND 1000. Kromě koncentrace DNA jsme kvalitu (míru degradace) izolované DNA následně ověřovali amplifikací fragmentů o přesně definované velikosti (100, 200, 300,

400, 600 bp) podle publikace autorů van Dongen et al. (2003). V souvislosti se zhoršenou kvalitou DNA následkem její degradace u archivních FFPE vzorků, jsme v naší laboratoři rozšířili spektrum primerů pro amplifikaci exonu 11 genu *KIT*. Prostřednictvím 4 sad primerů jsme uspěli s amplifikací specifického PCR produktu ve všech 334 vyšetřovaných vzorcích.

Historicky je přímé sekvenování zlatým standardem pro detekci bodových mutací, inzercí a delecí menšího rozsahu. Na druhou stranu se jedná o časově náročnou techniku vyžadující dostatečný počet nádorových buněk ve vyšetřovaném vzorku (Blay et al., 2005). Nejnižší limit pro detekci mutací pomocí přímého sekvenování je stanoven na 20 % nádorových buněk ve vzorku (de Leng et al., 2016; Smits et al., 2014). Nutnost přítomnosti nejméně 20 % nádorových buněk souvisí s nízkou citlivostí metodiky přímého sekvenování. U vzorků s nedostatečným počtem nádorových buněk (méně než 20 %) může docházet k nesprávné interpretaci výsledků ve smyslu falešné negativity. V případě onkogenetických bodových mutací bývá obvykle pouze jedna ze dvou kopií genu mutovaná. V případě přítomnosti 20 – 25 % mutované DNA v heterozygotním stavu, by požadovaný počet nádorových buněk měl dosahovat minimálně 40 – 50 %. Při použití relativně málo citlivých metod detekce mutací jakou je sekvenování podle Sangera, se potřeba dostatečného podílu nádorových buněk zvyšuje (Smits et al., 2014). Vzorky nádorů určené pro námi prováděnou molekulární analýzu obsahovaly v histopatologickém nálezu alespoň 20 % nádorových buněk. V případě výskytu lokalizovaných oblastí nádorových buněk v parafinových blocích a histologických řezech z nich jsme použili techniku makrodisekce oblasti nádorových buněk od nenádorového pozadí. Nenádorové pozadí může být tvořeno rovněž úseky nekrotické tkáně při spontánní nekróze nebo po cílené terapii.

U solidních nádorů musíme rovněž počítat s heterogenní buněčností vyšetřovaného vzorku. Buněčnost u hematologických malignit, například u akutní myeloidní leukémie, dosahuje 90 až 95 %. U solidních nádorů rozpětí výskytu nádorových buněk ve vztahu ke stromatu většinou dosahuje 25 – 75 % (nádory prsů). U některých vzorků nádorů pankreatu je buněčnost pouze 5 %.

Kromě toho, v průběhu amplifikace specifických PCR produktů u mutační analýzy se setkáváme se zvýšeným počtem artefaktů. Příkladem je detekce substituční záměny vedoucí ke vzniku STOP kodonu v jednom amplifikačním PCR produktu a úplná absence uvedené mutace ve druhé nezávislé amplifikaci ze stejného vzorku DNA (Williams et al.,

1999). Doporučením pro předcházení detekce těchto amplifikačních artefaktů je provedení vždy dvou nezávislých amplifikací. Z toho důvodu byly všechny námi detekované primární a sekundární mutace v genech *KIT* a *PDGFRA*, mutace v genu *BRAF*, změny v genech *AKT1* a *ATR* vždy ověřeny druhou nezávislou amplifikací. Artefakty v první amplifikaci a jejich nepřítomnost v amplifikaci druhé, případně další nežádoucí fenomény, jsme zjistili ve vzorku s bodovou mutací v genu *ATR* a ve dvou vzorcích s bodovou záměnou v genu *AKT1*. Ve zmiňovaném vzorku s bodovou mutací v genu *ATR* jsme identifikovali synonymní záměnu, která vedla k substituci nukleotidu ve STOP kodonu TAA. Následkem substituce došlo ke vzniku STOP kodonu TGA. Uvedená záměna tedy nezpůsobila zrušení STOP kodonu, ani záměnu STOP kodonu za jinou aminokyselinu. V následujících dvou nezávislých amplifikacích jsme záměnu nukleotidu adeninu za guanin nedetekovali. Na základě histologické revize jsme v uvedeném vzorku zjistili přibližně 50 % nádorových buněk. Vzorek bude dále analyzován pomocí techniky NGS s ohledem na možnost vyšší citlivosti, hloubky čtení a paralelní amplifikace několika specifických produktů najednou. Synonymním mutacím se věnuje pozornost, protože mohou mimo jiné ovlivňovat vazbu substrátu nebo místo sestřihu v procesu posttranskripčních úprav (Supek, 2016).

Podobně jsme při analýze mutačního stavu exonu 2 genu *AKT1* detekovali přítomnost artefaktů u 2 pacientů. Ve vzorku nádoru (muž, 55 let) lokalizovaného v žaludku jsme zjistili přítomnost substituce v kodonu 43 genu *AKT1*. V následujících nezávislých amplifikacích nebyla substituce přítomna. Analýza mutačního stavu uvedeného vzorku zůstává otevřena a rovněž DNA z tohoto vzorku budeme analyzovat prostřednictvím NGS. U vzorku nádoru z tenkého střeva (muž, 83 let) jsme provedli 5 nezávislých amplifikací a substituci jsme potvrdili ve 3 případech. V uvedených 3 případech jsme zjistili záměnu p.G16E. Rovněž u tohoto nádoru jsme provedli histologickou revizi. Počet nádorových buněk ve vzorku tvořil více než 50 %. V exonu 2 genu *AKT1* se mutace typicky kumulují v kodonu 17 (p.E17K) a vyskytují se u nádorů mléčné žlázy, meningeomů, nádorů ovarií a v rámci Proteus syndromu (Chen et al., 2020).

Pro účely cílené terapie je nezbytné dosáhnout vysoké citlivosti detekce přítomnosti mutací. Proto jsou požadované specifické a senzitivní skrínigové metody, které umožňují rychlou analýzu vzorků. Z důvodu nižší citlivosti metody sekvenování dle Sangera jsme pro skrínig mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* zavedli a optimalizovali analýzu křivek tání s vysokým rozlišením (HRM – High Resolution Melting). HRM je všeobecně považovaná

za vysoce senzitivní molekulární metodu pro rychlou a efektivní detekci klinicky relevantních mutací (Chen et al., 2014; Ney et al., 2012). Metoda HRM je rovněž pokládána za spolehlivou preskriningovou metodu pro detekci změn v sekvenci DNA izolované z archivních vzorků (FFPE). Několik studií rovněž potvrzuje senzitivitu metody HRM pro skrining mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* (Holden et al., 2007; Willmore et al., 2004). Citlivost metody HRM pro detekci mutované DNA na nemutovaném pozadí je stanovená v rozpětí 3.1 % až 12.5 % (Ney et al., 2012). HRM představuje také vhodnou metodu pro skrining mutací s nízkou frekvencí výskytu, jako jsou např. mutace v exonu 2 genu *AKT1* nebo mutace v exonu 9 katalytické podjednotky genu *PIK3CA*. Na druhou stranu, přesnost detekce mutací prostřednictvím HRM mohou ovlivnit některé faktory. Mezi tyto faktory patří zdroj materiálu (FFPE versus nativní vzorky) a jeho příprava. Senzitivitu detekce mutací dále ovlivňuje délka ampliconu (amplifikovaného PCR produktu). Citlivost HRM je vyšší při délce ampliconu kolem 400 bp. Při délce nad 600 bp se snižuje. Faktorem, který ovlivňuje detekci alterací je také poměr GC párů. Nižší poměr GC párů může vést k falešně negativnímu výsledku.

Pro detekci mutací v genu *BRAF* jsme z uvedeného důvodu zavedli metodu alelově-specifické PCR (AS PCR). Citlivost metody AS PCR jsme stanovili na detekci 2.5 % nádorové mutované DNA (hodnota 1 % mutované DNA, kterou se nám povedlo detekovat je hraniční). Metoda AS PCR je v naší laboratoři kromě detekce substituce p.V600E ve vzorcích GIST využívána rovněž u molekulárního vyšetření melanomů, kolorektálních karcinomů, histiocytóz z Langerhansových buněk a u gliomů.

Nové možnosti v diagnostice a analýze mutací tvoří metoda NGS. Metoda NGS výrazně ovlivnila schopnost analyzovat aberace genů v nádorových tkáních. V posledních letech se tato technologie stala cenově dostupnou, co umožnilo studium nádorů v rámci celého genomu (Giardina et al., 2018). Technologie NGS může detekovat mutace, které jsou ve vzorku přítomny ve velmi malých frakcích buněk. Mimoto se metoda NGS v narůstající míře využívá pro detekci změn a variant u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním, konkrétně u onkologických onemocnění s aplikací cílené terapie. Metodu NGS jsme v našem souboru pacientů použili pro ověření přítomnosti sekundárních mutací, detekci získané rezistence, případně v rámci personalizované terapie pro identifikaci potenciálně cílitelných terapeuticky významných variant a fúzí. Ve spolupráci s Klinikou dětské hematologie a onkologie byla metoda NGS zvolena rovněž pro detekci mutací v genech *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, a *SDHD*.

Významným omezením úspěšné analýzy vzorku nádoru pomocí NGS je nutnost volby adekvátní nádorové tkáně a dosažitelnost po rutinním histopatologickém vyšetření (Morris et al., 2018). Výtěžek nukleových kyselin (DNA nebo RNA) ovlivňuje malé množství vstupního materiálu, problémem jsou ovšem obzvláště FFPE vzorky. Z tohoto důvodu je důležitá optimalizace celého procesu extrakce nukleových kyselin (Jennings et al., 2017). DNA získaná ze starších archivních FFPE vzorků (starších než 3 roky) často vykazuje přítomnost deaminace. Deaminace může, v závislosti na použité sekvenační metodě, významně zvýšit nežádoucí „pozadí“ konečných čtení u NGS. Jak jsme již uvedli výše, formaldehyd používaný při fixaci tkáně reaguje s DNA a proteiny a vytváří kovalentní příčné vazby. Formaldehyd v souvislosti s metodou NGS navíc způsobuje oxidační a deaminační reakce, a vede ke tvorbě cyklických derivátů bází. Tyto chemické změny mohou vést ke vzniku chyb získaných NGS dat s nízkým pokrytím, nebo u analýz navržených pro detekci variant s nízkou frekvencí alel (VAF - variant allele frequencies) (Jennings et al., 2017). V případě, že pracujeme s malým množstvím tkáně ve vzorku, počet genomových ekvivalentů přítomných ve vzorku nemusí být dostatečný ke konzistentní detekci VAF (Jennings et al., 2017). Některé bioinformační programy dokáží detekovat VAF kolem 1 %, nebo dokonce nižší. Při analýzách s nízkou hladinou detekce musíme ovšem počítat se dvěma současně působícími faktory. Na jedné straně jsou to chyby související s přípravou NGS knihovny, sekvenační chemií a zvolenými platformami. Na straně druhé nám přítomnost nežádoucích artefaktů v klinických NGS datech může interferovat se spolehlivostí detekce VAF (Jennings et al., 2017). Pro testování onkologických vzorků, které jsou charakterizovány vnitřní genetickou nestabilitou, minimum VAF pro detekci sekvenačních variant nekoreluje s procentem buněčnosti nádoru, nebo s procentem nádorových buněk, které nesou sekvenační změnu. V případě solidních nádorů detekci variant ovlivňují dvě rozdílné charakteristiky. První charakteristikou je heterogenita tkáně daná přítomností nenádorových buněk stromatu (cévy, buňky intersticia) a vlastní heterogenita nádorových populací. Maligní nádory často obsahují několik rozdílných buněčných klonů. Při interpretaci výsledků NGS analýz musíme zohlednit oba tyto fenomény. Heterogenita tkáně i nádorových buněk ovlivňují nejnižší limit detekce minoritních variant alel (Jennings et al., 2017).

## 5.2. Molekulární analýza primárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA*

### 5.2.1. Molekulární analýza primárních mutací v genu *KIT*

Primární mutace v genech *KIT* a *PDGFRA* jsme v souboru 334 vzorků (289 pacientů) identifikovali u 83.5 % vzorků, což je v souladu s dosavadními literárními studii (Bombac et al., 2020).

Mutace v exonu 11, ovlivňují autoregulační funkci proteinu KIT a vedou tak k aktivaci kinázy nezávislé na ligandu. Obecně jsou nádory s mutacemi v uvedeném exonu senzitivní na cílenou terapii IM. U primárních mutací v exonu 11 jsme prokázali charakteristickou širokou variabilitu identifikovaných mutací. Detekovali jsme případy mutací ve formě jednoduchých delecí, substitucí nukleotidů, nebo inzercí. Rovněž jsme identifikovali i případy delecí spojených se záměnou nukleotidů, nebo inzercí nukleotidů, složitějších delecí s inzercí a substitucí nukleotidů, případně jednoduchých duplikací ve smyslu interních tandemových duplikací.

Jednoduché delece jsme zjistili u 81 (38.6 %) vzorků. Nejčastěji jsme v souvislosti s jednoduchými delecemi identifikovali delece 2 kodonů, konkrétně kodonů 557 a 558 (31 vzorků, 38.2 %). Rovněž v několika dalších studiích byla delece kodonů 557 a 558 detekována nejčastěji (Szucs et al., 2017; Zhu et al., 2020). Zvýšená kumulace delecí v oblasti kodonů 557 a 558 se týká buď těchto 2 kodonů izolovaně, nebo dochází k delecí kodonů 557 – 558 společně s dalšími kodony lokalizovanými v jejich sousedství. Klinicky je delece kodonů 557 – 558 spojena s agresivnějším fenotypem GIST a s častějším výskytem metastáz (Wardelmann et al., 2003). Přítomnost uvedené delece celkově signalizuje horší prognózu (Barcelos et al., 2018). Navíc je spojena s vyšším podílem recidiv onemocnění (Dematteo et al., 2008). Kromě toho se delece kodonů 557 – 558 častěji vyskytuje u nádorů větších rozměrů (nad 50 mm) a u nádorů s vyšším mitotickým indexem ( $< 5$  mitóz/5 mm<sup>2</sup>). Podle studie autorů Joensuu et al. (2017) adjuvantní podávání IM (prodloužený režim) u pacientů s delecemi kodonu 557 – 558 snižuje riziko recidivy onemocnění. Ve studii autorů Martín et al. (2005) vysvětlují souvislost mezi častějším výskytem delecí v kodonech 557 – 558 s plněním funkce dvou aminokyselin, které kódují. Tryptofan na místě kodonu 557 plní totiž roli inhibitoru aktivity receptoru KIT. Delecí této aminokyseliny tedy dochází ke ztrátě inhibičního účinku kinázy a ke spuštění aktivační kaskády. Záměna aminokyseliny prolinu za lysin v kodonu 558 souvisí s vyšším stupněm konstitutivní fosforylace proteinu KIT.



Jednoduché substituce jsme v našem souboru pacientů zjistili v 57 (27.1%) vzorcích. Substituce měly podobnou tendenci shlukovat se v oblastech kodonů 557, 559 a 560. Bodové mutace v kodonu 557 jsme zjistili v 18 vzorcích (31.6 %), v kodonu 559 ve 25 vzorcích (43.9 %), a v kodonu 560 ve 12 vzorcích (21.1 %). Společně se substituce v těchto 3 kodonech (557, 559 a 560) vyskytovaly v 96.6 % případů. Ve zbývajících 3.4 % (2 vzorky) byly substituce detekovány jednotlivě, mimo jiné i v kodonu 576. Výsledky naší mutační analýzy se shodují se studií autorů Miettinen et al. (2005), kteří detekovali bodové mutace v exonu 11 ve 4 kodonech, konkrétně v kodonech 557, 559, 560 a 576. Rovněž autoři Mavroeidis et al. (2018) zaznamenali přítomnost mutací v exonu 11 v jeho proximální části, konkrétně mezi kodony 550 a 560. Ve 2 vzorcích pak zjistili přítomnost substitucí v distální části exonu, v kodonu 576. Přednostní výskyt mutací v proximální oblasti (tj. v 5' konci) exonu 11 souvisí s činností jednotlivých aminokyselin lokalizovaných na daných pozicích. Při přenosu signálu jsou tyrozinové zbytky na pozicích kodonů 568 (Tyr568) a 570 (Tyr570) prvními tyroziny, které jsou aktivovány po navázání ligandu. Přítomnost nebo absence aminokyselin Tyr568 a Tyr570 může mít rozdílný efekt v rámci regulace proteinu KIT, nebo v rámci aktivace následné signální dráhy (Bachet et al., 2013). Mimoto, heterozygotní versus homozygotní (ztráta nemutované alely genu *KIT*) stav genu *KIT* může být spojený se specifickým biologickým účinkem. Podle studie autorů Wozniak et al. (2012) homozygotní výskyt mutací v exonu 11 silně koreluje s maligním klinickým chováním nádoru.

Interní tandemové duplikace (ITD) jsme detekovali v 13 (6.2 %) vzorcích v rozsahu kodonů 571-591. Nejčastěji se vyskytují v distální (3' konec) části exonu 11 (Antonescu 2008; Hou et al., 2004; Miettinen, Lasota, 2013). Pacienti se zjištěnými ITD v exonu 11 mají prognosticky příznivější průběh onemocnění (Lasota et al., 2007).

Složitější mutace, zahrnující substituce společně s delecí a inzercí nukleotidů, jsme v našem souboru detekovali v 31 (14.8 %) vzorcích. Typicky se substituce vyskytovaly v oblasti kodonů 557, 558, nebo 560. Delece spojené s těmito substitucemi jsme často detekovali v kodonech následujících po kodonu s přítomnou záměnou, tj. v kodonech 558, 559, 561 a 562.

Mutace v exonu 9 genu *KIT* jsme v našem souboru vyšetřili v 16 vzorcích (5.7 %). Mutace postihující exon 9 narušují antidimerizační motiv a vedou ke spontánní homodimerizaci proteinu a tedy i k aktivaci receptoru. V exonu 9 je charakteristicky identifikována

duplikace kodonů 502 – 503. Nádory s uvedenou mutací se vyskytují výhradně v tenkém střevě a jsou asociovány s agresivnějším fenotypem (Antonescu et al., 2003).

Autoři Sharma et al. (2021) zjistili souvislost mezi žaludeční lokalizací a genetickým profilem nádoru. Souvislost anatomické lokalizace nádoru s přítomností některých mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* můžeme vysvětlit rozdílným původem ICC. Nádory s mutacemi v exonu 9 genu *KIT*, jak jsme již zmínili, se přednostně vyskytují v tenkém střevě. Tím se liší od nádorů s mutacemi v exonu 18 genu *PDGFRA*, které se nacházejí pouze v žaludku, mesenteriu nebo v omentu. Důvodem je, že nádory s mutacemi v exonu 9 genu *KIT* vznikají z odlišné podskupiny ICC buněk. Mutace v exonu 11 genu *KIT*, které se vyskytují nejčastěji, nacházíme naproti tomu v nádorech v rámci celého GIT. Možným vysvětlením je, že pocházejí z tzv. ubikvitního podtypu ICC buněk (Corless, 2014).

Pacienti s mutacemi v exonu 9 genu *KIT* mají prokazatelně prodlouženou dobu přežívání při podávání akcelerované dávky IM již v počátku terapie (tj. z 400mg/den na 800mg/den) (Demetri et al., 2002). Molekulární mechanismus primární rezistence u pacientů s mutacemi v exonu 9 může mít souvislost s rozdíly v biologii této skupiny GIST. Předpokládaným vysvětlením je alternativní aktivace proteinu KIT, která nevyžaduje jeho enzymatickou aktivitu. IM se může vázat pouze na inaktivní formu KIT. Z tohoto důvodu mechanismus aktivace RTK KIT nezávislý na jeho fosforylaci přispívá ke stabilizaci proteinu v aktivní konformaci, která je rezistentní na IM (Heinrich et al., 2006). Autoři Ravegnini et al. (2019) na druhou stranu uvádějí, že následkem duplikace kodonů 502 – 503 v exonu 9 dochází ke změnám konformace receptoru, které imitují vazbu fyziologického ligandu, tj. SCF, a tím podporují konstitutivní aktivaci. Molekulární analýza prováděná na našem pracovišti v případě zjištění mutací v exonu 9 napomáhá identifikaci potenciální primární rezistence a volbě vhodné terapeutické dávky.

Frekvence výskytu mutací v exonech 13 a 17 genu *KIT* není vyšší než 1 – 2 %. Primární mutace v exonu 13, který kóduje ATP-vazebnou doménu, se vyskytují sporadicky (Lasota et al., 2000). Navíc primární mutace v exonu 13 vzájemně interferují s auto-inhibiční funkcí juxtamembránové domény (exon 11). Mutace v exonu 13 genu *KIT* jsme v našem souboru zjistili u 8 vzorků (2.9 %). Shodně jsme u všech 8 vyšetřených vzorků (4 pacientů) stanovili substituci p.K642E. Nádory s mutacemi v exonu 13 jsou charakterizovány sníženou citlivostí na podávaný IM. Důvodem snížené citlivosti IM je neschopnost jeho vazby na mutací změněné ATP vazebné místo (Gramza et al., 2009).

Primární mutace v exonu 17 genu *KIT*, který kóduje aktivační místo receptoru (TK2), stabilizují aktivní konformaci proteinu. Bodovou záměnu v exonu 17 genu *KIT* jsme detekovali u 1 pacienta (0.4 %) - 1 vzorek (0.4 %). Konkrétně se jednalo o substituci v kodonu 822 (p.N822K). Autoři Lasota et al. (2008) ve své studii identifikovali primární mutace v exonu 17 v 4 kodonech – 822 (nejčastěji), 816, 820 a 823.

### **5.2.2. Molekulární analýza primárních mutací v genu *PDGFRA***

U převážné většiny GIST se primární mutace vyskytují v genu *KIT* (více než 80 %). U pacientů, u kterých se nezjistí přítomnost mutací v genu *KIT*, se v 5 – 8 % případů vyskytují mutace v genu *PDGFRA*. Mutace v genu *PDGFRA* jsme v našem souboru detekovali ve 44 vzorcích (13.2 %) od 41 pacientů (17.2 %).

Nejčastěji jsme v rámci genu *PDGFRA* identifikovali mutace v exonu 18 (34 pacientů - 14.3 %). V 75 % jsme zjistili bodovou záměnu p.D842V. Je již známo, že substituce p.D842V vede k primární rezistenci nádoru na cílenou terapii IM. Důvodem je vznik konstitučně aktivovaného proteinu (exon 18 kóduje enzymatickou TK2 doménu proteinu *PDGFRA*), který neodpovídá na terapeutickou intervenci. Ačkoliv je nejběžnější mutace v genu *PDGFRA* (p.D842V) primárně rezistentní na terapii IM, přibližně 30 % nádorů s jinými mutacemi než p.D842V jsou na terapii IM potenciálně senzitivní (Tajima et al. 2015). Simulací proteinové struktury v 3D modelu receptoru *PDGFRA* bylo zjištěno, že ani delece zahrnující kodony 842 až 845 v exonu 18, ani substituce p.V561D v exonu 12 negativně neovlivňují afinitu kinázy k IM. Delece kodonů 842 – 845 je přitom lokalizovaná v aktivačním místě, tj. TK2 doméně receptoru. Navíc delece zahrnuje i kodon 842, který má klíčovou roli ve vazbě terapeutika. Vysvětlením je absence kodonu 846 v rámci zmiňované delece. Přítomnost kodonu 846 totiž umožňuje opětovné konformační nastavení aktivačního místa, které neinterferuje s vazbou IM. Kromě toho, kodon 846 hraje důležitou roli v kontrole kývavého pohybu aktivačního místa, které je pro změnu spojeno s konformačním přesunem ATP vazebného místa z aktivní na neaktivní konformaci (Dileo et al., 2011).

Mutace v exonu 12 genu *PDGFRA* jsme detekovali v 2.1 % z *KIT/PDGFRA* mutovaných (5 vzorků od 5 pacientů) vzorků. Ve třech případech jsme zjistili substituční záměnu p.V561D. Deleci 5 kodonů (566 – 570) jsme identifikovali v jednom případě. Rovněž v jednom případě jsme zjistili rozsáhlejší deleci kodonů (565 až 571) společně s inzercí 6 nukleotidů. Podobných výsledků (substituci p.V561D a delece v exonu 12) dosáhli i další

autoři (Miettinen et al., 2005; Wozniak et al., 2012). Nádory s mutacemi v exonu 12 genu *PDGFRA* jsou na terapii IM senzitivní rovněž jako je tomu u exonu 11 genu *KIT*. Exon 12 genu *PDGFRA* totiž kóduje, stejně tak jako exon 11 genu *KIT*, juxtamembránovou oblast proteinu PDGFRA (Tornillo, Terracciano, 2006). U primární mutace p.V561D v exonu 12 genu *PDGFRA* dochází k výměně malého hydrofobního aminokyselinového zbytku (valin) za větší hydrofobní negativně nabitý aminokyselinový zbytek (kyselina asparágová), který je okolím dobře tolerovaný. Nedochozí tedy k významným změnám neaktivní (tj. „uzamčené či uzavřené“) konformace kinázy PDGFRA, tedy i vazebného místa IM (Dileo et al., 2011).

Mutace v exonu 14 genu *PDGFRA* jsme v našem souboru identifikovali ve 2 vzorcích (u 2 pacientů), tj. 0.7 % z *KIT/PDGFRA* mutovaných. U prvního pacienta jsme detekovali najednou dvě substituční mutace v exonu 14 genu *PDGFRA* (p.M642T a p.H659N). Mutace v kodonu 659 jsou v rámci exonu 14 genu *PDGFRA* nejčastější (Lasota et al., 2006). V souladu s naším vyšetřením rovněž autoři Bombac et al. (2020) ve své studii detekovali přítomnost 2 substitučních záměn v exonu 14 genu *PDGFRA*. V rámci mutační analýzy jsme se u druhého pacienta setkali s přítomností mutace p.P653L v exonu 14 genu *PDGFRA* a zároveň s přítomností druhé mutace p.D846H v exonu 18 genu *PDGFRA*. Zmiňovaný pacient byl na terapii inhibitory RTK. Pro posouzení, jestli se v případě substituce v exonu 14 jedná o primární, a v exonu 18 o sekundární mutaci je nutná analýza vzorku DNA před terapií. Vzorek DNA před nasazením terapie od uvedeného pacienta nebyl dostupný. Předpokládáme, že mutace v exonu 14 genu *PDGFRA* je primární mutací, a mutace v exonu 18 by mohla být mutací sekundární.

