

Histopatologická a molekulární charakteristika a diagnostika gastrointestinálních stromálních tumorů

Mgr. Alena Augustiňáková; prof. MUDr. Roman Kodet, CSc.

■ Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN v Motole, Praha

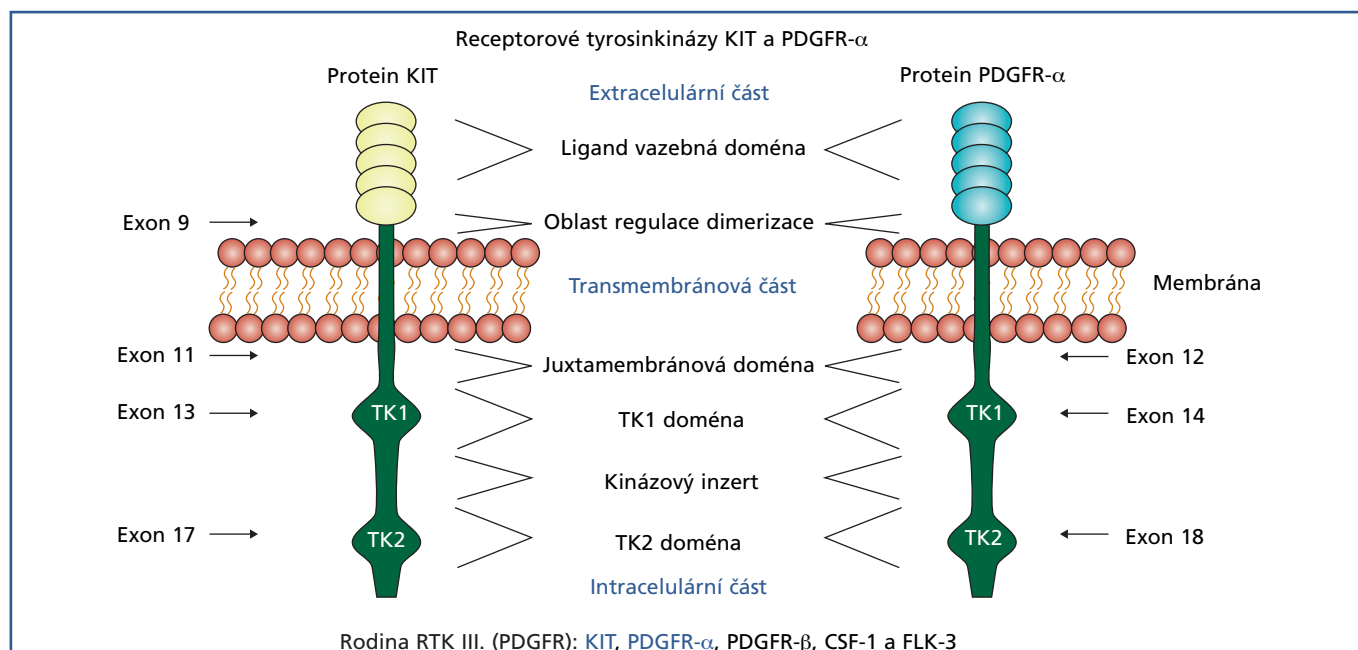
Úvod

Gastrointestinální stromální tumory (GIST) tvoří skupinu mezenchymálních nádorů, které mají některé společné celulórní rysy s intersticiálními Cajalovými buňkami (ICC) trávicího ústrojí a tyto buňky nebo jejich prekursory jsou považovány za fyziologické protějšky nádorově transformovaných buněk GIST. Toto pozorování je založeno na expresi molekul KIT (CD117) a CD34 u ICC a buněk GIST, a také na skutečnosti, že mnohotné a familiární formy GIST vznikají v terénu difúzní hyperplazie Cajalových buněk.¹ Z molekulárního pohledu i po stránce exprese proteinů jsou GIST nejlépe charakterizovány expresí transmembránového proteinu KIT (CD117).² Exprese proteinu KIT je detekována až u 95 % GIST.³ Během let výzkumu se ukázalo, že konstitutivní aktivace proteinu KIT hraje významnou patogenetickou úlohu při vzniku některých nádorů, včetně GIST. Na patogenezi GIST se

kromě proteinu KIT podílí ještě jeden receptor, a to PDGFR- α (platelet-derived growth factor receptor alpha). Aktivace obou těchto receptorů probíhá nezávisle na přítomnosti jejich ligandů, prostřednictvím aktivačních (gain of function) mutací příslušných genů *c-kit* a *pdgfr- α* .^{3,4}

Nejčastěji (v 95 %) se setkáváme s tzv. sporadickými GIST. Sporadické GIST postihují převážně dospělé pacienty ve středním věku (nad 40 let). Mutace genů *c-kit* a *pdgfr- α* jsou u těchto nemocných získané. Vzácně se můžeme setkat s familiární formou GIST, charakterizovanou zárodečnými mutacemi zmíněných genů. Mutace se pak vyskytují jak v nádorových buňkách, tak i ve všech ostatních buňkách organismu.^{5,6} GIST s familiárním výskytem se klinicky obvykle projeví mnohočetným výskytem nádoru a dalším charakteristickým znakem – hyperpigmentací kůže.⁷ V několika málo případech je zaznamenán výskyt GIST v dětském věku. Vznik GIST u dětí (6–14 let) a mladých dospělých (15–24 let) bývá často

■ obrázek 1 Schematický přehled struktury receptorových tyrosinkináz KIT a PDGFR- α a oblastí, které kódují vyšetřované exony genů *c-kit* a *pdgfr- α*



spojen s jinými syndromy, většinou s neurofibromatózou typu I (von Recklinghausenova nemoc), nebo vznikají jako součást Carneyho trias (GIST, chondrohamartom plicí a paragangliom).⁸ GIST postihující děti představují odlišnou klinickopatologickou a molekulární skupinu nádorů s indolentním průběhem onemocnění a s mnohočetnými ložisky v žaludku. Charakteristickým znakem je také absence mutací v genech *c-kit* a *pdgfr-α* a epiteloidní morfologie těchto nádorů.⁹

Receptorové tyrosinkinázy KIT a PDGFR-α

Proteiny KIT a PDGFR-α řadíme mezi transmembránové receptorové tyrosinkinázy (RTK). RTK KIT a PDGFR-α jsou členy rodiny RTK proteinů podobných receptoru pro destičkový růstový faktor (PDGFR – platelet-derived growth factor receptor). Tato skupina RTK je také označována pořadovým číslem III. Společně s proteiny KIT a PDGFR-α patří do této skupiny i proteiny PDGFR-β, CSF-1 (colony-stimulating factor-1) a FLK-3 (FMS-like tyrosine kinase-3).^{10–12} Zástupci této proteinové rodiny se vyznačují strukturální homologií sestávající se 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 spojených krátkým kinázovým inzertem.¹² TK1 je místem, kde se na intracelulární část proteinu váže ATP. Za přenos fosfátu zodpovídá TK2, tzv. aktivační místo. Extracelulární část je s intracelulární částí proteinu propojena sekvenčně jednoduchým hydrofobním transmembránovým úsekem.^{7,13,14}

Obrázek 1 poskytuje přehled struktury receptorových tyrosinkináz KIT a PDGFR-α a oblastí, které kódují vyšetřované exony genů *c-kit* a *pdgfr-α*. RTK jsou důležitými mediátory signálních drah, které přenášejí extracelulární signály do nitra buněk. Výsledkem přenosu signálu je aktivace intracelulárních procesů, jež 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.¹⁵

Aktivace proteinů KIT a PDGFR-α probíhá za fyziologických podmínek prostřednictvím ligandů příslušných růstových faktorů. Ligandem pro protein KIT je růstový faktor kmenových buněk (SCF – stem cell factor); pro protein PDGFR-α je to růstový faktor PDGF. SCF je známý rovněž jako KIT-ligand nebo růstový faktor žírných buněk (mast cell growth factor).¹⁶

Protein KIT

Aktivovaný protein KIT je nezbytný pro vývoj a přežívání různých typů buněk.¹⁷ Přehled buněk a tkání, které exprimují protein KIT, podává **tabulka 1**. Protein KIT sehrává rozhodující úlohu v diferenciaci ICC. Jeho aktivita je rovněž nutná pro formaci funkční sítě ICC.⁵ Tyto buňky se podílejí na řízení peristaltiky střev a na přenosu nervových impulsů mezi nervovými buňkami a buňkami hladké svaloviny ve stěně trávicí trubice. Podle fenotypových znaků GIST se předpokládá, že tyto nádory vznikají transformací podpůrných ICC nebo jejich prekursorů či kmenových buněk se schopností diferenciaci v ICC.^{18,19}

■ **tabulka 1** Přehled buněčných typů a tkání exprimujících receptorovou tyrosinkinázu KIT (Podle 17)

Buněčné typy a tkáně exprimující protein KIT
Intersticiální Cajalovy buňky gastrointestinálního traktu
Žírné buňky
Melanocyty
Některé hematopoetické kmenové buňky
Prekursory osteoklastů
Gliální buňky
Nezralé epidermální Langerhansovy buňky
Některé epitelální a zárodečné buňky

Geny *c-kit* a *pdgfr-α*

Geny *c-kit* a *pdgfr-α* jsou lokalizovány ve stejné chromosomální oblasti, na dlouhém raménku 4. chromosomu (4q12).⁵ Onkogenetické mutace příslušných genů aktivují proteiny KIT a PDGFR-α prostřednictvím konstitutivní fosforylace. Kontinuální, na přítomnosti ligandu nezávislá aktivace RTK KIT a PDGFR-α vede k neregulovanému spuštění signálních drah, které podporují proliferaci nebo přežívání buněk. Typy mutací v genech *c-kit* a *pdgfr-α* 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 nově popsané delece s inzercí invertovaných komplementárních sekvencí, tzv. delece-inverze.¹³

Mutace v genech *c-kit* a *pdgfr-α*

Mutace v genech *c-kit* a *pdgfr-α* 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).¹³

Mutace genu *c-kit* se vyskytují u více než 80 % GIST. Gen *c-kit* tvoří 21 exonů. Mutace mohou vzniknout v kterémkoliv z těchto exonů. Typická je však kumulace mutací v exonech 9, 11, 13 a 17. Exon 9 kóduje extracelulární oblast proteinu KIT, exon 11 intracelulární juxtamembránovou oblast, exon 13 první intracelulární tyrosinkinázovou doménu (TK1) a exon 17 kóduje druhou intracelulární tyrosinkinázovou doménu (TK2).²⁰ Přehled topografie kódujících oblastí je znázorněn na **obrázku 1**. V převažující většině případů (60–70 %) postihují mutace genu *c-kit* exon 11. Jedná se o značně heterogenní mutace rozdílného typu (jednoduché substituce bází, delece, inzerce, nebo složitější delece-inzerce, delece-substituce nebo delece-inverze). Druhým nejčastěji mutovaným exonem je exon 9. Mutace jsou zde diagnostikovány přibližně v 10 % případů. Značná část zjištěných mutací exonu 9 je výsledkem jednoho typu mutace: inzerce 6 nukleotidů, která vede k duplikaci dvojice aminokyselin v pozici kodonu 502 a 503. Mutace v exonu 13 se vyskytují výjimečně. Nacházíme je přibližně u 1 % GIST. Rovněž mutace v exonu 17 jsou vzácné. Jejich přítomnost v nádorech zjišťujeme u méně než 1 % případů.^{20,21} V exonech 13 a 17 byly doposud detekovány výhradně substituční záměny nukleotidů. Ty vedou k záměně aminokyselin v polypeptidovém řetězci receptoru.

U přibližně pěti pacientů s GIST gen *c-kit* mutován není. U 5–8 % pacientů s nemutovaným genem *c-kit* vznikají mutace

■ **tabulka 2** Přehled frekvence, lokalizace a typů mutací u pacientů s gastrointestinálním stromálním tumorem (Podle 24)

Gen/exon	Frekvence	Lokalizace	Typy mutací
<i>c-kit</i>	80 %		
11	60–70 %	Juxtamembránová doména	Delece, bodové mutace, delece-inzerce, ITD
9	10 %	Extracelulární doména	Inzerce
13	1–2 %	Intracelulární tyrosinkinázová doména 1, TK1 (ATP a ADP vazebné místo)	Bodové mutace
17	1 %	Intracelulární tyrosinkinázová doména 2, TK2	Bodové mutace
<i>pdgfr-α</i>	5–8 %		
12	1 %	Juxtamembránová doména	Bodové mutace
14	< 1 %	Intracelulární tyrosinkinázová doména 1, TK1 (ATP a ADP vazebné místo)	Bodové mutace
18	5 %	Intracelulární tyrosinkinázová doména 2, TK2	Bodové mutace, delece

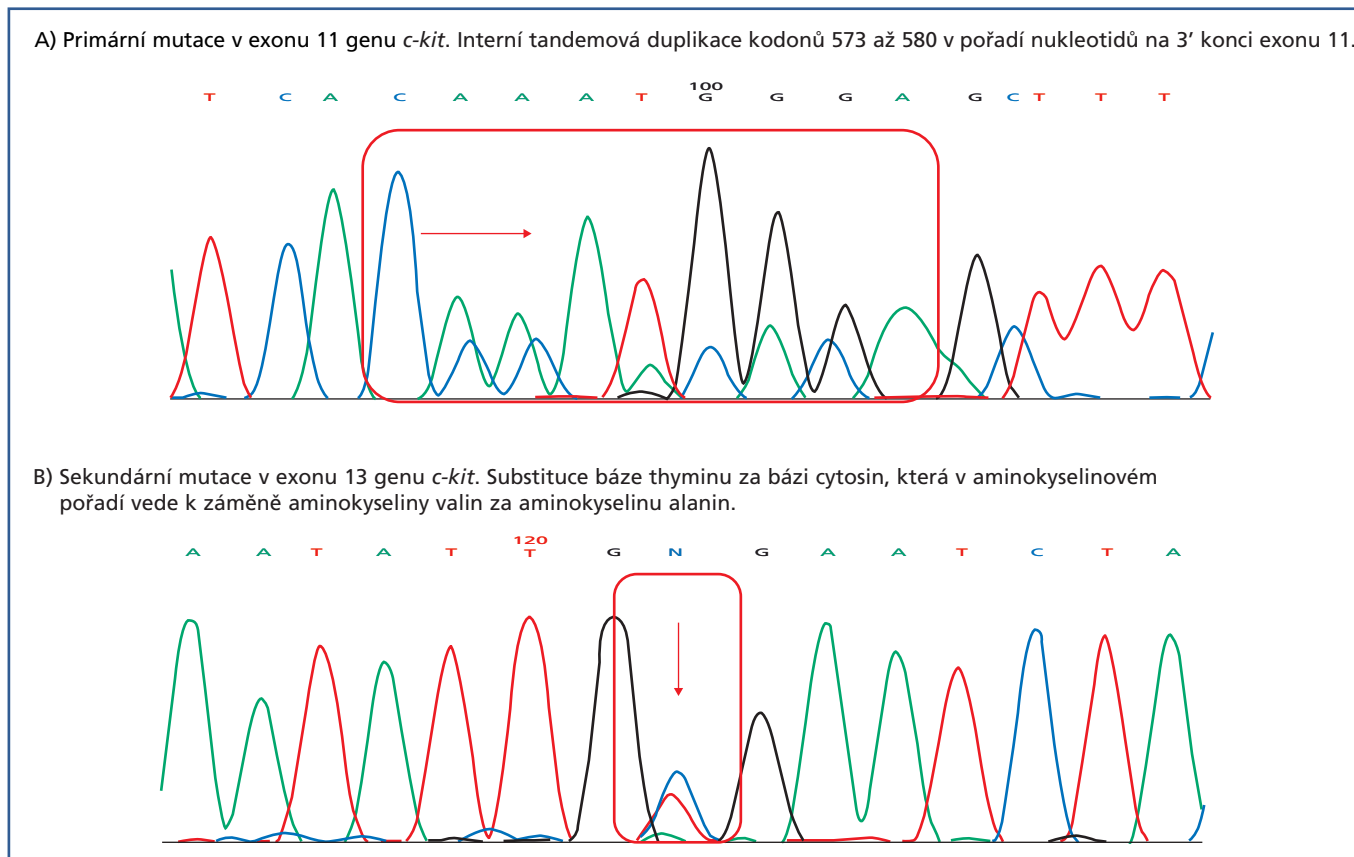
v genu *pdgfr-α*.^{22,23} Mutace genu *pdgfr-α* se kumulují v exonech 12, 14 a 18, které jsou homologní s exony 11 (juxtamembránová oblast), 13 a 17 (intracelulární TK1, respektive TK2 domény) genu *c-kit*.²⁰ Nejčastěji (v 5 % případů) se mutace vyskytují v exonu 18. Jedná se zejména o bodové mutace (převažuje aminokyselínová záměna na pozici kodonu 842) a delece. Mutace v exonech 12 a 14 genu *pdgfr-α* se vyskytují výjimečně (v 1 %, respektive pod 1 % případů). Zahrnují bodové mutace, inzerce a delece.²⁴

Mutace v genech *c-kit* a *pdgfr-α* jsou vzájemně exkluzivní. Nádory s mutacemi přítomnými v genu *c-kit* nemají mutovaný gen *pdgfr-α*, a naopak.⁸ U části nemocných s GIST se přítomnost mutací nezjistí ani v jednom z uvedených genů. Předpokládaným vysvětlením patogeneze skupiny GIST s nemutovanými geny

c-kit nebo *pdgfr-α* je výskyt aktivačních mutací v genech pro jiné RTK, které jsou analogem transmembránových proteinů KIT a PDGFR- α , nebo v genech pro signální molekuly, jež jsou regulovány signalizační kaskádou zprostředkovanou proteiny KIT/PDGFR- α .²⁰ Přehled frekvence výskytu, lokalizací a typů mutací v genech *c-kit* a *pdgfr-α* podává **tabulka 2**.