### **5.3. Molekulární analýza sekundárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA***

Rozhodujícím mechanismem sekundární neboli získané rezistence na terapii IM je vznik sekundárních mutací (Guo et al., 2009). Sekundární mutace vznikají v průběhu cílené terapie a jsou zodpovědné za selhání terapie a za progresi onemocnění. Problematika sekundárních mutací a následné sekundární rezistence je tedy významnou komplikací biologické terapie (precizní onkologie).

Mezi nejčastěji identifikované sekundární mutace patří mutace p.V654A v exonu 13 a mutace p.N822K v exonu 17 genu *KIT* (Zhu et al., 2020). V našem souboru jsme vyšetřili 42 vzorků od 16 pacientů, u kterých byla diagnostikována progresivní onemocnění. Přítomnost sekundárních mutací jsme zjistili v 29 ložiscích (69 %). V uvedeném souboru

16 pacientů jsme v rámci exonu 13 detekovali výhradně sekundární mutaci p.V654A. Mutaci p.V654A jsme detekovali buď jednotlivě u 6 z 16 analyzovaných pacientů (pacienti č. 2, 4, 5, 6, 12, 13), nebo společně s mutacemi v exonu 17 u jednoho pacienta (pacient č. 11).

Mutace v exonu 17 tvoří 30 – 40 % sekundárních mutací vedoucích ke vzniku rezistence (Yeh et al., 2017). Sekundární mutace v exonu 17 jsme v našem souboru zjistili u 9 pacientů v 16 ložiscích. Rovněž jako u sekundárních mutací v exonu 13 jsme mutace v exonu 17 detekovali buď jednotlivě – 8 pacientů (pacienti č. 1, 3, 7, 8, 9, 14, 15, 16), nebo s mutacemi v exonu 13 – zmiňovaný pacient č. 11. Mutace v exonu 17 se, na rozdíl od mutací v exonu 13 (výhradně mutace p.V654A), vyznačují velkou variabilitou. Sekundární mutace v exonu 17 jsme identifikovali v kodonech 809, 820, 822 a 823. Největší variabilitu identifikovaných sekundárních mutací jsme zaznamenali v kodonu 820 (exon 17). Konkrétně jsme v kodonu 820 zaznamenali substituční záměny p.D820Y, p.D820A, p.D820E, a p.D820G.

U jednoho pacienta (pacient č. 10) jsme detekovali přítomnost sekundární mutace v exonu 18 genu *PDGFRA*. Sekundární mutace v exonu 18 genu *PDGFRA* se vyskytují častěji, rovněž jako je tomu u sekundárních mutací v exonu 17 genu *KIT*. Na rozdíl od tohoto zjištění, autoři Wang et al. (2009) ve své studii zjistili sekundární mutaci v exonu 14 genu *PDGFRA*.

Za podstatný nález kromě samotné identifikace přítomnosti sekundárních mutací považujeme průkaz heterogenity nádorových populací po terapii. Mutační analýza rezistentních mutací v souboru zmiňovaných 16 pacientů odhalila jejich vysokou heterogenitu a to jednak co do počtu i typu mutací v rámci jednoho ložiska nádoru či jeho metastázy, jednak mezi jednotlivými metastázami.

U sekundárních mutací v exonu 13 jsme se setkali s internádorovou heterogenitou, kdy jsme detekovali mutace v jednotlivých odběrech jednak v uvedeném exonu a rovněž v exonu 17. Nejvýrazněji byla zmiňovaná internádorová heterogenita zjištěná u výše zmiňovaného pacienta č. 11. V průběhu tří molekulárních vyšetření (odběry z let 2017, 2018 a 2022) jsme u pacienta č. 11 měli možnost analyzovat 11 ložisek. Ve třech vzorcích z roku 2017 jsme v jednom vzorku zjistili přítomnost sekundární mutace v exonu 13 – p.V654A. Následně jsme v roce 2018 vyšetřili 7 vzorků. V části vzorků se sekundární

mutace vyskytovaly v exonu 17 (u 2 vzorků) – p.D820Y, a v části v exonu 13 (5 vzorků) – p.V654A. Ve vzorku z roku 2022 (1 vzorek) jsme detekovali mutaci p.D820Y v exonu 17.

Internádorovou heterogenitu u exonu 17 jsme na jedné straně identifikovali v souvislosti s mutací v exonu 13 (výše popsáný pacient č. 11) a na druhé straně v rámci mutací v exonu 17 (pacient č. 9). U pacienta č. 9 jsme ve 3 odběrech progresivních ložisek z let 2007 a 2008 detekovali tři rozdílné sekundární mutace v exonu 17. Všechny tři mutace se vzájemně lišily (p.N822K, p.D820A, p.D820G).

O důležitosti vyšetřování všech dostupných ložisek nádoru a o nerovnoměrné distribuci a přítomnosti sekundárních mutací v jednotlivých ložiscích jsme se přesvědčili při mutační analýze u pacienta č. 1. Molekulárním vyšetřením 3 ložisek jsme zjistili přítomnost sekundární mutace p.D820Y ve dvou analyzovaných vzorcích. Ve třetím vzorku jsme žádnou sekundární mutaci nedetekovali. V případě analýzy pouze tohoto vzorku bychom při neúplném vyšetření uváděli nepřítomnost sekundárních mutací a nejasný mechanismus získané rezistence.

Kromě výrazné heterogenity sekundárních mutací mezi jednotlivými ložisky, tzv. internádorovou heterogenitu jsme u pacienta č. 7 detekovali tzv. intranádorovou heterogenitu, tj. heterogenitu sekundárních mutací v rámci jednoho ložiska. Pro molekulární analýzu jsme měli dostupný vzorek z roku 2014 z paliativního chirurgického výkonu. Ve vyšetřovaném vzorku jsme zjistili současnou přítomnost dvou sekundárních mutací p.D820E a p.N822K v exonu 17. Intranádorová heterogenita sekundárních mutací byla v tomto případě ověřena pomocí techniky NGS. Pacient v témže roce, tj. v roce 2014 zemřel.

Autoři Heinrich et al. (2006) rovněž detekovali klonální evoluci a internádorovou heterogenitu sekundárních mutací. Ve své studii analyzovali několik vzorků resekovaných nádorů od 16 pacientů s progresí onemocnění. U 3 pacientů (3 z 16, 18.8 %) zjistili přítomnost polyklonálních sekundárních mutací. U jednoho pacienta vyšetřovali 3 vzorky nádoru. Ve dvou vzorcích byly přítomny sekundární mutace v exonu 13 genu *KIT* (p.V654A). Ve třetím vzorku detekovali sekundární mutaci v exonu 17 genu *KIT* (p.D816H). Přítomnost více než jedné sekundární mutace ve vyšetřovaných vzorcích nádorů u pacientů s pokročilým onemocněním byla identifikována v několika dalších studiích (Antonescu et al., 2005; Liegl et al., 2008; Wardelmann et al., 2010).

V jednom případě, konkrétně u pacienta č. 14, jsme detekovali primární mutaci v exonu 11 a sekundární mutaci v kodonu 809 (p.C809G) exonu 17. Sekundární mutaci v kodonu 809 exonu 17 genu *KIT* detekovali rovněž ve studii Heinrich et al. (2006). Mutaci detekovali u pacienta, u kterého byly kromě uvedených sekundárních mutací zjištěny 2 primární mutace (p.K642E a p.N822H). Výraznou internádorovou heterogenitu sekundárních mutací zaznamenali i autoři Lim et al. (2008). Konkrétně detekovali rozdílné sekundární mutace mezi jednotlivými vzorky a také rozdílné mutace ve dvou rozdílných exonech genu *KIT* (exon 13 a exon 17).

Lze shrnout, že přítomnost, počet a výrazná heterogenita (intranádorová a rovněž internádorová) sekundárních mutací významně ovlivňuje cílenou léčbu. Problémem současné doby je zvládnutí léčby pacienta s několika rozdílnými sekundárními mutacemi. Důvodem je rozdílná citlivost jednotlivých sekundárních mutací k daným inhibitorům (I., II., nebo III. generace). Sekundární mutace v TK1 doméně (tj. v exonu 13, nebo v exonu 14) vykazují citlivost na terapii sunitinib malátem (SM). Na druhé straně, přítomnost sekundárních mutací lokalizovaných v TK2 doméně (aktivační místo receptoru: exony 17 a 18), souvisí s nižším terapeutickým účinkem, případně s rezistencí na terapii (Mei et al., 2018; Ravegnini et al., 2019). Terapeutická účinnost sekundárních mutací lokalizovaných v exonu 17 byla zjištěna při terapii inhibitorem III. linie (regorafenib). Stanovení typu a lokalizace sekundárních mutací tedy významně ovlivňuje řízení terapeutické intervence u pacientů s pokročilým GIST.

Problematice sekundárních mutací v genu *PDGFRA* se věnovali autoři Grunewald et al. (2021). Autoři analyzovali mutace v exonech 13, 14 a 15 genu *PDGFRA* ve vzorcích plasmy a v dostupných případech ve vzorcích nádorů po terapeutické intervenci avapratinibem, používaným od roku 2020 pro léčbu pacientů s primárně rezistentní mutací v exonu 18 genu *PDGFRA* (p.D842V). Autoři ve své studii poukazují na důležitost neinvazivních metod odběrů vzorků. Význam vyšetření vzorků plasmy podle autorů podtrhává fakt, že v několika případech nebyly sekundární mutace detekovány ve vzorcích z progresivních ložisek, ale pouze ve vzorcích plasmy. Navíc je u pacientů s výraznou progresí onemocnění, selháváním jednotlivých systémů, nebo na paliativní léčbě chirurgické odebrání materiálu k cílenému vyšetření značně problematické technicky i z etického pohledu. Snahou je tedy možnost vyšetřovat nejen vzorky získané klasickým způsobem prostřednictvím chirurgické resekce nebo excize, ale také šetrnějšími a méně rizikovými přístupy. Využití méně invazivních metod odběru vzorků (technika jehlové

biopsie nebo detekce mutací v cirkulující nádorové DNA z plasmy) tak umožní získat bioptický materiál i od pacientů v pokročilém stadiu onemocnění a ve špatném klinickém stavu (Bertucci et al., 2006). Kromě toho je možné pomocí méně invazivních metod sledovat molekulární změny (přítomnost sekundárních mutací) v průběhu terapie.

### ***5.3.1. Změna morfolgie nádorových buněk u terapeuticky ovlivněných nádorů***

U terapeuticky ovlivněných nádorů často dochází ke změně morfolgie nádorových buněk (Pauwels et al., 2005). Většina GIST po selhání terapie nemění základní morfologický obraz ani IHC ověřovaný fenotyp. Setkáváme se ale například se změnou vřetenobuněčné morfolgie buněk na morfolgii epiteloidní, se změnami exprese proteinů detekovaných pomocí IHC vyšetření, ale také i bez nich. V této souvislosti vykazuje mnoho nádorů variabilní expresi proteinu KIT, nebo dochází k úplné ztrátě jeho exprese (Bickenbach et al., 2007; Liegl et al., 2008; Pauwels et al., 2005). U nádorů rezistentních na terapii IM často vznikají sekundární mutace jako hlavní mechanismus rezistence (Antonescu 2008). Méně často vznikají v primárním nádoru nebo v jeho metastázách metaplastické změny, trans-diferenciace nebo heterologní diferenciace (dediferenciace) (Liegl et al., 2009; Zheng et al., 2013). Autoři Vassos et al. (2011) popsali trans-diferenciaci GIST po terapii cíleným inhibitorem IM z vřetenobuněčného/epiteloidního vzhledu bez znaků hladkosvalové diferenciace na hladkosvalový typ. Trans-diferenciaci ICC buněk na buňky hladkosvalové ovlivňuje blokáda KIT signální dráhy (Torihashi et al., 1999). Podobně autoři Zheng et al. (2013) popsali nezvyklou změnu histopatologických znaků u pacienta s metastatickým GIST. Konkrétně došlo ke změně epiteloidní morfolgie v primárním nádoru na rabdomyoblastický fenotyp s pozitivitou desminu a myogeninu v metastatickém ložisku v játrech.

Histologická odpověď nádoru na cílenou terapii inhibitory RTK bývá heterogenní, a nekoreluje s klinickou odpovědí. Ve skupině GIST citlivých na terapii IM zjistili někteří autoři přítomnost znaků dobře diferencovaného hladkého svalstva. Nádory citlivé na terapii exprimovaly desmin, nebo jiné svalové markery (Díaz Delgado et al., 2011). Ve srovnání s nádory bez terapeutického zásahu vykazovaly nádory citlivé na terapii nápadnou expresi genů zapojených do diferenciace a funkce svalových buněk. Prostřednictvím chronické inaktivace signalizačních drah RTK KIT může tedy terapie IM vést k indukci transdiferenciace směrem k hladkosvalovému fenotypu. Rovněž autoři Agaram et al. (2008b) ve své studii uvádějí příklad histologické odpovědi nádorových buněk na terapii. V rámci histopatologické revize detekovali změnu vřetenobuněčné



morfologie nádoru před terapií na fenotyp embryonálního rhabdomyosarkomu po terapii. V souladu s uvedeným zjištěným, autoři Antonescu et al. (2013) prokázali u 8 pacientů náhlou dediferenciací vřetenobuněčného CD117 pozitivního nádoru do anaplastického CD117 negativního. Ve třech případech souvisela změna morfologie a fenotypu s terapií IM, ve zbývajících pěti případech se jednalo o *de novo* událost.

V našem souboru pacientů s detekovanými sekundárními mutacemi jsme změnu morfologie nádorových buněk po terapii (tj. v čase vzniku rezistence) zjistili u jednoho pacienta (pacient č. 1). Konkrétně jsme detekovali změnu vřetenobuněčné morfologie v celém rozsahu nádoru z roku 2009 na smíšenou morfologii (vřetenobuněčnou společně s epiteloidní) ve vzorku nádoru z roku 2016.

#### **5.4. Molekulární analýza *KIT/PDGFR* nemutovaných GIST**

Z celkového počtu diagnostikovaných GIST se v 10 – 15 % setkáváme s nepřítomností mutací v genech *KIT* nebo *PDGFR*, jak jsme mohli potvrdit i u našeho souboru nemocných. V naší studii jsme nemutovaný stav genů *KIT* nebo *PDGFR* zjistili u 55 vzorků (16.4 %) od 50 pacientů (17.3 %).

V minulosti byla skupina *KIT/PDGFR* nemutovaných GIST považována za terapeuticky nepostihnutelnou. Případně při použití cílené terapie s velmi nízkou léčebnou odpovědí nebo se jednalo o skupinu GIST primárně rezistentních. Recentně se ovšem pohled na molekulární diagnostiku a terapii *KIT/PDGFR* nemutovaných GIST výrazně změnil.

Molekulární analýza této skupiny GIST i pomocí metod NGS prokázala genetické alterace v genech kódujících důležité signální molekuly v jednotlivých aktivačních drahách, nebo vznik fúzních transkriptů ovlivňujících aktivitu transformovaných buněk. Zjištěné molekulární změny umožňují rozšíření nejen diagnostických, ale zejména terapeutických možností skupiny *KIT/PDGFR* nemutovaných GIST.

##### **5.4.1 Mutační analýza genu *BRAF***

Ve skupině *KIT/PDGFR* nemutovaných GIST byla detekována přítomnost mutací v genu *BRAF* v rozpětí 3 – 13 % (Agaimy et al., 2009; Daniels et al., 2011; Hostein et al., 2010; Rossi et al., 2015). GIST s mutacemi v genu *BRAF* postihují v rámci GIT různé části trávicího ústrojí. Mohou se vyskytovat v žaludku, v tenkém či tlustém střevu, v rektu, a rovněž v extragastrointestinální lokalizaci, například na peritoneu. Nejčastěji se však

nádory s mutacemi v genu *BRAF* vyskytují v tenkém střevě. Po morfologické stránce je u těchto nádorů charakteristický vřetenobuněčný typ buněk a příznivější klinický průběh.

V námi analyzovaném souboru *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST (55 vzorků od 50 pacientů) jsme substituci p.V600E v genu *BRAF* identifikovali ve 2 vzorcích (3.6 %) od 2 pacientů (4 %). Mutace p.V600E byla zjištěna ve vzorcích nádorů lokalizovaných v tenkém střevě u muže a u ženy. Autoři Agaimy et al. (2009) identifikovali přítomnost mutace p.V600E v genu *BRAF* v 7 % (2/28) případů s *KIT/PDGFR*A nemutovanými GIST. V obou případech byly mutace detekovány u mužů. Podobně, ve studii od autorů Hostein et al. (2010), byla ve skupině pacientů s nemutovanými geny *KIT/PDGFR*A a mutaci p.V600E zaznamenána predilekce mužského pohlaví (78%) a přednostní lokalizace nádorů v tenkém střevě (67%). Mutace v genu *BRAF* autoři nedetkovali ve skupině GIST s mutacemi v genu *KIT* nebo *PDGFR*A. Podobně autoři Daniels et al. (2011) zjistili mutaci p.V600E ve 3.5 % (3/87) pacientů s *KIT/PDGFR*A nemutovanými GIST. Na rozdíl od předchozí studie se v jejich souboru pacientů nádory s mutacemi v genu *BRAF* vyskytovaly častěji u žen. Ve studii Huss et al. (2017) autoři vyšetřovali mutace genu *BRAF* ve skupině 172 *KIT/PDGFR*A nemutovaných pacientů. Mutaci p.V600E detkovali v 3.9 % (7/172) případů. Výskyt mutací v genu *BRAF* považují za ojedinělý mechanismus onkogeneze u *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST.

Mutace v genech *KIT* a *BRAF* se při současných znalostech jeví vzájemně exkluzivní. To potvrzují i naše zkušenosti, kdy jsme substituci v kodonu 600 genu *BRAF* detkovali pouze u pacientů bez přítomnosti mutací v genech *KIT* nebo *PDGFR*A. Na druhou stranu, autoři Jašek et al. (2020) analyzovali skupinu 35 náhodně vybraných *KIT/PDGFR*A pozitivních GIST, u kterých zjišťovali přítomnost mutace p.V600E. V 8 případech detkovali koexistenci mutace p.V600E současně s mutacemi v genu *KIT* (5 případů), nebo v genu *PDGFR*A (3 případy).

Podle autorů Rossi et al. (2015) jsou mutace v genu *BRAF* spojeny nejen s primární, ale rovněž se sekundární rezistencí na terapii IM. V naší studii jsme pro objasnění sekundární rezistence u pacientů bez sekundárních mutací v genech *KIT/PDGFR*A vyšetřili soubor 76 pacientů. Mutaci p.V600E jsme v tomto souboru pacientů nedetkovali ani v jednom případě. Agaram et al. (2008b) identifikovali mutace v genu *BRAF* ve 4 % (3/61) pacientů s *KIT/PDGFR*A nemutovanými GIST. Navíc ve skupině pacientů (26) bez sekundárních mutací v genech *KIT/PDGFR*A a rezistentních na terapii IM detkovali u jednoho pacienta mutaci p.V600E. Lze uvažovat, že mutace p.V600E může reprezentovat alternativní

mechanismus rezistence nádoru na terapii IM. V další studii autorského kolektivu Curtin et al. (2006) byla popsána společná koexistence mutace p.V600E v genu *BRAF* s mutací p.K642E (exon 13) v genu *KIT*. Případně byla identifikována konkomitantní mutace v genech *BRAF* a *FGFR3* u pacientů s mutacemi v genu *KIT* (analyzováno a detekováno metodou NGS) (Mavroeidis et al., 2018). Ve studii autorů Falchook et al. (2013) byl prezentován případ terapie u GIST s mutacemi v genu *BRAF*. Pacientovi s mutací v genu *BRAF* byl v rámci cílené léčby indikován inhibitor kinázy BRAF (dabrafenib). Po 8 měsících terapie došlo k progresi onemocnění. Analýzou progresivních ložisek nádoru autoři zjistili přítomnost somatické mutace p.H1047R v genu *PIK3CA*. Substituce v genu *PIK3CA* může tedy kromě rezistence na terapii inhibitorem RTK vést rovněž ke vzniku získané rezistence na cílenou terapii BRAF inhibitorem.

Recentně se prostřednictvím komplexní molekulární analýzy podařilo v části *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST vysvětlit další mechanismus patogeneze transformace nádorových buněk. Zjistilo se, že se jedná o komplexní skupinu, kterou můžeme rozdělit na několik podtypů. V 20 – 40 % *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST se setkáváme s defektem genů *SDH* komplexu.

#### **5.4.2. Molekulární analýza defektů *SDH* komplexu**

Klinické chování GIST s defektem *SDH* komplexu se shoduje s chováním u pediatrických GIST a GIST v rámci Carneyovy triády. U všech je výrazná predominance výskytu nádoru v mladém věku. Po klinické stránce je rovněž typické dlouhodobé trvání onemocnění. Běžná je několik let trvající latence od nálezu primárního nádoru po vznik metastáz. Ve studii více než 750 GIST žaludku identifikovali Miettinen et al. (2011) defekt *SDH* komplexu v 8.7 % (66 pacientů ze 756). Ve skupině pacientů ve věku pod 20 let měli prakticky všichni defekt v některé z *SDH* podjednotek. Skupina pacientů ve věku pod 40 let byla z podstatné části tvořena pacienty s GIST s defektem *SDH* komplexu. U starších pacientů byl defekt *SDH* komplexu velmi vzácný. GIST s defektem *SDH* komplexu vykazovaly jasnou predominanci ženského pohlaví. Všechny vzorky z této skupiny shodně vykazovaly pozitivitu exprese proteinů *KIT* a *DOG1*. Všech 66 pacientů se žaludečním GIST a defektem *SDH* mělo negativní IHC vyšetření proteinu *SDHB*. Na druhé straně, mnoho GIST žaludku (zbývajících 690 z celkového množství 756, tj. 91.2 %) bylo IHC *SDHB* pozitivních. Autoři Gill et al. (2010) právě na základě IHC vyšetření positivity nebo negativity *SDHB* proteinu rozdělují GIST do dvou skupin. GIST s pozitivitou exprese *SDHB* zahrnují pacienty bez defektu *SDH* komplexu s mutacemi v genech *KIT*, *PDGFR*A,

*BRAF*, *NF1* apod. Skupina GIST bez exprese SDHB je tvořena nádory s defektem SDH komplexu. Výskyt mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* a současně v genech *SDH* komplexu byl vzájemně exkluzivní. Zajímavého výsledku dosáhli autoři Daum et al. (2012), kteří detekovali koexistenci mutace v genu *KIT* (exon 11 – delece kodonů 557 – 558) společně s mutací v genu *SDHD* (exon 1 - p.G12S). V souladu s obecnými charakteristikami SDH mutovaných GIST měly buňky epiteloidní morfologii, pozitivitu CD117 a lokální pozitivitu exprese proteinu SDHB. Podle jejich zjištění nemusí být mutace v genech *KIT/PDGFRA* a *SDH* komplexu mutačně exkluzivní.

V naší studii jsme zjišťovali přítomnost alterací v genech *SDH* komplexu pouze u pacientů bez přítomnosti mutací v genech *KIT*, *PDGFRA* a *BRAF*. Analýzu přítomnosti defektů nebo mutací v genech *SDH* komplexu jsme provedli u 12 vzorků od 9 pacientů. Přítomnost defektů genů *SDH* komplexu jsme detekovali u 8 pacientů (16 %) v 10 vzorcích (18.2 %). V převážné většině se jednalo o delece buď jednoho, nebo několika exonů genů *SDHB*, *SDHC*, nebo *SDHD*. Zjistili jsme také přítomnost delecí v genech pro kofaktory *SDHAF1* a *SDHAF2*. Autoři Janeway et al. (2011) zjistili přítomnost zárodečných mutací v genech *SDHB*, *SDHC*, a *SDHD* u jednotlivců s GIST bez osobní či rodinné historie paragangliomu. Autoři konkrétně analyzovali 34 pediatrických a *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST. U 18 % (6 pacientů) detekovali zárodečné mutace v genech *SDHB*, *SDHC* nebo *SDHD*. Všichni pacienti s mutacemi v genech *SDHB*, *SDHC* nebo *SDHD* byli mladí dospělí s multifokálním výskytem nádorů. U všech pediatrických GIST autoři dále potvrdili absenci exprese proteinu SDHB zjistitelnou pomocí IHC vyšetření (100 %, 18 z 18 vyšetřených vzorků). Autoři doporučují testování přítomnosti zárodečných mutací u pacientů s *KIT/PDGFRA* nemutovaným GIST, zejména u mladých jednotlivců, jak jsme sami také stanovili. Navíc uvedení autoři zjistili přítomnost zárodečných mutací u 50 % mužů. Tím se tato skupina GIST liší od typické predominance ženského pohlaví ve skupině *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST a od predominance dívek u pediatrických GIST. V souladu s předchozí studií rovněž další autoři doporučují testování zárodečných i somatických mutací v genech *SDH* komplexu *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST s IHC negativní expresí proteinu SDHB, přinejmenším v genech *SDHA* a *SDHB* (Pantaleo et al., 2014; von Mehren, Joensuu 2018).