Podle času a způsobu vzniku dále rozdělujeme mutace v genech *c-kit* a *pdgfr-α* do dvou skupin – na primární a sekundární. Výše popsané primární mutace jsou spojeny se vznikem a rozvojem GIST. Diagnostikujeme je v nádorech před zahájením terapie. Sekundární mutace vznikají v průběhu léčby pacienta s GIST a podílejí se na vzniku získané rezistence těchto nádorů vůči terapii. Sekundární mutace se prezentují ve formě jednoduchých substitucí.²⁵ Častěji se vyskytují v genu *c-kit*. Konkrétně vznikají

■ **obrázek 2** Příklady analyzovaných mutací genu *c-kit*



v TK doménách proteinu KIT (TK1, respektive TK2), které jsou kódovány exony 13 a 17.^{3,14,17} U genu *pdgfr-α* se s nimi setkáváme výjimečně. U pacientů s primárně nemutovanými geny *c-kit* a *pdgfr-α* ke vzniku sekundárních mutací nedochází.¹⁴

Příklad detekce primární mutace v exonu 11 a sekundární mutace v exonu 13 genu *c-kit* poskytuje **obrázek 2**. Mutace byly analyzovány ze vzorku nádoru pacienta léčeného imatinib mesylátem (IM).

Histopatologické nálezy a současný stav diagnostického postupu u GIST

Základním postupem při stanovení diagnózy GIST je histopatologické vyšetření odebraného vzorku tkáně. Odběr tkáně je proveden zpravidla chirurgem nebo gastroenterologem. Vyšetření je založeno na určení morfologických charakteristik a fenotypových znaků nádorových buněk.²⁶

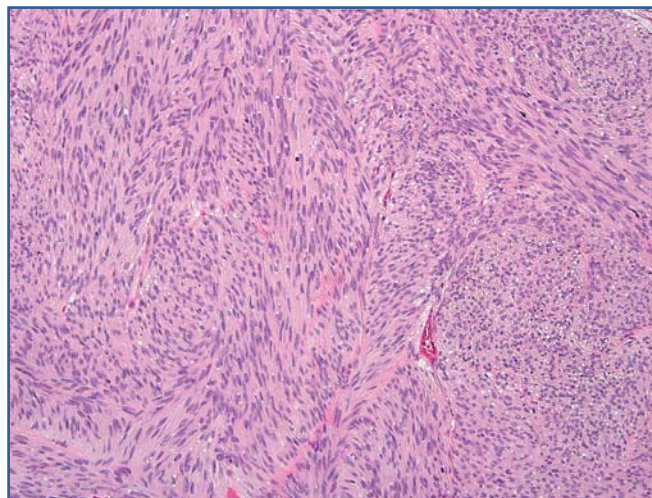
GIST jsou nejčastěji lokalizované ve stěně trávicí trubice (žaludku, střeva, vzácně v jícnu a v rektu). Vzácně se mohou také vyskytovat primárně v omentu nebo v retroperitoneu. Malé nádory do dvou centimetrů průměru jsou oválné nebo okrouhlé a jsou obvykle zanořeny ve stěně trávicí trubice. Jsou zpravidla nahodilým nálezem. Někdy jsou GIST lokalizovány převážnou částí ve sliznici, pak se polytypově vyklenují do lumen trubice, někdy jsou lokalizovány převážně subserózně. Velké GIST nad 5 cm prostupují zpravidla celou stěnou trávicí trubice. Sliznice nad nádorem bývá zejména u polypózně rostoucích nádorů a u nádorů větších rozměrů exulcerována. Některé subserózně lokalizované

■ **obrázek 3** Makroskopický obraz GIST – resekovaná klička tenkého střeva s převážně exofyticky rostoucím GIST širokou stopkou nasadajícím na zevní stěnu střeva



■ **obrázek 4** Mikroskopický obraz, barvení hematoxylin a eosin – vřetenobuněčný GIST žaludku.

Nádor je fascikulárně uspořádaný a připomíná mikroskopický obraz leiomyomu. V některých buňkách jsou patrné drobné perinukleární vakuoly. Nádor je uniformní, prakticky bez mitóz, velikost 4 cm.

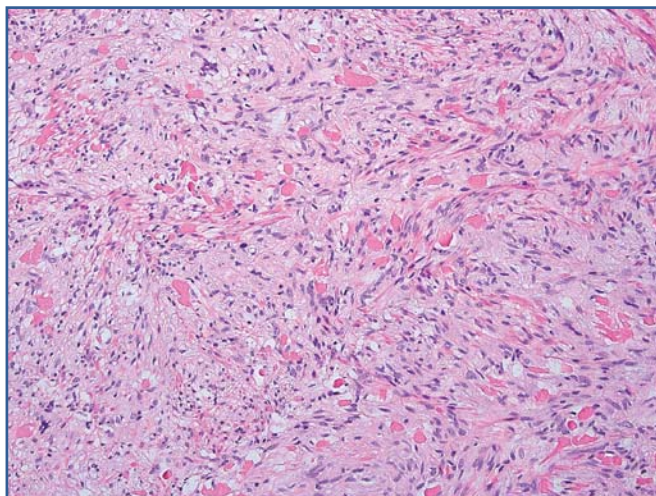


GIST rostou stopkatě a exofyticky se vyklenují do dutiny břišní (**obrázek 3**). Nádor není opouzdřený vlastním pouzdrem, ale bývá poměrně ostře ohraničený od ostatních struktur (např. svaloviny žaludku/střeva). Na řezu je buď homogenní, nebo je tvořen lalůčkovitou/uzlovitou tkání šedorůžové, někdy i nažloutlé barvy. Menší nádory jsou tužší konzistence, velké bývají měkké a na řezu sarkomatózní – připomínající rybí maso. Fokálně mohou být pseudocystické, s ložisky hemoragií a asi v pětině případů s ložisky koagulačních nekrotů (zvláště u zřetelně maligních, sarkomatózních variant).

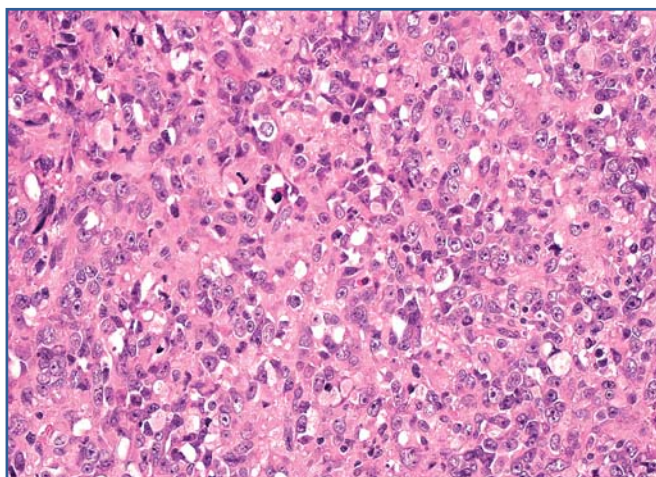
Mikroskopická struktura je variabilní a v zásadě rozpoznáváme varianty vřetenobuněčné, epiteloidní – připomínající až epitelové nádory –, a smíšené. Vřetenobuněčné varianty jsou nejčastější a obecně připomínají nádory z hladké svaloviny – leiomyom, popřípadě leiomyosarkom (**obrázek 4**). Nejčastěji jsou buněčné, uniformní, téměř bez atypií. Často jsou jádra nádorových buněk sešikována do palisád, což připomíná neurogenní nádory (neurinom). Perinukleárně jsou v některých GIST prominentní ostře konturované vakuoly. Při větším výskytu těchto vakuol nádor připomíná až liposarkom. U vřetenobuněčných GIST s nízkou proliferační aktivitou bývají nádorové buňky štíhlé, silně protáhlé, stroma tvoří hojný kolagen separující jednotlivé buňky nebo jejich svazy od sebe. Někdy toto stroma kalcifikuje. Některé buněčné GIST vykazují vyšší proliferační aktivitu a nádorové buňky mají fokálně nebo i povšechně znaky atypií. Stroma pak bývá myxoidně prosáklé. Dosti svéráznou extracelulární strukturou jsou tzv. skenoidní fibrily, což jsou depozita eozinofilní smotkovité (skenoid) fibrilární hmoty mezi nádorovými buňkami (**obrázek 5**).

Epiteloidní varianty GIST (dříve označované jako bizarní leiomyom či leiomyoblastom) jsou obvykle buněčné a jsou tvořené kohezivně rostoucími polygonálními buňkami s nezřetelnými buněčnými hranicemi (**obrázek 6**). Variační šíře projevů je i v kategorii epiteloidních GIST poměrně značná. Kromě blandně vyhlí-

■ **obrázek 5** Mikroskopický obraz, barvení hematoxylin a eosin – vřetenobuněčný GIST tenkého střeva s hojnými skenoidními fibrilami (silně eosinofilní neuspořádané pentlicovité struktury)



■ **obrázek 6** Mikroskopický obraz, barvení hematoxylin a eosin – epiteloidní GIST. Nádor vycházel ze žaludku. Největší průměr nádoru 12 cm. Proliferační aktivita > 5 mitóz/50 zorných polí.



žejících typů s nízkou proliferační aktivitou jsou poměrně běžné varianty se znaky jaderných i cytoplazmatických nepravidlostí a s vyšším počtem mitóz, včetně mitóz atypických. Extrémem jsou GIST s dyskohezivně rostoucími velkými polygonálními buňkami a s výraznými atypiiemi.

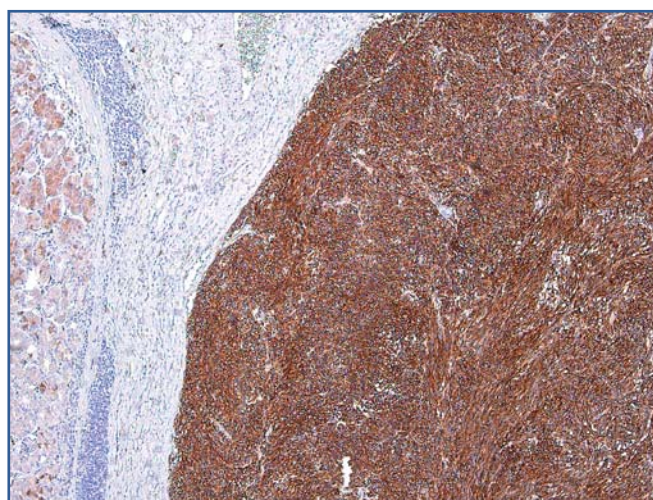
Prognosticky se vřetenobuněčné a epiteloidní varianty zásadním způsobem neliší, v každé ze skupin závisí na proliferační aktivitě nádoru (viz níže). Ukazuje se, že alespoň některé GIST s mutací genu *pdgfr-α* mohou mít morfologicky svérázný vřetenobuněčný a epiteloidní charakter s palisádami epiteloidních buněk, a přestože nejde o jednoznačnou morfologicky definovatelnou kategorii, může tento nález vést k cílené indikaci molekulárního vyšetření.²⁷

Nádor v naprosté většině případů (90–95 %) exprimuje receptorový membránový protein KIT (CD117) (**obrázek 7**).

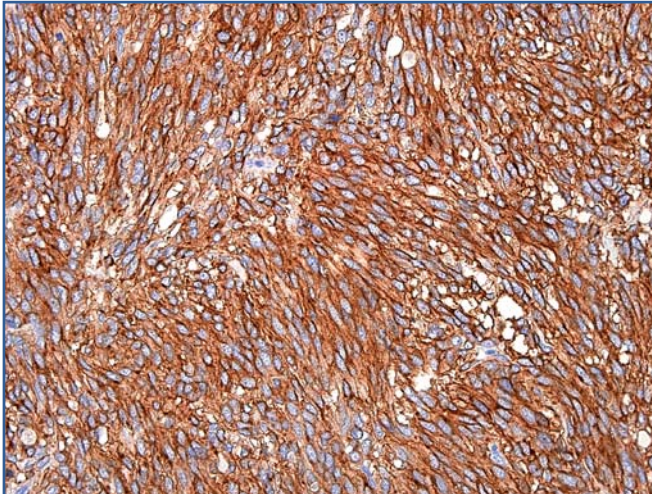
Pozitivita je jak membránová, tak cytoplazmatická difúzní nebo bodová v okolí jádra (**obrázek 8**). V naprosté většině je pozitivita KIT výrazná a povšechná. Ve většině případů (nad 80 %) prokazujeme také molekulu jednořetězcového membránového proteinu, CD34 (**obrázek 9**). Nádory CD117-negativní bývají často i CD34-negativní a mívají epiteloidní charakter. Taková negativita může být skutečná, avšak vždy je nutné snažit se vyloučit technické obtíže průkazu molekuly KIT, popřípadě chybu odběru při vyšetření příliš malého vzorku. Expres dalšími molekulami, které se v rámci rutinního vyšetření stanovují, je variabilní. Nejčastěji bývá pozitivní hladkosvalový aktin (ložiskově, někdy i povšechně) – do 20 % případů –, vzácněji desmin (cytoskeletální protein svalové tkáně) – do 5 % –, a jasná pozitivita S100 proteinu se prokáže u méně než 1 % GIST. Je možné uplatňovat i další markery, zejména užitečné pro diferenciální diagnózu, avšak výše uvedený panel k diagnostickému vyšetření obvykle dostačuje. U některých GIST byla prokázána neurosekreční aktivita (zejména při ultrastrukturálním vyšetření) a tyto nádory se po krátkou dobu v literatuře označovaly jako gastrointestinální nádory autonomního nervového systému (GANT – gastrointestinal autonomic nerve tumor). V průběhu studia těchto nádorů se ukázalo, že mají obdobné fenotypové i genové charakteristiky jako GIST, proto je pojem GANT v podstatě opuštěn a jednotka s neurosekreční diferenciací je hodnocena v rámci GIST. V případech nejasné diferenciální diagnózy, například u malých endoskopických odběrů, lze k vyloučení karcinomu, popřípadě lymfomu, použít příslušné spektrum protilátek.

Velmi podstatné je posouzení proliferační aktivity nádorových buněk. Proliferační aktivita, spolu s velikostí nádoru, má rozhodující vliv na prognostický odhad chování GIST. Proliferační aktivita se může stanovit imunohistochemickým průkazem mo-

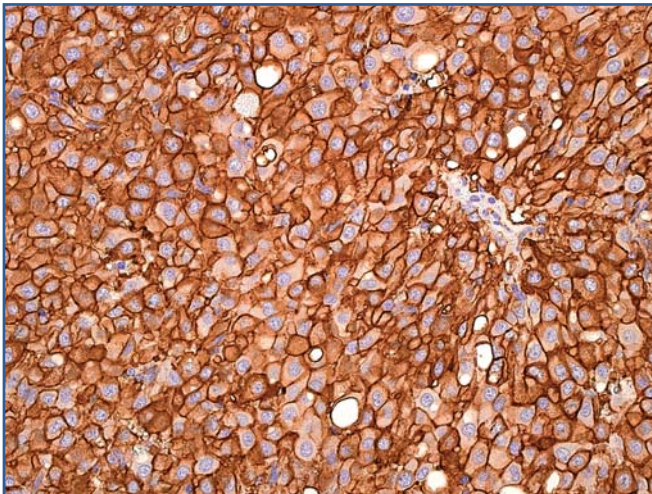
■ **obrázek 7** Mikroskopický obraz, přehledné zvětšení – vřetenobuněčný GIST žaludku. Imunohistochemický průkaz molekuly KIT (CD117) ukazuje na silnou pozitivitu nádorových buněk (část vpravo). Nádor je ostře ohraničen od negativní fibrózně změněné submukózy, slizniční svaloviny a vlastní sliznice žaludku (vlevo, s mírnou nespecifickou vazbou protilátky na žaludeční žlásky)



■ **obrázek 8** Mikroskopický obraz, středně velké zvětšení – vřetenobuněčný GIST. Imunohistochemický průkaz molekuly KIT (CD117) ukazuje na membránovou i cytoplazmatickou pozitivitu nádorových buněk



■ **obrázek 9** Mikroskopický obraz – epiteloidní GIST. Imunohistochemický průkaz molekuly CD34 se silnou membránovou a slabší cytoplazmatickou pozitivitou



lekuly Ki-67, avšak k zařazení nádoru do prognostických kategorií je běžně využíváno počítání mitóz v 50 zorných polích při velkém zvětšení, tj. s využitím objektivu mikroskopu zvětšujícího 40x a okuláru 10x. Návrhy prognostických kategorií GIST pocházejí od různých autorů (např. Miettinen³ či Fletcher a spol.²⁸ [tabulka 3]). Kromě primární diagnostiky a vymezení prognostických skupin nemocných s GIST sleduje histopatologické vyšetření také změny indukované terapií, zejména po léčbě IM (pokud je dostupná tkáň primárního nádoru nebo jeho metastáz k vyšetření). GIST mohou být po terapii zařazeny jako reagující na terapii či alespoň stabilní, nebo jako IM rezistentní.²⁹ U nádorů reagujících na terapii bývají nálezy variabilní. Je patrná pyknotizace jader nádorových buněk, apoptózy, snížení proliferační aktivity, vyskytují se hypocelulární ložiska s fibrotizací stromatu až denzní

hyalinózou (ojediněle i s tvorbou metaplastické chrupavky nebo kosti), nekrózy a pseudocystické změny a hemoragie. Rezistentní nádor se morfoloicky nemusí změnit vůbec, nebo může změnit charakter z původního vřetenobuněčného typu GIST na epiteloidní. Zároveň bývají zaznamenány změny imunofenotypu, především ztráta imunoreaktivity při průkazu proteinu KIT, popřípadě i CD34.³⁰ Je zaznamenána *de novo* exprese desminu, tedy diferenciace exprese proteinů směrem k hladkosvalovým buňkám, a recentně i transdiferenciace směrem k rhabdomyoblastům.³¹

■ **tabulka 3** Konsenzuální vodítko k posouzení rizika agresivního chování GIST všech anatomických lokalizací (Podle 28)

	Velikost nádoru (největší rozměr)	Počet mitóz
Velmi nízké riziko	< 2 cm	< 5/50 HPF
Nízké riziko	2–5 cm	< 5/50 HPF
Střední riziko	< 5 cm 5–10 cm	6–10/50 HPF < 5/HPF
Vysoké riziko	> 5 cm > 10 cm Jakákoliv	> 5/10 HPF Bez ohledu na počet mitóz > 10/50 HPF

Vysvětlivky: HPF – high power field/velké zvětšení (objektiv 40x, okulár 10x)

Souhrnných článků popisujících problematiku morfoloické a imunofenotypové charakteristiky GIST je v současné literatuře celá řada.^{1,3,4,7,16,20} V českém písemnictví je dostupný text autorů Dauma a spol.¹²

Histopatologická diagnóza pro běžné posouzení GIST zatím dostačuje. Ukazuje se však, že rozšíření diagnostické nabídky o molekulární vyšetření má význam v několika rovinách a do budoucna se stane nedílnou součástí vyšetření nejen nemocných s vyššími rizikovými kategoriemi GIST, ale prakticky všech nádorů typu GIST nebo těch nádorů, u kterých je GIST v diferenciálně-diagnostickém spektru.