V další studii autoři Boikos et al. (2016) definovali 3 molekulární podtypy pacientů s *KIT/PDGFRA* nemutovaným GIST. První skupinu tvořily GIST bez alterací genů *SDH* komplexu. Všechny nádory z této skupiny měly pozitivní expresi proteinu SDHB. Další

dvě skupiny byly charakterizovány defektem v genech *SDH* komplexu. Jednu z těchto skupin tvořili pacienti se somatickými, nebo zárodečnými mutacemi v genech *SDH* komplexu. Ve druhé skupině byla ve 22 % případů identifikována metylace promotoru genu *SDHC*. Methylace promotoru v rámci epigenetického mechanismu ovlivňování exprese genů vede k umlčení exprese genu *SDHC* (Giger et al., 2022). Pacienti s hypermetylovanou oblastí promotoru genu *SDHC* vykazovali společné charakteristiky. V převážné většině se jednalo o ženy v mladším věku, s nádorem lokalizovaným v žaludku a s častou přítomností metastáz (40 %) (Boikos et al., 2016). Hypermetylací promotorové oblasti genu *SDHC* se věnovali i další studie (Haller et al., 2014; Killian et al., 2014; Lou et al., 2020; Ricci et al., 2019). Autoři ve svých studiích zjistili přítomnost metylace ve skupině *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST s defektem v *SDH* komplexu, ale ne ve skupinách bez defektu *SDH* komplexu, případně *KIT/PDGFR*A mutovaných GIST. Detekce přítomnosti metylace promotoru genu *SDHC* má tedy kromě diagnostického účelu důležitý terapeutický význam. Pacienti s *KIT/PDGFR*A nemutovaným GIST a identifikovanou metylací promotoru genu *SDHC* mohou v rámci personalizované terapie profitovat z léčby inhibitory DNA metyltransferáz (Ravegnini, Ricci, 2019).

#### **5.4.3. Molekulární diagnostika v genech signální dráhy RAS/NF1**

##### *5.4.3.1. Mutace v genech KRAS, NRAS*

Další definovanou skupinou *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST je skupina bez defektu genů *SDH* komplexu. Do této skupiny patří GIST s alteracemi v RAS signální dráze (mutace v genech *BRAF*, *NF1*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*). Geny *KRAS* a *NRAS* hrají zásadní roli v patomechanizmu vzniku několika typů nádorů. V naší studii jsme v rámci komplexní molekulární analýzy pacientů s GIST zavedli zjišťování mutací v genech *KRAS* a *NRAS* následně po zavedení mutační analýzy genů *KIT*, *PDGFR*A, *BRAF* a *SDH*.

Autoři Miranda et al. (2012), kteří vyšetřovali mutační stav genů *KRAS* a *BRAF* ve skupině *KIT/PDGFR*A mutovaných a rovněž nemutovaných GIST, u 5 % (3/60) detekovali mutace v genu *KRAS* společně s *KIT/PDGFR*A mutacemi. Konkrétně identifikovali mutaci v kodonu 12 (p.G12D) a v kodonu 13 (p.G13D) genu *KRAS*. Navíc v jednom případě zjistili konkomitantní mutace v obou kodonech genu *KRAS* najednou, tj. p.G12A/G13D. Kromě toho u pacientů s mutacemi p.G12D a p.G12A/G13D současně detekovali přítomnost mutací v exonu 11 genu *KIT*. U pacienta s mutací p.G13D identifikovali konkomitantní mutaci v exonu 18 genu *PDGFR*A (p.D842V).

Naproti tomu, Lasota et al. (2013) analyzovali přítomnost mutací v genu *KRAS* ve skupině 514 GIST. V žádném z vyšetřovaných vzorků mutace v genu *KRAS* nedetekovali. Na základě této analýzy jsou mutace v genu *KRAS* u pacientů s GIST ojedinělou genetickou událostí. Rovněž Belinsky et al. (2009) zjišťovali přítomnost mutací v genech *HRAS*, *KRAS* a *BRAF* ve všech vzorcích nádorů s mutacemi a bez mutací v genech *KIT/PDGFR*. Mutace v genech *KRAS* nebo *HRAS* nezjistili ani v jednom případě. V jednom vzorku detekovali mutaci p.V600E genu *BRAF*. Ojedinělý výskyt mutací v genech ze skupiny *RAS* u pacientů s GIST potvrzuje také studie autorů Bombac et al. (2020). V jejich souboru 8 *KIT/PDGFR* nemutovaných pacientů nebyla ani v jednom případě detekována přítomnost mutace v genu *KRAS*.

Stejného výsledku bylo dosaženo i v našem souboru 40 *KIT/PDGFR/BRAF/SDH* nemutovaných pacientů. Ani u jednoho pacienta jsme neidentifikovali mutace v genech *KRAS* ani *NRAS*. V souladu s údaji publikovanými v recentní literatuře můžeme shrnout, že mutace v genech *KRAS* a *NRAS* nejsou v rozvoji GIST významné, alespoň ne z hlediska iniciace nádorového klonu. Pokud by se do budoucna prokázaly mutace v genech *KRAS* a *NRAS* u některých GIST, je třeba se soustředit na korelaci s klinickými projevy, biologickými vlastnostmi a dalším profilem těchto GIST.

#### 5.4.3.2. Mutace v genu *NF1*

Gen *NF1* (neurofibromin) kóduje protein, který negativně reguluje rodinu RAS GTPáz ve smyslu udržování těchto GTPáz v inaktivní formě, tj. RAS-GDP (Walker, Upadhyaya, 2018). Mutace v genu *NF1* vedou ke vzniku defektního proteinu neurofibrominu a následně vedou ke ztrátě jeho inhibiční úlohy při aktivaci onkoproteinu RAS. Jedinci s alteracemi v genu *NF1* mají vůči běžné populaci 34-násobné riziko vzniku GIST (Wu et al., 2021). GIST související s *NF1* se liší od sporadických GIST v několika ohledech. Velice častý je multifokální výskyt nádorů, přednostní lokalizace v tenkém střevě a vyšší frekvence větvenobuněčné morfologie (Valencia, Saif, 2014).

V naší studii jsme zjistili přítomnost mutace v genu *NF1* u pacienta (2 % *KIT/PDGFR* nemutovaných GIST pacientů) ve středním věku s multifokálním výskytem nádorů, s výraznou expresí proteinů CD117 i DOG1 a nepřítomností mutací v genech *KIT* a *PDGFR*. S ohledem na multifokální výskyt nádorů u tohoto nemocného jsme molekulární vyšetření mutačního stavu vzorku nádoru (přes střední věk pacienta) směřovali na detekci defektů v genech *SDH* komplexu. Molekulární analýza zahrnující i gen *NF1* prokázala přítomnost sestřihové varianty c.5206-2A>G v uvedeném genu současně se ztrátou genů

*SDHB*, *SDHAF1* a exonu 4 genu *SDHD*. V souladu s našim zjištěním autoři Belinsky et al. (2015) detekovali hemizygotní frameshift mutaci v genu *NF1* u 54 letého pacienta s GIST (tenké střevo) bez mutací v genech *KIT/PDGFRA/BRAF/SDH*. Mimoto u pacienta zjistili přítomnost frameshift mutace v genu *MAX* (MYC associated factor X). Studie uvedených autorů naznačuje, že inaktivační mutace v genu *NF1* mohou být onkogenetickým mechanismem této skupiny sporadických GIST. Mutace v genu *NF1* detekovali rovněž autoři Astolfi et al. (2020). U 3 pacientů z 26 (11.5 %) detekovali inaktivační mutace genu *NF1*. Autoři se zaměřili na *KIT/PDGFRA/SDH/RAS-P* nemutované GIST. Kromě toho, neobvykle vysoké procento (59 %) detekovaných patogenních mutací v genu *NF1* u „quaduple“ nemutovaných GIST (*KIT/PDGFRA/BRAF/SDH*) identifikovali ve své studii autoři Gasparotto et al. (2017). Na základě jejich analýzy hrají mutace v genu *NF1* významnou roli v patogeneze *KIT/PDGFRA/BRAF/SDH* nemutovaných GIST. Navíc uvedené výsledky poukazují na skutečnost, že významný podíl sporadických a „quaduple“ nemutovaných GIST jsou ve skutečnosti nedignostikovaní pacienti s mutací *NF1*. Z léčebného hlediska je z důvodu nízké efektivity terapie pomocí IM v této skupině GIST doporučeným terapeutikem SM (Ylä-Outinen et al., 2019). Autoři Fujimi et al. (2019) navíc prezentovali úspěšnou terapii prostřednictvím regorafenibu u pacienta s GIST asociovaným s neurofibromatózou 1.

#### 5.4.3.3. Mutace v genech *AKT1*, *PIK3CA* a *ATR*

Následně po analýze alterací v genech *BRAF*, *SDH* a *NF1* u *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST jsme se zaměřili na přítomnost mutací, případně na aktivaci intracelulárních kináz v signální dráze PIK3/AKT. Mutace v genech *AKT1*, *PIK3CA* a *ATR* jsme analyzovali ve výše uvedeném souboru 40 pacientů.

Intracelulární kináza *AKT1* je klíčovým členem jedné z nejčastěji aktivovaných drah ovlivňujících přežívání a proliferaci nádorových buněk (Carpten et al., 2007). Recentně narůstá počet studií, podle kterých somatická mutace p.E17K hraje v rozvoji nádorů specifickou roli (Chen et al., 2020). Autoři Kim et al. (2008) analyzovali soubor 731 pacientů se širším spektrem nádorových onemocnění s ohledem na zjištění přítomnosti mutace p.E17K. Kromě karcinomů prsu, kolorektálních karcinomů a nádorů ovarií vyšetřovali přítomnost mutace rovněž u nádorů plic, žaludku, hepatocelulárních karcinomů a u akutních leukémií. Mimo odpovídající oblast (kodon 17) v genu *AKT1* vyšetřovali danou lokalitu také v genech *AKT2* a *AKT3*. Mutaci p.E17K v genu *AKT1* zjistili ve 4.3 % (4/93) karcinomů prsu. V ostatních skupinách nádorů v genech *AKT1/2/3* nedetekovali

žádnou mutaci. Rovněž Bleeker et al. (2008) vyšetřovali rozsáhlou skupinu nádorů (karcinomy prsu, plic, ovarií, kolorektální karcinomy, karcinomy pankreatu, melanomy a glioblastomy) na přítomnost substituce p.E17K v genu *AKT1*. Uvedená substituce byla přítomna pouze u karcinomů prsu (5.8 %), u kolorektálních karcinomů (1 %), a u nádorů plic (0.6 %). Na přítomnost mutace p.E17K u pacientů s GIST, s nádory prostaty, maligními meningeomy, hepatoblastomy, karcinomy jícnu, laryngu a urotelu se zaměřila studie autorů Eom et al. (2009). Mutaci p.E17K nedetkovali v žádném z uvedených onemocnění.

V naší studii jsme v jednom případě (muž, 83 let) detkovali mutaci v kodonu 16 genu *AKT1* (2 % z *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST pacientů). Konkrétně se jednalo o substituci aminokyseliny glycinu za kyselinu glutamovou (p.G16E). Ve shodě s mutací v kodonu 17 (p.E17K) je substituce p.G16E lokalizována v PH doméně kinázy AKT1, která zodpovídá za její konstitutivní aktivaci. Mutace p.E17K může kromě uvedené aktivační funkce vést ke snížení citlivosti nádorových buněk k inhibitorům kináz. Z klinického hlediska se na druhé straně substituce p.E17K stává potenciálním cílem pro individualizovanou terapii pacientů (Carpten et al., 2007). Rovněž autoři Kozinova et al. (2021) považují kinázu AKT za slibný terapeutický cíl. Na základě studií na GIST buněčných liniích a preklinických modelech doporučují v terapii GIST kombinaci inhibitorů KIT i AKT.

U karcinomů prsu se kromě mutací v genu *AKT1* vyskytují mutace v genu *PIK3CA* (40 % invazivních karcinomů prsu). Uvedené mutace se objevují v časných stádiích vývoje tohoto nádoru. Přítomnost mutací, nebo změn v signální dráze PI3K/AKT, má kromě patomechanizmu vzniku těchto nádorů rovněž významný terapeuticko-indikační význam (Starzyńska et al., 2020). U mutací v genu *PIK3CA* můžeme využít terapeutického zásahu inhibitory PI3K. U nádorů plic je klinicky úspěšná kombinovaná terapie inhibitory aktivovaných PI3K a MAPK signálních drah. V přehledné studii autorů Ney et al. (2012) sledovali výskyt mutací v genu *PIK3CA* v rozsáhlém spektru nádorů. Kromě karcinomů prsu prezentují přítomnost mutací uvedeného genu například u kolorektálních karcinomů (s frekvencí 32 %), karcinomů endometria (15 – 36 %), nebo u glioblastomů (5 – 26 %). U GIST byly mutace v genu *PIK3CA* detekovány ve skupině primárních GIST velkých rozměrů a metastatických GIST. Autoři Lasota et al. (2016) analyzovali přítomnost mutací v genu *PIK3CA* v souboru 529 pacientů s GIST. U 10 pacientů identifikovali mutace v genu *PIK3CA*. V 9 případech byla současně s mutací v genu *PIK3CA* přítomná mutace



v genu *KIT*. Navíc v jednom vzorku nádoru autoři zaznamenali přítomnost dvou rozdílných mutací v genu *PIK3CA*. Haefliger et al. (2020) identifikovali přítomnost mutace v exonu 9 genu *PIK3CA* (p.M1043I), která u GIST dosud ještě nebyla rozpoznána. Chen et al. (2018b) prostřednictvím metody NGS analyzovali soubor 38 vzorků na přítomnost mutací ve 14 onkogenech. V 10 % (4 případy) zjistili přítomnost mutací v exonech 9 a 20 genu *PIK3CA* (p.E542K, p.E545K, a p.H1047Y). Aktivace mTOR signální dráhy je charakterističtější pro *PDGFRA* mutované a *KIT/PDGFRA* nemutované GIST, než pro *KIT* mutované GIST. Mutace v genu *PIK3CA* tak mohou hrát významnou roli v patogeneze *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST.

Kromě aktivace GIST může přítomnost mutací v genu *PIK3CA* zodpovídat za rezistenci na inhibitory RTK. Důvodem je již zmiňovaná aktivace alternativní signální dráhy PI3K/AKT/mTOR. Molekulární analýza mutačního stavu genu *PIK3CA* tak může identifikovat primární a metastatické GIST s předpokládaným rozvojem rezistence k inhibitorům RTK. Příkladem je studie autorů Daniels et al. (2011), kteří u pacienta s GIST s mutací v exonu 11 genu *KIT* současně zjistili mutaci v genu *PIK3CA* (p.H1047L). Na druhou stranu, analýza mutací *PIK3CA* je v současnosti jednou z nejčastějších onkologických indikací pro terapeutické ovlivnění několika onemocnění. Identifikace mutace v genu *PIK3CA* tedy umožňuje personalizovanou terapii při selhání klasických léčebných postupů (Kaboli et al., 2021; Madsen et al., 2018; Mateo et al., 2020). Z důvodu možného terapeutického cíle jsme mutační stav genu *PIK3CA* analyzovali i v našem souboru *KIT/PDGFRA/BRAF/SDH/NFI* nemutovaných pacientů. Mutace jsme analyzovali v exonech 9 a 20. Ani v jednom případě jsme přítomnost patogenní a terapeuticky postihnutelné varianty nezjistili.

Udržování stability genomu částečně závisí na náležité regulaci odpovědi buňky na poškození DNA a na integritě DNA reparačního systému. Poškození tohoto velmi citlivého systému může vést ke vzniku nádoru. Klíčovou roli v rozpoznávání poškozené DNA sehrávají 2 kinázy. První kinázou je ATM (ataxia-telangiectasia mutated), druhou ATR (ATM and Rad3-related). ATM je zapojena výlučně do aktivace oprav dvouvláknových zlomů (Liu et al., 2005). ATR je kináza naproti tomu zapojená do aktivace oprav poškozené DNA ionizačním zářením a UV zářením. ATR se podle všeho podílí na udržování stability fragilních míst. Snížením exprese ATR tedy dochází ke zlomům v těchto místech (Liu et al., 2005). U GIST je přítomnost mutací v genu *ATR* výjimečná a je spojená s výskytem u *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST (Shi et al., 2016).

Na přítomnost mutací v genu *ATR* jsme se zaměřili i v našem souboru *KIT/PDGFR*A nemutovaných pacientů. U jedné pacientky (81 let) jsme identifikovali substituční záměnu v exonu 43 (2 % z *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST pacientů). Uvedená substituce nukleotidů vedla ke vzniku STOP kodonu TGA z původního STOP kodonu TAA. Nedošlo tedy k záměně STOP kodonu za jinou aminokyselinu. Jedná se o synonymní mutaci, pořadí AMK je tedy zachováno beze změny. Na druhou stranu, je známo, že ačkoliv nedošlo ke změně aminokyseliny, synonymní mutace jsou u nádorů člověka často tzv. řídicími neboli hnacími mutacemi (driver mutations), které ovlivňují vznik nádoru. Autoři Supek et al. (2014) analyzovali více než 3.000 exomů asociovaných s nádory a rovněž více než 300 genomů. Ve své studii zjistili, že synonymní mutace přispívají ke vzniku nádoru. Molekulární mechanismy, kterými se synonymní mutace podílejí na vzniku nádoru, jsou rozdílné, nejčastěji jsou spojeny se změnami v sestřihových místech. Na synonymní mutace tedy musíme nahlížet jako na alterace, které mohou souviset s rozvojem nádoru.

#### **5.4.4. Fúze genů *NTRK* a *FGFR***

Třetí molekulárně definovanou skupinou *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST, bez alterací v genech *SDH* komplexu a RAS signální dráhy (RAS-P) jsou tzv. „quadruple“ nemutované nádory charakterizované fúzemi *NTRK*, *FGFR* genů, případně mutacemi v těchto genech.

U několika hematologických a solidních nádorů hrají přestavby chromozomů nebo vzniklé fúzní transkripty významnou roli v rozvoji nádorové transformace buněk. Kromě objasnění mechanismu onkogenetické transformace buněk, poskytuje diagnostika přítomnosti fúze genů nebo přestaveb chromozomů efektivní a účinnou strategii v terapii těchto nádorových onemocnění. Rodina genů *NTRK*, podobně jako jiných genů, je předmětem alterací, zahrnujících i fúze. Fúze zahrnující proteiny z rodiny TRK podporují nádorovou transformaci navozením konstitutivní buněčné proliferace a přežívání.

Účinnost inhibitorů fúzních kináz TRK byla prokázána u pacientů s *NTRK* přestavěnými nádory (Kheder, Hong, 2018). Brenca et al. (2016) jako první detekovali přítomnost chimérického transkriptu *ETV6::NTRK3* u 5 pacientů s GIST (bez mutací v genech *KIT*, *PDGFR*A, *RAS* dráhy a defektů *SDH* komplexu). Skupině GIST bez mutací v genech *KIT/PDGFR*A/*RAS* se věnovali rovněž autoři Shi et al. (2016). Na základě metody genomového profilování (CGP, comprehensive genomic profilig) mutovaných a nemutovaných GIST autoři zjistili častější přítomnost mutací v 7 genech (*ARID1B*, *ATR*, *FGFR1*, *LTK*, *SUFU*, *PARK2* a *ZNF217*). U dvou pacientů byly zjištěny fúze genu

*FGFR1*, konkrétně *FGFR1::HOOK3* (*FGFR1* intron 17 - *HOOK3* intron 4) a *FGFR1::TACCI* (*FGFR1* intron 17 - *TACCI* intron 6). U jednoho pacienta byla identifikována fúze *ETV6::NTRK3*, která byla senzitivní na terapii inhibítorem TRK. Analýza mutačního stavu, nebo expresního profilu *KIT/PDGFR/AS/SDH* nemutovaných GIST (tzv. „quadruple“) byla provedena i ve studii Nannini et al. (2014). Důležitým poznatkem bylo zjištění, že skupina „quadruple“ nemutovaných GIST výrazně exprimovala onkogeny *ERG* a *NTRK2*. Profilování alterací nových genů (např. ze skupiny *NTRK* nebo *FGFR*) u *KIT/PDGFR* nemutovaných GIST pomáhá tedy objasnit změny vedoucí k transformaci buněk podobně jako je tomu u *KIT/PDGFR* mutovaných GIST (Cao et al., 2022). Navíc má identifikace těchto alterací významný dopad v rámci personalizované léčby (terapeutické ovlivnění v rámci precizní onkologie) (Zito Marino et al., 2020).

V rámci naší studie jsme přítomnost fúzního transkriptu *ETV6::NTRK3* nedetekovali. U jednoho vzorku jsme provedli vyšetření přítomnosti fúzního transkriptu *ETV6::NTRK3* prostřednictvím metody NGS (panel Fusion Plex Lung Kit V2). Analýza dat získaných prostřednictvím NGS přítomnost fúzního transkriptu *ETV6::NTRK3* v uvedeném vzorku nepotvrdila. Rovněž v našem souboru *KIT/PDGFR* nemutovaných GIST nebyla detekována přítomnost fúzního transkriptu *FGFR1::TACCI*.

## 5.5. Expresní analýza proliferace a senescence

Progrese onemocnění má zásadní dopad na klinický stav a kvalitu života pacientů. Stanovení biologického rizika a určení agresivního chování je základním parametrem při diagnostickém vyšetření. Zjištění prognostického rizika má následně výrazný dopad na plánování léčby. U GIST, stejně tak jako u jiných nádorových onemocnění, se setkáváme s několika klasifikačními systémy. Spektrum biologického rizika GIST je široké. Zahrnuje nádory benigní, nádory s nejasným biologickým potenciálem a rovněž nádory zřetelně maligní, s vysokým rizikem progrese (Miettinen et al., 2002). Ovšem i benigní nádory menších rozměrů (méně než 2 cm) mohou metastázovat a vykazovat znaky agresivního chování. Proto i tyto nádory musí být důsledně vyhodnocovány. Faktory, které by měly být dále zohledněny, zahrnují také klinické aspekty (věk, pohlaví, velikost nádoru, výskyt syndromů) a radiologické znaky. Molekulární heterogenita GIST je rovněž výrazná, a proto se setkáváme se snahou identifikovat nové biologické prognostické faktory (Greco et al., 2018). Největší pozornost se soustřeďuje na stanovení proliferativní aktivity, případně stanovení markerů ovlivňujících buněčný cyklus, přežívání nebo apoptózu buněk.

S ohledem na význam stanovení proliferační aktivity GIST v současné WHO klasifikaci těchto nádorů – cílené počítání mitóz v histopatologickém nálezu, jsme se snažili obohatit možnosti diagnostického přístupu s využitím molekulární analýzy genů zapojených v regulaci buněčného cyklu a aktivity enzymu podporujícího přežívání buněk (WHO, 2020).

V naší studii jsme se proto zaměřili na stanovení expresních hladin mRNA vybraných, nám dostupných molekulárních proliferačních markerů a telomerázové podjednotky hTERT pomocí kvantitativní PCR v reálném čase. (RQ RT PCR). Naším cílem byla snaha objektivně, pomocí vysoce citlivé a reprodukovatelné metody, určit proliferační aktivitu GIST a s tím spojený různý stupeň rizika agresivnějšího chování. Proliferační aktivitu GIST jsme stanovovali ve srovnání s jinými nádory. Kontrolní skupinou byl vysoce proliferačně aktivní Burkittův lymfom a leiomyosarkomy různého gradu. Pro určení biologického rizika jsme zjišťovali expresi proliferačních markerů a hTERT ve skupině histopatologicky posouzených benigních a maligních GIST. Rovněž jsme analyzovali expresní hladiny mRNA uvedených molekulárních markerů ve vztahu k přežívání pacientů (EFS a OS) na základě křivek přežití.

Kvantitativní RT PCR v reálném čase je často používanou metodou analyzování expresního profilu určitých nádorů pro diagnostické, výzkumné, prognostické, případně terapeutické účely. Metoda absolutní kvantifikace v reálném čase umožňuje stanovení koncentrace, nebo přesného počtu kopií analyzovaného molekulárního markeru po normalizaci k hladinám tzv. housekeeping genu. Hladiny mRNA proliferačních markerů Ki-67, TPX2, TOP2A a telomerázové podjednotky hTERT jsme v našem případě normalizovali k hladinám mRNA housekeeping genu *ABL*. Vhodný referenční gen musí být stabilně exprimovaný ve tkáních a nesmí být ovlivněn biologickými nebo experimentálními podmínkami. Typický referenční gen má regulovat základní buněčné funkce. Cílový gen je amplifikovaný společně s referenčním genem za účelem minimalizování experimentálních rozdílů týkajících se účinnosti enzymů pro reverzní transkripci, účinnosti PCR reakce a množství vstupního materiálu (Fassunke et al., 2010).

### **5.5.1. Proliferační marker Ki-67**

Protein označovaný jako Ki-67 je nejpoužívanějším markerem pro stanovení proliferačního indexu pomocí IHC průkazu jeho exprese u širokého spektra nádorů. Proliferační marker Ki-67 se vyskytuje v jádrech všech buněk v průběhu G1, S, G2 a M

fáze buněčného cyklu. Stanovení Ki-67 indexu slouží jednak k diagnostickým účelům, k určení prognózy, a jednak byla prokázána jeho prediktivní hodnota. V některých studiích byla exprese Ki-67 indikátorem příznivé prognózy, v jiných indikuje nepříznivou prognózu (Shi et al., 2020). Velké studie zabývající se prognostickou hodnotou exprese Ki-67, potvrzují souvislost vyšší exprese Ki-67 a horší prognózy u nádorů žlučníku (5147 pacientů), nádorů prostaty (5419 pacientů), nebo renálního karcinomu (5398 pacientů) (Berlin et al., 2017; Tian et al., 2016). Krvácení v rámci GIT a vysoký index proteinové exprese Ki-67 uvádí jako nepříznivý prognostický faktor u GIST rovněž autorský kolektiv Zhang, Liu (2020). Autoři ve své studii doporučují, aby se pro objektivizaci biologického rizika GIST do diagnostického vyšetřování začlenily další prognostické faktory. Jedním z faktorů, který autoři uvádějí je mutační stav genů *KIT* a *PDGFRA*. Autoři dále doporučují zohlednit i mutační stav *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST (SDH deficientní pacienti). Na potřebu zahrnutí mutačního stavu do prognostického systému jako jednoho z významných biologických faktorů poukazují rovněž Rutkowski et al. (2021). Ve velkých studiích má ovšem samotné IHC stanovení Ki-67 indexu nadále významnou prognostickou hodnotu (Shi et al., 2020). K akumulaci proteinu Ki-67 dochází pouze v průběhu fáze S, G2 a M buněčného cyklu. K degradaci dochází kontinuálně ve fázích G1 a G0, bez ohledu na příčinu vstupu do G0 fáze (fáze klidu). Následkem toho jsou hladiny Ki-67 v průběhu G0 a G1 v jednotlivých buňkách vysoce heterogenní. Hodnoty Ki-67 tak závisí na čase, který daná buňka stráví v G0 fázi. Ki-67 je tedy více stupňovým než binárním markerem progresu buněčným cyklem a časem, kdy buňka vstoupí do G0 fáze (Miller et al., 2018). Pro plynulý přechod jednotlivými fázemi buněčného cyklu je tedy požadovaná regulovaná exprese a kontrolovaná degradace Ki-67 (Sobecki et al., 2017). Autoři Zhou et al. (2017) považují Ki-67 za vhodný marker pro odhad či určení maligního chování GIST. Výsledky výzkumu autorského týmu Sobecki et al. (2016) poukazují na odlišnou skutečnost. Ve své studii identifikovali hlavní funkci proliferačního markeru Ki-67, kterou je kontrola organizace heterochromatinu. Organizace heterochromatinu prostřednictvím Ki-67 neinterferuje s vývojem buněčného cyklu ani s buněčnou proliferací. Ki-67 v tomto směru pravděpodobně přispívá k přestavbě genové exprese (Sobecki et al., 2016).