Diferenciální diagnóza GIST je poměrně široká.³² Je nutné odlišit leiomyom, popřípadě vzácný leiomyosarkom – CD117-negativní a CD34-negativní/hladkosvalový aktin-pozitivní a desmin-pozitivní (v jícnu je leiomyom častější než GIST). V žaludku diferenciálně diagnosticky přichází v úvahu tzv. fibroidní polyp, zánětlivý myofibroblastický tumor (raritně, spíše u dětí a mladistvých), solitární fibrózní nádor a tzv. plexiformní fibromyxom.³³ Fibromatózu a některé varianty liposarkomů je třeba odlišit vždy u GIST lokalizovaných mimo trávicí trubici. GIST mohou napodobit i některé zánětlivé procesy. V trávicí trubici se může vyskytnout také neurinom, v jícnu také sarkomatoidní karcinom, popřípadě melanom, v žaludku glomus tumor, a tyto nádory se mohou GIST do určité míry podobat. Rovněž některé fibroblastické procesy reaktivního nebo nejistého původu mohou být s GIST zaměněny.³⁴

Ve druhém kroku můžeme morfoloické vyšetření a diagnostiku GIST rozšířit o molekulární analýzu. Molekulární analýza mutací umožňuje:

1. pozvednout diagnostiku GIST na komplexní úroveň;
2. potvrdit diagnózu (v opodstatněných případech);

3. předpovědět terapeutickou odpověď na biologickou léčbu IM;
4. zvolit odpovídající terapii a vyvinout nové terapeutické přístupy.

Ad 1. Komplexní diagnostika GIST poskytuje kromě zkvalitnění a ověření diagnózy rovněž potvrzení patogenetického mechanismu vzniku těchto nádorů.

Ad 2. Potvrzení diagnózy GIST je nutné v nejistých případech při zvažování jiných klinicko-patologických jednotek s pozitivitou CD117 v gastrointestinálním traktu (GIT) nebo u CD117-negativních GIST (asi 5 % všech GIST, viz výše).²³ Je však třeba zdůraznit, že i u CD117-negativních GIST mohou být geny *c-kit* nebo *pdgfr-α* mutovány. Aktivační onkogenní mutace totiž ovlivňují nikoliv expresi proteinů, ale jejich funkci. Průkaz mutací se tak u těchto pacientů stává pomocným diagnostickým vyšetřením pro potvrzení diagnózy.^{1,35} Nepřítomnost mutací však diagnózu GIST nevyvrací. Na druhou stranu lze uvést, že ani při pozitivní expresi proteinů KIT/PDGFR- α nemusí být geny *c-kit* nebo *pdgfr-α* mutovány.

Ad 3. Zásadní význam má molekulární analýza mutací při předpovědi odezvy nádoru na terapii. Podle doposud provedených klinických a molekulárních studií terapeutická odpověď pacientů s GIST souvisí s mutačním stavem jejich genů.^{36,37}

Ad 4. Úloha molekulární diagnostiky GIST při volbě terapie nabývá na významu. Dokládají to klinické studie zabývající se strategií léčby GIST.^{2,36} Se sníženou odezvou na terapii IM se kromě pacientů s mutacemi v TK doménách proteinů setkáváme rovněž u pacientů s mutacemi v exonu 9. Nižší odezva na terapii je také často spojena i s nemutovanými geny *c-kit* a *pdgfr-α*.³⁸ Podle výsledků recentních studií může navýšení dávky IM (400 vs 800 mg/den) u pacientů s mutacemi v exonu 9 významně oddálit nástup progresu nemoci.^{23,36}

Rozvoj získané rezistence prostřednictvím vzniku sekundárních mutací je dalším faktorem ovlivňujícím terapeutickou odezvu. Podle zmiňovaných doporučení je také v těchto případech vhodné zvážit podávání zvýšené dávky IM.³⁶ Pokrokům v léčbě GIST se v českém písemnictví věnuje příspěvek autorů Linkeho a spol.³⁹

Metodika molekulárního vyšetření mutací genů

Základním materiálem pro molekulární vyšetření mutací genů *c-kit* a *pdgfr-α* jsou vzorky primárních nádorů nebo nádorů recidivujících či jejich metastáz. DNA potřebná pro molekulární analýzu je izolována ze vzorků nádorů ve formě zmrazených tkáňů nebo tkání fixovaných ve formolu a zalitých do parafínu, určených též pro klasickou histopatologickou diagnostiku a typizaci. Při molekulární diagnostice provádíme na našem pracovišti nejprve amplifikaci exonů 9, 11, 13 a 17 genu *c-kit* a exonů 12, 14 a 18 genu *pdgfr-α*. Samotnou detekci mutací realizujeme prostřednictvím asymetrické sekvenční polymerázové řetězové reakce (PCR) s následným určením pořadí nukleotidů pomocí kapilární elektroforézy na genetickém analyzátoru. Výsledné hodnocení spočívá v porovnání sekvence vzorků pacienta s referenčními sekvencemi genů *c-kit* a *pdgfr-α*. Každá detekovaná mutace je ověřena novou – opakovanou nezávislou analýzou.

Závěrečné shrnutí

V přehledu jsme chtěli poukázat na problematiku gastrointestinálních stromálních tumorů, která se z histopatologického a imunofenotypizačního vyšetření postupně rozšířila na molekulární analýzu. Tato vyšetření mají význam diagnostický, prognostický a terapeuticko-indikační. GIST mají i přes pokroky v histopatologické diagnostice nesnadno odhadnutelný průběh, často s dlouhodobou latencí rozvoje progresu onemocnění, a proto je potřebné hledat další cesty v posuzování biologických vlastností této skupiny nádorů a od toho se odvíjejících terapeutických postupů.

Vyšetření mutačního stavu genů *c-kit* a *pdgfr-α* má opodstatnění u nemocných, kteří podstupují léčbu IM. Jedná se o pacienty s maligními metastazujícími nebo recidivujícími nádory, popřípadě o pacienty s nádory inoperabilními. Po zvážení nasazení IM by molekulární diagnostika mutací v rámci rutinního vyšetření měla být provedena před zahájením terapie. Výsledky analýzy v tomto případě umožní odhadnout citlivost nádoru na léčbu. Další provedení molekulární analýzy doporučujeme ve shodě s literárními údaji při selhávání léčebné odpovědi. Odebrané vzorky z nádoru v tomto případě slouží k případné detekci sekundárních mutací. Mimo tyto případy může molekulární analýza mutací sloužit k ověření histopatologické diagnózy při nejistém zařazení nádoru nebo při průkazu mutací u CD117-negativních GIST. V případě detekce mutací je pak i pacientům s negativní expresí proteinu KIT doporučována terapie IM.

Technické vybavení našeho pracoviště a získané zkušenosti nám umožňují pokračovat ve screeningu mutací a molekulární diagnostice GIST. Analýzu mutací provádíme vždy u pacientů s morfoloicky a imunohistochemicky verifikovanou diagnózou GIST. Do programu však lze zařadit i ty nemocné, u kterých není histopatologická diagnostika GIST snadná nebo je součástí diferenciálnědiagnostické rozvahy. Dosavadní soubor pacientů je tvořen vzorky, které jsme získali z biopického provozu Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a Fakultní nemocnice v Motole. Dalším zdrojem jsou vzorky zaslané z jiných pracovišť v rámci konzultačních biopsií nebo vzorky cíleně odeslané na molekulární vyšetření mutačního stavu. Důležitá je tedy indikace k molekulárnímu vyšetření, která je dána nejen základní histopatologickou diagnostikou, ale vychází především z klinické rozvahy o zahájení terapie IM. Navázání a prohloubení komunikace s onkologickými centry, která nemocné s GIST léčí a sledují, je proto zcela zásadní.

Děkujeme za spolupráci Radioterapeuticko-onkologickému oddělení FN Motol, Fakultní Thomayerově nemocnici v Krči, Masarykově onkologickému ústavu v Brně, Nemocnici České Budějovice, Oblastní nemocnici Mladá Boleslav a Nemocnici s poliklinikou v Mělníce.

Podpořeno: firma Novartis s.r.o., VZ FNM MZO 2005/6704

Literatura

- 1 Hirota S, Isozaki K. Pathology of gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int* 2006;56(1):1–9.
- 2 Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003;21(23):4342–9.
- 3 Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(10):1466–78.
- 4 Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005;29(1):52–68.
- 5 Tornillo L, Terracciano LM. An update on molecular genetics of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol* 2006;59(6):557–63.
- 6 Gupta P, Tewari M, Shukla HS. Gastrointestinal stromal tumor. *Surg Oncol* 2008;17(2):129–38.
- 7 Steigen SE, Eide TJ. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a review. *APMIS* 2009;117(2):73–86.
- 8 Samelis GF, Ekmektzoglou KA, Zografos GC. Gastrointestinal stromal tumours: clinical overview, surgery and recent advances in imatinib mesylate therapy. *Eur J Surg Oncol* 2007;33(8):942–50.
- 9 Antonescu CR. Targeted therapy of cancer: new roles for pathologists in identifying GISTs and other sarcomas. *Mod Pathol* 2008;21(Suppl 2):S31–6.
- 10 Wardelmann E, Hrychuk A, Merkelbach-Bruse S, et al. Association of platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *J Mol Diagn* 2004;6(3):197–204.
- 11 Judson IR. Prognosis, imatinib dose, and benefit of sunitinib in GIST: knowing the genotype. *J Clin Oncol* 2008;26(33):5322–5.
- 12 Daum O, Vaněček T, Šíma R, et al. Gastrointestinální stromální tumor: Současný pohled. *Klinická onkologie* 2006;19(4):201–11.
- 13 Lasota J, Miettinen M. Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2008;53(3):245–66.
- 14 Maleddu A, Pantaleo MA, Nannini M, et al. Mechanisms of secondary resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumours (Review). *Oncol Rep* 2009;21(6):1359–66.
- 15 Burger H, den Bakker MA, Kros JM, et al. Activating mutations in c-KIT and PDGFRalpha are exclusively found in gastrointestinal stromal tumors and not in other tumors overexpressing these imatinib mesylate target genes. *Cancer Biol Ther* 2005;4(11):1270–4.
- 16 Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors-definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001;438(1):1–12.
- 17 Reichardt P, Hogendoorn PC, Tamborini E, et al. Gastrointestinal stromal tumors I: pathology, pathobiology, primary therapy, and surgical issues. *Semin Oncol* 2009;36(4):290–301.
- 18 Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Hum Pathol* 1999;30(10):1213–20.
- 19 Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005;13(3):205–20.
- 20 Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology* 2006;48(1):83–96.
- 21 Lasota J, Kopczyński J, Sarlomo-Rikala M, et al. KIT 1530ins6 mutation defines a subset of predominantly malignant gastrointestinal stromal tumors of intestinal origin. *Hum Pathol* 2003;34(12):1306–12.
- 22 Duffaud F, Le Cesne A. Imatinib in the treatment of solid tumours. *Target Oncol* 2009;4(1):45–56.
- 23 Blackstein ME, Blay JY, Corless C, et al. Gastrointestinal stromal tumours: consensus statement on diagnosis and treatment. *Can J Gastroenterol* 2006;20(3):157–63.
- 24 Dirnhofer S, Leyvraz S. Current standards and progress in understanding and treatment of GIST. *Swiss Med Wkly* 2009;139(7–8):90–102.
- 25 Lim KH, Huang MJ, Chen LT, et al. Molecular analysis of secondary kinase mutation in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumours (Review). *Med Oncol* 2008;25(2):207–13.
- 26 Casali PG, Jost L, Reichardt P, et al. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009;20(Suppl 4):64–7.
- 27 Kwon JE, Kang HJ, Kim SH, et al. Pathological characteristics of gastrointestinal stromal tumours with PDGFRA mutations. *Pathology* 2009;41(6):544–54.
- 28 Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Human Pathology* 2002;33(5):459–65.
- 29 Sciot R, Debiec-Rychter M. GIST under imatinib therapy. *Semin Diagn Pathol* 2006;23(2):84–90.
- 30 Pauwels P, Debiec-Rychter M, Stul M, et al. Changing phenotype of gastrointestinal stromal tumours under imatinib mesylate treatment: a potential diagnostic pitfall. *Histopathology* 2005;47(1):41–7.
- 31 Liegl B, Hornick JL, Antonescu CR, et al. Rhabdomyosarcomatous differentiation in gastrointestinal stromal tumors after tyrosine kinase inhibitor therapy. *Am J Surg Pathol* 2009;33(2):218–26.
- 32 Miettinen M, Majidi M, Lasota J. Pathology and diagnostic criteria of gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a review. *Eur J Cancer* 2002;38(Suppl 5):S39–51.
- 33 Miettinen M, Makhlof HR, Sobin LH, et al. Plexiform fibromyxoma: a distinctive benign gastric antral neoplasm not be confused with a myxoid GIST. *Am J Surg Pathol* 2009;33(11):1624–32.
- 34 Daum O, Vanecek T, Šíma R, et al. Reactive nodular fibrous pseudotumors of the gastrointestinal tract: report of 8 cases. *Int J Surg Pathol* 2004;12(4):365–74.
- 35 Tarn C, Godwin AK. Molecular research directions in the management of gastrointestinal stromal tumors. *Curr Treat Options Oncol* 2005;6(6):473–86.
- 36 Blay JY, Reichardt P. Advanced gastrointestinal stromal tumor in Europe: a review of updated treatment recommendations. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;9(6):831–8.
- 37 Bertolini V, Chiaravalli AM, Klersy C, et al. Gastrointestinal stromal tumors-frequency, malignancy, and new prognostic factors: the experience of a single institution. *Pathol Res Pract* 2008;204(4):219–33.
- 38 Ali S, Ali S. Role of c-kit/SCF in cause and treatment of gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Gene* 2007;401(1–2):38–45.
- 39 Linke Z, Prausová J, Kubáčková K. Pokroky v léčbě gastrointestinálního stromálního tumoru. *Farmakoterapie* 2007;3(4):373–81.

Molekulární diagnostika gastrointestinálních stromálních tumorů ve vztahu k predikci terapeutické odpovědi na cílenou biologickou léčbu

Augustiňáková A., Kodet R.

Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha

SOUHRN

Cílená biologická léčba založená na inhibici receptorových tyrosinkináz přinesla průlom v terapii pacientů s metastatickým, recidivujícím nebo inoperabilním gastrointestinálním stromálním tumorem (GIST). Aktivační mutace genů *KIT* a *PDGFRA*, které kódují příslušné receptorové tyrosinkinázy, jsou jedním z hlavních faktorů maligní transformace stromálních buněk trávicího ústrojí. Přesná lokalizace mutací rovněž určuje odezvu nádoru na cílené terapeutikum. Molekulární diagnostika primárních mutací se v tomto ohledu stává důležitým nástrojem pro určení citlivosti respektive rezistence nádoru na terapii. Význam molekulární analýzy navíc spočívá v detekci sekundárních mutací zodpovědných za získanou rezistenci nádoru k biologické terapii. Mutační analýza v tomto případě umožňuje vysvětlit selhávání terapie a poskytuje příležitost pro volbu léčby alternativní.

Klíčová slova: GIST – receptorové tyrosinkinázy – *KIT* – *PDGFRA* – cílená biologická terapie – molekulární analýza

Gastrointestinal stromal tumor molecular diagnostics in relation to the prediction of a therapeutic response to targeted biological therapy

SUMMARY

Targeted therapy based on the inhibition of the receptor tyrosine kinases has improved the outcome of patients with metastatic, recurrent and/or unresectable gastrointestinal stromal tumors (GIST). Activating mutations of *KIT* and *PDGFRA* genes, which code for receptor tyrosine kinases, play an important role in the malignant transformation of stromal cells in the gastrointestinal tract. The response to targeted therapy is associated with the presence and type of mutations. Molecular identification of the primary mutational status became an important tool in predicting the response to therapy (sensitivity/resistance). The identification of secondary mutations occurring in patients treated with targeted therapy may explain the cause of acquired, secondary resistance of GIST. In these cases, mutational analysis represents a tool to explain failure of the therapy and provides a rationale for alternative therapeutic strategies.

Keywords: GIST – receptor tyrosine kinases – *KIT* – *PDGFRA* – targeted therapy – molecular analysis

Cesk Patol 2011; 47(4): xxx-xxx

Gastrointestinální stromální tumory (GIST) patří mezi nejčastější mesenchymální nádory gastrointestinálního traktu (GIT) (1).

Morfologicky tvoří heterogenní skupinu nádorů, u které se setkáváme s odlišnostmi a rozdíly v rámci jednoho nádoru, stejně jako s odlišnostmi mezi jednotlivými nádory v rámci této skupiny onemocnění. Nádor je nejčastěji složen z vrетенitých buněk (přibližně 70 %). Méně častá je epiteloidní varianta (20 %) s polygonálními buňkami a s relativně uniformními jádry kulatého až oválného tvaru (2). Existují i varianty smíšené (10 %) (3).

GIST mohou vzniknout kdekoliv v trávicí trubici od jícnu až po rektum. Jejich nejčastější lokalizací je však žaludek (40–60 %) a tenké střevo (30–40 %). S přítomností nádoru v dalších intraabdominálních orgánech, tj. v jícnu, tlustém střevu, rektu nebo apendixu se setkáváme ojediněle (u méně než 10 % případů) (2,4). Možný, i když vzá-

ný, je výskyt tohoto typu nádoru ve tkáních a orgánech mimo trávicí trakt. Jedná se o tzv. extragastrointestinální stromální tumory (EGIST) lokalizované v mesenteriu, retroperitoneu, v močovém měchýři, žlučníku, játrech, prostatě, vagině, děloze, ale i na plevře.

HISTOPATOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA GIST

Histopatologická diagnostika GIST je založena na stanovení charakteristických morfologických a imunofenotypových znaků nádorových buněk. Kromě již zmíněného základního morfologického obrazu je typickým a diagnosticky významným znakem GIST exprese transmembránového proteinu KIT (povrchová molekula CD117), který je u GIST detekován přibližně v 95 % (5).

Dalšími diferenciativně diagnosticky hodnotnými vyšetřeními je imunohistochemický průkaz exprese molekuly CD34 (60–70 %) a markerů svalové případně neuroektodermální diferenciace, zpravidla hladkosvalového aktinu (30–40 %), proteinu S100 (5 %) a desminu (1–2 %). Pozitivita CD117 je obvykle silná a difúzní, s cytoplazmatickou, membránózní nebo perinukleární (bodovou) distribucí. Některé případy CD117 negativních nádorů jsou charakteristicky spojeny s epiteloidní morfologií, lokalizací v žaludku, omentu či v retroperitoneu a s přítomností mutací v genu *PDGFRA* (3).

✉ Adresa pro korespondenci:

Mgr. Alena Augustiňáková
Ústav patologie a molekulární medicíny
2. LF UK a FN Motol
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5
tel: 22 443 5622, fax: 22 443 5620
e-mail: alena.augustinakova@fnmotol.cz

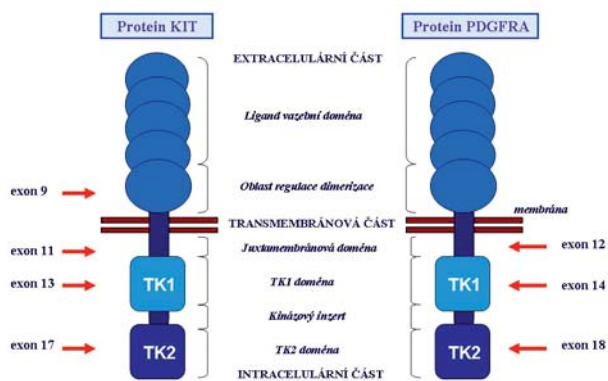
Častá koexprese proteinu KIT a povrchové molekuly CD34, která je společná pro GIST i intersticiální Cajalovy buňky (ICC, interstitial cells of Cajal) vedla k úvahám o pravděpodobném vzniku GIST z transformovaných ICC nebo z jejich prekurzorů, tedy z tkáňových progenitorových buněk diferencujících se v ICC. V rámci GIT mají ICC funkci tzv. pacemakerů (2,6). Ve stěně trávicí trubice zprostředkovávají přenos impulzů mezi nervovými buňkami a buňkami hladké svaloviny a podílejí se na řízení peristaltiky střev (6,7).

Podrobnější histopatologickou diagnostiku GIST uvádíme v přehledném článku věnovanému této problematice (8). Bližší orientaci lze získat i z dalších článků publikovaných v českém i zahraničním písemnictví (9–14).

RECEPTOROVÉ TYROSINKINÁZY

Jedním z dosud známých patogenetických mechanismů vzniku GIST jsou aktivační mutace genů *KIT* a *PDGFRA* (platelet-derived growth factor receptor alpha), které kódují příslušné receptorové tyrosinkinázy (RTK) KIT a PDGFRA. Proteiny KIT i PDGFRA patří do rodiny receptorů podobných receptoru pro destičkový růstový faktor (PDGFR), která je také označována pořadovým číslem III. Mimo zmiňovaných proteinů KIT a PDGFRA patří do této skupiny rovněž proteiny PDGFRB, CSF1 (colony stimulating factor-1) a FLT3 (FMS-like tyrosin kinase-3)(15). Pro uvedenou skupinu receptorů je charakteristická přítomnost pěti domén podobných molekule imunoglobulinu v extracelulární části, jednoduchá transmembránová část a intracelulární část proteinu se dvěma tyrosinkinázovými doménami (TK1 a TK2). Schématické znázornění struktury RTK KIT a PDGFRA včetně oblastí, které kódují vyšetřované exony genů *KIT* nebo *PDGFRA* (viz níže), poskytuje obr. 1.

RECEPTOROVÉ TYROSINKINÁZY KIT a PDGFRA



Rodina RTK III. (PDGFR): *KIT*, *PDGFRA*, *PDGFRB*, *CSF-1* a *FLK-3*

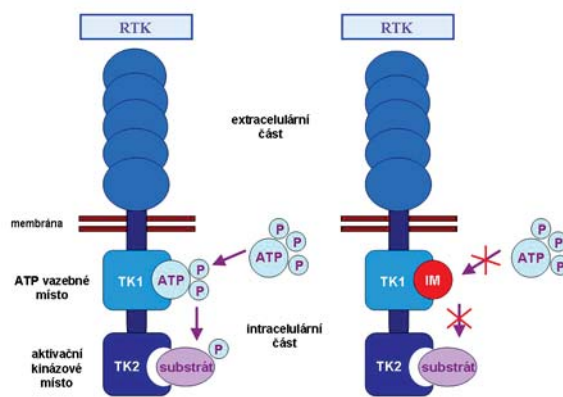
Obr. 1. Schématický přehled struktury receptorových tyrosinkináz KIT a PDGFRA a oblastí, které kódují vyšetřované exony genů *KIT* a *PDGFRA*.

RTK KIT a PDGFRA plní důležitou funkci při přenosu extracelulárních signálů do nitra buněk. Přenos signálu se děje prostřednictvím vazby odpovídajících ligandů na extracelulární doménu RTK. V případě receptoru KIT je příslušným ligandem růstový faktor kmenových buněk (SCF, stem cell factor), u receptoru PDGFRA je to destičkový růstový faktor PDGF (13). Vazbou ligandu na extracelulární doménu receptoru dochází ke konformačním změnám proteinu a k aktivaci TK domén v jeho intracelulární části. Aktivované domény TK následně aktivují další signální molekuly v cytoplazmě buňky a spouštějí signalizační dráhy vedoucí v konečném důsledku k ovlivnění exprese molekul odpovědných za proliferaci, diferenciaci nebo za programovanou smrt buňky (16).

MUTACE GENŮ *KIT* a *PDGFRA*

Mutace v genech *KIT* nebo *PDGFRA* způsobují aktivaci uvedené signalizační kaskády bez přítomnosti specifického ligandu. Výsledkem je neregulovaná exprese molekul, která ve spojení s nekontrolovanou zvýšenou proliferací buněk nebo se sníženou schopností přejít do apoptózy vede k maligní transformaci buněk.

Mutace mohou být přítomny v kterémkoliv z exonů, vzácně i intronů, genů *KIT* nebo *PDGFRA*, zvýšeně se však kumulují v určitých a pro daný gen typických místech (tzv. hot spots). U genu *KIT* jsou jimi exony 9, 11, 13 a 17, u genu *PDGFRA* exony 12, 14 a 18. Nejčastěji se mutace vyskytují v exonu 11 genu *KIT* (60–70 %), který kóduje juxtamembránovou oblast proteinu. Méně často se přítomnost mutací zjišťuje v exonu 9 téhož genu (10 %), který kóduje extracelulární doménu. Ojedinele se vyskytují mutace v exonech 13 a 17, které kódují intracelulární TK domény (TK1, respektive TK2) (1–2 %, respektive 1 %). Exony 12, 14 a 18 genu *PDGFRA*



Obr. 2. Mechanismus působení inhibitoru receptorových tyrosinkináz imatinib mesylát (IM).

Tab. 1. Přehled lokalizace, výskytu, typu mutací a odpovědi nádoru na cílenou terapii IM

GEN/EXON	LOKALIZACE	VÝSKYT	TYP MUTACÍ	TERAPEUTICKÁ ODEZVA NÁDORU
KIT		80 %		
11	juxtamembránová doména	60–70 %	delece, BM, duplikace	dobrá
9	extracelulární doména	10 %	duplikace, BM	střední
13	intracelulární TK1 doména	1–2%	BM	nízká
17	intracelulární TK2 doména	1 %	BM	nízká
PDGFRA		5–8 %		
12	juxtamembránová doména	1 %	BM, delece	dobrá
14	intracelulární TK1 doména	≤ 1 %	BM	nízká
18	intracelulární TK2 doména	5 %	BM, delece	Asp842Val rezistentní

IM – imatinib mesylát, BM – bodové mutace, TK – tyrosinkinázová

kódují analogické oblasti u proteinu PDGFRA jako je tomu u proteinu KIT. Nejčastěji se mutace genu *PDGFRA* vyskytují v exonu 18 (5 %), který kóduje doménu TK2. Výjimečně pak v exonech 12 a 14, které kódují juxtamembránovou doménu, respektive doménu TK1 (1 %, respektive <1 %) (15). Podle dosud známých informací se současný výskyt primárních mutací v obou genech vzájemně vylučuje. Pokud jsou tedy mutace přítomny v genu *KIT*, nevyskytují se v genu *PDGFRA* a naopak. U části pacientů se přítomnost mutací nezjistí ani v jednom z vyšetřovaných genů. U skupiny GIST s nemutovanými geny *KIT* nebo *PDGFRA* je mechanismus vzniku vysvětlován pravděpodobným výskytem aktivačních mutací v genech pro jiné RTK, funkčně příbuzné transmembránovým proteinům KIT a PDGFRA, nebo v genech pro signální molekuly, které jsou regulovány signalizační kaskádou zprostředkovanou RTK KIT nebo PDGFRA (3). Přehled lokalizace mutací v jednotlivých exonech genů *KIT* a *PDGFRA*, frekvence výskytu a typů diagnostikovaných mutací poskytuje tab. 1.

TERAPIE IMATINIB MESYLÁTEM, MECHANIZMUS ÚČINKU

Význam molekulární diagnostiky GIST a analýzy mutačního stavu genů *KIT* a *PDGFRA* vzrostl se zavedením cílené protinádorové terapie pomocí imatinib mesylátu (IM) (Gleevec®, Novartis Pharma, Basel, Switzerland). IM je účinným inhibítorům RTK KIT, PDGFRA, PDGFRB, ABL a BCR-ABL. Výrazně ovlivňuje přežití pacientů s inoperabilním, metastazujícím nebo recidivujícím GIST (17). IM byl nejprve úspěšně použit v léčbě chronické myeloidní leukémie. Mechanismus účinku IM v tomto případě spočívá v inhibici aktivace signálních drah vedoucích ke vzniku leukemického fenotypu buňky, který byl navozen vznikem fúzního proteinu BCR-ABL (18). IM je nízkomolekulovým analogem ATP. Vazbou na vazebné místo pro ATP v cytoplazmatické doméně TK uvedených receptorů znemožňuje změnu konformace proteinu. Tímto procesem blokuje přenos fosfátových skupin (P) z ATP na tyrosinová residua molekul, která patří k substrátům těchto proteinů (19). Zmíněnou blokadou se zastaví aktivační signální kaskáda podílející se na vzniku nádorů (obr. 2).

VÝZNAM MOLEKULÁRNÍ ANALÝZY GIST

Analýza uvedených mutací má pro pacienty s GIST podstupující biologickou léčbu IM zásadní klinicko-terapeutický dopad. Charakter odpovědi nádoru na cílenou terapii totiž výrazně souvisí s přítomností a přesnou lokalizací mutací ve vyšetřovaných genech *KIT* a *PDGFRA*. Na základě výsledků mutační analýzy můžeme předpokládat odpověď nádoru na terapii a následně tedy odhadnout i účinnost terapie IM.

Obecně se nádory s mutacemi genů *KIT* a *PDGFRA* v oblastech kódujících regulační oblasti proteinů (exon 11 u genu *KIT* a exon 12 u *PDGFRA*) považují za mutace s dobrou odpovědí na léčbu IM. Naproti tomu nádory s mutacemi v exonech kódujících enzymatické domény receptorů (exony 13 a 17 genu *KIT* a exony 14 a 18 genu *PDGFRA*) nebo nemutovanými geny *KIT* a *PDGFRA* odpovídají na léčbu IM méně, případně jsou primárně rezistentní (3), vždy však záleží na přesné lokalizaci mutace a jejím konkrétním typu. Stručný přehled vztahu lokalizace mutací k biologickému chování nádoru a odpovědi nádoru na terapii IM poskytuje tab. 1.

U pacientů s mutacemi v exonech 11 a 9 genu *KIT* se obecně setkáváme s nejlepší odezvou na terapii IM. Exon 11, jak již bylo uvedeno, kóduje intracelulární juxtamembránovou doménu proteinu KIT. Juxtamembránová doména plní funkci negativního regulátoru kinázové aktivity receptoru. Následkem mutací v této doméně dojde ke konformačním změnám proteinu a tím k porušení regulační funkce domény (20). Exon 9 kóduje extracelulární část proteinu KIT, jehož

dimerizací po vazbě specifického ligandu dochází k aktivaci receptorové kinázy. Mutace postihující exon 9 narušují antidimerizační motiv a vedou ke spontánní homodimerizaci proteinu a tím i ke konstitutivní aktivaci receptoru. V obou případech (tj. mutacích v exonu 11 i 9) cílená inhibice RTK prostřednictvím kompetice vazby IM a ATP vazebné místo účinně ovlivňuje jejich mutacemi navozenou deregulaci činnosti. Při hodnocení odezvy nádoru se však i u mutací v exonech 11 a 9, které jsou senzitivní na IM, setkáváme s rozdíly v terapeutické odpovědi. Parciální odpověď nádoru s mutacemi v juxtamembránové doméně genu *KIT* (exon 11) je přibližně 84 % ve srovnání se 48 % při přítomnosti mutací v extracelulární doméně (exon 9) (21). Podle studií z poslední doby zabývajících se strategií terapie IM mají pacienti s mutacemi v exonu 9 genu *KIT* významně prodlouženou dobu přežití bez příznaků onemocnění při podání akcelerované dávky IM již v počátku terapie (22).

U pacientů s mutacemi v exonech 13 a 17 genu *KIT*, které kódují tzv. enzymatické oblasti proteinu KIT (vazebné místo pro ATP, respektive kinázové aktivační místo), je odpověď nádoru na terapii nižší. Důvodem je v prvním případě neschopnost vazby IM na mutací změněné vazebné místo pro ATP. V druhém případě spočívá selhání inhibičního účinku IM v tvorbě stabilně aktivní konformace proteinu KIT. Je nutné podotknout, že mutace v enzymatických doménách přitom nemusí vždy postihovat přesně oblasti vazby IM. Změna struktury proteinu i ve vzdálenějším místě může totiž indukovat konformační změny zamezující vazbě molekuly IM.

U pacientů s GIST se setkáváme jednak s primární rezistencí na terapii IM, jednak s rezistencí sekundární. U pacientů s nádory primárně rezistentními se klinická odpověď na léčbu neprojevuje, naopak nádor progreduje v průběhu prvních 6 měsíců terapie IM. Primární rezistence je mimo jiné spojena s bodovou mutací v exonu 18 genu *PDGFRA*, která vede k záměně aminokyseliny kyseliny asparagové za aminokyselinu valin (p. Asp842Val), nebo s nemutovaným stavem genů *KIT* a *PDGFRA*. Důvodem rezistence je v případě bodové mutace v exonu 18 genu *PDGFRA* vznik stabilně aktivní konformace proteinu. Nemutovaný stav genů *KIT* nebo *PDGFRA* a následně i neaktivované RTK KIT a PDGFRA znemožňují naproti tomu specifickou inhibici IM (1).

U některých primárně senzitivních nádorů dochází ke vzniku sekundární neboli získané rezistence. Sekundární rezistenci definuje progresse nemoci v průběhu terapie IM vznikající 6 měsíců po zahájení zprvu účinné terapie. Mechanismy vzniku sekundární rezistence jsou různé. Zahrnují mimo jiné vznik sekundárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA*, amplifikaci genu *KIT* s následnou zvýšenou expresí proteinu KIT, nebo aktivaci jiných RTK (23).

Navzdory značnému prospěchu biologické léčby pacientů s GIST představuje primární a sekundární rezistence na IM v terapii těchto nádorů značný klinický problém. Přibližně 4 % pacientů s GIST na léčbu IM nereagují. Kromě toho se u asi 50 % pacientů nakonec vyvine rezistence na IM v průběhu léčby s mediánem doby vzniku rezistence 24 měsíců. V 70 % je rezistence důsledkem vzniku sekundárních mutací (22). Podle současných návrhů terapeutických postupů se pacientům, u kterých došlo k metastatickému rozsevu nádoru, pacientům progredujícím na terapii nebo pacientům rezistentním na terapii, doporučuje podávání vyšší dávky IM, a to 800mg/den místo obvyklých 400mg/den (22).

DALŠÍ MOŽNOSTI TERAPIE

Stále se rozvíjející, doplňovaná a přepracovávaná terapeutická doporučení dále navrhuje, aby se u pacientů s neresekovatelným nebo metastatickým nádorem, u kterých byla zjištěna mutace v exonu 9 genu *KIT*, podávala zvýšená dávka IM (800mg/den) už při zahájení terapie (22). Při progresi nemoci i na vysokodávkovaném IM nebo při intoleranci IM je lékem druhé volby sunitinib malát (SM).

Tab. 2. Přehled nových terapeutik a v současné době zkoušených kombinací terapie u pacientů s výskytem metastatického gastrointestinálního stromálního tumoru

Nová terapeutika	Kombinace cílených terapeutik
Nilotinib	Nilotinib + IM
Sorafenib	PKC412 + IM
Masatinib	Sunitinib + IM
IPI-504 (inhibitor HSP90)	IM + everolimus
	IM + bevacizumab
	IM v kombinaci s chemoterapií
	IM + doxorubicin

Upraveno dle (22).

Sunitinib malát (SUTENT®, Pfizer Inc., CA, USA) je tyrosinkinázovým inhibítorem druhé generace (24). Inhibuje širší spektrum RTK, které zahrnují receptory pro cévní endoteliální růstové faktory (VEGFR1, VEGFR2 a VEGFR3; vascular endothelial growth factor receptors), receptory KIT, PDGFRA, PDGFRB, FLT3, CSF1 a RET (22,25). Efektivita SM může záviset na mutačním stavu nádoru. Jak se ukazuje, nemutované geny *KIT* nebo *PDGFRA* nebo nádory s mutacemi v exonu 9 genu *KIT*, vykazují lepší odpověď než pacienti s mutacemi v exonu 11 genu *KIT* (4).

Současně se v rámci klinických studií pro léčbu pacientů s GIST testuje několik dalších nových inhibitorů receptorových tyrosinkináz s předpokládaným inhibičním efektem podobným jako je tomu u IM nebo SM. Jedná se o terapeutika nilotinib, sorafenib nebo masatinib. Nilotinib účinkuje na aktivované RTK KIT, PDGFRA a/nebo PDGFRB a BCR/ABL. Podávání samotného nilotinibu nebo v kombinaci s IM se testuje u pacientů, kteří na léčbě IM progredují nebo špatně snášejí terapii IM při dávce 800mg/den. Sorafenib prokázal efektivitu u pacientů s rezistencí na IM nebo SM. Masatinib (AB 1010), nové cílené terapeutikum RTK KIT, PDGFRA a/nebo PDGFRB a receptoru růstového faktoru fibroblastů - FGF (fibroblast growth factor receptor), je v současné době testován jako potenciální lék první linie terapie GIST (22).