Statistická analýza výsledků naší studie potvrzuje úzkou korelaci mezi vyšší expresí normalizovaných hladin mRNA proliferačního markeru Ki-67 a maligním chováním GIST ( $p > 0.0001$ ). Rovněž jsme zjistili vyšší expresní hladiny mRNA Ki-67 ( $p < 0.0001$ ) u Burkittova lymfomu, charakterizovaného vysokou proliferační aktivitou (nad 90 %). V neposlední řadě, vyšší mRNA hladiny průměrných hodnot Ki-67 měly prokazatelnou

souvislost se zkrácenou dobou do recidivy nádoru. Konkrétně jsme detekovali asociaci vyšších hladin mRNA Ki-67 s kratším celkovým přežíváním ( $p < 0.0304$ ) a progresí onemocnění ( $p < 0.0121$ ). Stanovení expresních hladin mRNA proliferačního markeru Ki-67 pomocí vysoce citlivé metody absolutní kvantifikace tak může přispět k objektivnímu určení proliferační aktivity nádoru, maligního potenciálu GIST a rovněž k stanovení délky přežívání do progresu, případně celkového přežívání (Kalfusova et al., 2016). Naproti tomu, Sözütek et al. (2014) nezjistili významnou korelaci mezi hodnotami Ki-67 u pacientů v časných a pokročilých stádiích GIST. Na druhou stranu, společně s dalšími autory, potvrzují korelaci Ki-67 s mitotickým indexem, který má u GIST výrazný prognostický význam (Kadado et al., 2022; Sözütek et al., 2014; Zhao et al., 2014).

### **5.5.2. Proliferační marker TPX2**

Proliferační marker TPX2 je důležitým proteinem v rámci sestavování mitotického vřeténka a plní tak významnou roli během mitózy. Nadměrná exprese TPX2 (mRNA nebo proteinu) je markerem horší prognózy u mnoha typů nádorů - nádorů mozku, karcinomu prsu, kolorektálních karcinomů, nádorů plic, ale rovněž tak meningeomů, lymfomů z buněk pláště a u mezoteliomů (Brizova et al., 2010; Pérez de Castro, Malumbres, 2012). Autoři Zou et al. (2018a) určovali roli markeru TPX2 u karcinomu prostaty. Ve své studii identifikovali zvýšenou expresi TPX2 v nádorových buňkách v porovnání s benigní, nenádorovou tkání prostaty. Autoři navíc zjistili souvislost zvýšené exprese TPX2 s akcelerací proliferace a schopnosti invaze a migrace buněk karcinomu prostaty. Zvýšená exprese TPX2 rovněž korelovala s TNM stadiem, metastázami a s horší prognózou u karcinomu žlučových cest a žlučníku a u ovariálního karcinomu (Ma et al., 2018; Zou et al., 2018b; Yan et al., 2013).

V naší studii jsme zjistili, že mRNA hladiny proliferačního markeru TPX2 jsou asociovány s proliferační aktivitou GIST a rovněž s jejich biologickým potenciálem ve vztahu k progresi onemocnění a nepříznivé prognóze. Potvrdili jsme statisticky významnou korelaci vyšších hladin mRNA markeru TPX2 a vysoce proliferačně aktivních nádorů ( $p > 0.0001$ ). Navíc, vyšší hladiny exprese mRNA TPX2 markeru byly signifikantně spojeny s maligním biologickým chováním GIST ( $p > 0.0001$ ). Rovněž jsme detekovali souvislost vyšších hladin mRNA TPX2 a kratším celkovým přežíváním i horší prognózou (EFS  $p > 0.0003$ , OS  $p > 0.0030$  při hodnotách průměru a EFS  $p > 0.0311$  při hodnotách mediánu) (Kalfusova et al., 2016).

### 5.5.3. Proliferační marker TOP2A

Topoizomeráza 2A (TOP2A) je enzym, který katalyzuje uvolňování nadobrátek vinutí vláken DNA v procesu její replikace. Aktivita enzymu TOP2A tedy koreluje s dělením buňky. Hladiny TOP2A se mění v průběhu buněčného cyklu. Do pozdní S fáze jsou nedetekovatelné, následně narůstají s maximem v G2/M fáze cyklu (dvou až trojnásobný nárůst). Dokončením mitózy dochází ke snížení hladin TOP2A (Panvichian et al., 2015). Významně vyšší expresní hladiny TOP2A identifikujeme u buněk proliferačně aktivních, na rozdíl od populace klidových buněk. Enzym TOP2A je tedy považovaný za specifický marker buněčné proliferace a má důležitou roli u maligních nádorů (Chen et al., 2015). Klinický význam stanovení exprese TOP2A mimo jiné spočívá v možnosti terapeutického ovlivnění některých hematologických i solidních nádorových onemocnění (Matias-Barrios et al., 2021). TOP2A je totiž cílovým markerem pro protinádorová léčiva ze skupiny inhibitorů TOP2A. Navíc má zvýšená exprese TOP2A u hepatocelulárního karcinomu (HCC) prognostický význam. Konkrétně je nadměrná exprese TOP2A u HCC spojena s potenciálně agresivním fenotypem nádoru, dřívějším začátkem onemocnění, případně zkráceným přežitím pacientů (Cai et al., 2020; Meng et al., 2022).

V naší studii jsme potvrdili souvislost vyšší exprese TOP2A s vysokým proliferačním indexem nádoru (Burkittův lymfom vs. GIST a leiomyosarkomy,  $p > 0.001$ ). Na rozdíl od potvrzeného vzájemného vztahu exprese TOP2A a proliferace nádoru jsme nezjistili asociaci vyšších hladin mRNA TOP2A a agresivnějším chováním GIST – maligní versus benigní GIST, ( $p > 0.1910$ ). Rovněž jsme nedetkovali souvislost mezi vyššími hladinami TOP2A a dobou přežívání pacientů s GIST (při hodnotách rozdělených podle průměru: EFS  $p > 0.3435$ , OS  $p > 0.4040$  a při hodnotách mediánů: EFS  $p > 0.3065$ , OS  $p > 0.4401$ ). Výsledky naší studie však nejsou překvapivé ve světle studie autorů Stacey et al. (2000). Autoři pomocí časosběrných studií sledovali expresi TOP2A v průběhu buněčného cyklu. Z výsledků jejich studie vyplývá, že exprese TOP2A je v nádorových buňkách méně závislá na proliferačním stavu nádorových buněk. Buňky, které zůstávají životaschopné, ale jsou dočasně vyřazeny z aktivního buněčného cyklu, jsou totiž schopny stát se dominantními a produkovat vyšší hladiny TOP2A. Vysvětlení může podporovat fakt, že pomalu rostoucí buňky aktivně neprolifерují. Z tohoto pohledu, skupiny GIST s nízkým a vysokým rizikem mohou být z velké části tvořeny pomalu rostoucími buňkami. Následně statistické rozdíly expresních hladin mRNA TOP2A mezi benigními a maligními GIST nejsou podle našeho zjištění tak významné jako je tomu u expresních hladin Ki-67, TPX2 a

hTERT. Na rozdíl od našich výsledků studie jiných autorských kolektivů zjistili, že vyšší hladiny exprese TOP2A jsou významně spojeny se skupinou GIST vyššího rizika (Bertucci et al., 2012, Nowak et al., 2022).

#### **5.5.4. Marker senescence hTERT**

Telomeráza je RNA-dependentní DNA polymeráza, která prodlužuje 5'TTAGGG-3'konce DNA (Sakurai et al., 1998). Kromě udržování délky telomer bylo v procesu onkogeneze zjištěno několik dalších funkcí podjednotky hTERT. Ektopická exprese podjednotky hTERT může navodit maligní transformaci buněk nezávisle na délce telomer. Telomeráza a podjednotky hTERT mohou rovněž chránit nádorové buňky před apoptózou. V neposlední řadě je zvýšená exprese podjednotky hTERT spojená s pokročilým stadiem onemocnění a s nepříznivou prognózou u různých typů nádorů (Liu et al., 2016). Přibližně 85 – 90 % nádorů má zvýšenou aktivitu telomerázy a expresi katalytické podjednotky hTERT. Exprese a funkce genu *TERT* je regulována pomocí rozdílných molekulárních mechanismů (Leão et al., 2018). Dominantním mechanismem regulace telomerázové aktivity je transkripce hTERT. Mutace v promotoru genu *TERT* a chromozomální přestavby hrají rovněž roli v aktivaci telomerázy v nádorových buňkách (Ramlee et al., 2016). Somatické mutace v promotoru genu *TERT* jsou nejčastěji lokalizované v pozicích c.-124bp odpovídající záměně p.C228T, a c.-146 bp odpovídající p.C250T (Hannen, Bartsch, 2018). Detekce těchto mutací umožňuje identifikovat biomarkery pro stanovení diagnózy a prognózy u různých typů nádorů. Mutace v promotoru genu *TERT* byly zjištěny u více než 60 typů nádoru. Nejčastěji jsou uvedené mutace přítomny u hepatocelulárního karcinomu, glioblastomu, karcinomu močového měchýře a u melanomu (Ramlee et al., 2016). Přítomnost mutací v uvedené promotorové oblasti genu *TERT* u GIST byla zjištěna přibližně v 4 %. Campanella et al. (2015) nezjistili žádnou významnou asociaci mezi mutacemi v promotoru genu *TERT* a klinicko-patologickými znaky pacientů. Recentně, Gong et al. (2021) prezentují schopnost hTERT spolupracovat s transkripčními faktory a následně ovlivňovat proliferaci a migraci nádorových buněk u kolorektálního karcinomu. Potlačení exprese hTERT se tak stává, rovněž jako u proliferčních markerů, slibným nástrojem na blokaci proliferace a migrace nádorových buněk (Kong et al., 2015; Maggisano et al., 2017). Určení aktivity exprese katalytické podjednotky hTERT u GIST se věnovala studie autorů Günther et al. (2000). Autoři měřili expresi ve vzorcích primárních nádorů, ale rovněž ve vzorcích metastáz a recidivujících GIST. Kontrolními skupinami byly vzorky leiomyosarkomů a maligních nádorů periferních nervových



pochev. Zvýšenou aktivitu hTERT autoři detekovali u maligních GIST ve srovnání s benigními GIST.

V naší studii jsme rovněž detekovali zvýšenou expresi hTERT ve skupině GIST maligního rizika vůči benigní skupině ( $p > 0.001$ ). Při sledování proliferační aktivity jsme stejně tak zjistili vyšší expresi hTERT u vysoce proliferačně aktivních Burkittových lymfomů ( $p > 0.001$ ) vůči skupinám GIST a leiomyosarkomům. Mimoto jsme prokázali statisticky významné zkrácení doby přežívání pacientů s GIST při hodnotách exprese mRNA hTERT vyšších než medián stanovených počtů kopií ( $p > 0.0106$ ). Stanovení expresních hladin mRNA telomerázové podjednotky hTERT se tak může stát účinným biomarkerem buněčného přežívání a pokročilého stádia onemocnění v rámci komplexní diagnostiky GIST (Kalfusova et al., 2016).

## 6. ZÁVĚR

V posledních dvou desetiletích molekulární patologie významně přispěla ke zlepšení a porozumění mechanismu vzniku a rozvoje GIST. Zjištění mechanismu funkce tyrosin kinázových receptorů a dalších regulačních proteinů a identifikace jejich molekulárních změn (mutace v genech *KIT*, *PDGFRA*, *BRAF*, *NF1*, *SDH* komplexu, *ETV6::NTRK3* a dalších) jako terapeutických cílů zásadně změnilo léčebné přístupy a přineslo u většiny pacientů s GIST zlepšení v prodloužení kvality a délky života. Mutační analýza u GIST má zásadní prediktivní a terapeutický dopad u každého nemocného. Identifikace příčin vzniku sekundární rezistence na podávané inhibitory RTK, průkaz intranádorové nebo internádorové heterogenity sekundárních mutací a pochopení jejich mechanismů poskytuje možnost alternativních změn léčby ve smyslu nových terapeutických strategií nebo cílů. Volba inhibitorů II. a III. generace, kombinace s dalšími inhibitory, případně s imunoterapií se stává součástí terapeutické rozvahy v léčbě GIST. Průkaz molekulárních alterací ve skupině GIST s *KIT/PDGFRA* nemutovanými geny (mutace v genech *BRAF*, *NF1*, *AKT1*, *ATR*, defekty v genech komplexu *SDH*) v naší studii umožnil částečně pochopení mechanismu vzniku těchto podskupin GIST a volbu personalizované terapie.

Recentní publikační výstupy a studie potvrzují prognostický význam námi analyzovaných proliferačních markerů Ki-67, TPX2, TOP2A a telomerázové podjednotky hTERT. Výsledky kvantitativní analýzy (RQ RT PCR) proliferačních markerů Ki-67, TPX2, TOP2A a telomerázové podjednotky hTERT měřených prostřednictvím mRNA hladin, poukazují na vhodnost využívání této metodiky pro diagnostické a prognostické účely (zlepšení stanovení prognostického rizika). Potvrdili jsme rovněž korelaci expresních hladin mRNA molekulárních markerů Ki-67, TPX2 a podjednotky hTERT s morfologicky definovanými skupinami benigních a maligních GIST.

Genetická škála GIST se v průběhu let výzkumu ukazuje jako značně heterogenní. Některé genetické změny jsou časté, jiné raritní, ale všechny ukazují na komplexní rozvoj a příčiny případné progresy těchto nádorů. Očekáváme, že moderní diagnostické přístupy v molekulární analýze pomohou identifikovat patogenetické cesty rozvoje GIST v dalších letech. Zároveň hlubší a detailnější pochopení molekulárních mechanismů, které navozují vznik GIST a jeho progresi mohou zlepšit stanovení biologického rizika onemocnění a mohou přispět k volbě individualizované terapie.

## 7. SHRNU TÍ

Ve studii jsme po molekulární stránce komplexně vyšetřili 334 vzorků od 289 pacientů s GIST. Vzhledem k rozsáhlému souboru pacientů jsme mohli potvrdit a po statistické stránce ověřit variabilitu a lokalizaci primárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA*. Pro rychlý skríníng primárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* jsme zavedli metodu analýzy křivek tání (HRM). Pro detekci aktivační mutace V600E v genu *BRAF* jsme zavedli alelově specifickou PCR. V úzké spolupráci s Onkologickou klinikou 2. LF UK a FN Motol a jejím zaměřením na cílenou terapii pacientů s GIST a s tím souvisejícím operačním provozem jsme u 16 pacientů měli možnost detekovat přítomnost sekundárních mutací (ozřejmit sekundární rezistenci na terapii) a identifikovat jejich intranádorovou i internádorovou heterogenitu. V současné době, po vyčerpání dostupné cílené terapie, na základě indikace od onkologa, vyšetřujeme patientskou DNA a RNA prostřednictvím metody NGS, pomocí které vyhledáváme možné terapeutické varianty. Recentní vyhledávání terapeutických variant, respektive vyšetření exprese prediktivních markerů, je výrazným molekulárně – genetickým přínosem v rámci personalizované medicíny.

V uvedeném souboru pacientů jsme navíc měli možnost identifikovat podskupiny *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST s mutacemi v genech *BRAF*, *NFI*, defekty v genech *SDH* komplexu, případně variantami v genech *AKT1* a *ATR*. Potvrdili jsme heterogenitu podskupin *KIT* a *PDGFRA* nemutovaných GIST. Pacienti s alteracemi v jiných genech než *KIT* a *PDGFRA* mohou profitovat z cílené inhibice. Kromě toho, GIST s mutacemi v genu *NFI* případně defekty v *SDH* komplexu jsou často součástí syndromů s návazností na genetické poradenství.

Pro objektivní zhodnocení biologického rizika jsme v naší studii analyzovali expresní hladiny mRNA markerů proliferace a senescence. Rovněž jsme se zaměřili na určení prognózy onemocnění GIST na základě expresních hladin vybraných markerů buněčné proliferace ve vztahu k přežívání do progresu a celkovému přežívání.

## 7. SUMMARY

In our study, we examined 334 samples from 289 patients with GIST with a comprehensive molecular investigation. Due to such an extensive set of patients we confirmed and statistically verified the variability and localization of primary mutations in the *KIT* and *PDGFRA* genes. We introduced a melting curve analysis method for rapid screening of primary mutations in the *KIT* and *PDGFRA* genes. We introduced allele-specific PCR to detect the V600E activating mutation in the *BRAF* gene. In close cooperation with Department of Oncology, 2nd Medical Faculty, Charles University and University Hospital Motol and its focus on the targeted therapy of patients with GIST and related surgery, we had an opportunity to identify secondary mutations in 16 patients (also clarify secondary resistance to treatment) and their intratumoral and intertumoral heterogeneity. Currently, after the failure of available targeted therapy, based on the request from the oncologist, we examine the patient's DNA and RNA using the NGS method, with a purpose to look for possible therapeutic variants. The recent search for therapeutic variants or the examination of the expression of predictive markers is a significant molecular-genetic contribution within the framework of personalized medicine.

In investigated group of patients in this study we also had the opportunity to identify subgroups of *KIT/PDGFRA* non-mutated GISTs with mutations in the *BRAF*, *NFI* genes, defects in the *SDH* complex genes, or variants in the *AKT1* and *ATR* genes. We confirmed the heterogeneity of *KIT* and *PDGFRA* subsets of non-mutated GISTs. Patients with gene alterations other than *KIT* and *PDGFRA* may benefit from targeted inhibition. In addition, GISTs with mutations in the *NFI* gene or defects in the *SDH* complex are often an integral part of syndromes requiring genetic counseling.

To assess the biological risk objectively, we analysed the expression levels of mRNA markers of proliferation and senescence in our study. We also focused on determining the prognosis of GIST based on the expression levels of these markers in relation to survival to progression and overall survival.

## 8. REFERENCE

1. Agaimy, A., Terracciano, L. M., Dirnhofer, S., Tornillo, L., Foerster, A., Hartmann, A., & Bihl, M. P. (2009). V600E BRAF mutations are alternative early molecular events in a subset of KIT/PDGFR $\alpha$  wild-type gastrointestinal stromal tumours. *Journal of clinical pathology*, *62*(7), 613–616. <https://doi.org/10.1136/jcp.2009.064550>
2. Agaram, N. P., Laquaglia, M. P., Ustun, B., Guo, T., Wong, G. C., Socci, N. D., Maki, R. G., DeMatteo, R. P., Besmer, P., & Antonescu, C. R. (2008a). Molecular characterization of pediatric gastrointestinal stromal tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *14*(10), 3204–3215. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1984>
3. Agaram, N. P., Wong, G. C., Guo, T., Maki, R. G., Singer, S., Dematteo, R. P., Besmer, P., & Antonescu, C. R. (2008b). Novel V600E BRAF mutations in imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Genes, chromosomes & cancer*, *47*(10), 853–859. <https://doi.org/10.1002/gcc.20589>
4. Ali, S., & Ali, S. (2007). Role of c-kit/SCF in cause and treatment of gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Gene*, *401*(1-2), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.06.017>
5. Alkhuziem, M., Burgoyne, A. M., Fanta, P. T., Tang, C. M., & Sicklick, J. K. (2017). The Call of "The Wild"-Type GIST: It's Time for Domestication. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, *15*(5), 551–554. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.0057>
6. Al-Share, B., Alloghbi, A., Al Hallak, M. N., Uddin, H., Azmi, A., Mohammad, R. M., Kim, S. H., Shields, A. F., & Philip, P. A. (2021). Gastrointestinal stromal tumor: a review of current and emerging therapies. *Cancer metastasis reviews*, *40*(2), 625–641. <https://doi.org/10.1007/s10555-021-09961-7>
7. An, X., Xu, F., Luo, R., Zheng, Q., Lu, J., Yang, Y., Qin, T., Yuan, Z., Shi, Y., Jiang, W., & Wang, S. (2018). The prognostic significance of topoisomerase II alpha protein in early stage luminal breast cancer. *BMC cancer*, *18*(1), 331. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4170-7>
8. Antonescu, C. R., Sommer, G., Sarran, L., Tschernyavsky, S. J., Riedel, E., Woodruff, J. M., Robson, M., Maki, R., Brennan, M. F., Ladanyi, M., DeMatteo, R. P., & Besmer, P.

(2003). Association of KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(9), 3329–3337.

9. Antonescu, C. R., Besmer, P., Guo, T., Arkun, K., Hom, G., Koryotowski, B., Leversha, M. A., Jeffrey, P. D., Desantis, D., Singer, S., Brennan, M. F., Maki, R. G., & DeMatteo, R. P. (2005). Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(11), 4182–4190. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2245>

10. Antonescu C. R. (2008). Targeted therapy of cancer: new roles for pathologists in identifying GISTs and other sarcomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 21 Suppl 2, S31–S36. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.9>

11. Antonescu C. R. (2011). The GIST paradigm: lessons for other kinase-driven cancers. *The Journal of pathology*, 223(2), 251–261. <https://doi.org/10.1002/path.2798>

12. Antonescu, C. R., Romeo, S., Zhang, L., Nafa, K., Hornick, J. L., Nielsen, G. P., Mino-Kenudson, M., Huang, H. Y., Mosquera, J. M., Dei Tos, P. A., & Fletcher, C. D. (2013). Dedifferentiation in gastrointestinal stromal tumor to an anaplastic KIT-negative phenotype: a diagnostic pitfall: morphologic and molecular characterization of 8 cases occurring either de novo or after imatinib therapy. *The American journal of surgical pathology*, 37(3), 385–392. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31826c1761>

13. Astolfi, A., Pantaleo, M. A., Indio, V., Urbini, M., & Nannini, M. (2020). The Emerging Role of the FGF/FGFR Pathway in Gastrointestinal Stromal Tumor. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3313. <https://doi.org/10.3390/ijms21093313>

14. Bachet, J. B., Tabone-Eglinger, S., Dessaux, S., Besse, A., Brahimi-Adouane, S., Emile, J. F., Blay, J. Y., & Alberti, L. (2013). Gene expression patterns of hemizygous and heterozygous KIT mutations suggest distinct oncogenic pathways: a study in NIH3T3 cell lines and GIST samples. *PloS one*, 8(4), e61103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061103>

15. Barcelos, D., Neto, R.A., Cardili, L. *et al.* (2018). *KIT exon 11 and PDGFRA exon 18* gene mutations in gastric GIST: proposal of a short panel for predicting therapeutic response. *Surg Exp Pathol* **1**, 8. <https://doi.org/10.1186/s42047-018-0021-8>
16. Bauer, S., George, S., von Mehren, M., & Heinrich, M. C. (2021). Early and Next-Generation KIT/PDGFR Kinase Inhibitors and the Future of Treatment for Advanced Gastrointestinal Stromal Tumor. *Frontiers in oncology*, *11*, 672500. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.672500>
17. Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I., & Conti, E. (2003). Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Molecular cell*, *12*(4), 851–862. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00392-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00392-7)
18. Beadling, C., Patterson, J., Justusson, E., Nelson, D., Pantaleo, M. A., Hornick, J. L., Chacón, M., Corless, C. L., & Heinrich, M. C. (2013). Gene expression of the IGF pathway family distinguishes subsets of gastrointestinal stromal tumors wild type for KIT and PDGFRA. *Cancer medicine*, *2*(1), 21–31. <https://doi.org/10.1002/cam4.57>
19. Belinsky, M. G., Skorobogatko, Y. V., Rink, L., Pei, J., Cai, K. Q., Vanderveer, L. A., Riddell, D., Merkel, E., Tarn, C., Eisenberg, B. L., von Mehren, M., Testa, J. R., & Godwin, A. K. (2009). High density DNA array analysis reveals distinct genomic profiles in a subset of gastrointestinal stromal tumors. *Genes, chromosomes & cancer*, *48*(10), 886–896. <https://doi.org/10.1002/gcc.20689>
20. Belinsky, M. G., Rink, L., Cai, K. Q., Capuzzi, S. J., Hoang, Y., Chien, J., Godwin, A. K., & von Mehren, M. (2015). Somatic loss of function mutations in neurofibromin 1 and MYC associated factor X genes identified by exome-wide sequencing in a wild-type GIST case. *BMC cancer*, *15*, 887. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1872-y>
21. Berlin, A., Castro-Mesta, J. F., Rodriguez-Romo, L., Hernandez-Barajas, D., González-Guerrero, J. F., Rodríguez-Fernández, I. A., González-Conchas, G., Verdines-Perez, A., & Vera-Badillo, F. E. (2017). Prognostic role of Ki-67 score in localized prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Urologic oncology*, *35*(8), 499–506. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.05.004>
22. Bertucci, F., Goncalves, A., Monges, G., Madroszyk, A., Guiramand, J., Moutardier, V., Noguchi, T., Dubreuil, P., & Sobol, H. (2006). Acquired resistance to imatinib and

secondary KIT exon 13 mutation in gastrointestinal stromal tumour. *Oncology reports*, 16(1), 97–101.