S ohledem na častý vznik získané rezistence GIST způsobené sekundárními mutacemi není samotné podávání inhibitorů aktivovaných tyrosinkináz dostatečující. Podle posledních studií je možným alternativním přístupem blokáde proteinu KIT prostřednictvím inhibice „heat shock proteinu 90“ (HSP 90). HSP 90 je proteinem z třídy tzv. chaperonů, které chrání proteiny před degradací v protea-

somu. Inhibice HSP 90 zamezuje stabilizaci proteinu a tím snižuje jeho ochranu před degradací (24). Stejně tak se zkouší kombinace inhibitoru proteinkinázy C (PKC412) společně s IM u pacientů, kteří progredují na terapii samotným IM nebo u pokročilých GIST kombinace PKC412 s makrolidovým inhibitorem mTOR (mammalian target of rapamycin) sirolimus (jinak též rapamycin). U pacientů, kteří progredují na monoterapii IM, mají metastatické postižení, nebo u pacientů s předchozí terapeutickou zátěží se klinické testování zaměřuje na zjišťování účinnosti terapie v kombinacích: IM a SM, IM a everolimus (inhibitor mTOR), IM a bevacizumab (inhibitor VEGF) nebo IM a chemoterapie (konkrétně IM a nízké dávky doxorubicinu). Přehled standardních postupů a pokroků v terapii GIST v českém písemnictví poskytuje článek autorů Linke a spol. (26). Souhrnný přehled nových terapeutik a v současné době zkoušených kombinací terapie u pacientů s výskytem metastatického GIST poskytuje tab. 2.

VÝZNAM A DOPAD MOLEKULÁRNÍ ANALÝZY MUTACÍ U GIST

Z předchozího textu vyplývá i nutnost přesné molekulární analýzy GIST, která bude mít do budoucna stále větší význam. V současné době jsou výsledky molekulární diagnostiky mutací GIST využívány v následujících bodech:

- Potvrzení patogenetického mechanismu vzniku GIST.
- Diagnostický význam: potvrzení diagnózy GIST, zejména u tumorů bez exprese povrchové molekuly CD117.
- Prediktivní význam: zjištění přítomnosti mutací GIST primárně rezistentních na IM (mutace Asp842Val v exonu 18 genu *PDGFRA*), mutací v exonech 9, 13 a 17 genu *KIT*, v exonech 14 a 18 genu *PDGFRA* nebo nemutovaného stavu genů s možností volby dvojnásobné dávky IM nebo terapie pomocí inhibitorů tyrosinkináz další generace.
- Průkaz přítomnosti sekundárních mutací u pacientů s progresí nemoci s možností volby dvojnásobné dávky IM nebo aplikace inhibitorů druhé či třetí generace.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem Fakultní nemocnice Motol a Ministerstva zdravotnictví č. MZO FNM 2005/6704.

LITERATURA

- Heinrich MC. Molecular basis for treatment of gastrointestinal stromal tumours. *EJC Supplements* 2006; 4(1): 10–18.
- Joensuu H. Current perspectives on the epidemiology of gastrointestinal stromal tumours. *EJC Supplements* 2006; 4(1): 4–9.
- Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology* 2006; 48(1): 83–96.
- Dirnhofer S, Leyvraz S. Current standards and progress in understanding and treatment of GIST. *Swiss Med Wkly* 2009; 139(7–8): 90–102.
- Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130(10): 1466–1478.
- Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: Recent advances in understanding of their biology. *Hum Pathol* 1999; 30(10): 1213–1220.
- Chen LL, Holden JA, Choi H, et al. Evolution from heterozygous to homozygous KIT mutation in gastrointestinal stromal tumor correlates with the mechanism of mitotic nondisjunction and significant tumor progression. *Mod Pathol* 2008; 21(7): 826–836.
- Augustiňáková A, Kodet R. Histopatologická a molekulární charakteristika a diagnostika gastrointestinálních stromálních tumorů. *Farmakoterapie* (speciální příloha: Aktuální pohled na léčbu GIST) 2010; 6–13.
- Daum O, Vaněček T, Šima R, et al. Gastrointestinální stromální tumor: Současný pohled. *Klinická onkologie* 2006; 19(4): 201–211.
- Daum O, Vaněček T, Michal M. Patologická diagnostika gastrointestinálního stromálního tumoru. *Onkologie* 2010; 4(1): 13–17.
- Plank L. Biopická diagnostika gastrointestinálních stromálních nádorů. *Onkologie* 2007; 1(2): 73–78.
- Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005; 29(1): 52–68.
- Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors-definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001; 438(1): 1–12.
- Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, et al.

Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002; 33(5): 459–465.

15. **Wardelmann E, Hrychyk A, Merkelbach-Bruse S, et al.** Association of platelet-derived growth factor receptor alpha mutation with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *J Mol Diagn* 2004; 6(3): 197–204.
16. **Burger H, den Bakker MA, Kross JM, et al.** Activating mutation in c-KIT and PDGFRalpha are exclusively found in gastrointestinal stromal tumors and not in other tumors overexpressing these imatinib mesylate target genes. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(11): 1270–1274.
17. **Penzel R, Aulmann S, Mook M, et al.** The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumors is site and phenotype associated. *J Clin Pathol* 2005; 58(6): 634–639.
18. **Breccia M, Alimena G.** The metabolic consequences of imatinib mesylate: Changes on glucose, lipidic and bone metabolism. *Leuk Res* 2009; 33(7): 871–875.
19. **Heinrich MC, Corless CL, Demeteri GD, et al.** Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncology* 2003; 21(23): 4342–4349.
20. **Antonescu CR.** Targeted therapy of cancer: new roles for pathologists in identifying GISTs and other sarcomas. *Mod Pathol* 2008; 21(Suppl 2): S31–36.
21. **Hirota S, Isozaki K.** Pathology of gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int* 2006; 56(1): 1–9.
22. **Blay JY, Reichardt P.** Advanced gastrointestinal stromal tumor in Europe: a review of updated treatment recommendations. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 9(6): 831–838.
23. **Samelis GF, Ekmektzoglou KA, Zografos GC.** Gastrointestinal stromal tumor: clinical overview, surgery and recent advances in imatinib mesylate therapy. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33(8): 942–950.
24. **Hornick JL, Fletcher CD.** The role of Kit in the management of patients with gastrointestinal stromal tumor. *Hum Pathol* 2007; 38(5): 679–687.
25. **Gupta P, Tewari M, Shukla HS.** Gastrointestinal stromal tumor. *Surg Oncol* 2008; 17(2): 129–138.
26. **Linke Z, Prausová J, Kubáčková K.** Pokroky v léčbě gastrointestinálního stromálního tumoru. *Farmakoterapie* 2007; 3(4): 373–381.



MONITOR

aneb **nemělo by vám uniknout, že ...**

■ PATOLOGIE MAMMY ▸

... prognóza mladých pacientek s karcinomem prsu závisí na stejných histopatologických a molekulárních parametrech jako u pacientek starších

Karcinomy prsu u žen mladších 40 let jsou onkology tradičně pokládány za prognosticky nepříznivé. To odráží i většina standardních diagnosticko-terapeutických protokolů, které věk do 35 let považují za indikaci k adjuvantní chemoterapii bez ohledu na ostatní charakteristiky nádoru. Dnes je dobře známo, že karcinomy prsu u mladých žen vykazují statisticky významně vyšší podíl prognosticky nepříznivých biologických znaků (negativita steroidních receptorů, mutace genů BRCA, Her-2 amplifikace atd.). Otázku, jaké parametry jsou prognosticky významné u mladších pacientek se pokusil podrobněji prozkoumat holandský tým. Pro analýzu využil soubory z randomizovaných klinických studií EORTC fáze III, prováděných v letech 1989–1999. Zahrnovaly celkem 9938 pacientek v časných klinických stadiích, z toho 1192 (12 %) bylo diagnostikováno ve věku pod 40 let a u 549 případů byl dostupný archivní parafinový materiál. Molekulární subtypizace nádorů byla přitom aproximována zájímavým způsobem kombinujícím imunohistologii a grade: za nádory lumenální A byly považovány nádory ER+ nebo PR+, Her-2- a grade 1–2; lumenální B byly ER+ nebo PR+, Her-2+, případně ER+ nebo PR+, Her-2- a grade 3. Typ Her-2 měl charakteristiku ER-, PR- a Her-2+; bazální typ ER-, PR- a Her-2-

V jednorozměrných analýzách se potvrdily vesměs všechny obecně známé prognostické parametry, v multiparametrické analýze

se pak ukázaly jako významné velikost nádoru, uzlinové metastázy a jako třetí v pořadí dle významnosti aproximovaný molekulární subtyp. Pokud se však hodnocení omezilo jen na pacientky bez uzlinových metastáz (341 případů), zůstal aproximovaný molekulární subtyp jediným významným prognostickým parametrem pro celkové přežití i přežití bez vzdálené diseminace v multiparametrické analýze (desetileté přežití 94 % pacientek s nádory lumenální A, následované 93 % u typu Her-2, 78 % s nádory lumenální B a 72 % u bazálního typu). Je zde nutno podotknout, že tyto pacientky prakticky (vzhledem k době studie) nedostaly v adjuvanci Tamoxifen ani Herceptin. Desetileté přežití pacientek s nádory grade 1 bylo 92 %, pro grade 3 pak 72 %.

Studie je poučná zejména pro onkology: paušální indikace adjuvantní chemoterapie u pacientek bez uzlinových metastáz s nádory ER pozitivními, Her-2 negativními a grade 1–2 by asi zasloužila přehodnocení. Něco si z ní však mohou odnést i patoloové: poměrně primitivní kombinace základních imunohistologicky stanovených parametrů s gradem dává silný prognostický ukazatel. A staré bločky se nemají vyhazovat ...

Zdroj:

Van der Hage JA et al. Impact of established prognostic factors and molecular subtype in very young breast cancer patients: pooled analysis of four EORTC randomized controlled trials. *Breast Cancer Res* 2011; 13: R68. Volně dostupná plná verze: <http://breast-cancer-research.com/content/13/3/R68>.

– R. Nenutil –

Pokračování na str. 158

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

A. KALFUSOVA^{1*}, I. HILSKA¹, L. KRŠKOVA¹, M. KALINOVA¹, Z. LINKE², R. KODET¹

¹Department of Pathology and Molecular Medicine, Charles University in Prague - 2nd Faculty of Medicine and University Hospital in Motol;

²Department of Oncology, Charles University in Prague - 2nd Faculty of Medicine and University Hospital in Motol

*Correspondence: alena.kalfusova@fnmotol.cz

Received July 14, 2015 / Accepted December 19, 2015

Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) have an unpredictable biological potential ranging from benign to malignant. Molecular markers involved in the mechanisms of proliferation and cellular senescence may provide additional information about biological behavior of the tumor. The aim of the present study was to investigate Ki-67, TPX2, TOP2A and hTERT mRNA expression levels in specimens from patients with GISTs to define relationships between proliferation activity and biological potential and progression of the disease. We measured Ki-67, TPX2, TOP2A and hTERT mRNA levels using quantitative real-time reverse transcription PCR (RQ RT PCR). The highest Ki-67, TPX2, TOP2A and hTERT mRNA expression levels were found in the highly proliferative BLs (18 specimens), in comparison with GISTs (137 specimens) and LMSs (9 specimens). Patients with GISTs and adequate information about mitotic activity, tumor size and anatomical site (84 specimens) were divided into two groups - GISTs with benign (29 patients) and with malignant (55 patients) potential. We observed association between higher Ki-67, TPX2 and hTERT mRNA levels and the GISTs with malignant potential. Univariate analysis (57 patients with available follow-up information) of survival (Kaplan Meier curves method) revealed a correlation between higher levels of TPX2, Ki-67 and hTERT markers and shorter event-free survival (EFS) or poorer overall survival (OS). The results demonstrate the importance of quantitative assessment of the proliferation activity in GISTs. Proliferation markers of Ki-67, TPX2, TOP2A and hTERT are suitable markers for detection the proliferation activity and telomerase activity of these tumors. Furthermore, the assessment of TPX2, Ki-67 and hTERT expression levels is appropriate for determination of malignant potential of GISTs.

Key words: gastrointestinal stromal tumors (GISTs), proliferation markers, biological behavior, prognosis

Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) constitute a distinctive group of mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract, based on their morphological and immunohistochemical (IHC) properties, molecular pathogenesis, and responsiveness to target therapy [1, 2].

Constitutively activating mutations of *KIT* and *PDGFRA* (platelet-derived growth factor receptor alpha) genes are central in the oncogenesis of GISTs, resulting in an increased cell proliferation and enhanced cell survival [2, 3].

GISTs represent a heterogeneous group of tumors with an unpredictable biological behavior ranging from benign to malignant. Estimation of a potentially aggressive behavior of these neoplasms has found a rationale in contemporary classification schemes but it is still difficult [1, 4, 5, 6].

Assessment of prognosis (risk of relapse or progression of the disease) commonly takes the primary tumor size and mitotic index into consideration. Based on these two variables, Fletcher et al. proposed GIST related risk classification [7]. They categorized GISTs into four risk groups: very low, low, intermediate and high risk

Another important risk factor is the primary site of the tumor. Miettinen et al. [8] extended criteria for evaluating the biological potential of GISTs with regard of the anatomic location.

A final consensus on classification of GISTs into prognostic groups has been worked out by the WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone [9]. Though effective and widely used criteria are set, estimation of the biological behavior of

GISTs is still open to research activities. Information about mechanisms of the tumor proliferation activity and cellular senescence may provide additional information. In the present work we evaluate the proliferation activity and prognosis of GISTs investigating the activity of several molecules. We selected molecular markers which are important regulators of the cell cycle - Ki-67, TPX2, and topoisomerase II alpha (TOP2A), and a marker that is associated with the mechanism of cellular senescence - enzyme telomerase, specifically hTERT telomerase catalytic subunit (hTERT).

Ki-67 is a nuclear proliferation associated antigen expressed in the growth and synthesis phases of the cell cycle (G1, S, G2 and M), but not in the resting phase, G0. This antigen provides information about the proportion of the active cells in the cell cycle [10]. Another molecular marker, TPX2 is a microtubule-associated protein homolog. It plays an important role in mitotic spindle formation, and a segregation of chromosomes during the cell division [11]. TPX2 is expressed exclusively in the proliferating cells in S, G2 and M phases of the cell cycle and its activity accurately corresponds to proliferation activity of cells. TOP2A controls topology of the DNA, chromosome segregation, and cell cycle progression and is used as indicator of the cellular proliferation [12], and moreover is used as molecular target for several anti-cancer chemotherapeutics agents [13]. hTERT is a frequently used marker, which is associated with the mechanism of cellular senescence. The hTERT is an enzymatic human telomerase reverse transcriptase catalytic subunit, one of two components of the enzyme telomerase [14]. Telomerase activity has been observed in 80-90% of malignant tumors (one of the mechanisms for immortalization of tumor cells is activation of telomerase). This fact suggesting that reactivation of the telomerase plays an important role in the development and/or progression of neoplastic cells [15].

In this study we have measured the expression of the proliferation markers and hTERT at the mRNA level. Furthermore, we correlated the expression of the above mentioned molecular markers with the proliferation activity and with the biological behavior of GISTs.

Patients and methods

Patients. The study was performed using the primary tumor specimens diagnosed at the Department of Pathology and Molecular Medicine. All specimens of GISTs and control tissues samples from Burkitt lymphomas (BLs), and leiomyosarcomas (LMSs) (137, 18, and 9 samples, respectively) were processed in a routine way for morphological and IHC examinations at the time of diagnosis.

According to the histopathological criteria assessed by WHO classification [9], we assorted GISTs into two categories: GISTs with benign and malignant potential. In the group of benign GISTs, WHO prognostic groups 1, 2, and 3a (4, 13, and 12 cases) were included. In the group of malignant GISTs, WHO prognostic categories 3b, 5, 6a, and 6b (3, 1, 5,

and 46 cases) were gathered. To categorize patients within the WHO specific subgroups, we did not have the cohorts of patients large enough for statistical evaluation in individual subgroups. Furthermore, there were no patients with GISTs that would comply with criteria for prognostic group 4 (GISTs with tumor size less than 2 cm and mitotic rate over 5 mitosis in 50 high power fields, HPF). Of 137 patients with GIST, we were able to obtain complete information about the mitotic activity, anatomic site and tumor size in 84 cases. Of the 84 patients with complete information we analyzed 29 and 55 samples of benign and malignant GISTs, respectively (34.5%, and 65.5%).

Follow-up information was available in 57 patients. A period of follow-up for event free survival time (EFS) and overall survival time (OS) ranged from 1 to 102 months, and from 1 to 124 months, respectively. Median follow-up for EFS and OS was 16 and 41 months. Median age of the patients was 65 years (range, 22 - 91 years). There were 27 females (47%) and 30 males (53%). Clinicopathological data of the 57 patients are summarized in Supplementary Table 1.

There were 18 patients (31.6%) in the group of GISTs with benign potential. In the group of patients with malignant potential there were 39 patients (68.4%).

For univariate analysis by Kaplan Meier survival we used the Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT expression levels from the group of 57 patients with the follow-up. Expression levels were analyzed according to two aspects: i.) mean values, and ii.) median values. Patients were categorized as the "high risk" group, if the molecular markers mRNA levels were greater or equal than the mean value, and/or median value. The "low risk" group constituted cases with the mRNA levels that were lower than the mean value, and/or median value. Values of each molecular marker are summarized in Table 1.

Diagnostic tumor tissues were collected and tested after an informed consent given by patients, and with the approval by the Ethical committee.

RNA extraction and cDNA synthesis. RNA was extracted from the formalin fixed and paraffin embedded (FFPE) tissue samples using High Pure RNA Paraffin Kit (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). In case of frozen tissues available, RNA was extracted using Tri-Reagent (Invitrogen Ltd., Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instruction.