23. Bertucci, F., Finetti, P., Ostrowski, J., Kim, W. K., Kim, H., Pantaleo, M. A., Astolfi, A., Polkowski, M., & Birnbaum, D. (2012). Genomic Grade Index predicts postoperative clinical outcome of GIST. *British journal of cancer*, 107(8), 1433–1441. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.390>

24. Bickenbach, K., Wilcox, R., Veerapong, J., Kindler, H. L., Posner, M. C., Noffsinger, A., & Roggin, K. K. (2007). A review of resistance patterns and phenotypic changes in gastrointestinal stromal tumors following imatinib mesylate therapy. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 11(6), 758–766. <https://doi.org/10.1007/s11605-007-0150-y>

25. Blanke, C. D., Eisenberg, B. L., & Heinrich, M. C. (2001). Gastrointestinal stromal tumors. *Current treatment options in oncology*, 2(6), 485–491. <https://doi.org/10.1007/s11864-001-0070-0>

26. Blay, J. Y., Bonvalot, S., Casali, P., Choi, H., Debiec-Richter, M., Dei Tos, A. P., Emile, J. F., Gronchi, A., Hogendoorn, P. C., Joensuu, H., Le Cesne, A., McClure, J., Maurel, J., Nupponen, N., Ray-Coquard, I., Reichardt, P., Sciot, R., Stroobants, S., van Glabbeke, M., van Oosterom, A., ... GIST consensus meeting panelists (2005). Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. Report of the GIST Consensus Conference of 20-21 March 2004, under the auspices of ESMO. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 16(4), 566–578. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdi127>

27. Blay, J. Y., Kang, Y. K., Nishida, T., & von Mehren, M. (2021). Gastrointestinal stromal tumours. *Nature reviews. Disease primers*, 7(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00254-5>

28. Bleeker, F. E., Felicioni, L., Buttitta, F., Lamba, S., Cardone, L., Rodolfo, M., Scarpa, A., Leenstra, S., Frattini, M., Barbareschi, M., Grammastro, M. D., Sciarrotta, M. G., Zanon, C., Marchetti, A., & Bardelli, A. (2008). AKT1(E17K) in human solid tumours. *Oncogene*, 27(42), 5648–5650. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.170>

29. Boikos, S. A., Pappo, A. S., Killian, J. K., LaQuaglia, M. P., Weldon, C. B., George, S., Trent, J. C., von Mehren, M., Wright, J. A., Schiffman, J. D., Raygada, M., Pacak, K.,



- Meltzer, P. S., Miettinen, M. M., Stratakis, C., Janeway, K. A., & Helman, L. J. (2016). Molecular Subtypes of KIT/PDGFR $\alpha$  Wild-Type Gastrointestinal Stromal Tumors: A Report From the National Institutes of Health Gastrointestinal Stromal Tumor Clinic. *JAMA oncology*, 2(7), 922–928. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0256>
30. Bombac, A., Zakotnik, B., Bucic, M., Setrajcic Dragos, V., Gazic, B., Stegel, V., Klancar, G., & Novakovic, S. (2020). Mutational spectrum and classification of novel mutations in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumours. *International journal of oncology*, 56(6), 1468–1478. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5028>
31. Brčić, I., Argyropoulos, A., & Liegl-Atzwanger, B. (2021). Update on Molecular Genetics of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(2), 194. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11020194>
32. Brenca, M., Rossi, S., Polano, M., Gasparotto, D., Zanatta, L., Racanelli, D., Valori, L., Lamoni, S., Dei Tos, A. P., & Maestro, R. (2016). Transcriptome sequencing identifies ETV6-NTRK3 as a gene fusion involved in GIST. *The Journal of pathology*, 238(4), 543–549. <https://doi.org/10.1002/path.4677>
33. Brinch, C. M., Aggerholm-Pedersen, N., Hogdall, E., & Krarup-Hansen, A. (2022). Medical oncological treatment for patients with Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST) - A systematic review. *Critical reviews in oncology/hematology*, 172, 103650. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103650>
34. Brizova, H., Kalinova, M., Krskova, L., Mrhalova, M., & Kodet, R. (2010). A novel quantitative PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase II $\alpha$ , and TPX2): an immunohistochemical correlation, testing, and optimizing for mantle cell lymphoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 456(6), 671–679. <https://doi.org/10.1007/s00428-010-0922-8>
35. Burger, H., den Bakker, M. A., Kros, J. M., van Tol, H., de Bruin, A. M., Oosterhuis, W., van den Ingh, H. F., van der Harst, E., de Schipper, H. P., Wiemer, E. A., & Nooter, K. (2005). Activating mutations in c-KIT and PDGFR $\alpha$  are exclusively found in gastrointestinal stromal tumors and not in other tumors overexpressing these imatinib mesylate target genes. *Cancer biology & therapy*, 4(11), 1270–1274. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.11.2253>

36. Cai, H., Shao, B., Zhou, Y., & Chen, Z. (2020). High expression of TOP2A in hepatocellular carcinoma is associated with disease progression and poor prognosis. *Oncology letters*, *20*(5), 232. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12095>
37. Campanella, N. C., Celestino, R., Pestana, A., Scapulatempo-Neto, C., de Oliveira, A. T., Brito, M. J., Gouveia, A., Lopes, J. M., Guimarães, D. P., Soares, P., & Reis, R. M. (2015). Low frequency of TERT promoter mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *European journal of human genetics : EJHG*, *23*(6), 877–879. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.195>
38. Cao, Z., Li, J., Sun, L., Xu, Z., Ke, Y., Shao, B., Guo, Y., & Sun, Y. (2022). GISTs with *NTRK* Gene Fusions: A Clinicopathological, Immunophenotypic, and Molecular Study. *Cancers*, *15*(1), 105. <https://doi.org/10.3390/cancers15010105>
39. Caram, M. V., & Schuetze, S. M. (2011). Advanced or metastatic gastrointestinal stromal tumors: systemic treatment options. *Journal of surgical oncology*, *104*(8), 888–895. <https://doi.org/10.1002/jso.21930>
40. Carney, J. A., Sheps, S. G., Go, V. L., & Gordon, H. (1977). The triad of gastric leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma and pulmonary chondroma. *The New England journal of medicine*, *296*(26), 1517–1518. <https://doi.org/10.1056/NEJM197706302962609>
41. Carney J. A. (1999). Gastric stromal sarcoma, pulmonary chondroma, and extra-adrenal paraganglioma (Carney Triad): natural history, adrenocortical component, and possible familial occurrence. *Mayo Clinic proceedings*, *74*(6), 543–552. <https://doi.org/10.4065/74.6.543>
42. Carney, J. A., & Stratakis, C. A. (2002). Familial paraganglioma and gastric stromal sarcoma: a new syndrome distinct from the Carney triad. *American journal of medical genetics*, *108*(2), 132–139. <https://doi.org/10.1002/ajmg.10235>
43. Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T. Y., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y. W., Zeckner, D. J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., ... Thomas, J. E. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, *448*(7152), 439–444. <https://doi.org/10.1038/nature05933>

44. Corless, C. L., Fletcher, J. A., & Heinrich, M. C. (2004). Biology of gastrointestinal stromal tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(18), 3813–3825. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.140>
45. Corless, C. L., Schroeder, A., Griffith, D., Town, A., McGreevey, L., Harrell, P., Shiraga, S., Bainbridge, T., Morich, J., & Heinrich, M. C. (2005). PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(23), 5357–5364. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.14.068>
46. Corless C. L. (2014). Gastrointestinal stromal tumors: what do we know now?. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 27 Suppl 1, S1–S16. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.173>
47. Curtin, J. A., Busam, K., Pinkel, D., & Bastian, B. C. (2006). Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(26), 4340–4346. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.2984>
48. Cypriano, M. S., Jenkins, J. J., Pappo, A. S., Rao, B. N., & Daw, N. C. (2004). Pediatric gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcoma. *Cancer*, 101(1), 39–50. <https://doi.org/10.1002/cncr.20352>
49. Daniels, M., Lurkin, I., Pauli, R., Erbstösser, E., Hildebrandt, U., Hellwig, K., Zschille, U., Lüders, P., Krüger, G., Knolle, J., Stengel, B., Prall, F., Hertel, K., Lobeck, H., Popp, B., Theissig, F., Wunsch, P., Zwarthoff, E., Agaimy, A., & Schneider-Stock, R. (2011). Spectrum of KIT/PDGFR $\alpha$ /BRAF mutations and Phosphatidylinositol-3-Kinase pathway gene alterations in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Cancer letters*, 312(1), 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.07.029>
50. Daum O, Vanecek T, Sima R, Michal M. (2006). Gastrointestinal stromal tumor: update. *Klin Onkol*, 19:203–11
51. Daum, O., Grossmann, P., Vanecek, T., Sima, R., Mukensnabl, P., & Michal, M. (2007). Diagnostic morphological features of PDGFRA-mutated gastrointestinal stromal tumors: molecular genetic and histologic analysis of 60 cases of gastric gastrointestinal stromal tumors. *Annals of diagnostic pathology*, 11(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2006.10.002>

52. Daum O, Šíma R, Michal M. (2010). Patologická diagnostika gastrointestinálního stromálního tumoru. *Onkologie*, 4(1): 13-17.
53. Daum, O., Sedivcova, M., Dubova, M., & Michal, M. (2012). KIT mutations and sequence changes in genes encoding SDH complex possibly need not be mutually exclusive in gastrointestinal stromal tumors. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*, 20(5), 523–524. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e3182494026>
54. Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., ... Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949–954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>
55. de Leng, W. W., Gadellaa-van Hooijdonk, C. G., Barendregt-Smouter, F. A., Koudijs, M. J., Nijman, I., Hinrichs, J. W., Cuppen, E., van Lieshout, S., Loberg, R. D., de Jonge, M., Voest, E. E., de Weger, R. A., Steeghs, N., Langenberg, M. H., Sleijfer, S., Willems, S. M., & Lolkema, M. P. (2016). Targeted Next Generation Sequencing as a Reliable Diagnostic Assay for the Detection of Somatic Mutations in Tumours Using Minimal DNA Amounts from Formalin Fixed Paraffin Embedded Material. *PloS one*, 11(2), e0149405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149405>
56. Debiec-Rychter, M., Cools, J., Dumez, H., Sciot, R., Stul, M., Mentens, N., Vranckx, H., Wasag, B., Prenen, H., Roesel, J., Hagemeyer, A., Van Oosterom, A., & Marynen, P. (2005). Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants. *Gastroenterology*, 128(2), 270–279. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.11.020>
57. Dematteo, R. P., Gold, J. S., Saran, L., Gönen, M., Liau, K. H., Maki, R. G., Singer, S., Besmer, P., Brennan, M. F., & Antonescu, C. R. (2008). Tumor mitotic rate, size, and location independently predict recurrence after resection of primary gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Cancer*, 112(3), 608–615. <https://doi.org/10.1002/cncr.23199>
58. Demetri, G. D., von Mehren, M., Blanke, C. D., Van den Abbeele, A. D., Eisenberg, B., Roberts, P. J., Heinrich, M. C., Tuveson, D. A., Singer, S., Janicek, M., Fletcher, J. A., Silverman, S. G., Silberman, S. L., Capdeville, R., Kiese, B., Peng, B., Dimitrijevic, S., Druker, B. J., Corless, C., Fletcher, C. D., ... Joensuu, H. (2002). Efficacy and safety of

imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *The New England journal of medicine*, 347(7), 472–480. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020461>

59. Díaz Delgado, M., Hernández Amate, A., Pereira Gallardo, S., Jaramillo, S., Virizuela Echaburu, J. A., & González-Cámpora, R. J. (2011). Gastrointestinal stromal tumors: morphological, immunohistochemical and molecular changes associated with kinase inhibitor therapy. *Pathology oncology research : POR*, 17(3), 455–461. <https://doi.org/10.1007/s12253-011-9362-2>

60. Dileo, P., Pricl, S., Tamborini, E., Negri, T., Stacchiotti, S., Gronchi, A., Posocco, P., Laurini, E., Coco, P., Fumagalli, E., Casali, P. G., & Pilotti, S. (2011). Imatinib response in two GIST patients carrying two hitherto functionally uncharacterized PDGFRA mutations: an imaging, biochemical and molecular modeling study. *International journal of cancer*, 128(4), 983–990. <https://doi.org/10.1002/ijc.25418>

61. Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., & Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature medicine*, 2(5), 561–566. <https://doi.org/10.1038/nm0596-561>

62. Earnshaw, W. C., Halligan, B., Cooke, C. A., Heck, M. M., & Liu, L. F. (1985). Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *The Journal of cell biology*, 100(5), 1706–1715. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.5.1706>

63. Eom, H. S., Kim, M. S., Hur, S. Y., Yoo, N. J., & Lee, S. H. (2009). Absence of oncogenic AKT1 E17K mutation in prostate, esophageal, laryngeal and urothelial carcinomas, hepatoblastomas, gastrointestinal stromal tumors and malignant meningiomas. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 48(7), 1084–1085. <https://doi.org/10.1080/02841860902878152>

64. Ettrich, T. J., & Seufferlein, T. (2018). Regorafenib. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*, 211, 45–56. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8_3)

65. Falchook, G. S., Trent, J. C., Heinrich, M. C., Beadling, C., Patterson, J., Bastida, C. C., Blackman, S. C., & Kurzrock, R. (2013). BRAF mutant gastrointestinal stromal tumor: first report of regression with BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) and whole

exomic sequencing for analysis of acquired resistance. *Oncotarget*, 4(2), 310–315. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.864>

66. Fassunke, J., Blum, M. C., Schildhaus, H. U., Zapatka, M., Brors, B., Künstlinger, H., Büttner, R., Wardelmann, E., & Merkelbach-Bruse, S. (2010). qPCR in gastrointestinal stromal tumors: Evaluation of reference genes and expression analysis of KIT and the alternative receptor tyrosine kinases FLT3, CSF1-R, PDGFRB, MET and AXL. *BMC molecular biology*, 11, 100. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-100>

67. Fletcher, C. D., Berman, J. J., Corless, C., Gorstein, F., Lasota, J., Longley, B. J., Miettinen, M., O'Leary, T. J., Remotti, H., Rubin, B. P., Shmookler, B., Sobin, L. H., & Weiss, S. W. (2002). Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *International journal of surgical pathology*, 10(2), 81–89. <https://doi.org/10.1177/106689690201000201>

68. Fujimi, A., Nagamachi, Y., Yamauchi, N., Tamura, F., Kimura, T., Miyajima, N., Inomata, H., Nishisato, T., Yoshida, M., Takada, K., Kobayashi, K., & Kato, J. (2019). Gastrointestinal Stromal Tumor in a Patient with Neurofibromatosis Type 1 That Was Successfully Treated with Regorafenib. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*, 58(13), 1865–1870. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.2321-18>

69. Gaspar, T. B., Sá, A., Lopes, J. M., Sobrinho-Simões, M., Soares, P., & Vinagre, J. (2018). Telomere Maintenance Mechanisms in Cancer. *Genes*, 9(5), 241. <https://doi.org/10.3390/genes9050241>

70. Gasparotto, D., Rossi, S., Polano, M., Tamborini, E., Lorenzetto, E., Sbaraglia, M., Mondello, A., Massani, M., Lamon, S., Bracci, R., Mandolesi, A., Frate, E., Stanzial, F., Agaj, J., Mazzoleni, G., Pilotti, S., Gronchi, A., Dei Tos, A. P., & Maestro, R. (2017). Quadruple-Negative GIST Is a Sentinel for Unrecognized Neurofibromatosis Type 1 Syndrome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(1), 273–282. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0152>

71. George, S., Wang, Q., Heinrich, M. C., Corless, C. L., Zhu, M., Butrynski, J. E., Morgan, J. A., Wagner, A. J., Choy, E., Tap, W. D., Yap, J. T., Van den Abbeele, A. D., Manola, J. B., Solomon, S. M., Fletcher, J. A., von Mehren, M., & Demetri, G. D. (2012). Efficacy and safety of regorafenib in patients with metastatic and/or unresectable GI stromal tumor after failure of imatinib and sunitinib: a multicenter phase II trial. *Journal of*

*clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(19), 2401–2407. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.9394>

72. Giardina, T., Robinson, C., Grieu-Iacopetta, F., Millward, M., Iacopetta, B., Spagnolo, D., & Amanuel, B. (2018). Implementation of next generation sequencing technology for somatic mutation detection in routine laboratory practice. *Pathology*, 50(4), 389–401. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2018.01.005>

73. Giger, O. T., Ten Hoopen, R., Shorthouse, D., Abdullahi, S., Bulusu, V. R., Jadhav, S., Maher, E. R., & Casey, R. T. (2022). Preferential *MGMT* hypermethylation in SDH-deficient wild-type GIST. *Journal of clinical pathology*, jcp-2022-208462. Advance online publication. <https://doi.org/10.1136/jcp-2022-208462>

74. Gill, A. J., Chou, A., Vilain, R., Clarkson, A., Lui, M., Jin, R., Tobias, V., Samra, J., Goldstein, D., Smith, C., Sioson, L., Parker, N., Smith, R. C., Sywak, M., Sidhu, S. B., Wyatt, J. M., Robinson, B. G., Eckstein, R. P., Benn, D. E., & Clifton-Bligh, R. J. (2010). Immunohistochemistry for SDHB divides gastrointestinal stromal tumors (GISTs) into 2 distinct types. *The American journal of surgical pathology*, 34(5), 636–644. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181d6150d>

75. Gill, A. J., Chou, A., Vilain, R. E., & Clifton-Bligh, R. J. (2011). "Pediatric-type" gastrointestinal stromal tumors are SDHB negative ("type 2") GISTs. *The American journal of surgical pathology*, 35(8), 1245–1248. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182217b93>

76. Gill A. J. (2018). Succinate dehydrogenase (SDH)-deficient neoplasia. *Histopathology*, 72(1), 106–116. <https://doi.org/10.1111/his.13277>

77. Gong, C., Yang, H., Wang, S., Liu, J., Li, Z., Hu, Y., Chen, Y., Huang, Y., Luo, Q., Wu, Y., Liu, E., & Xiao, Y. (2021). hTERT Promotes CRC Proliferation and Migration by Recruiting YBX1 to Increase NRF2 Expression. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 658101. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.658101>

78. Gounder, M. M., & Maki, R. G. (2011). Molecular basis for primary and secondary tyrosine kinase inhibitor resistance in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 67 Suppl 1(Suppl 1), S25–S43. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1526-3>

79. Gramza, A. W., Corless, C. L., & Heinrich, M. C. (2009). Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(24), 7510–7518. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0190>
80. Greco A, Rossi S, Ruffolo C, Pauletti B, Dei Tos AP, Morana G, Massani M. (2018). Evidence for improvements to risk stratification in high-risk gastrointestinal stromal tumor patients. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy*, *8*:25-36. [doi.org/10.2147/GICTT.S145037](https://doi.org/10.2147/GICTT.S145037)
81. Greer, C. E., Wheeler, C. M., & Manos, M. M. (1994). Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. *PCR methods and applications*, *3*(6), S113–S122. <https://doi.org/10.1101/gr.3.6.s113>
82. Grunewald, S., Klug, L. R., Mühlenberg, T., Lategahn, J., Falkenhorst, J., Town, A., Ehrh, C., Wardelmann, E., Hartmann, W., Schildhaus, H. U., Treckmann, J., Fletcher, J. A., Jung, S., Czodrowski, P., Miller, S., Schmidt-Kittler, O., Rauh, D., Heinrich, M. C., & Bauer, S. (2021). Resistance to Avapritinib in PDGFRA-Driven GIST Is Caused by Secondary Mutations in the PDGFRA Kinase Domain. *Cancer discovery*, *11*(1), 108–125. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0487>
83. Günther, T., Schneider-Stock, R., Häckel, C., Pross, M., Schulz, H. U., Lippert, H., & Roessner, A. (2000). Telomerase activity and expression of hTERT and hTR in gastrointestinal stromal tumors in comparison with extragastrointestinal sarcomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *6*(5), 1811–1818.
84. Guo, T., Hajdu, M., Agaram, N. P., Shinoda, H., Veach, D., Clarkson, B. D., Maki, R. G., Singer, S., Dematteo, R. P., Besmer, P., & Antonescu, C. R. (2009). Mechanisms of sunitinib resistance in gastrointestinal stromal tumors harboring KITAY502-3ins mutation: an in vitro mutagenesis screen for drug resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(22), 6862–6870. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1315>
85. Gupta, P., Tewari, M., & Shukla, H. S. (2008). Gastrointestinal stromal tumor. *Surgical oncology*, *17*(2), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2007.12.002>



86. Haefliger, S., Marston, K., Juskevicius, D., Meyer-Schaller, N., Forster, A., Nicolet, S., Komminoth, P., Stauffer, E., Cathomas, G., Hoeller, S., Tornillo, L., Dirnhofer, S., Terracciano, L. M., Bihl, M., & Matter, M. S. (2020). Molecular Profile of Gastrointestinal Stromal Tumors in Sixty-Eight Patients from a Single Swiss Institution. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, *87*(3), 171–178. <https://doi.org/10.1159/000505407>
87. Haller, F., Moskalev, E. A., Faucz, F. R., Barthelmeß, S., Wiemann, S., Bieg, M., Assie, G., Bertherat, J., Schaefer, I. M., Otto, C., Rattenberry, E., Maher, E. R., Ströbel, P., Werner, M., Carney, J. A., Hartmann, A., Stratakis, C. A., & Agaimy, A. (2014). Aberrant DNA hypermethylation of SDHC: a novel mechanism of tumor development in Carney triad. *Endocrine-related cancer*, *21*(4), 567–577. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0254>
88. Hannen, R., & Bartsch, J. W. (2018). Essential roles of telomerase reverse transcriptase hTERT in cancer stemness and metastasis. *FEBS letters*, *592*(12), 2023–2031. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13084>
89. Heidebrecht, H. J., Buck, F., Steinmann, J., Sprenger, R., Wacker, H. H., & Parwaresch, R. (1997). p100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M. *Blood*, *90*(1), 226–233.
90. Heinrich, M. C., Corless, C. L., Demetri, G. D., Blanke, C. D., von Mehren, M., Joensuu, H., McGreevey, L. S., Chen, C. J., Van den Abbeele, A. D., Druker, B. J., Kiese, B., Eisenberg, B., Roberts, P. J., Singer, S., Fletcher, C. D., Silberman, S., Dimitrijevic, S., & Fletcher, J. A. (2003a). Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *21*(23), 4342–4349. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.04.190>
91. Heinrich, M. C., Corless, C. L., Duensing, A., McGreevey, L., Chen, C. J., Joseph, N., Singer, S., Griffith, D. J., Haley, A., Town, A., Demetri, G. D., Fletcher, C. D., & Fletcher, J. A. (2003b). PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science (New York, N.Y.)*, *299*(5607), 708–710. <https://doi.org/10.1126/science.1079666>
92. Heinrich, M. C., Corless, C. L., Blanke, C. D., Demetri, G. D., Joensuu, H., Roberts, P. J., Eisenberg, B. L., von Mehren, M., Fletcher, C. D., Sandau, K., McDougall, K., Ou, W. B., Chen, C. J., & Fletcher, J. A. (2006). Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the*

*American Society of Clinical Oncology*, 24(29), 4764–4774.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.2265>

93. Heinrich, M. C., Maki, R. G., Corless, C. L., Antonescu, C. R., Harlow, A., Griffith, D., Town, A., McKinley, A., Ou, W. B., Fletcher, J. A., Fletcher, C. D., Huang, X., Cohen, D. P., Baum, C. M., & Demetri, G. D. (2008). Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(33), 5352–5359.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.7461>

94. Heldin, C. H., & Lennartsson, J. (2013). Structural and functional properties of platelet-derived growth factor and stem cell factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(8), a009100. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009100>

95. Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad Tunio, G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y., & Kitamura, Y. (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5350), 577–580.  
<https://doi.org/10.1126/science.279.5350.577>

96. Hirota, S., & Isozaki, K. (2006). Pathology of gastrointestinal stromal tumors. *Pathology international*, 56(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2006.01924.x>

97. Holden, J. A., Willmore-Payne, C., Coppola, D., Garrett, C. R., & Layfield, L. J. (2007). High-resolution melting amplicon analysis as a method to detect c-kit and platelet-derived growth factor receptor alpha activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *American journal of clinical pathology*, 128(2), 230–238.  
<https://doi.org/10.1309/7TEH56K6WWXENNQY>

98. Hølmekjær, T., Wiedswang, A. M., Meza-Zepeda, L. A., Hompland, I., Lobmaier, I. V. K., Berner, J. M., Stoldt, S., & Boye, K. (2021). Integrating Anatomical, Molecular and Clinical Risk Factors in Gastrointestinal Stromal Tumor of the Stomach. *Annals of surgical oncology*, 28(11), 6837–6845. <https://doi.org/10.1245/s10434-021-09605-8>

99. Hornick, J. L., & Fletcher, C. D. (2007). The role of KIT in the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Human pathology*, 38(5), 679–687.  
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.03.001>

100. Hostein, I., Faur, N., Primois, C., Boury, F., Denard, J., Emile, J. F., Bringuier, P. P., Scoazec, J. Y., & Coindre, J. M. (2010). BRAF mutation status in gastrointestinal stromal tumors. *American journal of clinical pathology*, *133*(1), 141–148. <https://doi.org/10.1309/AJCPPCKGA2QGBJ1R>
101. Hou, Y. Y., Tan, Y. S., Sun, M. H., Wei, Y. K., Xu, J. F., Lu, S. H., A-Ke-Su, S. J., Zhou, Y. N., Gao, F., Zheng, A. H., Zhang, T. M., Hou, W. Z., Wang, J., Du, X., & Zhu, X. Z. (2004). C-kit gene mutation in human gastrointestinal stromal tumors. *World journal of gastroenterology*, *10*(9), 1310–1314. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i9.1310>
102. Huang, T., Karsy, M., Zhuge, J., Zhong, M., & Liu, D. (2013). B-Raf and the inhibitors: from bench to bedside. *Journal of hematology & oncology*, *6*, 30. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-30>
103. Huang, Y., Guo, W., & Kan, H. (2014). TPX2 is a prognostic marker and contributes to growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *International journal of molecular sciences*, *15*(10), 18148–18161. <https://doi.org/10.3390/ijms151018148>
104. Huss, S., Pasternack, H., Ihle, M. A., Merkelbach-Bruse, S., Heitkötter, B., Hartmann, W., Trautmann, M., Gevensleben, H., Büttner, R., Schildhaus, H. U., & Wardelmann, E. (2017). Clinicopathological and molecular features of a large cohort of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) and review of the literature: BRAF mutations in KIT/PDGFR wild-type GISTs are rare events. *Human pathology*, *62*, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.01.005>
105. Chen, C., Li, S., Lu, X., Tan, B., Huang, C., & Qin, L. (2014). High resolution melting method to detect single nucleotide polymorphism of VKORC1 and CYP2C9. *International journal of clinical and experimental pathology*, *7*(5), 2558–2564.
106. Chen, J. S., Yeh, C. N., Cheng, C. T., Yen, C. C., Chen, Y. Y., Huang, S. C., Chiang, K. C., Yeh, T. S., Chen, S. C., Chao, T. C., Yang, M. H., & Chao, Y. (2018a). Role of PLK1 signaling pathway genes in gastrointestinal stromal tumors. *Oncology letters*, *16*(3), 3070–3082. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9003>
107. Chen, L. L., Sabripour, M., Andtbacka, R. H., Patel, S. R., Feig, B. W., Macapinlac, H. A., Choi, H., Wu, E. F., Frazier, M. L., & Benjamin, R. S. (2005). Imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Current oncology reports*, *7*(4), 293–299. <https://doi.org/10.1007/s11912-005-0053-6>

108. Chen, Q., Li, R., Zhang, Z. G., Deng, Q. T., Li, K., Wang, H., Yang, X. X., & Wu, Y. S. (2018b). Oncogene mutational analysis in Chinese gastrointestinal stromal tumor patients. *OncoTargets and therapy*, *11*, 2279–2286. <https://doi.org/10.2147/OTT.S155214>
109. Chen, T., Sun, Y., Ji, P., Kopetz, S., & Zhang, W. (2015). Topoisomerase II $\alpha$  in chromosome instability and personalized cancer therapy. *Oncogene*, *34*(31), 4019–4031. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.332>
110. Chen, Y., Huang, L., Dong, Y., Tao, C., Zhang, R., Shao, H., & Shen, H. (2020). Effect of AKT1 (p. E17K) Hotspot Mutation on Malignant Tumorigenesis and Prognosis. *Frontiers in cell and developmental biology*, *8*, 573599. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.573599>
111. Cheng, X., Wang, J., Lu, S., Fan, W., & Wang, W. (2021). Aurora kinase A (AURKA) promotes the progression and imatinib resistance of advanced gastrointestinal stromal tumors. *Cancer cell international*, *21*(1), 407. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02111-7>
112. Chou, A., Chen, J., Clarkson, A., Samra, J. S., Clifton-Bligh, R. J., Hugh, T. J., & Gill, A. J. (2012). Succinate dehydrogenase-deficient GISTs are characterized by IGF1R overexpression. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *25*(9), 1307–1313. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.77>
113. Ibrahim, A., & Chopra, S. (2020). Succinate Dehydrogenase-Deficient Gastrointestinal Stromal Tumors. *Archives of pathology & laboratory medicine*, *144*(5), 655–660. <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0370-RS>
114. Janeway, K. A., Kim, S. Y., Lodish, M., Nosé, V., Rustin, P., Gaal, J., Dahia, P. L., Liegl, B., Ball, E. R., Raygada, M., Lai, A. H., Kelly, L., Hornick, J. L., NIH Pediatric and Wild-Type GIST Clinic, O'Sullivan, M., de Krijger, R. R., Dinjens, W. N., Demetri, G. D., Antonescu, C. R., Fletcher, J. A., ... Stratakis, C. A. (2011). Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(1), 314–318. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009199108>
115. Janeway, K. A., & Weldon, C. B. (2012). Pediatric gastrointestinal stromal tumor. *Seminars in pediatric surgery*, *21*(1), 31–43. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2011.10.003>

116. Jašek, K., Váňová, B., Grendár, M., Štanclová, A., Szépe, P., Hornáková, A., Holubeková, V., Plank, L., & Lasabová, Z. (2020). BRAF mutations in KIT/PDGFR $\alpha$  positive gastrointestinal stromal tumours (GISTs): Is their frequency underestimated?. *Pathology, research and practice*, 216(11), 153171. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153171>
117. Jennings, L. J., Arcila, M. E., Corless, C., Kamel-Reid, S., Lubin, I. M., Pfeifer, J., Temple-Smolkin, R. L., Voelkerding, K. V., & Nikiforova, M. N. (2017). Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 19(3), 341–365. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.01.011>
118. Joensuu, H., Roberts, P. J., Sarlomo-Rikala, M., Andersson, L. C., Tervahartiala, P., Tuveson, D., Silberman, S., Capdeville, R., Dimitrijevic, S., Druker, B., & Demetri, G. D. (2001). Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *The New England journal of medicine*, 344(14), 1052–1056. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441404>
119. Joensuu, H., Martin-Broto, J., Nishida, T., Reichardt, P., Schöffski, P., & Maki, R. G. (2015). Follow-up strategies for patients with gastrointestinal stromal tumour treated with or without adjuvant imatinib after surgery. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 51(12), 1611–1617. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.05.009>
120. Joensuu, H., Wardelmann, E., Sihto, H., Eriksson, M., Sundby Hall, K., Reichardt, A., Hartmann, J. T., Pink, D., Cameron, S., Hohenberger, P., Al-Batran, S. E., Schlemmer, M., Bauer, S., Nilsson, B., Kallio, R., Junnila, J., Vehtari, A., & Reichardt, P. (2017). Effect of KIT and PDGFR $\alpha$  Mutations on Survival in Patients With Gastrointestinal Stromal Tumors Treated With Adjuvant Imatinib: An Exploratory Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA oncology*, 3(5), 602–609. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5751>
121. Kaboli, P. J., Imani, S., Jomhori, M., & Ling, K. H. (2021). Chemoresistance in breast cancer: PI3K/Akt pathway inhibitors vs the current chemotherapy. *American journal of cancer research*, 11(10), 5155–5183.

122. Kadado, K. J., Abernathy, O. L., Salyers, W. J., & Kallail, K. J. (2022). Gastrointestinal Stromal Tumor and Ki-67 as a Prognostic Indicator. *Cureus*, *14*(1), e20868. <https://doi.org/10.7759/cureus.20868>
123. Kalfusova, A., Hilska, I., Krskova, L., Kalinova, M., Linke, Z., & Kodet, R. (2016). Gastrointestinal stromal tumors - quantitative detection of the Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT telomerase subunit mRNA levels to determine proliferation activity and a potential for aggressive biological behavior. *Neoplasma*, *63*(3), 484–492. [https://doi.org/10.4149/320\\_150714N390](https://doi.org/10.4149/320_150714N390)
124. Kalfusova, A., Linke, Z., Kalinova, M., Krskova, L., Hilska, I., Szabova, J., Vicha, A., & Kodet, R. (2019). Gastrointestinal stromal tumors - Summary of mutational status of the primary/secondary KIT/PDGFR mutations, BRAF mutations and SDH defects. *Pathology, research and practice*, *215*(12), 152708. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152708>
125. Kelly, C. M., Gutierrez Sainz, L., & Chi, P. (2021). The management of metastatic GIST: current standard and investigational therapeutics. *Journal of hematology & oncology*, *14*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-01026-6>
126. Kheder, E. S., & Hong, D. S. (2018). Emerging Targeted Therapy for Tumors with *NTRK* Fusion Proteins. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *24*(23), 5807–5814. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1156>
127. Kikuchi, H., Miyazaki, S., Setoguchi, T., Hiramatsu, Y., Ohta, M., Kamiya, K., Sakaguchi, T., & Konno, H. (2012). Rapid relapse after resection of a sunitinib-resistant gastrointestinal stromal tumor harboring a secondary mutation in exon 13 of the c-KIT gene. *Anticancer research*, *32*(9), 4105–4109.
128. Killian, J. K., Miettinen, M., Walker, R. L., Wang, Y., Zhu, Y. J., Waterfall, J. J., Noyes, N., Retnakumar, P., Yang, Z., Smith, W. I., Jr, Killian, M. S., Lau, C. C., Pineda, M., Walling, J., Stevenson, H., Smith, C., Wang, Z., Lasota, J., Kim, S. Y., Boikos, S. A., ... Meltzer, P. S. (2014). Recurrent epimutation of SDHC in gastrointestinal stromal tumors. *Science translational medicine*, *6*(268), 268ra177. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009961>

129. Kim, M. S., Jeong, E. G., Yoo, N. J., & Lee, S. H. (2008). Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. *British journal of cancer*, *98*(9), 1533–1535. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604212>
130. Kim, T. W., Lee, H., Kang, Y. K., Choe, M. S., Ryu, M. H., Chang, H. M., Kim, J. S., Yook, J. H., Kim, B. S., & Lee, J. S. (2004). Prognostic significance of c-kit mutation in localized gastrointestinal stromal tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *10*(9), 3076–3081. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0581>
131. Kindblom, L. G., Remotti, H. E., Aldenborg, F., & Meis-Kindblom, J. M. (1998). Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *The American journal of pathology*, *152*(5), 1259–1269.
132. Kong, W., Lv, N., Wysham, W. Z., Roque, D. R., Zhang, T., Jiao, S., Song, D., Chen, J., Bae-Jump, V. L., & Zhou, C. (2015). Knockdown of hTERT and Treatment with BIBR1532 Inhibit Cell Proliferation and Invasion in Endometrial Cancer Cells. *Journal of Cancer*, *6*(12), 1337–1345. <https://doi.org/10.7150/jca.13054>
133. Koon, N., Schneider-Stock, R., Sarlomo-Rikala, M., Lasota, J., Smolkin, M., Petroni, G., Zaika, A., Boltze, C., Meyer, F., Andersson, L., Knuutila, S., Miettinen, M., & El-Rifai, W. (2004). Molecular targets for tumour progression in gastrointestinal stromal tumours. *Gut*, *53*(2), 235–240. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.021238>
134. Kozinova, M., Joshi, S., Ye, S., Belinsky, M. G., Sharipova, D., Farma, J. M., Reddy, S. S., Litwin, S., Devarajan, K., Campos, A. R., Yu, Y., Schwartz, B., von Mehren, M., & Rink, L. (2021). Combined Inhibition of AKT and KIT Restores Expression of Programmed Cell Death 4 (PDCD4) in Gastrointestinal Stromal Tumor. *Cancers*, *13*(15), 3699. <https://doi.org/10.3390/cancers13153699>
135. Lasota, J., Wozniak, A., Sarlomo-Rikala, M., Rys, J., Kordek, R., Nassar, A., Sobin, L. H., & Miettinen, M. (2000). Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases. *The American journal of pathology*, *157*(4), 1091–1095. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64623-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64623-8)
136. Lasota, J., Stachura, J., & Miettinen, M. (2006). GISTs with PDGFRA exon 14 mutations represent subset of clinically favorable gastric tumors with epithelioid

morphology. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 86(1), 94–100. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700360>

137. Lasota, J., Wasag, B., Steigen, S. E., Limon, J., & Miettinen, M. (2007). Improved detection of KIT exon 11 duplications in formalin-fixed, paraffin-embedded gastrointestinal stromal tumors. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 9(1), 89–94. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2007.060104>

138. Lasota, J., & Miettinen, M. (2008). Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology*, 53(3), 245–266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2008.02977.x>

139. Lasota, J., Corless, C. L., Heinrich, M. C., Debiec-Rychter, M., Sciot, R., Wardelmann, E., Merkelbach-Bruse, S., Schildhaus, H. U., Steigen, S. E., Stachura, J., Wozniak, A., Antonescu, C., Daum, O., Martin, J., Del Muro, J. G., & Miettinen, M. (2008). Clinicopathologic profile of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with primary KIT exon 13 or exon 17 mutations: a multicenter study on 54 cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 21(4), 476–484. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.2>

140. Lasota, J., Xi, L., Coates, T., Dennis, R., Evbuomwan, M. O., Wang, Z. F., Raffeld, M., & Miettinen, M. (2013). No KRAS mutations found in gastrointestinal stromal tumors (GISTs): molecular genetic study of 514 cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 26(11), 1488–1491. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.89>

141. Lasota, J., Felisiak-Golabek, A., Wasag, B., Kowalik, A., Zięba, S., Chłopek, M., Wang, Z. F., Coates, T., Kopczynski, J., Gozdz, S., Sarlomo-Rikala, M., & Miettinen, M. (2016). Frequency and clinicopathologic profile of PIK3CA mutant GISTs: molecular genetic study of 529 cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 29(3), 275–282. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.160>

142. Leão, R., Apolónio, J. D., Lee, D., Figueiredo, A., Tabori, U., & Castelo-Branco, P. (2018). Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. *Journal of biomedical science*, 25(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0422-8>



143. Lennartsson, J., & Rönstrand, L. (2012). Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiological reviews*, *92*(4), 1619–1649. <https://doi.org/10.1152/physrev.00046.2011>
144. Li, G. Z., & Raut, C. P. (2019). Targeted therapy and personalized medicine in gastrointestinal stromal tumors: drug resistance, mechanisms, and treatment strategies. *OncoTargets and therapy*, *12*, 5123–5133. <https://doi.org/10.2147/OTT.S180763>
145. Li, J., Wang, A. R., Chen, X. D., Pan, H., & Li, S. Q. (2022). Ki67 for evaluating the prognosis of gastrointestinal stromal tumors: A systematic review and meta-analysis. *Oncology letters*, *23*(6), 189. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13309>
146. Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q., & Zheng, J. N. (2015). Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Molecular medicine reports*, *11*(3), 1566–1572. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2914>
147. Liegl, B., Kepten, I., Le, C., Zhu, M., Demetri, G. D., Heinrich, M. C., Fletcher, C. D., Corless, C. L., & Fletcher, J. A. (2008). Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *The Journal of pathology*, *216*(1), 64–74. <https://doi.org/10.1002/path.2382>
148. Liegl, B., Hornick, J. L., Antonescu, C. R., Corless, C. L., & Fletcher, C. D. (2009). Rhabdomyosarcomatous differentiation in gastrointestinal stromal tumors after tyrosine kinase inhibitor therapy: a novel form of tumor progression. *The American journal of surgical pathology*, *33*(2), 218–226. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31817ec2e6>
149. Lim, K. H., Huang, M. J., Chen, L. T., Wang, T. E., Liu, C. L., Chang, C. S., Liu, M. C., Hsieh, R. K., & Tzen, C. Y. (2008). Molecular analysis of secondary kinase mutations in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, *25*(2), 207–213. <https://doi.org/10.1007/s12032-007-9014-2>
150. Liu, N., Stoica, G., Yan, M., Scofield, V. L., Qiang, W., Lynn, W. S., & Wong, P. K. (2005). ATM deficiency induces oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in astrocytes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *85*(12), 1471–1480. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700354>
151. Liu, P., Tan, F., Liu, H., Li, B., Lei, T., & Zhao, X. (2020). The Use of Molecular Subtypes for Precision Therapy of Recurrent and Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumor. *OncoTargets and therapy*, *13*, 2433–2447. <https://doi.org/10.2147/OTT.S241331>

152. Liu, T., Yuan, X., & Xu, D. (2016). Cancer-Specific Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Promoter Mutations: Biological and Clinical Implications. *Genes*, 7(7), 38. <https://doi.org/10.3390/genes7070038>
153. Liu, W., Xu, J., & Zhang, C. (2018). Prognostic and clinical value of Targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2 in patients with gastrointestinal tract cancers: A meta-analysis. *Medicine*, 97(46), e13303. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013303>
154. Lou, L., Zhang, W., Li, J., & Wang, Y. (2020). Abnormal MGMT Promoter Methylation in Gastrointestinal Stromal Tumors: Genetic Susceptibility and Association with Clinical Outcome. *Cancer management and research*, 12, 9941–9952. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S269388>
155. Ma, S., Rong, X., Gao, F., Yang, Y., & Wei, L. (2018). TPX2 promotes cell proliferation and migration via PLK1 in OC. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 22(3), 443–451. <https://doi.org/10.3233/CBM-171056>
156. Madsen, R. R., Vanhaesebroeck, B., & Semple, R. K. (2018). Cancer-Associated PIK3CA Mutations in Overgrowth Disorders. *Trends in molecular medicine*, 24(10), 856–870. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.08.003>
157. Maggisano, V., Celano, M., Lombardo, G. E., Lepore, S. M., Sponziello, M., Rosignolo, F., Verrienti, A., Baldan, F., Puxeddu, E., Durante, C., Filetti, S., Damante, G., Russo, D., & Bulotta, S. (2017). Silencing of hTERT blocks growth and migration of anaplastic thyroid cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 448, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.03.007>
158. Maleddu, A., Pantaleo, M. A., Nannini, M., Di Battista, M., Saponara, M., Lolli, C., & Biasco, G. (2009). Mechanisms of secondary resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumours (Review). *Oncology reports*, 21(6), 1359–1366. [https://doi.org/10.3892/or\\_00000361](https://doi.org/10.3892/or_00000361)
159. Martín, J., Poveda, A., Llombart-Bosch, A., Ramos, R., López-Guerrero, J. A., García del Muro, J., Maurel, J., Calabuig, S., Gutierrez, A., González de Sande, J. L., Martínez, J., De Juan, A., Laínez, N., Losa, F., Alija, V., Escudero, P., Casado, A., García, P., Blanco, R., Buesa, J. M., ... Spanish Group for Sarcoma Research (2005). Deletions affecting codons 557-558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma

Research (GEIS). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(25), 6190–6198. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.19.554>

160. Mateo, L., Duran-Frigola, M., Gris-Oliver, A., Palafox, M., Scaltriti, M., Razavi, P., Chandarlapaty, S., Arribas, J., Bellet, M., Serra, V., & Aloy, P. (2020). Personalized cancer therapy prioritization based on driver alteration co-occurrence patterns. *Genome medicine*, 12(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00774-x>

161. Matias-Barrios, V. M., Radaeva, M., Song, Y., Alperstein, Z., Lee, A. R., Schmitt, V., Lee, J., Ban, F., Xie, N., Qi, J., Lallous, N., Gleave, M. E., Cherkasov, A., & Dong, X. (2021). Discovery of New Catalytic Topoisomerase II Inhibitors for Anticancer Therapeutics. *Frontiers in oncology*, 10, 633142. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.633142>

162. Mathias-Machado, M. C., de Jesus, V. H. F., de Carvalho Oliveira, L. J., Neumann, M., & Peixoto, R. D. (2022). Current Molecular Profile of Gastrointestinal Stromal Tumors and Systemic Therapeutic Implications. *Cancers*, 14(21), 5330. <https://doi.org/10.3390/cancers14215330>

163. Mavroeidis, L., Metaxa-Mariatou, V., Papoudou-Bai, A., Lampraki, A. M., Kostadima, L., Tsinokou, I., Zarkavelis, G., Papadaki, A., Petrakis, D., Gkoura, S., Kamplatsas, E., Nasioulas, G., Batistatou, A., & Pentheroudakis, G. (2018). Comprehensive molecular screening by next generation sequencing reveals a distinctive mutational profile of *KIT/PDGFR* genes and novel genomic alterations: results from a 20-year cohort of patients with GIST from north-western Greece. *ESMO open*, 3(3), e000335. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2018-000335>

164. Mei, L., Du, W., Idowu, M., von Mehren, M., & Boikos, S. A. (2018). Advances and Challenges on Management of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Frontiers in oncology*, 8, 135. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00135>

165. Meng, J., Wei, Y., Deng, Q., Li, L., & Li, X. (2022). Study on the expression of TOP2A in hepatocellular carcinoma and its relationship with patient prognosis. *Cancer cell international*, 22(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02439-0>

166. Merkelbach-Bruse, S., Dietmaier, W., Füzesi, L., Gaumann, A., Haller, F., Kitz, J., Krohn, A., Mechtersheimer, G., Penzel, R., Schildhaus, H. U., Schneider-Stock, R., Simon, R., & Wardelmann, E. (2010). Pitfalls in mutational testing and reporting of common KIT

and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors. *BMC medical genetics*, 11, 106. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-106>

167. Miettinen, M., Sarlomo-Rikala, M., & Lasota, J. (1999a). Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Human pathology*, 30(10), 1213–1220. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(99\)90040-0](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(99)90040-0)

168. Miettinen, M., Monihan, J. M., Sarlomo-Rikala, M., Kovatich, A. J., Carr, N. J., Emory, T. S., & Sobin, L. H. (1999b). Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors (GISTs) primary in the omentum and mesentery: clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *The American journal of surgical pathology*, 23(9), 1109–1118. <https://doi.org/10.1097/00000478-199909000-00015>

169. Miettinen, M., & Lasota, J. (2001). Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 438(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s004280000338>

170. Miettinen, M., El-Rifai, W., H L Sobin, L., & Lasota, J. (2002). Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review. *Human pathology*, 33(5), 478–483. <https://doi.org/10.1053/hupa.2002.124123>

171. Miettinen, M., Lasota, J., & Sobin, L. H. (2005). Gastrointestinal stromal tumors of the stomach in children and young adults: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases with long-term follow-up and review of the literature. *The American journal of surgical pathology*, 29(10), 1373–1381. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000172190.79552.8b>

172. Miettinen, M., & Lasota, J. (2006). Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 130(10), 1466–1478. <https://doi.org/10.5858/2006-130-1466-GSTROM>

173. Miettinen, M., Wang, Z. F., & Lasota, J. (2009). DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases. *The American journal of surgical pathology*, 33(9), 1401–1408. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181a90e1a>

174. Miettinen, M., Wang, Z. F., Sarlomo-Rikala, M., Osuch, C., Rutkowski, P., & Lasota, J. (2011). Succinate dehydrogenase-deficient GISTs: a clinicopathologic,

immunohistochemical, and molecular genetic study of 66 gastric GISTs with predilection to young age. *The American journal of surgical pathology*, 35(11), 1712–1721. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182260752>

175. Miettinen, M., & Lasota, J. (2013). Gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology clinics of North America*, 42(2), 399–415. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2013.01.001>

176. Miller, I., Min, M., Yang, C., Tian, C., Gookin, S., Carter, D., & Spencer, S. L. (2018). Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell reports*, 24(5), 1105–1112.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.110>

177. Miranda, C., Nucifora, M., Molinari, F., Conca, E., Anania, M. C., Bordoni, A., Saletti, P., Mazzucchelli, L., Pilotti, S., Pierotti, M. A., Tamborini, E., Greco, A., & Frattini, M. (2012). KRAS and BRAF mutations predict primary resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(6), 1769–1776. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2230>

178. Morris, S. M., Subramanian, J., Gel, E. S., Runger, G. C., Thompson, E. J., Mallery, D. W., & Weiss, G. J. (2018). Performance of next-generation sequencing on small tumor specimens and/or low tumor content samples using a commercially available platform. *PloS one*, 13(4), e0196556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196556>

179. Mou Y, Wang Q, Li B. (2018). “The 'Wild'-Type Gastrointestinal Stromal Tumors: Heterogeneity on Molecule Characteristics and Clinical Features.” *Cancer Transl Med*, 4(3):75–82. doi: 10.4103/ctm.ctm\_17\_18

180. Nannini, M., Astolfi, A., Urbini, M., Indio, V., Santini, D., Heinrich, M. C., Corless, C. L., Ceccarelli, C., Saponara, M., Mandrioli, A., Lolli, C., Ercolani, G., Brandi, G., Biasco, G., & Pantaleo, M. A. (2014). Integrated genomic study of quadruple-WT GIST (KIT/PDGFR/SDH/RAS pathway wild-type GIST). *BMC cancer*, 14, 685. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-685>

181. Nannini, M., Urbini, M., Astolfi, A., Biasco, G., & Pantaleo, M. A. (2017). The progressive fragmentation of the KIT/PDGFR wild-type (WT) gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Journal of translational medicine*, 15(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1212-x>

182. Napolitano, A., & Vincenzi, B. (2019). Secondary KIT mutations: the GIST of drug resistance and sensitivity. *British journal of cancer*, *120*(6), 577–578. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0388-7>
183. Ney, J. T., Froehner, S., Roesler, A., Buettner, R., & Merkelbach-Bruse, S. (2012). High-resolution melting analysis as a sensitive prescreening diagnostic tool to detect KRAS , BRAF , PIK3CA , and AKT1 mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Archives of pathology & laboratory medicine*, *136*(9), 983–992. <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0176-OA>
184. Nielsen, C. F., Zhang, T., Barisic, M., Kalitsis, P., & Hudson, D. F. (2020). Topoisomerase II $\alpha$  is essential for maintenance of mitotic chromosome structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(22), 12131–12142. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001760117>
185. Niinuma, T., Suzuki, H., & Sugai, T. (2018). Molecular characterization and pathogenesis of gastrointestinal stromal tumor. *Translational gastroenterology and hepatology*, *3*, 2. <https://doi.org/10.21037/tgh.2018.01.02>
186. Nishida, T., Kanda, T., Nishitani, A., Takahashi, T., Nakajima, K., Ishikawa, T., & Hirota, S. (2008). Secondary mutations in the kinase domain of the KIT gene are predominant in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Cancer science*, *99*(4), 799–804. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00727.x>
187. Nishida, T., Blay, J. Y., Hirota, S., Kitagawa, Y., & Kang, Y. K. (2016a). The standard diagnosis, treatment, and follow-up of gastrointestinal stromal tumors based on guidelines. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, *19*(1), 3–14.
188. Nishida, T., Tsujimoto, M., Takahashi, T., Hirota, S., Blay, J. Y., & Wataya-Kaneda, M. (2016b). Gastrointestinal stromal tumors in Japanese patients with neurofibromatosis type I. *Journal of gastroenterology*, *51*(6), 571–578. <https://doi.org/10.1007/s00535-015-1132-6>
189. Nowak, K., Formenti, K., Huang, J., Bigras, G., Chu, Q., Adam, B. A., & Izevbaye, I. (2022). Risk stratification of gastrointestinal stromal tumors by Nanostring gene expression profiling. *Journal of cancer research and clinical oncology*, *148*(6), 1325–1336. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-03924-3>