The complementary DNA (cDNA) was synthesized using reverse transcription (RT) from 10 μ L isolated RNA in a total

Table 1. Summary of the distribution of Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT mRNA levels

MOLECULAR MARKERS	RANGE OF VALUES (No. of copies)	MEAN (No. of copies)	MEDIAN (No. of copies)
Ki-67	0-71.3	4.875	0.771
TPX2	0-250	23.837	7.01
TOP2A	0-10400	625.483	84
hTERT	0-71.2	2.765	0.101

volume of 20µL. The processes of RT and cDNA quality control were prepared as described elsewhere [16].

Quantitative Real Time Reverse Transcription PCR (RQ RT PCR)

Plasmid Calibrators. Plasmids of Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT genes were produced from PCR products of the respective genes that were cloned into the pCR[®]-2.1. TOPO vector. Resulting constructs were transformed into TOP10 competent *Escherichia coli* cells using TOPO[®] TA cloning Kit (Invitrogen by Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Cloned plasmids were purified using Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, Löhne, Germany) according to the manufacturer's instructions. ABL plasmid of ABL control gene was produced as described elsewhere [17].

RQ RT PCR. RQ RT PCR analyses were performed using LightCycler 480 detection system (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). The assessment of the expression levels of Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT catalytic subunit transcript were accomplished using the Universal Probe Library software system for Human (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, US). The sequences of the primers and probes are listed in Table 2. Reaction conditions were as follows: reaction mixture comprised FastStart TaqMan Probe Master Mix (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), 500nM of each sense and antisense primers, 100nM of LNA probe and 1µL cDNA in a final volume of 20µL. The reaction was started with incubation at 50°C for 2 minutes, initial denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 55 PCR cycles: 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute.

Parameters for PCR amplification of *ABL* transcript: reaction mix contained 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, US), 375nM of each sense and antisense primer, 250nM of ABL hydrolysis fluorescent probe and 1µL of cDNA in a final volume of 20µL.

Table 2. Sequence of probes and primers

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

Roche Applied Science^a

The amplification conditions of ABL transcript were derived from those published by Willasch et al. [17]. Detection of Ki-67, TPX2, TOP2A, hTERT and ABL copy numbers was performed according to a standard curve method. Consequent plasmid calibrators of each gene were using for standard curves construction.

Standard curves of the Ki-67, TPX2, TOP2A, hTERT mRNA transcripts and ABL housekeeping gene mRNA transcript were prepared from decimal diluted plasmids. Plasmids were diluted in salmon sperm low-molecular weight DNA (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, US). The concentration range of the ABL housekeeping gene plasmids was from 2.5E+07 to 2.5E+01 copies per µL. Standard curves of the mRNA transcript of molecular markers were prepared from a followed concentration range: from 1.45E+10 to 1.45E+01 copies/µL for Ki-67, from 2.49E+09 to 2.49E+01 copies/µL for TPX2, from 7.83E+09 to 7.83E+04 copies/µL for TOP2A, and from 1.8E+10 to 1.8E+01 copies/µL for hTERT.

RQ RT PCR of Ki-67, TPX2, TOP2A, hTERT and ABL plasmid dilution, non-template control, as well as the quantification of Ki-67, TPX2, TOP2A, hTERT and ABL expression of the respective samples were performed in duplicates.

Normalized expression of Ki-67, TPX2, TOP2A, hTERT transcripts were calculated as a ratio between the expression levels of Ki-67, TPX2, TOP2A, hTERT and ABL housekeeping gene expression levels.

Statistical analysis. For the statistical analysis we used JMP IN 5.1. software (SAS Institute, Cary, NC, US). Kruskal-Wallis nonparametric test was applied to assess differences of the mRNA levels of the molecular markers within GISTs, BLs, and LMSs and benign/malignant potential of GISTs. Univariate analysis of EFS and OS with connection of benign/malignant potential of GISTs and mRNA levels of the molecular markers were performed by the Kaplan-Meier survival method, using the long-rank test. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Expression levels of the proliferation markers and hTERT in GISTs, BLs, and LMSs. We analyzed a cohort of 137 patients with GISTs, control group of 18 specimens of highly proliferative BLs, and control group of 9 samples of LMSs to determine their proliferation activity. When we compared the expression levels of the proliferation markers in BLs, GISTs, and LMSs, we found the most significant differences in the group of patients with BLs - Ki-67 ($p < 0.0001$), TPX2 ($p < 0.0001$), TOP2A ($p < 0.0001$), and hTERT ($p < 0.0001$) (Figure 1A, 1B, 1C, and 1D). The proliferation activity of Ki-67, TPX2, TOP2A, and the activity of hTERT in GISTs and LMSs was significantly lower, than the expression of those molecular markers in BLs. Median values for the mRNA levels of proliferation markers and hTERT of BLs, GISTs, and LMSs are shown in Figure 1.

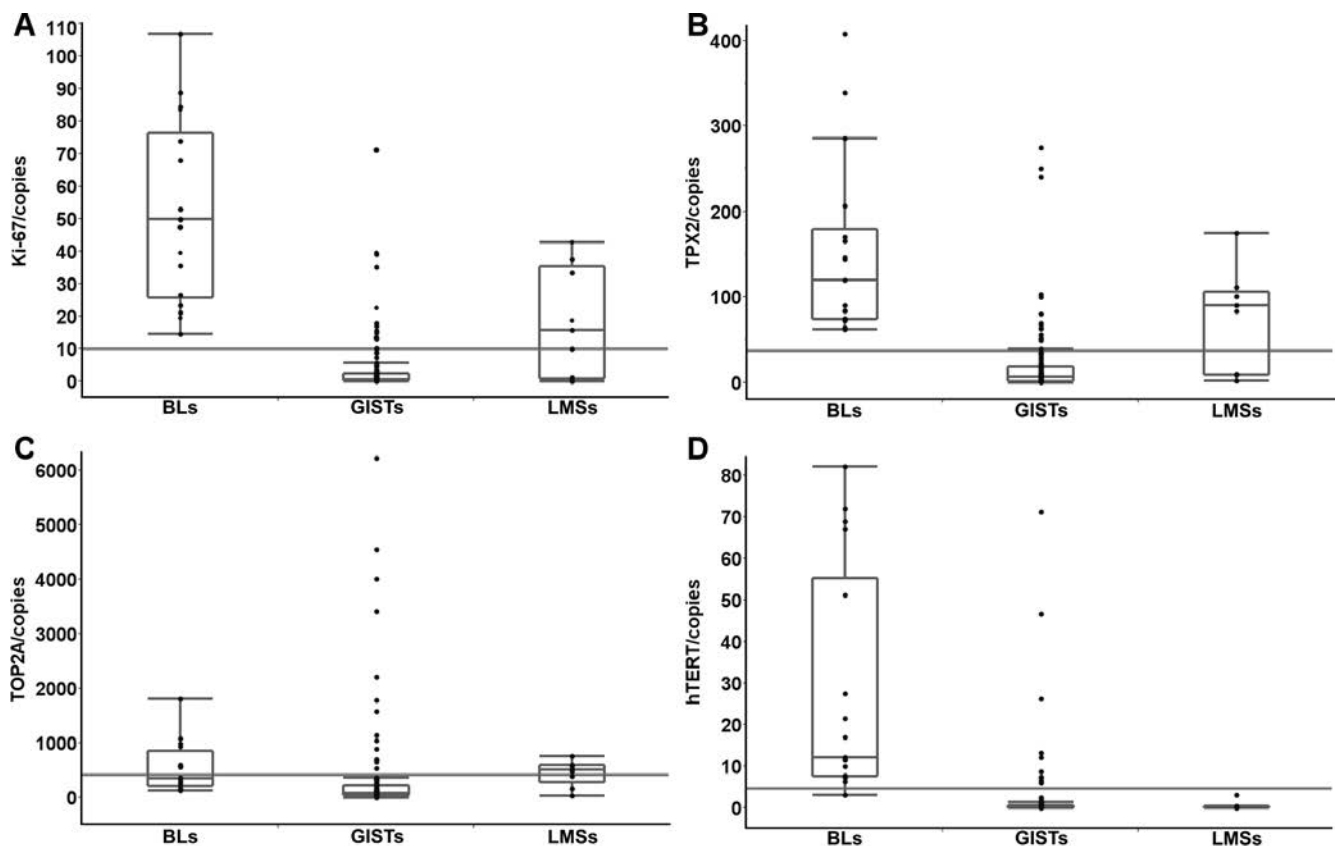


Figure 1. Normalized mRNA levels of molecular markers in GISTs, BLs, and LMSs. Vertical lines of box plot graphs display mRNA levels of Ki-67 (A), TPX2 (B), TOP2A (C), and hTERT (D) in absolute copies. Horizontal lines display individual groups of diseases. The extremities of each box show the 25th-75th percentile. The lines within the boxes represent median values. The bottom and top bars of the whiskers designate the 10th and 90th percentiles. Outlying values are shown by dots. The result of non-parametric Kruskal-Wallis test was: $p < 0.0001$ (for Ki-67), $p < 0.0001$ (for TPX2), $p < 0.0001$ (for TOP2A), and $p < 0.0001$ (for hTERT). The higher mRNA levels of Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT were significantly associated with BLs.

Abbreviation: BLs – Burkitt lymphomas, GISTs – Gastrointestinal stromal tumors, LMSs – leiomyosarcomas

Median values of the Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT mRNA levels in BLs, GISTs, and LMSs were follows: 49.95, 0.676, and 15.8 for Ki-67, 120, 6.88, 90 for TPX2, 355.5, 78.5, 517 for TOP2A, and 12.15, 0.0556, 0 for hTERT.

Expression levels of the proliferation markers and hTERT in GISTs with benign and malignant potential. The results revealed that the expression levels of Ki-67, TPX2, and hTERT in the GISTs with malignant potential (prognostic groups 3b, 5, 6a, and 6b) closely correlate ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, and $p < 0.0001$, respectively). Specimens from prognostic groups 3b, 5, 6a, and 6b (GISTs with malignant potential) had higher levels of Ki-67, TPX2, and hTERT mRNA than specimens from prognostic groups 1, 2, and 3a (GISTs with benign potential) (Figure 2A, 2B, and 2D). We did not find any significance in the mRNA levels of TOP2A and benign/malignant potential of GISTs ($p < 0.1910$) (Figure 2C). Median values of the Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT mRNA levels are summarized in Figure 2. Illustrative comparison of protein Ki-67 expression (IHC method) and comparable mRNA level of Ki-67 (RQ RT PCR) showed Figure 3.

A relationship of the benign / malignant potential of GISTs with EFS and OS. Patients with GISTs and malignant

potential manifested a shorter EFS than patients in the group of GISTs with benign potential (log-rank test, $p < 0.0040$). Patients with GISTs and malignant potential had also a shorter OS than the patients in the group of GISTs with benign potential (log-rank test, $p < 0.0263$). Data not shown.

Relationship of the proliferation markers and hTERT levels with EFS and OS in univariate analysis. Higher levels of Ki-67 and TPX2 mRNA (stratified according to mean values) correlated with shorter EFS and OS, $p < 0.0121$ and $p < 0.0304$ (for Ki-67 proliferation marker) and $p < 0.0003$ and $p < 0.0030$ (for TPX2 proliferation marker). If the expression levels of molecular markers were stratified according to median values, shorter EFS was associated with higher TPX2 and hTERT mRNA levels ($p < 0.0311$, and $p < 0.0106$, respectively). Summarized data are presented in Table 3. Graphical overview of the results of EFS in connection with TPX2 (median values), Ki-67 (mean values) and hTERT (median values) expression levels are shown in Figure 4.

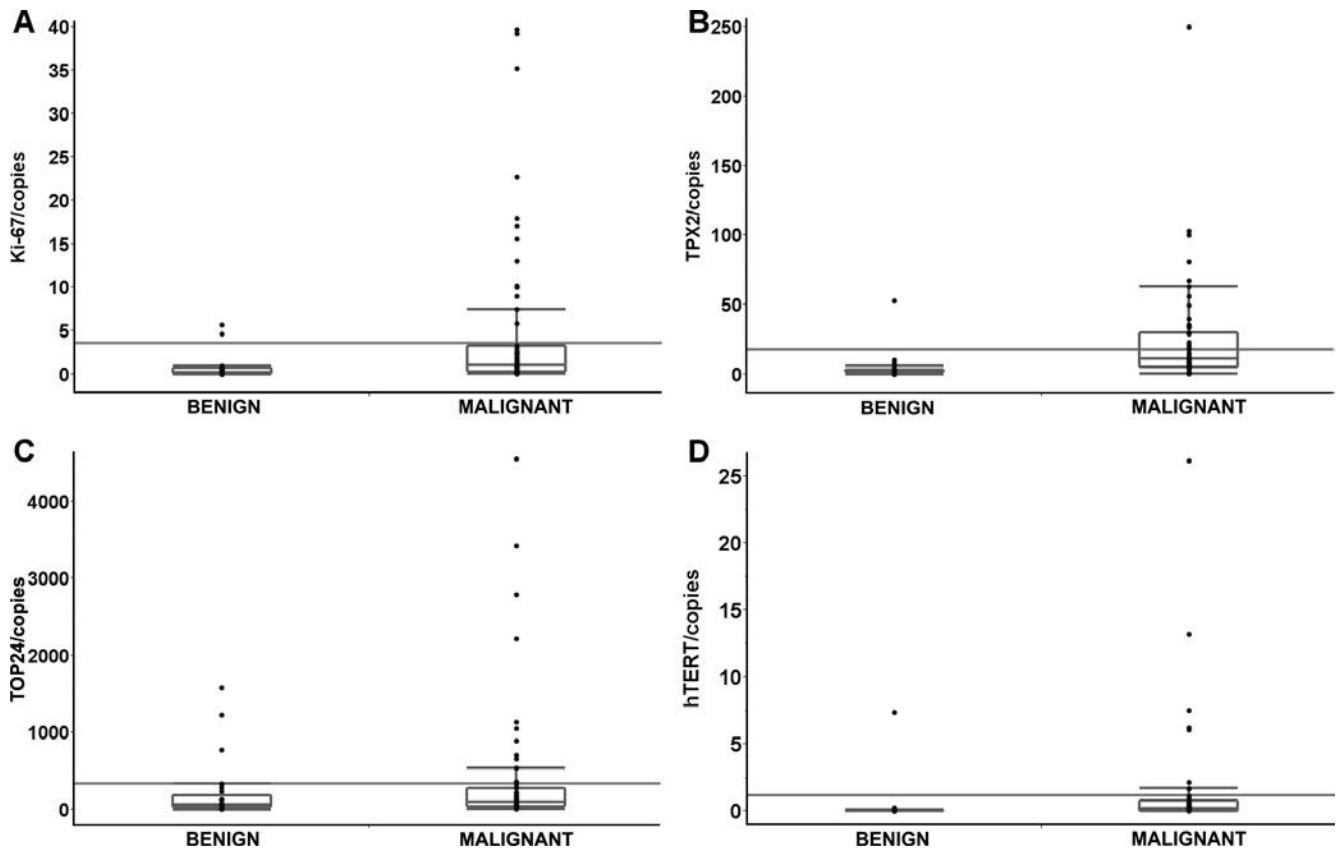


Figure 2. Normalized mRNA levels of molecular markers and group of the GISTs with benign and malignant potential. Vertical lines display Ki-67 (A), TPX2 (B), TOP2A (C), and hTERT (D) mRNA levels in absolute copies. Horizontal lines display groups of GISTs with benign and malignant potential. Expression levels of Ki-67 (A), TPX2 (B), and hTERT (D) molecular markers in GISTs with malignant potential were significantly higher than in GISTs with benign potential $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, and $p < 0.0001$, respectively (non-parametric Kruskal-Wallis test). In TOP2A (C) there was no statistical association between mRNA levels of TOP2A in the groups of GISTs with benign and malignant potential ($p < 0.1910$). Median values of benign and malignant GISTs were as follows: 0.168 and 1.05 for Ki-67, 1.89 and 11.1 for TPX2, 61.2 and 96.7 for TOP2A, and 0 and 0.193 for hTERT.

Table 3. Summary of the parameters of univariate analysis

VALUES	MOLECULAR MARKER	SURVIVAL TIME	UNIVARIATE ANALYSIS P VALUE
MEAN	Ki-67	EFS	0.0121^a
		OS	0.0304^a
	TPX2	EFS	0.0003^a
		OS	0.0030^a
	TOP2A	EFS	0.3435
		OS	0.4040
	hTERT	EFS	0.1058
		OS	0.3455
MEDIAN	Ki-67	EFS	0.1082
		OS	0.4768
	TPX2	EFS	0.0311^a
		OS	0.1080
	TOP2A	EFS	0.3065
		OS	0.4401
	hTERT	EFS	0.0106^a
		OS	0.3152

^a statistically significant

Discussion

GISTs are mesenchymal tumors with an unpredictable biological potential ranging from benign to malignant. Many previous studies have proven that the evaluation of proliferative indices is a most useful in distinguishing benign from malignant GISTs [18, 19, 20]. Therefore, the aim of this study was to investigate proliferation and telomerase activity of GISTs to improve our understanding of their proliferation activity and to estimate their malignant potential and prognosis with a greater accuracy than establishing the mitotic rate.

Proliferation marker Ki-67 is a most common and widely used marker for detection of the proliferation activity of tumors using IHC investigations. Data on GISTs based on the IHC results are still controversial. Gelen et al. [19] demonstrated that Ki-67 proliferation index is valuable in predicting a malignant potential of GIST. Correspondingly, Di Vizio et al. [20] published a correlation of Ki-67 overexpression (using methods of IHC analysis) and RFS and OS in GIST patients.