190. Ordog, T., Zörnig, M., & Hayashi, Y. (2015). Targeting Disease Persistence in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Stem cells translational medicine*, 4(7), 702–707. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0298>
191. Pantaleo, M. A., Astolfi, A., Urbini, M., Nannini, M., Paterini, P., Indio, V., Saponara, M., Formica, S., Ceccarelli, C., Casadio, R., Rossi, G., Bertolini, F., Santini, D., Pirini, M. G., Fiorentino, M., Basso, U., Biasco, G., & GIST Study Group (2014). Analysis of all subunits, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, of the succinate dehydrogenase complex in KIT/PDGFRA wild-type GIST. *European journal of human genetics : EJHG*, 22(1), 32–39. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.80>
192. Pantaleo, M. A., Nannini, M., Corless, C. L., & Heinrich, M. C. (2015). Quadruple wild-type (WT) GIST: defining the subset of GIST that lacks abnormalities of KIT, PDGFRA, SDH, or RAS signaling pathways. *Cancer medicine*, 4(1), 101–103. <https://doi.org/10.1002/cam4.325>
193. Pantaleo, M. A., Urbini, M., Indio, V., Ravegnini, G., Nannini, M., De Luca, M., Tarantino, G., Angelini, S., Gronchi, A., Vincenzi, B., Grignani, G., Colombo, C., Fumagalli, E., Gatto, L., Saponara, M., Ianni, M., Paterini, P., Santini, D., Pirini, M. G., Ceccarelli, C., ... Biasco, G. (2017). Genome-Wide Analysis Identifies MEN1 and MAX Mutations and a Neuroendocrine-Like Molecular Heterogeneity in Quadruple WT GIST. *Molecular cancer research : MCR*, 15(5), 553–562. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0376>
194. Panvichian, R., Tantiwetrueangdet, A., Angkathunyakul, N., & Leelaudomlipi, S. (2015). TOP2A amplification and overexpression in hepatocellular carcinoma tissues. *BioMed research international*, 2015, 381602. <https://doi.org/10.1155/2015/381602>
195. Pauwels, P., Debiec-Rychter, M., Stul, M., De Wever, I., Van Oosterom, A. T., & Sciot, R. (2005). Changing phenotype of gastrointestinal stromal tumours under imatinib mesylate treatment: a potential diagnostic pitfall. *Histopathology*, 47(1), 41–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02179.x>
196. Pei, Y. F., Yin, X. M., & Liu, X. Q. (2018). TOP2A induces malignant character of pancreatic cancer through activating  $\beta$ -catenin signaling pathway. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1864(1), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.10.019>

197. Pérez de Castro, I., & Malumbres, M. (2012). Mitotic Stress and Chromosomal Instability in Cancer: The Case for TPX2. *Genes & cancer*, 3(11-12), 721–730. <https://doi.org/10.1177/1947601912473306>
198. Pitsava, G., Settas, N., Faucz, F. R., & Stratakis, C. A. (2021). Carney Triad, Carney-Stratakis Syndrome, 3PAS and Other Tumors Due to SDH Deficiency. *Frontiers in endocrinology*, 12, 680609. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.680609>
199. Postow, M. A., & Robson, M. E. (2012). Inherited gastrointestinal stromal tumor syndromes: mutations, clinical features, and therapeutic implications. *Clinical sarcoma research*, 2(1), 16. <https://doi.org/10.1186/2045-3329-2-16>
200. Pyo, J. S., Kang, G., & Sohn, J. H. (2016). Ki-67 labeling index can be used as a prognostic marker in gastrointestinal stromal tumor: a systematic review and meta-analysis. *The International journal of biological markers*, 31(2), e204–e210. <https://doi.org/10.5301/jbm.5000183>
201. Ramlee, M. K., Wang, J., Toh, W. X., & Li, S. (2016). Transcription Regulation of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Gene. *Genes*, 7(8), 50. <https://doi.org/10.3390/genes7080050>
202. Ravegnini, G., & Ricci, R. (2019). Succinate Dehydrogenase-Deficient Gastrointestinal Stromal Tumors: Small Steps Toward Personalized Medicine?. *Epigenetics insights*, 12, 2516865719842534. <https://doi.org/10.1177/2516865719842534>
203. Ravegnini, G., Hrelia, P., & Angelini, S. (2019). Somatic pharmacogenomics of gastrointestinal stromal tumor. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, 2(1), 107–115. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.02>
204. Reith, J. D., Goldblum, J. R., Lyles, R. H., & Weiss, S. W. (2000). Extragastrintestinal (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 13(5), 577–585. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880099>
205. Ricci, R., Martini, M., Ravegnini, G., Cenci, T., Milione, M., Lanza, P., Pierconti, F., Santini, D., Angelini, S., Biondi, A., Rosa, F., Alfieri, S., Clemente, G., Persiani, R., Cassano, A., Pantaleo, M. A., & Larocca, L. M. (2019). Preferential MGMT methylation could predispose a subset of KIT/PDGFR $\alpha$ -WT GISTs, including SDH-deficient ones, to



respond to alkylating agents. *Clinical epigenetics*, 11(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0594-9>

206. Ríos-Moreno, M. J., Jaramillo, S., Pereira Gallardo, S., Vallejo, A., Mora, M., García-Escudero, A., Amérigo, J., & González-Cámpora, R. (2012). Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): CD117, DOG-1 and PKC $\theta$  expression. Is there any advantage in using several markers?. *Pathology, research and practice*, 208(2), 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2011.11.006>

207. Rossi, S., Gasparotto, D., Miceli, R., Toffolatti, L., Gallina, G., Scaramel, E., Marzotto, A., Boscato, E., Messerini, L., Bearzi, I., Mazzoleni, G., Capella, C., Arrigoni, G., Sonzogni, A., Sidoni, A., Mariani, L., Amore, P., Gronchi, A., Casali, P. G., Maestro, R., ... Dei Tos, A. P. (2015). KIT, PDGFRA, and BRAF mutational spectrum impacts on the natural history of imatinib-naive localized GIST: a population-based study. *The American journal of surgical pathology*, 39(7), 922–930. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000418>

208. Rubin B. P. (2006). Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology*, 48(1), 83–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02291.x>

209. Rutkowski P. (2021). Why We Still Need the Better Risk Classification for GIST. *Annals of surgical oncology*, 28(5), 2425–2427. <https://doi.org/10.1245/s10434-021-09620-9>

210. Sakurai, S., Fukayama, M., Kaizaki, Y., Saito, K., Kanazawa, K., Kitamura, M., Iwasaki, Y., Hishima, T., Hayashi, Y., & Koike, M. (1998). Telomerase activity in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer*, 83(10), 2060–2066. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19981115\)83:10<2060::aid-cnrc3>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19981115)83:10<2060::aid-cnrc3>3.0.co;2-#)

211. Sakurai, S., Hishima, T., Takazawa, Y., Sano, T., Nakajima, T., Saito, K., Morinaga, S., & Fukayama, M. (2001). Gastrointestinal stromal tumors and KIT-positive mesenchymal cells in the omentum. *Pathology international*, 51(7), 524–531. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1827.2001.01224.x>

212. Samelis, G. F., Ekmektzoglou, K. A., & Zografos, G. C. (2007). Gastrointestinal stromal tumours: clinical overview, surgery and recent advances in imatinib mesylate therapy. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of*

*Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 33(8), 942–950.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejso.2006.11.025>

213. Saponara, M., Urbini, M., Astolfi, A., Indio, V., Ercolani, G., Del Gaudio, M., Santini, D., Pirini, M. G., Fiorentino, M., Nannini, M., Lolli, C., Mandrioli, A., Gatto, L., Brandi, G., Biasco, G., Pinna, A. D., & Pantaleo, M. A. (2015). Molecular characterization of metastatic exon 11 mutant gastrointestinal stromal tumors (GIST) beyond KIT/PDGFR $\alpha$  genotype evaluated by next generation sequencing (NGS). *Oncotarget*, 6(39), 42243–42257. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6278>

214. Selak, M. A., Armour, S. M., MacKenzie, E. D., Boulahbel, H., Watson, D. G., Mansfield, K. D., Pan, Y., Simon, M. C., Thompson, C. B., & Gottlieb, E. (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer cell*, 7(1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.11.022>

215. Serrano, C., Mariño-Enríquez, A., Tao, D. L., Ketzer, J., Eilers, G., Zhu, M., Yu, C., Mannan, A. M., Rubin, B. P., Demetri, G. D., Raut, C. P., Presnell, A., McKinley, A., Heinrich, M. C., Czapinski, J. T., Sicinska, E., Bauer, S., George, S., & Fletcher, J. A. (2019). Complementary activity of tyrosine kinase inhibitors against secondary kit mutations in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumours. *British journal of cancer*, 120(6), 612–620. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0389-6>

216. Serrano, C., & George, S. (2020). Gastrointestinal Stromal Tumor: Challenges and Opportunities for a New Decade. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 26(19), 5078–5085. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-1706>

217. Settas, N., Faucz, F. R., & Stratakis, C. A. (2018). Succinate dehydrogenase (SDH) deficiency, Carney triad and the epigenome. *Molecular and cellular endocrinology*, 469, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.018>

218. Sharma, A. K., de la Torre, J., IJzerman, N. S., Sutton, T. L., Zhao, B., Khan, T. M., Banerjee, S., Cui, C., Nguyen, V., Alkhuziem, M., Snaebjornsson, P., van Boven, H., Bruining, A., Tang, C. M., Yoon, H., De la Fuente, A., Kato, S., Patel, H., Heinrich, M. C., Corless, C. L., ... Sicklick, J. K. (2021). Location of Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST) in the Stomach Predicts Tumor Mutation Profile and Drug Sensitivity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 27(19), 5334–5342. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-1221>

219. Shi, E., Chmielecki, J., Tang, C. M., Wang, K., Heinrich, M. C., Kang, G., Corless, C. L., Hong, D., Fero, K. E., Murphy, J. D., Fanta, P. T., Ali, S. M., De Siena, M., Burgoyne, A. M., Movva, S., Madlensky, L., Heestand, G. M., Trent, J. C., Kurzrock, R., Morosini, D., ... Sicklick, J. K. (2016). FGFR1 and NTRK3 actionable alterations in "Wild-Type" gastrointestinal stromal tumors. *Journal of translational medicine*, *14*(1), 339. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1075-6>
220. Shi, Z., Jiang, W., Chen, X., Xu, M., Wang, X., & Zha, D. (2020). Prognostic and clinicopathological value of Ki-67 expression in patients with nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis. *Therapeutic advances in medical oncology*, *12*, 1758835920951346. <https://doi.org/10.1177/1758835920951346>
221. Schaefer, I. M., & Fletcher, C. D. M. (2018). Recent advances in the diagnosis of soft tissue tumours. *Pathology*, *50*(1), 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.07.007>
222. Schaefer, I. M., DeMatteo, R. P., & Serrano, C. (2022). The GIST of Advances in Treatment of Advanced Gastrointestinal Stromal Tumor. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, *42*, 1–15. [https://doi.org/10.1200/EDBK\\_351231](https://doi.org/10.1200/EDBK_351231)
223. Sihto, H., Sarlomo-Rikala, M., Tynninen, O., Tanner, M., Andersson, L. C., Franssila, K., Nupponen, N. N., & Joensuu, H. (2005). KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha tyrosine kinase gene mutations and KIT amplifications in human solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *23*(1), 49–57. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.093>
224. Smits, A. J., Kummer, J. A., de Bruin, P. C., Bol, M., van den Tweel, J. G., Seldenrijk, K. A., Willems, S. M., Offerhaus, G. J., de Weger, R. A., van Diest, P. J., & Vink, A. (2014). The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *27*(2), 168–174. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.134>
225. Sobecki, M., Mrouj, K., Camasses, A., Parisis, N., Nicolas, E., Llères, D., Gerbe, F., Prieto, S., Krasinska, L., David, A., Eguren, M., Birling, M. C., Urbach, S., Hem, S., Déjardin, J., Malumbres, M., Jay, P., Dulic, V., Lafontaine, D. L.j, Feil, R., ... Fisher, D. (2016). The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *eLife*, *5*, e13722. <https://doi.org/10.7554/eLife.13722>

226. Sobecki, M., Mrouj, K., Colinge, J., Gerbe, F., Jay, P., Krasinska, L., Dulic, V., & Fisher, D. (2017). Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer research*, 77(10), 2722–2734. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0707>
227. Sözütek, D., Yanık, S., Akkoca, A. N., Sözütek, A., Ozdemir, Z. T., Avşar, C. U., Günaldı, M., Sahin, B., & Doron, F. (2014). Diagnostic and prognostic roles of DOG1 and Ki-67, in GIST patients with localized or advanced/metastatic disease. *International journal of clinical and experimental medicine*, 7(7), 1914–1922.
228. Stacey, D. W., Hitomi, M., & Chen, G. (2000). Influence of cell cycle and oncogene activity upon topoisomerase II $\alpha$  expression and drug toxicity. *Molecular and cellular biology*, 20(24), 9127–9137. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.24.9127-9137.2000>
229. Starzyńska, A., Sejda, A., Adamska, P., Marvaso, G., Sakowicz-Burkiewicz, M., Adamski, Ł., & Jereczek-Fossa, B. A. (2020). Prognostic value of the *PIK3CA*, *AKT*, and *PTEN* mutations in oral squamous cell carcinoma: literature review. *Archives of medical science : AMS*, 17(1), 207–217. <https://doi.org/10.5114/aoms.2020.100780>
230. Steigen, S. E., & Eide, T. J. (2009). Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a review. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 117(2), 73–86. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2008.00020.x>
231. Stratakis, C. A., & Carney, J. A. (2009). The triad of paragangliomas, gastric stromal tumours and pulmonary chondromas (Carney triad), and the dyad of paragangliomas and gastric stromal sarcomas (Carney-Stratakis syndrome): molecular genetics and clinical implications. *Journal of internal medicine*, 266(1), 43–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02110.x>
232. Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127(2), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>
233. Supek, F., Miñana, B., Valcárcel, J., Gabaldón, T., & Lehner, B. (2014). Synonymous mutations frequently act as driver mutations in human cancers. *Cell*, 156(6), 1324–1335. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.051>
234. Supek F. (2016). The Code of Silence: Widespread Associations Between Synonymous Codon Biases and Gene Function. *Journal of molecular evolution*, 82(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s00239-015-9714-8>

235. Szucs, Z., Thway, K., Fisher, C., Bulusu, R., Constantinidou, A., Benson, C., van der Graaf, W. T., & Jones, R. L. (2017). Molecular subtypes of gastrointestinal stromal tumors and their prognostic and therapeutic implications. *Future oncology (London, England)*, *13*(1), 93–107. <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0192>
236. Tajima, S., Ohata, A., Koda, K., & Maruyama, Y. (2015). Myxoid epithelioid gastrointestinal stromal tumor harboring an unreported PDGFRA mutation: report of a case and review of the literature. *International journal of clinical and experimental pathology*, *8*(5), 5821–5829.
237. Tamborini, E., Pricl, S., Negri, T., Lagonigro, M. S., Miselli, F., Greco, A., Gronchi, A., Casali, P. G., Ferrone, M., Fermeiglia, M., Carbone, A., Pierotti, M. A., & Pilotti, S. (2006). Functional analyses and molecular modeling of two c-Kit mutations responsible for imatinib secondary resistance in GIST patients. *Oncogene*, *25*(45), 6140–6146. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209639>
238. Tang, C. M., Lee, T. E., Syed, S. A., Burgoyne, A. M., Leonard, S. Y., Gao, F., Chan, J. C., Shi, E., Chmielecki, J., Morosini, D., Wang, K., Ross, J. S., Kendrick, M. L., Bardsley, M. R., Siena, M., Mao, J., Harismendy, O., Ordog, T., & Sicklick, J. K. (2016). Hedgehog pathway dysregulation contributes to the pathogenesis of human gastrointestinal stromal tumors via GLI-mediated activation of KIT expression. *Oncotarget*, *7*(48), 78226–78241. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12909>
239. Tarn, C., Rink, L., Merkel, E., Flieder, D., Pathak, H., Koumbi, D., Testa, J. R., Eisenberg, B., von Mehren, M., & Godwin, A. K. (2008). Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for gastrointestinal stromal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(24), 8387–8392. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803383105>
240. Tian, Y., Ma, Z., Chen, Z., Li, M., Wu, Z., Hong, M., Wang, H., Svatek, R., Rodriguez, R., & Wang, Z. (2016). Clinicopathological and Prognostic Value of Ki-67 Expression in Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one*, *11*(7), e0158891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158891>
241. Torihashi, S., Nishi, K., Tokutomi, Y., Nishi, T., Ward, S., & Sanders, K. M. (1999). Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology*, *117*(1), 140–148. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70560-3](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70560-3)

242. Tornillo, L., & Terracciano, L. M. (2006). An update on molecular genetics of gastrointestinal stromal tumours. *Journal of clinical pathology*, *59*(6), 557–563. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.031112>
243. Tornillo L. (2014). Gastrointestinal stromal tumor - an evolving concept. *Frontiers in medicine*, *1*, 43. <https://doi.org/10.3389/fmed.2014.00043>
244. Valencia, E., & Saif, M. W. (2014). Neurofibromatosis type 1 and GIST: is there a correlation?. *Anticancer research*, *34*(10), 5609–5612.
245. van Dongen, J. J., Langerak, A. W., Brüggemann, M., Evans, P. A., Hummel, M., Lavender, F. L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., García-Sanz, R., van Krieken, J. H., Droese, J., González, D., Bastard, C., White, H. E., Spaargaren, M., González, M., Parreira, A., Smith, J. L., Morgan, G. J., ... Macintyre, E. A. (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, *17*(12), 2257–2317. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403202>
246. van Oosterom, A. T., Judson, I., Verweij, J., Stroobants, S., Donato di Paola, E., Dimitrijevic, S., Martens, M., Webb, A., Sciot, R., Van Glabbeke, M., Silberman, S., Nielsen, O. S., & European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (2001). Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet (London, England)*, *358*(9291), 1421–1423. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06535-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06535-7)
247. Vassos, N., Agaimy, A., Schlabrakowski, A., Hohenberger, W., Schneider-Stock, R., & Croner, R. S. (2011). An unusual and potentially misleading phenotypic change in a primary gastrointestinal stromal tumour (GIST) under imatinib mesylate therapy. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, *458*(3), 363–369. <https://doi.org/10.1007/s00428-010-1034-1>
248. Verweij, J., Casali, P. G., Zalcberg, J., LeCesne, A., Reichardt, P., Blay, J. Y., Issels, R., van Oosterom, A., Hogendoorn, P. C., Van Glabbeke, M., Bertulli, R., & Judson, I. (2004). Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet (London, England)*, *364*(9440), 1127–1134. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17098-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17098-0)

249. von Mehren, M., & Joensuu, H. (2018). Gastrointestinal Stromal Tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(2), 136–143. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.9705>
250. Walker, J. A., & Upadhyaya, M. (2018). Emerging therapeutic targets for neurofibromatosis type 1. *Expert opinion on therapeutic targets*, 22(5), 419–437. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1465931>
251. Wang, C. M., Fu, H., Zhao, G. F., Zhou, X. Y., Du, C. Y., Dong, R. Z., Zhou, Y., & Shi, Y. Q. (2009). Secondary resistance to imatinib in patients with gastrointestinal stromal tumors through an acquired KIT exon 17 mutation. *Molecular medicine reports*, 2(3), 455–460. [https://doi.org/10.3892/mmr\\_00000121](https://doi.org/10.3892/mmr_00000121)
252. Wang, K., Wang, R. L., Liu, J. J., Zhou, J., Li, X., Hu, W. W., Jiang, W. J., & Hao, N. B. (2018). The prognostic significance of hTERT overexpression in cancers: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 97(35), e11794. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011794>
253. Wang, S., Li, Q., Ma, P., Fang, Y., Yu, Y., Jiang, N., Miao, H., Tang, Q., Yang, Y., Xing, S., Chen, R., Yi, X., & Li, N. (2022). KRAS Mutation in Rare Tumors: A Landscape Analysis of 3453 Chinese Patients. *Frontiers in molecular biosciences*, 9, 831382. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.831382>
254. Wang, Y., Wang, H., Yan, Z., Li, G., Hu, G., Zhang, H., Huang, D., Wang, Y., Zhang, X., Yan, Y., Lu, Q., Cheng, M., & Luo, S. (2020). The critical role of dysregulated Hh-FOXM1-TPX2 signaling in human hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Cell communication and signaling : CCS*, 18(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00628-4>
255. Wardelmann, E., Neidt, I., Bierhoff, E., Speidel, N., Manegold, C., Fischer, H. P., Pfeifer, U., & Pietsch, T. (2002). c-kit mutations in gastrointestinal stromal tumors occur preferentially in the spindle rather than in the epithelioid cell variant. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 15(2), 125–136. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880504>
256. Wardelmann, E., Losen, I., Hans, V., Neidt, I., Speidel, N., Bierhoff, E., Heinicke, T., Pietsch, T., Büttner, R., & Merkelbach-Bruse, S. (2003). Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic

behavior of gastrointestinal stromal tumors. *International journal of cancer*, 106(6), 887–895. <https://doi.org/10.1002/ijc.11323>

257. Wardelmann, E., Hrychyk, A., Merkelbach-Bruse, S., Pauls, K., Goldstein, J., Hohenberger, P., Losen, I., Manegold, C., Büttner, R., & Pietsch, T. (2004). Association of platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 6(3), 197–204. [https://doi.org/10.1016/s1525-1578\(10\)60510-7](https://doi.org/10.1016/s1525-1578(10)60510-7)

258. Wardelmann, E., Thomas, N., Merkelbach-Bruse, S., Pauls, K., Speidel, N., Büttner, R., Bihl, H., Leutner, C. C., Heinicke, T., & Hohenberger, P. (2005). Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumours caused by multiple KIT mutations. *The Lancet. Oncology*, 6(4), 249–251. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70097-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70097-8)

259. Wardelmann, E., Merkelbach-Bruse, S., Pauls, K., Thomas, N., Schildhaus, H. U., Heinicke, T., Speidel, N., Pietsch, T., Buettner, R., Pink, D., Reichardt, P., & Hohenberger, P. (2006). Polyclonal evolution of multiple secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(6), 1743–1749. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1211>

260. Wardelmann, E., Schildhaus, H. U., Merkelbach-Bruse, S., Hartmann, W., Reichardt, P., Hohenberger, P., & Büttner, R. (2010). Soft tissue sarcoma: from molecular diagnosis to selection of treatment. Pathological diagnosis of soft tissue sarcoma amid molecular biology and targeted therapies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 21 Suppl 7, vii265–vii269. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq381>

261. Wei, P., Zhang, N., Xu, Y., Li, X., Shi, D., Wang, Y., Li, D., & Cai, S. (2013). TPX2 is a novel prognostic marker for the growth and metastasis of colon cancer. *Journal of translational medicine*, 11, 313. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-313>

262. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Soft tissue and bone tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer 2020. (WHO classification of tumours series, 5th ed. Vol. 3). <https://publications.iarc.fr/588>



263. Wilhelm, S. M., Dumas, J., Adnane, L., Lynch, M., Carter, C. A., Schütz, G., Thierauch, K. H., & Zopf, D. (2011). Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *International journal of cancer*, *129*(1), 245–255. <https://doi.org/10.1002/ijc.25864>
264. Willasch, A. M., Gruhn, B., Coliva, T., Kalinova, M., Schneider, G., Kreyenberg, H., Steinbach, D., Weber, G., Hollink, I. H., Zwaan, C. M., Biondi, A., van der Velden, V. H., Reinhardt, D., Cazzaniga, G., Bader, P., Trka, J., & European Study Group on WT1 Expression in Childhood AML (2009). Standardization of WT1 mRNA quantitation for minimal residual disease monitoring in childhood AML and implications of WT1 gene mutations: a European multicenter study. *Leukemia*, *23*(8), 1472–1479. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.51>
265. Williams, C., Pontén, F., Moberg, C., Söderkvist, P., Uhlén, M., Pontén, J., Sitbon, G., & Lundeberg, J. (1999). A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *The American journal of pathology*, *155*(5), 1467–1471. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65461-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65461-2)
266. Willmore, C., Holden, J. A., Zhou, L., Tripp, S., Wittwer, C. T., & Layfield, L. J. (2004). Detection of c-kit-activating mutations in gastrointestinal stromal tumors by high-resolution amplicon melting analysis. *American journal of clinical pathology*, *122*(2), 206–216. <https://doi.org/10.1309/4E6U-YBY6-2N2F-CA6N>
267. Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E., & Vernos, I. (2000). TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization. *The Journal of cell biology*, *149*(7), 1405–1418. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.7.1405>
268. Wozniak, A., Rutkowski, P., Piskorz, A., Ciwoniuk, M., Osuch, C., Bylina, E., Sygut, J., Chosia, M., Rys, J., Urbanczyk, K., Kruszewski, W., Sowa, P., Siedlecki, J., Debiec-Rychter, M., Limon, J., & Polish Clinical GIST Registry (2012). Prognostic value of KIT/PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours (GIST): Polish Clinical GIST Registry experience. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, *23*(2), 353–360. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr127>
269. Wu, C. E., Tzen, C. Y., Wang, S. Y., & Yeh, C. N. (2019). Clinical Diagnosis of Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): From the Molecular Genetic Point of View. *Cancers*, *11*(5), 679. <https://doi.org/10.3390/cancers11050679>

270. Wu, J., Zhou, H., Yi, X., He, Q., Lei, T., Tan, F., Liu, H., & Li, B. (2021). Targeted Deep Sequencing Reveals Unrecognized KIT Mutation Coexistent with NF1 Deficiency in GISTs. *Cancer management and research*, *13*, 297–306. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S280174>
271. Yamamoto, H., Oda, Y., Kawaguchi, K., Nakamura, N., Takahira, T., Tamiya, S., Saito, T., Oshiro, Y., Ohta, M., Yao, T., & Tsuneyoshi, M. (2004). c-kit and PDGFRA mutations in extragastrointestinal stromal tumor (gastrointestinal stromal tumor of the soft tissue). *The American journal of surgical pathology*, *28*(4), 479–488. <https://doi.org/10.1097/00000478-200404000-00007>
272. Yan, L., Li, S., Xu, C., Zhao, X., Hao, B., Li, H., & Qiao, B. (2013). Target protein for Xklp2 (TPX2), a microtubule-related protein, contributes to malignant phenotype in bladder carcinoma. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *34*(6), 4089–4100. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1000-z>
273. Yeh, C. N., Yen, C. C., Chen, Y. Y., Cheng, C. T., Huang, S. C., Chang, T. W., Yao, F. Y., Lin, Y. C., Wen, Y. S., Chiang, K. C., Chen, J. S., Yeh, T. S., Tzeng, C. H., Chao, T. C., & Fletcher, J. A. (2014). Identification of aurora kinase A as an unfavorable prognostic factor and potential treatment target for metastatic gastrointestinal stromal tumors. *Oncotarget*, *5*(12), 4071–4086. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1705>
274. Yeh, C. N., Chen, M. H., Chen, Y. Y., Yang, C. Y., Yen, C. C., Tzen, C. Y., Chen, L. T., & Chen, J. S. (2017). A phase II trial of regorafenib in patients with metastatic and/or a unresectable gastrointestinal stromal tumor harboring secondary mutations of exon 17. *Oncotarget*, *8*(27), 44121–44130. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17310>
275. Ylä-Outinen, H., Lopenen, N., Kallionpää, R. A., Peltonen, S., & Peltonen, J. (2019). Intestinal tumors in neurofibromatosis 1 with special reference to fatal gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Molecular genetics & genomic medicine*, *7*(9), e927. <https://doi.org/10.1002/mgg3.927>
276. Zhang, H., & Liu, Q. (2020). Prognostic Indicators for Gastrointestinal Stromal Tumors: A Review. *Translational oncology*, *13*(10), 100812. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100812>

277. Zhao, Q., Li, H., Zhu, L., Hu, S., Xi, X., Liu, Y., Liu, J., & Zhong, T. (2020). Bioinformatics analysis shows that TOP2A functions as a key candidate gene in the progression of cervical cancer. *Biomedical reports*, 13(4), 21. <https://doi.org/10.3892/br.2020.1328>
278. Zhao, W. Y., Xu, J., Wang, M., Zhang, Z. Z., Tu, L., Wang, C. J., Lin, T. L., Shen, Y. Y., Liu, Q., & Cao, H. (2014). Prognostic value of Ki67 index in gastrointestinal stromal tumors. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(5), 2298–2304.
279. Zhao, X., & Yue, C. (2012). Gastrointestinal stromal tumor. *Journal of gastrointestinal oncology*, 3(3), 189–208. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.031>
280. Zheng, S., Huang, K. E., Jia, J., Li, X., & Tao, D. Y. (2013). Rhabdomyosarcomatous differentiation in gastrointestinal stromal tumors after imatinib resistance: a potential diagnostic pitfall. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 238(1), 120–124. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.012173>
281. Zhou, T., Wang, Y., Qian, D., Liang, Q., & Wang, B. (2018). Over-expression of TOP2A as a prognostic biomarker in patients with glioma. *International journal of clinical and experimental pathology*, 11(3), 1228–1237.
282. Zhou, Y., Hu, W., Chen, P., Abe, M., Shi, L., Tan, S. Y., Li, Y., & Zong, L. (2017). Ki67 is a biological marker of malignant risk of gastrointestinal stromal tumors: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 96(34), e7911. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000007911>
283. Zhu, G., Shi, J., Zhang, S., Guo, Y., Huang, L., Zhao, H., Jiang, Y., & Sun, J. (2020). Loss of PI3 kinase association improves the sensitivity of secondary mutation of KIT to Imatinib. *Cell & bioscience*, 10, 16. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-0377-9>
284. Zito Marino, F., Pagliuca, F., Ronchi, A., Cozzolino, I., Montella, M., Berretta, M., Errico, M. E., Donofrio, V., Bianco, R., & Franco, R. (2020). NTRK Fusions, from the Diagnostic Algorithm to Innovative Treatment in the Era of Precision Medicine. *International journal of molecular sciences*, 21(10), 3718. <https://doi.org/10.3390/ijms21103718>
285. Zou J, Huang RY, Jiang FN, Chen DX, Wang C, Han ZD, Liang YX, Zhong WD. (2018a). Overexpression of TPX2 is associated with progression and prognosis of prostate

cancer. *Oncol Lett.* Sep;16(3):2823-2832. doi: 10.3892/ol.2018.9016. Epub 2018 Jun 25. PMID: 30127868; PMCID: PMC6096215.

286. Zou, Z., Zheng, B., Li, J., Lv, X., Zhang, H., Yu, F., Kong, L., Li, Y., Yu, M., Fang, L., & Liang, B. (2018b). TPX2 level correlates with cholangiocarcinoma cell proliferation, apoptosis, and EMT. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *107*, 1286–1293. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.011>

287. Diagnosis GIST [online], Copyright © 2006. GIST support International [cit. 31.05.2023]. Dostupné z: <https://www.gistsupport.org/about-gist/for-new-gist-pages/understanding-your-pathology-report-for-gist/diagnosing-gist/>

## 9. SEZNAM PUBLIKACÍ

### **Původní vědecké práce bez impakt faktoru, které jsou podkladem disertační práce**

1. **Augustiňáková (Kalfusová) A.** a Kodet R. (2010) Histopatologická a molekulární charakteristika a diagnostika gastrointestinálních stromálních tumorů. Aktuální pohled na léčbu GIST. Farmakoterapie. Speciální příloha, (6), 6 – 13.
2. **Augustiňáková (Kalfusová) A.** a Kodet R. (2011) Molekulární diagnostika gastrointestinálních stromálních tumorů ve vztahu k predikci terapeutické odpovědi na cílenou biologickou léčbu. *Cesk. Patol.* 47(4), 148 – 152.
3. **Kalfusová A.** a Kodet R. (2017) Molekulární mechanizmy primární a sekundární rezistence, molekulárně-genetické znaky a vlastnosti *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST. *Cesk. Patol.* 53(4), 167 – 173.

### **Původní vědecké práce bez impakt faktoru, které nejsou podkladem disertační práce**

1. Kalinová M, Mrhalová M, Krsková L, Jungbauerová H, **Kalfusová A**, Mand'áková P, Čandová J, Soukup J, Camp V, Kodet R. (2014) Komplexní přístup v diagnostice lymfomů v praktických příkladech. *Cesk. Patol.* 50(3), 118 – 126.

### **Původní vědecké práce s impakt faktorem, které jsou podkladem disertační práce**

1. **A. Kalfusova**, I. Hilska, L. Krskova, M. Kalinova, Z. Linke, R. Kodet. (2016) Gastrointestinal stromal tumors – quantitative detection of the Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT telomerase subunit mRNA levels to determine proliferation activity and potential for aggressive biological behavior. *Neoplasma* 63(3) p. 484 – 492. (IF<sub>2016</sub> = **2.119**)
2. **Kalfusova, A.**, Linke, Z., Kalinova, M., Krskova, L., Hilska, I., Szabova, J., Vicha, A., Kodet, R. (2019). Gastrointestinal stromal tumors - Summary of mutational status of the primary/secondary *KIT/PDGFR*A mutations, *BRAF* mutations and *SDH* defects. *Pathology, research and practice*, 215(12), 152708. Available online <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152708> (IF<sub>2019</sub> = **2.050**)

### **Původní vědecké práce s impakt faktorem, které nejsou podkladem disertační práce**

1. Fabian, O., Hradsky, O., Potuznikova, K, **Kalfusova, A.**, Krskova, L., Hornofova, L., Zamecnik, J., Bronsky, J. (2017) Low predictive value of histopathological scoring system for complications development in children with Crohn's disease. *Pathology-Research and Practice*. 213, 353 – 358. **publikace (IF<sub>2017</sub> = 1.466)**
2. Vasovcak, P., Krepelova, A., Menigatti, M., Puchmajerova, A., Skapa, P., **Augustinakova (Kalfusova), A.**, Amann, G., Wernstedt, A., Jiricny, J., Marra, G., Wimmer, K. (2012) Unique mutational profile associated with a loss of TDG expression in the reptal cancer of a patient with a constitutional *PMS2* deficiency. *DNA Repair* 11, 616-623. **publikace (IF<sub>2012</sub> = 4.274)**

### **Přednášky a plakátová sdělení na odborných setkáních**

*International Scientific Meeting, Association of Clinical Pathologist*, 12.6. – 13.6.2008, Praha, **Posterová prezentace:** Significance of mutational analysis of the receptor tyrosine kinases KIT and PDGFRalpha in patients with gastrointestinal stromal tumor

Cena za nejlepší posterovou prezentaci (**Best poster presentation**)

**35. Sjezd českých patologů**, 18.6. – 19.6.2008, Brno, **Přednáška:** Význam mutační analýzy genů receptorových tyrosinkináz KIT a PDGFRalpha u pacientů s gastrointestinálními stromálními nádory

*Clinical Cancer Immunotherapy and Translational Research*, 19.11. – 21. 11.2009, Havana, **Vyzvaná přednáška:** Prognostic significance of GIST with regard to the activity of proliferation markers and the telomerase subunit hTERT

*ASCO Annual Meeting*, 4.6. – 8.6.2010, Chicago (USA), **Posterová prezentace:** Prognostic significance of proliferation markers and telomerase activity in gastrointestinal stromal tumors

**2. mezioborové onkologické kolokvium PragueONCO 2011**, 27.1. – 28.1.2011, Praha, **Posterová prezentace:** Prediktivní a prognostický význam molekulární analýzy gastrointestinálních stromálních nádorů

*XVII. pracovní setkání a fórum onkologů a zástupců zdravotních pojišťoven – Molekulární diagnostika v onkologii – vliv na efektivitu a náklady onkologické léčby,*

27.5.2011, Brno, **Vyzvaná přednáška:** Vyšetřování mutací c-kit a PDGFRA u gastrointestinálních stromálních nádorů k doplnění indikace terapie imatinib mesylátem

**Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky CLS JEP a 44. cytogenetické konference**  
7.9. – 9.9.2011, Třeboň, **Přednáška:** Molekulární diagnostika gastrointestinálních stromálních nádorů v kontextu komplexní histopatologické diagnostiky GIST

**24th European Congress of Pathology**, 8.9. – 12.9.2012, Kongresové centru v Praze,  
**Posterová prezentace:** Role sekundárních mutací v mechanismu vývoje lékové rezistence u pacientů s GIST

**9. sympozium a workshop molekulární patologie a histo(cyto)chemie, 99. olomoucký diagnostický seminář české divize IAP a 5. olomoucké dny histologických laborantů**,  
26.4. – 27.4.2013, Olomouc, **Posterová prezentace:** Přehled primárních a sekundárních mutací s ohledem na význam detekce primární a sekundární rezistence u pacientů s gastrointestinálním stromálním nádorem

**3<sup>rd</sup> Annual Oncology Biomarkers Congress and 2<sup>nd</sup> Annual Oncology Clinical Development Congress**, 14.10. – 15.10.2013, Manchester, **Posterová prezentace:** The detection of activity of selected proliferative biological markers to determine potential aggressive biological behaviour and prognosis of gastrointestinal stromal tumours

**21. Sjezd českých a slovenských patologů**, 7.11. – 8. 11.2014, Praha, **Posterová prezentace:** Přehled zajímavých případů v molekulární diagnostice mutací genů *KIT*, *PDGFRA* a *BRAF* u pacientů s gastrointestinálním stromálním nádorem.

**Vědecká konference 2. LF UK**, 9.4. – 10.4.2014, Praha, **komentovaný poster:** Přehled vyšetření primárních a sekundárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* u pacientů v rámci komplexní diagnostiky gastrointestinálních stromálních nádorů a rozšíření molekulární analýzy o stanovování mutací v genu *BRAF*

**Satelitní sympozium u konference DDPEO**, 2.12.2014, Olomouc, **Přednáška:** Prediktivní genetické biomarkery u GIST

**Dni molekulovej patológie, 11. sympóziu molekulovej patológie s medzinárodnou účasťou a Martinské dni nelekárskych pracovníkov v patológii**, 4.6. – 5.6.2015, Martin,  
**Vyzvaná přednáška:** Prediktivní význam molekulární diagnostiky pacientů s gastrointestinálním stromálním nádorem

*20th World Congress on Advances in Oncology and 18th International Symposium on Molecular Medicine*, 8.10. – 10.10.2015, Atény, **Posterová prezentace:** Secondary mutations in the KIT gene and mutation analysis of the BRAF gene in the patients with gastrointestinal stromal tumors, implication of their assessment.

*Setkání účastníku ReGISTer*, 2017, Praha, **Vyzvaná přednáška:** Novinky v molekulární diagnostice gastrointestinálních stromálních nádorů

*Institucionální podpora FNM*, hodnocení projektů interních grantů v rámci Institucionální podpory FNM, 2018, Praha, **Přednáška:** Gastrointestinální stromální nádory – část jedné problematiky z blízka

*Vědecká konference 2. LF UK*, 10.4. – 11.4.2019, Praha, **komentovaný poster:** Význam klonální evoluce sekundárních mutací na intra a intertumorální heterogenitu s ohledem na rezistenci na terapii inhibitory RTK u pacientů s GIST.

*47. Sjezd českých patologů a 25. Sjezd České společnosti histopatologických laborantů*, 3.11. – 5.11.2022, Praha, **poster:** Molekulární podtypy *KIT/PDGFR*A nemutovaných gastrointestinálních stromálních nádorů



## 10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1	Přehled imunohistochemického a molekulárního vyšetření u GIST	11
Obr. 2	Přehled strukturálního složení RTK rodiny III.	14
Obr. 3	Schéma aktivace RTK KIT.	15
Obr. 4	Schéma citlivosti TK inhibitorů po selhání terapie IM.	19
Obr. 5	Model klonální selekce buněk se získanými mutacemi.	26
Obr. 6	Přehled <i>KIT/PDGFR</i> A nemutovaných GIST.	27
Obr. 7	SDH komplex.	29
Obr. 8	Schéma vyšetření a klasifikace GIST.	32
Obr. 9	Klinicko-patologické znaky <i>KIT/PDGFR</i> A nemutovaných GIST	32
Obr. 10	Specifická alelově specifická PCR.	47
Obr. 11	Senzitivita alelově specifické PCR.	48
Obr. 12	Křivka tání.	48
Obr. 13	Průběh křivky tání mutované a nemutované DNA.	49
Obr. 14	Standardní křivky proliferačního markeru TPX2.	52
Obr. 15	Přehled rozložení delecí a substitucí v exonu 11 genu <i>KIT</i> .	58
Obr. 16	Příklad intranádorové heterogenity sekundárních mutací.	67
Obr. 17	Příklad internádorové heterogenity sekundárních mutací.	67
Obr. 18	Analýza delecí v genech SDH komplexu pomocí metody MLPA	72
Obr. 19	Normalizované hladiny mRNA u GIST, BL, a LMS.	74
Obr. 20	Normalizované hladiny mRNA u benigních/maligních GIST.	75
Obr. 21	Kaplan-Meierovy křivky	82

## 11. SEZNAM TABULEK

Tab. 1	Přehled frekvence a lokalizace mutací v genech <i>KIT</i> a <i>PDGFRA</i>	17
Tab. 2	Přehled TK inhibitorů používaných v léčbě GIST	20
Tab. 3	Přehled sekundárních mutací	22
Tab. 4	Přehled mechanismů sekundární rezistence	23
Tab. 5	Přehled senzitivity sekundárních mutací na TK inhibitory	25
Tab. 6	Molekulární skupiny <i>KIT/PDGFRA</i> nemutovaných GIST	31
Tab. 7	Přehled terapeutických cílů	34
Tab. 8	Přehled klasifikací prognostického rizika u GIST	35
Tab. 9	Prognostické znaky u GIST dle WHO 2020	35
Tab. 10	Přehled reakčních podmínek kontroly integrity DNA a cDNA	44
Tab. 11	Přehled reakčních podmínek	45
Tab. 12	Přehled reakčních podmínek sekvenační reakce dle Sangera	46
Tab. 13	Reakční podmínky alelově specifické PCR	47
Tab. 14	Reakční podmínky analýzy křivek tání s vysokým rozlišením	50
Tab. 15	Reakční podmínky kvantitativní PCR v reálném čase (RQ RT PCR)	54
Tab. 16	Přehled základních klinicko-patologických údajů	55
Tab. 17	Přehled přítomnosti primárních mutací v genech <i>KIT</i> a <i>PDGFRA</i>	56
Tab. 18	Celkový přehled přítomnosti mutací v genech <i>KIT/PDGFRA</i>	56
Tab. 19	Přehled primárních mutací v jednotlivých exonech genů <i>KIT</i> a <i>PDGFRA</i>	57
Tab. 20	Přehled variability primárních mutací v exonu 11 genu <i>KIT</i>	57
Tab. 21	Přehled histopatologických dat u pacientů se sekundárními mutacemi	59
Tab. 22	Přehled klinicko-patologických dat u pacientů se sekundárními mutacemi	62
Tab. 23	Přehled detekce alterací ve skupině <i>KIT/PDGFRA</i> nemutovaných GIST	68

Tab. 24	Přehled klinicko-patologických údajů u pacientů s mutací p.V600E	69
Tab. 25	Přehled histopatologických dat pacientů s defektem SDH komplexu	70
Tab. 26	Hodnoty mediánů kopií hladin mRNA ve skupinách BL, GIST, a LMS	73
Tab. 27	Přehled klinicko-patologických dat a údaje o přežití	76
Tab. 28	Celkový přehled klinických dat	81
Tab. 29	Přehled expresních mRNA hladin Ki-67, TPX2, TOP2A a hTERT	81

## 12. SEZNAM ONLINE ZDROJŮ

<https://oncologypro.esmo.org/education-library/factsheets-on-biomarkers>

<http://www.hgvs.org/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>

<https://www.illumina.com/>

<https://varnomen.hgvs.org/>

<https://www.genecards.org/>

<http://www.uniprot.org/>

<https://www.omim.org/>

<https://www.mycancergenome.org/>

<https://varsome.com/>

## 13. SEZNAM PŘÍLOH

### 13.1. Seznam primerů

#### 13.1.1. Mutační analýza

GEN	EXON	NUKLEOTIDOVÁ SEKVENCE OLIGONUKLEOTIDŮ
<i>AKT1</i>	2 F	GGCCAAGGGGATACTTACGC
	2 R	AGGGTCTGACGGGTAGAGTG
<i>ATR</i>	46 F	GCTGCTGTCTTCTTTCACTTGTGACA
	46 R	CACCTTCATTCCCCGTAGTTCTTTCA
<i>BRAF</i>	11 F	TTTCTGTTTGGCTTGACTTGACT
	11 R	GTCACAATGTCACCACATTACATACT
	15 F	AGTAACTCAGCAGCATCTCAGG
	15 R	TCATAATGCTTGCTCTGATAGG
<i>ETV6</i>	4 F1	GCTGCTGACCAAAGAGGACTTTC
<i>ETV6</i>	4 F2	GCAGAGGAAACCTCGGATTC
<i>NTRK3</i>	14 R	ATGCCGTGGTTGATGTGGTGCAGTGG
<i>FGFR1</i>	F	GTGTGCCTGTGGAGGAACTT
<i>TACCI</i>	R	GAGCTGCACTCTCAGCCTTT
<i>KIT</i>	9a F	GAGTAAGCCAGGGCTTTTGTGTT
	9a R	CGTGCCATTGTGCTTGAAT
	9b F	CCGTTTGGAAAGCTAGTGGT
	9b R	CAGAGCCTAAACATCCCCTTA
	11 F <sup>a</sup>	TGTTCTCTCTCCAGAGTGCTCTA
	11 R <sup>a</sup>	ACCCAAAAAGGTGACATGGA
	11 F <sup>b</sup>	GATCTATTTTCCCTTTC
	11 R <sup>b</sup>	AGCCCCTGTTTCATACTG
	11 F <sup>c</sup>	CTATTTTCCCTTTCTCC
	11 R <sup>c</sup>	TACCCAAAAAGGTGACAT
	11 F <sup>d</sup>	CCAGAGTGCTCTAATGACTG
	11 R <sup>d</sup>	TGACATGGAAAGCCCCTGTT

13 F CATGCGCTTGACATCAGTTT  
 13 R CAATAAAAGCCAGCTTGGACA  
 14 F GTCTGATCCACTGAAGCT  
 14 R ACCCCATGAACTGCCTGT  
 17 F GGTTTTCTTTTCTCCTCCACCC  
 17 R TGCAGGACTGTCAAGCAGAG  
 18 F CAAGGAAGCAGGACACCA  
 18 R CATTTCAGCAACAGCAGC  
*KRAS* 2 F GTTCTAATATAGTCACATTTTCA  
 2 R TGGTCCTGCACCAGTAATATG  
 3 F GAGCGGATAACAATTTACACAGG  
 3 R CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC  
 4 F ATGACAAAAGTTGTGGACAGGTTTTGA  
 4 R TGTTACTTACCTGTCTTGTCTTTGCTGATG  
*NRAS* 2 F TACTGGTTTCCAACAGGTTCTTGCT  
 2 R CTACCACTGGGCCTCACCTCTAT  
 3 F CCAGGATTCTTACAGAAAA  
 3 R CGCAAATGACTTGCTATTATTGATGGC  
 4 F GCCACTGTACCCAGCCTAATCTTG  
 4 R CACATCTCTACCAGAGTTAATCAACTGATGC  
*PDGFRA* 12 F CTCTGGTGCCTGGGACTTT  
 12 R GGAGGTTACCCCATGGA ACT  
 14 F GCTCAGCTGGACTGATATGTGA  
 14 R CCAGTGAAAATCCTCACTCCA  
 18 F GCTACAGATGGCTTGATCCTG  
 18 R GACCAGTGAGGGAAGTGAGG  
*PIK3CA* 9 F CCAGAGGGGAAAAATATGACAA  
 9 R CCATTTTAGCACTTACCTGTGAC  
 20 F CTCAATGATGCTTGGCTCTGG  
 20 R GTGGAATCCAGAGTGAGCTTTC

Legenda: 11<sup>a</sup> Daum et al., 2007, 11<sup>b</sup> Kim et al. 2004, 11<sup>c</sup> Hou et al., 2004, 11<sup>d</sup> Wardelmann et al., 2002

### 13.1.2. *Expresní analýza*

GEN	PRIMER	NUKLEOTIDOVÁ SEKVENCE OLIGONUKLEOTIDŮ
<i>ABL</i>	sonda	5' 6-FAM-CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT T-TAMRA 3'
	F	5' TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T 3'
	R	5' GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA 3'
<i>Ki67</i>	sonda	Universal ProbeLibrary, probe No. 30 <sup>a</sup>
	F	5' GAG GTG TGC AGA AAA TCC AAA 3'
	R	5' CTG TCC CTA TGA CTT CTG GTT GT 3'
<i>TPX2</i>	sonda	Universal ProbeLibrary, probe No. 51 <sup>a</sup>
	F	5' ACA TCT GAA CTA CGA AAG CAT CC 3'
	R	5' GGC TTA ACA ATG GTA CAT CCC TTA 3'
<i>TOP2A</i>	sonda	Universal ProbeLibrary, probe No. 76 <sup>a</sup>
	F	5' CAA CAT GCC AAT TGA GTG AAA 3'
	R	5' ACT TGG GCC TTA AAC TTC ACC 3'
<i>hTERT</i>	sonda	Universal ProbeLibrary, probe No. 19 <sup>a</sup>
	F	5' GCC TTC AAG AGC CAC GTC 3'
	R	5' CCA CGA ACT GTC GCA TGT 3'

Legenda: Roche Applied Science<sup>a</sup>

## 13.2. Seznam publikací

**13.2.1. Augustiňáková A. (Kalfusová) a Kodet R. (2010)** Histopatologická a molekulární charakteristika a diagnostika gastrointestinálních stromálních tumorů. Aktuální pohled na léčbu GIST. Farmakoterapie, Speciální příloha, (6), 6 – 13.

**13.2.2. Augustiňáková A. (Kalfusová) a Kodet R. (2011)** Molekulární diagnostika gastrointestinálních stromálních tumorů ve vztahu k predikci terapeutické odpovědi na cílenou biologickou léčbu. Cesk. Patol. 47(4), 148-152.

**13.2.3. Kalfusova, A., Hilska, I., Krskova, L., Kalinova, M., Linke, Z., Kodet, R. (2016).** Gastrointestinal stromal tumors - quantitative detection of the Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT telomerase subunit mRNA levels to determine proliferation activity and a potential for aggressive biological behavior. *Neoplasma*, 63(3), 484-492. [https://doi.org/10.4149/320\\_150714N390](https://doi.org/10.4149/320_150714N390)

**13.2.4. Kalfusová A. a Kodet R. (2017)** Molekulární mechanizmy primární a sekundární rezistence, molekulárně-genetické znaky a vlastnosti *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST. Cesk. Patol. 53(4), 167 – 173.

**13.2.5. Kalfusova, A., Linke, Z., Kalinova, M., Krskova, L., Hilska, I., Szabova, J., Vicha, A., Kodet, R. (2019).** Gastrointestinal stromal tumors - Summary of mutational status of the primary/secondary *KIT/PDGFR*A mutations, *BRAF* mutations and *SDH* defects. *Pathology, research and practice*, 215(12), 152708. Available online <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152708>



**13.2.1. Augustiňáková A. (Kalfusová) a Kodet R. (2010) Histopatologická a molekulární charakteristika a diagnostika gastrointestinálních stromálních tumorů. Aktuální pohled na terapii GIST. Farmakoterapie, Speciální příloha, (6), 6 – 13.**

**13.2.2. Augustiňáková A. (Kalfusová) a Kodet R. (2011) Molekulární diagnostika gastrointestinalních stromálních tumorů ve vztahu k predikci terapeutické odpovědi na cílenou biologickou léčbu. Cesk. Patol. 47(4), 148-152.**

**13.2.3. Kalfusova, A.,** Hilska, I., Krskova, L., Kalinova, M., Linke, Z., Kodet, R. (2016). Gastrointestinal stromal tumors - quantitative detection of the Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT telomerase subunit mRNA levels to determine proliferation activity and a potential for aggressive biological behavior. *Neoplasma*, 63(3), 484–492. [https://doi.org/10.4149/320\\_150714N390](https://doi.org/10.4149/320_150714N390)

**13.2.4. Kalfusová A.** a Kodet R. (2017) Molekulární mechanizmy primární a sekundární rezistence, molekulárně-genetické znaky a vlastnosti *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST. *Cesk. Patol.* 53(4), 167 – 173.

**13.2.5. Kalfusova, A.,** Linke, Z., Kalinova, M., Krskova, L., Hilska, I., Szabova, J., Vicha, A., Kodet, R. (2019). Gastrointestinal stromal tumors - Summary of mutational status of the primary/secondary KIT/PDGFRA mutations, BRAF mutations and SDH defects. *Pathology, research and practice*, 215(12), 152708. Available online <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152708>