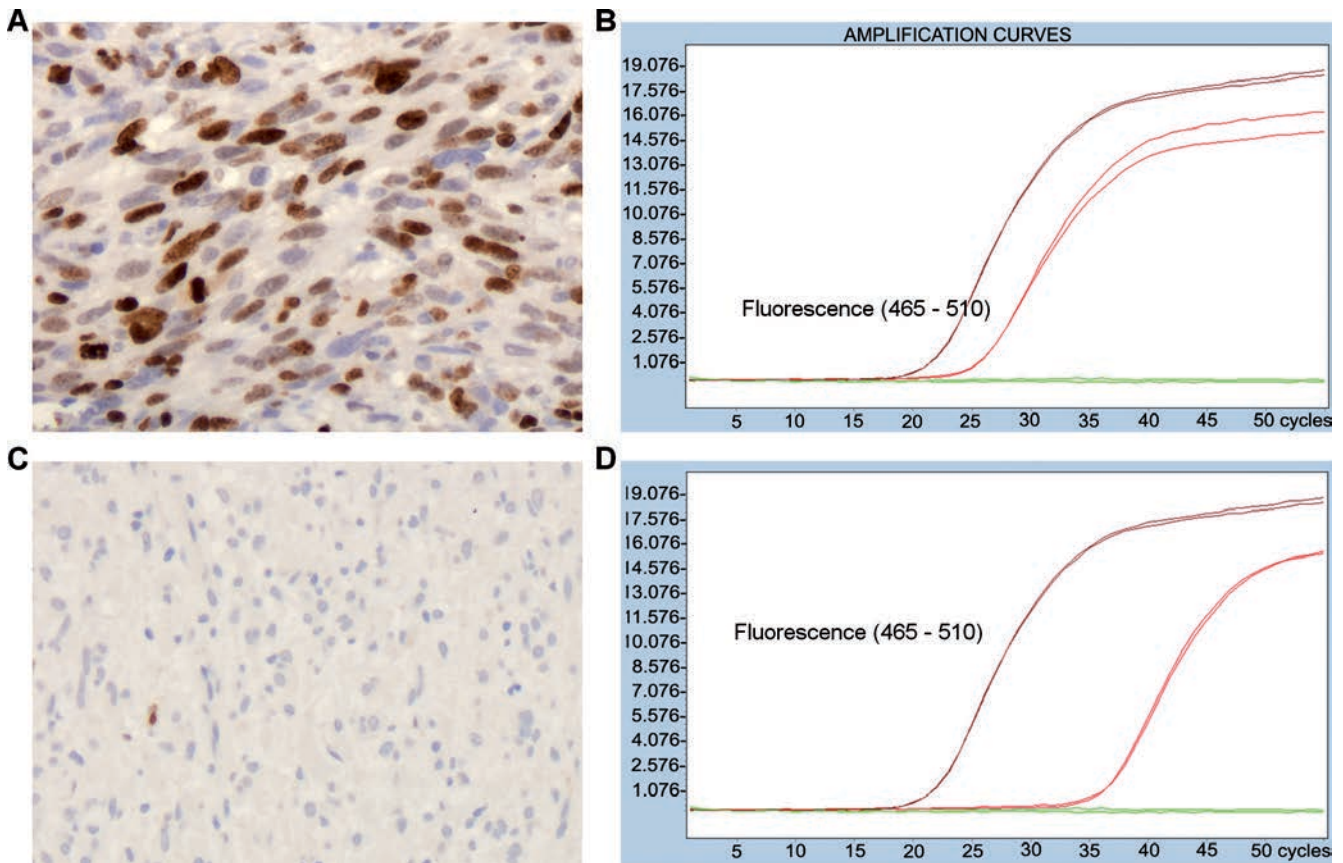


Figure 3. Illustrative picture of protein expression and mRNA levels of Ki-67. Illustrative picture of a high protein Ki-67 expression (>50%) (A), high mRNA level of Ki-67 (1.11E4 absolute copies) (B), low protein Ki-67 expression of (<1%) (C), and low mRNA level of Ki-67 (2.67E0 absolute copies) (D). Brown lines show amplification curves of plasmid Ki-67 standard samples, red lines display amplification curves of measured samples, and green lines indicate amplification of NTC (no template control).

Other authors investigated, that Ki-67 index (≤ 5 , 6-8, $> 8\%$) was an independent prognostic factor for RFS of GIST patients, and moreover that high-risk GIST patients with Ki-67 index $> 8\%$ showed a poorer prognosis even with imatinib adjuvant therapy [21]. However, other investigators did not find any prognostic correlation between Ki-67 proliferation index and mitotic counts, tumor risk groups and the tumor size [22, 23]. Discrepancy is most probably due to the fact that the IHC method and semiquantitative evaluation of the results is liable to a subjective interpretation of the microscopic findings. In the present study we used data of RQ RT PCR which determines a real amount of the target molecules, expressed as copy numbers of molecules. We confirmed association between Ki-67 mRNA expression levels and proliferation activity of the tumor cells (significantly higher Ki-67 mRNA levels in highly proliferative BLs than in GISTs and in LMSs). We found also a statistical significance of Ki-67 expression levels in the group of GISTs with a malignant potential when compared with benign GISTs. Furthermore, we demonstrated a correlation between overexpression of the Ki-67 mRNA levels (divided according mean values) and both EFS and

OS. At the level of IHC demonstration of Ki-67, Gelen et al. determined significant differences of Ki-67 proliferation index between three groups of GISTs (benign, borderline and malignant) [19]. Group of GISTs with uncertain malignant potential (a borderline group) has not been investigated in this study. Molecular analyses of mutation state of *KIT* and *PDGFRA* genes and mRNA levels of proliferation markers were primarily carried out in patients with malignant potential (size over 5 cm, high mitotic rate), and specifically in metastatic, inoperable or recurrent tumors. The reason for focusing preferably on patients with unfavorable GISTs lays in therapy targeting potentially responsive GISTs by tyrosin kinase inhibitors. Patients categorized in the WHO prognostic group 4 are relatively uncommon [8, 9], and we had no such a patient for statistical analysis. Furthermore, the aim of the study was to ascertain whether we may separate clear polarities, e.g. benign and malignant lesions by the tools utilized in this study.

Beside establishing the proliferation activity of the tumor by the Ki-67 index, some authors focused on the expression of TOP2A activity. Wong et al. [24] observed that TOP2A expres-

sion correlated with more aggressive hepatocellular carcinoma (HCC) phenotype and patient responsiveness to doxorubicin-based therapy. De Resende et al. [25] reported that patients with higher expression of TOP2A presented shorter BRFS (biochemical recurrence-free survival) in prostate cancer. Our observation with TOP2A expression also revealed a relation between high tumor proliferation activity and higher TOP2A

mRNA levels. In contrast with these findings we did not find a statistical significance of TOP2A mRNA levels in connection with benign / malignant potential of GISTs. Likewise, we did not observe association between higher TOP2A levels and the outcome of the patients with GISTs in EFS and OS. The results obtained in our study may be explained at least partially by time lapse studies of TOP2A through cell cycle by Stacey et al. [26]. These studies indicate that the expression of TOP2A in tumor cells is less dependent on the proliferation state of malignant cells. Authors further reported that the cells which remain viable but are temporarily removed from the active cell cycle were able to become dominant and produce high levels of TOP2A. The explanation may rest in the fact that slowly growing cells do not actively proliferate. Therefore, the differences of the TOP2A mRNA levels in the GISTs with benign and malignant potential (probably comprise a majority of slowly growing cells) are not so significant.

Reactivation of telomerase is believed to play a role in tumor cell immortalization. Wang et al. [27] reported that detection of telomerase activity, apoptosis and control genes (P53 and BCL2) in GISTs will be helpful in the evaluation of the prognosis, and discrimination between malignant and benign GISTs. Similarly, Tominaga et al. [28] reported a strong relationship between detection of the telomerase activity and expression levels of hTERT in neoplastic and non-neoplastic esophageal lesions. In our study, we measured hTERT mRNA levels by means of RQ RT PCT technique. A similar approach was published by Capkova et al. [29] in bronchial mucosa of heavy smokers. Expression of the hTERT in the tumors of the gastrointestinal tract (cholangiocarcinoma, HCC and GISTs), and in non-neoplastic tissues was determined by others [30]. These authors found expression of hTERT mRNA in carcinomas but not in GISTs and non-neoplastic tissues. In contrast with their results, we detected expression of hTERT mRNA levels not only within highly proliferating tumors such as BLs, but also in GISTs and LMSs. More importantly, we demonstrated association of the hTERT mRNA level and GISTs with malignant potential. Same results were reported by Gunther et al. [31]. They compared extra-gastrointestinal myogenic or neurogenic sarcomas and GISTs. According to their study, malignant GISTs expressed telomerase at a significantly higher level than LMSs and malignant peripheral nerve sheath tumors.

TPX2 plays a pivotal role in the cell cycle promotion and mitotic cell division. TPX2 is expressed exclusively in the proliferating cells in S, G2 and M phases of the cell cycle and its activity corresponds to proliferation activity of cells [32]. Because of exclusive expression of TPX2 in proliferating cells, many studies indicate that determination of TPX2 expression is more suitable to determine the proliferation than Ki-67 in breast carcinoma [33], mantle cell lymphoma (MCL) [34, 35], neuroblastoma [36], colon cancer [37] and squamous cell carcinoma of the larynx [38]. Also, the estimation of TPX2 expression is a helpful and most precise prognostic indicator in various other diseases [11, 39, 40, 41]. In the

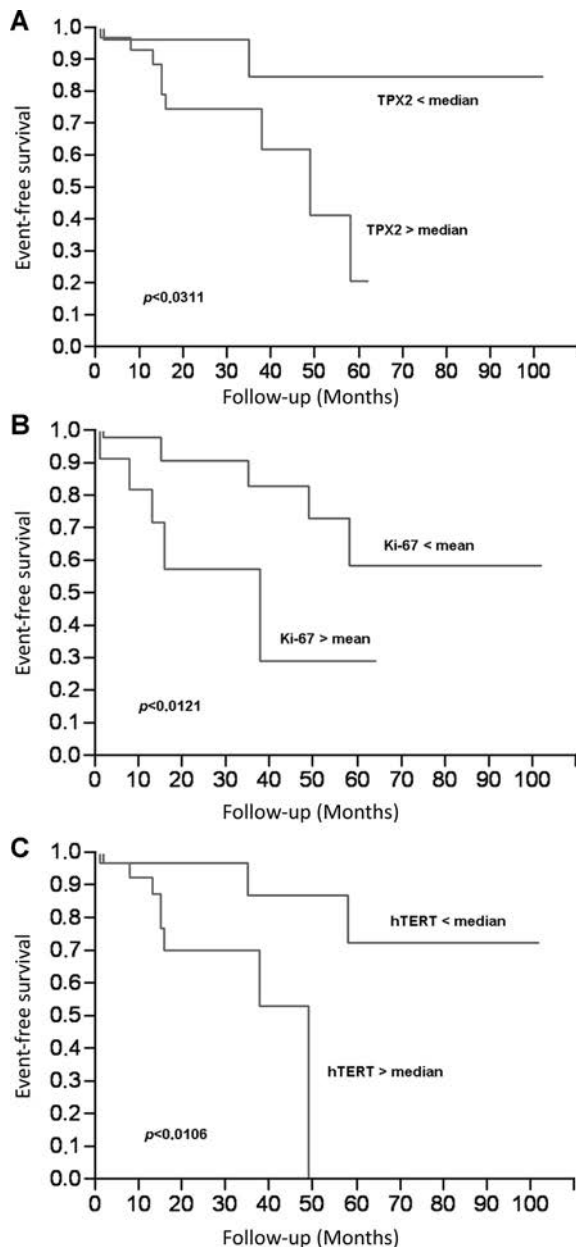


Figure 4. Kaplan Meier survival analysis of the EFS and mRNA levels of TPX2, Ki-67, and hTERT. EFS rates of the patients with GISTs distributed with respect of median values of the TPX2 mRNA levels (A), EFS rates in the connection of Ki-67 mRNA levels distributed according mean values (B), EFS rates in the connection of hTERT mRNA levels distributed according median values (C).

present study, the TPX2 and also Ki-67 mRNA levels were associated not only with the proliferation activity of GISTS, but also with their biological potential (progression and unfavorable prognosis). Our observation suggests, that a higher TPX2 and Ki-67 mRNA expression levels was associated with highly proliferative tumors. Furthermore, a higher TPX2 and Ki-67 mRNA expression levels was significantly associated with a malignant clinical behavior of the GISTS. We also investigated that the TPX2 and Ki-67 mRNA levels (divided according mean values) were significantly associated with a shorter EFS and OS in patients with GISTS. On the other hand, only TPX2 and hTERT mRNA levels (not Ki-67 mRNA levels) divided according median values were associated with shorter EFS.

In conclusion, normalized mRNA expression levels of molecular markers Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT are suitable markers for detection of the proliferation activity and telomerase activity of the GISTS. Our results suggest that determination of the expression status of Ki-67, TPX2 and hTERT are helpful for supporting the discrimination of the benign / malignant potential of GISTS. We demonstrated that combination of the measurement of Ki-67, TPX2 and hTERT expression by means of RQ RT PCR appears to be a suitable tool for diagnostic and prognostic purposes of GISTS. The assessment of Ki-67 and TPX2 and hTERT mRNA expressions could be a candidate for an improvement of GISTS prognostic estimation.

We confirmed that mRNA expression of Ki-67, TPX2, and hTERT molecular markers corresponded with morphologically defined groups of benign and malignant GISTS. In a further study we will focus on a group of GIST with uncertain malignant potential.

Acknowledgements: This study was supported by the project (Ministry of Health, Czech Republic) for conceptual development of research organization 00064203 (University Hospital Motol, Czech Republic), and GAUK registration number 198 213 (internal number 2 120 152).

References

- [1] MIETTINEN M, SARLOMO-RIKALA M, LASOTA J. Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Hum Pathol* 1999; 30: 1213–1220. [http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177\(99\)90040-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177(99)90040-0)
- [2] JOENSUU H. Current perspectives on the epidemiology of gastrointestinal stromal tumours. *EJC Supplements* 2006; 4: 4–9. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6349\(06\)80468-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6349(06)80468-4)
- [3] LASOTA J, CORLESS CL, HEINRICH MC, DEBIEC-RYCHTER M, SCIOT R et al. Clinicopathologic profile of gastrointestinal stromal tumors (GISTS) with primary KIT exon 13 or exon 17 mutations: a multicenter study on 54 cases. *Mod Pathol* 2008; 21: 476–484. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2008.2>
- [4] GUPTA P, TEWARI M, SHUKLA HS. Gastrointestinal stromal tumor. *Surg Oncol* 2008; 17: 129–138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.suronc.2007.12.002>
- [5] SABAH M, CUMMINS R, LEADER M, KAY E. Altered expression of cell cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumors: markers with potential prognostic implications. *Hum Pathol* 2006; 37: 648–655. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2006.01.023>
- [6] SAMELIS GF, EKMEKTZOGLOU KA, ZOGRAFOS GC. Gastrointestinal stromal tumours: clinical overview, surgery and recent advances in imatinib mesylate therapy. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33: 942–950. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2006.11.025>
- [7] FLETCHER CD, BERMAN JJ, CORLESS C, GORSTEIN F, LASOTA J et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002; 33: 459–465. <http://dx.doi.org/10.1053/hupa.2002.123545>
- [8] MIETTINEN M, LASOTA J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1466–1478.
- [9] FLETCHER C.D.M. et al. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. IARC: Lyon 2013
- [10] NEVES LR, OSHIMA CT, ARTIGIANI-NETO R, YAN-AGUIBASHI G, LOURENCO LG et al. Ki67 and p53 in gastrointestinal stromal tumors-GIST. *Arq Gastroenterol* 2009; 46: 116–120. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-28032009000200008>
- [11] WARNER SL, STEPHENS BJ, NWOKENKWO S, HOSTETTER G, SUGENG A et al. Validation of TPX2 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6519–6528. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0077>
- [12] TRETIAKOVA M, TURKYILMAZ M, GRUSHKO T, KOCHERGINSKY M, RUBIN C et al. Topoisomerase IIalpha in Wilms' tumour: gene alteration and immunoexpression. *J Clin Pathol* 2006; 59: 1272–1277. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2005.031963>
- [13] SIMON R, ATEFY R, WAGNER U, FORSTER T, FIJAN A et al. HER-2 and TOP2A coamplification in urinary bladder cancer. *Int J Cancer* 2003; 107: 764–772. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.11477>
- [14] KEITH WN, JEFFRY EVANS TR, GLASSPOOL RM. Telomerase and cancer: time to move from a promising target to clinical reality. *J Pathol* 2001; 195: 404–414. <http://dx.doi.org/10.1002/path.1001>
- [15] SAKURAI S, FUKAYAMA M, KAIZAKI Y, SAITO K, KANAZAWA K et al. Telomerase activity in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* 1998; 83: 2060–2066. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19981115\)83:10<2060::AID-CNCR3>3.0.CO;2-#](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19981115)83:10<2060::AID-CNCR3>3.0.CO;2-#)
- [16] BRIZOVA H., KALINOVA M, KRSKOVA L, MARHALOVA M, KODET R. Quantitative measurement of cyclin D1 mRNA, a potent diagnostic tool to separate mantle cell lymphoma from other B-cell lymphoproliferative disorders. *Diagn Mol Pathol* 2008; 17: 39–50 <http://dx.doi.org/10.1097/pdm.0b013e318146959a>
- [17] WILLASCH AM, GRUHN B, COLIVA T, KALINOVA M, SCHNEIDER G et al., Standardization of WT1 mRNA quantitation for minimal residual disease monitoring in childhood

- AML and implications of WT1 gene mutations: a European multicenter study. *Leukemia* 2009; 23: 1472–1479. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2009.51>
- [18] NAKAMURA N, YAMAMOTO H, YAO T, ODA Y, NISHIYAMA K et al. Prognostic significance of expressions of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and the relevance of the risk grade. *Hum Pathol* 2005; 36: 828–837. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2005.03.012>
- [19] GELEN MT, ELPEK GO, AKSOY NH, OGUS M, SULEYMANLAR I et al. p27 expression and proliferation in gastrointestinal stromal tumors. *Turk J Gastroenterol* 2003; 14: 132–137.
- [20] Di VIZIO D, DEMICHELIS F, SIMONETTI S, PETTINATO G, TERRACCIANO L et al. Skp2 expression is associated with high risk and elevated Ki67 expression in gastrointestinal stromal tumours. *BMC Cancer* 2008; 8: 134. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-8-134>
- [21] ZHAO WY, XU J, WANG M, ZHANG ZZ, TU L et al. Prognostic value of Ki67 index in gastrointestinal stromal tumors. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 2298–2304.
- [22] GUMURDULU D, ERDOGAN S, KAYASELCUK F, SEYDAOGLU G, PARSAK CK et al. Expression of COX-2, PCNA, Ki-67 and p53 in gastrointestinal stromal tumors and its relationship with histopathological parameters. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 426–431. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v13.i3.426>
- [23] KWON MJ, NAM ES, CHO SJ, PARK HR, SHIN HS et al. The expressions of E2F1 and p53 in gastrointestinal stromal tumors and their prognostic significance. *Korean J Pathol* 2009; 43: 212–220. <http://dx.doi.org/10.4132/KoreanJPathol.2009.43.3.212>
- [24] WONG N, YEO W, WONG WL, WONG NL, CHAN KY et al. TOP2A overexpression in hepatocellular carcinoma correlates with early age onset, shorter patients survival and chemoresistance. *Int J Cancer* 2009; 124: 644–652. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.23968>
- [25] de RESENDE MF, VIEIRA S, CHINEN LT, CHIAPPELLI F, da FONSECA FP et al. Prognostication of prostate cancer based on TOP2A protein and gene assessment: TOP2A in prostate cancer. *J Transl Med* 2013; 11: 36. <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-11-36>
- [26] STACEY DW, HITOMI M, CHEN G. Influence of cell cycle and oncogene activity upon topoisomerase IIalpha expression and drug toxicity. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9127–9137. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.20.24.9127-9137.2000>
- [27] WANG Q, KOU YW. Study of the expressions of p53 and bcl-2 genes, the telomerase activity and apoptosis in GIST patients. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2626–2628. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v13.i18.2626>
- [28] TOMINAGA T, KASHIMURA H, SUZUKI K, NAKAHARA A, TANAKA N et al. Telomerase activity and expression of human telomerase catalytic subunit gene in esophageal tissues. *J Gastroenterol* 2002; 37: 418–427. <http://dx.doi.org/10.1007/s005350200061>
- [29] CAPKOVA L, KALINOVA M, KRŠKOVA L, KODETOVA D, PETRIK F et al. Loss of heterozygosity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in bronchial mucosa of heavy smokers. *Cancer* 2007; 109: 2299–2307. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.22683>
- [30] Udomchairsertkul W, Narong S, Kongsema M, Leelawat K. Detection of hTERT mRNA in gastrointestinal tract cancer specimens. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2008; 39: 324–327.
- [31] Gunther T, Schneider-Stock R, Hackel C, Pross M, SCHULZ HU et al. Telomerase activity and expression of hTERT and hTR in gastrointestinal stromal tumors in comparison with extragastrointestinal sarcomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1811–1818.
- [32] HEIDEBRECHT HJ, BUCK F, STEINMANN J, SPRENGER R, WACKER HH et al. p100: A novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M. *Blood* 1997; 90: 226–233.
- [33] RUDOLPH P, ALM P, HEIDEBRECHT HJ, BOLTE H, RATJEN V et al. Immunologic proliferation marker Ki-S2 as prognostic indicator for lymph node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 271–278. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/91.3.271>
- [34] BRIZOVA H, KALINOVA M, KRŠKOVA L, MRHALOVA M, KODET R. A novel quantitative PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase IIalpha, and TPX2): an immunohistochemical correlation, testing, and optimizing for mantle cell lymphoma. *Virchows Arch* 2010; 456: 671–679. <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-010-0922-8>
- [35] SCHRADER C, JANSSEN D, MEUSERS P, BRITTINGER G, SIEBMANN JU et al. Repp86: a new prognostic marker in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2005; 75: 498–504. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0609.2005.00540.x>
- [36] KRAMS M, HEIDEBRECHT HJ, HERO B, BERTHOLD F, HARMS D et al. Repp86 expression and outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1810–1819. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2003.05.076>
- [37] WEI P, ZHANG N, XU Y, LI X, SHI D et al. TPX2 is a novel prognostic marker for the growth and metastasis of colon cancer. *J Transl Med* 2013; 11: 313. <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-11-313>
- [38] CORDES C, MUNZEL AK, GOROGH T, LEUSCHNER I, AMBROSCH P et al. Prognostic relevance of the proliferation marker REPP86 for laryngeal cancer. *Anticancer Res* 2010; 30: 3541–3547.
- [39] MA Y, LIN D, SUN W, XIAO T, YUAN J et al. Expression of targeting protein for xklp2 associated with both malignant transformation of respiratory epithelium and progression of squamous cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1121–1127. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1766>
- [40] SHIGEISHI H, OHTA K, HIRAOKA M, FUJIMOTO S, MINAMI M et al. Expression of TPX2 in salivary gland carcinomas. *Oncol Rep* 2009; 21: 341–344.
- [41] LI B, QI XQ, CHEN X, HUANG X, LIU GY et al. Expression of targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2 is associated with progression of human malignant astrocytoma. *Brain Res* 2010; 1352: 200–207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.060>

Molekulární mechanizmy primární a sekundární rezistence, molekulárně-genetické znaky a vlastnosti KIT/PDGFRa nemutovaných GIST

Alena Kalfusová, Roman Kodet

Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha

SOUHRN

Gastrointestinální stromální nádory (GIST) tvoří nejčastější mezenchymální nádory gastrointestinálního traktu. Velká část z nich vzniká na základě aktivačních mutací v genech *KIT* (75 - 85 %) nebo *PDGFRA* (méně než 10 %). Identifikace aktivačních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA*, které kódují příslušné receptorové tyrozinkinázy (RTK), znamenala významný průlom v cílené terapii metastatických, neoperabilních nebo recidivujících GIST. Primární a/nebo sekundární rezistence je významným problémem biologické terapie imatinib mesylátem (IM) u pacientů s GIST. Oba typy rezistence vedou ke snížené terapeutické odpovědi na IM, případně k selhání této léčby a progresi onemocnění. Hlavním mechanismem sekundární rezistence je vznik sekundárních mutací. Problémem progresu onemocnění je kromě primární a sekundární rezistence také selhání úplné eradikace nádorových buněk i při dlouhotrvající terapii inhibitory RTK. GIST bez přítomnosti mutací v genech *KIT/PDGFRa* tvoří u dospělých 10 - 15 %, u pediatrických GIST je to až 85 % případů. *KIT/PDGFRa* nemutované GIST tvoří heterogenní skupinu nádorů s několika molekulárně-genetickými i morfoloickými odlišnostmi. Molekulárně se *KIT/PDGFRa* nemutované GIST liší např. mutacemi v genech *BRAF*, *KRAS*, *NF1* nebo defekty v sukcinát dehydrogenázových (SDH) podjednotkách. GIST s nemutovanými geny *KIT/PDGFRa* vykazují nižší citlivost na cílenou terapii IM v porovnání s mutovanými GIST. Terapeutické možnosti se ve skupině *KIT/PDGFRa* nemutovaných GIST soustřeďují na *BRAF* inhibitory, inhibitory PI3K dráhy (mTOR), nebo na inhibitory receptorů IGF1R a VEGFR.

Klíčová slova: GIST – primární a sekundární rezistence – *KIT/PDGFRa* nemutované GIST – SDH komplex – *BRAF* mutace – IGH systém

Molecular mechanisms of primary and secondary resistance, molecular-genetic features and characteristics of KIT/PDGFRa non-mutated GISTs

SUMMARY

Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are the most common mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract. Most of them arise due to activating mutations in *KIT* (75 - 85 %) or *PDGFRA* (less than 10 %) genes. Identification of the activating mutations in *KIT* and *PDGFRA* genes, which code for receptor tyrosine kinases (RTKs), has improved the outcome of targeted therapy of metastatic, unresectable or recurrent GISTs. Primary and/or secondary resistance represents a significant problem in the targeted therapy by Imatinib mesylate (IM) in patients with GIST. An important mechanism of the secondary resistance is the evolution of secondary mutations. Except for primary and secondary resistance, there is another problem of disease progression - a failure of tumor cells eradication even in the long term therapy of tyrosine kinase inhibitors. GISTs without mutations in *KIT/PDGFRa* genes constitute 10 - 15% GISTs in adults, and a majority (85 %) of pediatric GISTs. *KIT/PDGFRa* wild-type GISTs represent a heterogeneous group of tumors with several molecular-genetics and/or morphologic differences. *KIT/PDGFRa* wild-type GISTs are different in their molecular features, for example in mutations in the *BRAF*, *KRAS*, *NF1* genes or defects of succinate dehydrogenase (SDH) subunits. *KIT/PDGFRa* wild-type GISTs are generally less sensitive to targeted therapy by tyrosine kinase inhibitors in comparison with *KIT/PDGFRa* mutated GISTs. Inhibitors of *BRAF*, PI3K (mTOR) or inhibitors of IGF1R and VEGFR receptors provide alternative therapeutic strategies.

Keywords: GIST – primary and secondary resistance – *KIT/PDGFRa* non mutated GISTs – SDH complex – *BRAF* mutations – IGH system

Cesk Patol 2017; 53(4): 167–173

Většina gastrointestinálních stromálních nádorů (GIST) vzniká na podkladě aktivačních mutací v genech *KIT* (75 - 85 %) nebo *PDGFRA* (méně než 10 %). Mutace jsou navzájem exkluzivní a často heterozygotní. Ve vzácných případech familiálních GIST se onemocnění rozvine na základě vrozených autozomálně dominantních mutací v genech *KIT* nebo *PDGFRA*. Mutované GIST mají podobné charakteristiky. Morfoloicky jsou tvořeny vřetenobuněčnými nebo epiteloidními

buněkami. V zastoupení pohlaví nejsou patrné rozdíly. Tyto GIST postihují pacienty nad 50 let věku a mohou se vyskytovat kdekoli v rámci gastrointestinálního traktu, méně často v omentu, mesenteriu, retroperitoneu nebo v oblasti malé pánve (1). Souvislost anatomické lokalizace nádoru s přítomností některých mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* můžeme vysvětlit rozdílným původem intersticiálních Cajalových buněk (Interstitial cells of Cajal, ICC). Nádory s mutacemi v exonu 9 genu *KIT* se kupříkladu přednostně vyskytují v tenkém střevě. Tím se liší od nádorů s mutacemi v exonu 18 genu *PDGFRA* (D842V), které se nacházejí pouze v žaludku, mesenteriu a 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, nacházejí naproti tomu v průběhu celého gastrointestinálního traktu (GIT). Možným vysvětlením je, že pocházejí z tzv. ubikvitiného podtypu ICC buněk (2).

✉ Adresa pro korespondenci:

Mgr. Alena Kalfusová
Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 - Motol
tel.: 224 435 622, 224 435 650
email: alena.kalfusova@fnmotol.cz

PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ REZISTENCE

Největším průlomem v terapii GIST byl objev aktivačních mutací v genu *KIT* (3) a v genu *PDGFRA* (4), které kódují příslušné receptorové tyrozinkinázy (RTK). Spojení těchto poznatků s poznatky úspěšné terapie chronické myeloidní leukemie (CML), která je cílená na fúzní protein BCR-ABL, rovněž s tyrozinkinázovou aktivitou (5), odstartovalo významnou kapitolu v léčbě metastatických, neoperabilních nebo recidivujících GIST. Terapie je u obou klinických jednotek založená na inhibici kinázové aktivity vazbou inhibitoru (imatinib mesylátu, IM) na ATP vazebné místo proteinu. V průběhu terapie se však u obou typů onemocnění setkáváme se vznikem sekundární rezistence. U CML je to přítomnost sekundárních mutací v kinázových doménách BCR-ABL fúzního proteinu nebo amplifikace genu *BCR-ABL* (6,7). U pacientů s GIST se setkáváme s primární a sekundární rezistencí (8). V domácím písemnictví jsme na problematiku primární a sekundární rezistence GIST s progresí na terapii ve stručném přehledu již upozornili (9). Otázka získané rezistence a s ní spojeného selhávání léčby je nadále aktuálním a důležitým tématem pro řešení volby cílené biologické léčby.

„Časná“ nebo také „primární“ rezistence je definována jako progresí onemocnění v průběhu prvních 3 - 6 měsíců od začátku terapie IM. Týká se přibližně 15 - 20 % pacientů. Hlavním důvodem vzniku primární rezistence je mutační stav genů *KIT* nebo *PDGFRA* (typ mutace a/nebo lokalizace primární mutace) (1,10). S primární rezistencí nejčastěji souvisí mutace v exonu 9 genu *KIT*, mutace v genu *PDGFRA* (zejména mutace D842V v exonu 18), nebo naopak absence mutací jak v genu *KIT*, tak genu *PDGFRA* (10). 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 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.

„Získaná“ nebo-li „sekundární“ rezistence vzniká v průběhu terapie u pacientů, jejichž GIST prvotně na terapii odpovídal, případně u nich došlo ke stabilizaci onemocnění, ovšem v průběhu několika měsíců na terapii nereagují a dochází u nich k progresi onemocnění. Časové rozmezí vzniku sekundární rezistence se pohybuje v rozpětí 6 až 24 měsíců od začátku terapie IM. Hlavním mechanismem vzniku získané rezistence je přítomnost sekundárních mutací. Sekundární mutace se vyskytují u 50 - 70 % pacientů s progresí onemocnění. 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*. Téměř výhradně se sekundární mutace vyskytují ve stejném genu a na stejné alele jako primární mutace (1). Sekundární mutace se shlukují ve dvou oddělených *KIT* tyrozinkinázových doménách (TK1 a TK2). První

Tabulka č. 1. Přehled sekundárních mutací v exonech 13, 14 a 17 genu *KIT*.

Doména	Kodon	Exon	Sekundární mutace
ATP vazebná doména	654	13	V654A
	670	14	T670I, T670E
Aktivační smyčka	816	17	D816E, D816G
	820	17	D820Y, D820E
	822	17	N822K
	823	17	Y823D

(upraveno dle Heinrich, 2008)

je ATP/imatinib vazebné místo (exony 13 a 14 genu *KIT*), druhá je kinázová aktivační smyčka (exony 17 a 18 genu *KIT*)(11). Sekundární mutace ATP vazebného místa přímo inhibují vazbu IM. Sekundární mutace V654A (exon 13 genu *KIT*) vede ke snížení vazebné aktivity IM. Sekundární mutace v exonu 14 genu *KIT*, tj. T670I, je často označovaná jako „strážce brány“ – gatekeeper. Tato mutace je zodpovědná za tvorbu sterické překážky pro vazbu IM (12). Mutace T670I je homologní s mutací T315I u CML (fúzního genu *BCR-ABL*), která způsobuje silnou rezistenci, a s mutací T790M u genu *EGFR* (13). Mutace v aktivační smyčce (exon 17 genu *KIT*) destabilizují inaktivní formu RTK (protein *KIT* je konstitutivně aktivován)(12). Přítomnost sekundárních mutací doposud nebyla popsána u pacientů, kteří nepodstoupili terapii IM (14). Stručný přehled mutací zodpovědných za sekundární rezistenci poskytuje tabulka č. 1.

Nepříznivým znakem sekundární rezistence je také velká heterogenita sekundárních (rezistentních) mutací. 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 (1). Rozdílné sekundární mutace v rozdílných metastázách u stejného pacienta poukazují na rozdílnou klonální evoluci (15). Heterogenita rezistentních (sekundárních) mutací „v“ jednotlivé metastáze a „mezi“ metastázami u jednotlivých pacientů může být značná. Může kolísat od dvou do pěti sekundárních mutací v rozdílných metastázách nebo i vznikem dvou rozdílných mutací v jedné metastáze (16,17). 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. Molekulárně-genetická analýza provedená z jednoho metastatického ložiska tak nemusí představovat skutečný mutační stav nádoru. Sekundární mutace v *KIT* kinázových doménách nebyly detekovány u nemutovaných genů *KIT/PDGFRA*, u mutovaných GIST s nezvyklou morfologií a/nebo u GIST se ztrátou exprese *KIT* proteinu (16).

Mezi další mechanismy sekundární (získané) rezistence patří amplifikace genu *KIT* a/nebo *PDGFRA* a následující nadměrná exprese daných proteinů. Aktivace alternativních RTK (např. *AXL*) je jedním z dalších mechanismů získané rezistence. Mimo uvedené mechanismy změny struktury nebo funkce receptorů *KIT* a *PDGFRA*, patří k dalším mechanismům získané rezistence chromozomální modifikace, změny ve farmakokinetice IM, popřípadě diferenciaci nádoru (18). Stručný přehled mechanismů sekundární rezistence je uvedený v tabulce č. 2.

Problémem progresí onemocnění je kromě primární a sekundární rezistence také selhání úplné eradikace nádorových buněk, popřípadě kmenových buněk, které jsou jejich prekurzory v nádorovém ložisku. Kompletní odstranění nádorových buněk selhává i při dlouhotrvající terapii inhibitory RTK. Inhibitory RTK selhávají při odstranění nádorových buněk v 95 - 97 % případů. Rozpětí redukovaných nádorových buněk může kolísat od méně než 10 % až po více než 90 %. Absolutního odstranění nádorových buněk ovšem nebylo dosaženo nikdy (1,2). Přežívající nádorové buňky jsou metabolicky v klidovém stadiu a neproliferují. Jejich výstup z buněčného cyklu je však reverzibilní (1). 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 existencí skupiny buněk s nízkou expresí proteinu *KIT*, nebo buněk, u kterých vznikla ztráta exprese proteinu *KIT* (*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.

Tabulka č. 2. Mechanizmy sekundární rezistence.

I. Mechanizmy související s KIT nebo PDGFRA receptory.	
a.	Amplifikace genu <i>KIT</i> , nadměrná exprese proteinu KIT
b.	Ztráta exprese proteinu KIT, aktivace alternativního receptoru
c.	Aktivace alternativní signální molekuly v KIT aktivační signální dráze
d. Sekundární mutace	
i)	3D konformační změny receptoru – sekundární mutace v exonu 13 genu <i>KIT</i> (V654A)
ii)	Strukturální změny receptoru – sekundární mutace v exonu 14 genu <i>KIT</i> (T607I)
iii)	Konstitutivní aktivace receptoru – sekundární mutace v exonu 17 genu <i>KIT</i> (D816V, Y823D)
II. Mechanizmy odlišné nebo nesouvisející s KIT/PDGFRA receptory	
a.	Histologická modifikace nádoru
b.	Snížení bioavility IM (změna farmakokinetiky IM)
c.	Chromozomální změny

(upraveno dle Maleddu, 2009 (13))

Vznik sekundárních mutací rezistentních na IM v přežívajících prekurzorech může umožnit jejich diferenciaci v KIT+ buňky a jejich nekontrolovatelný růst. Předpokládaný model procesu přetrvávání nádorových buněk a klonální selekci buněk se získanými mutacemi uvádíme na obr. 1.

Po morfologické stránce můžeme u nádorů, které jsou terapeuticky ovlivněny pozorovat změnu diferenciaci nádorových buněk v jiný buněčný typ. Buňky se mohou transformovat v rhabdomyoblastický, chondroidní, nebo kostní typ. Mechanismus transformace můžeme vysvětlit snahou nádorových buněk (pod vlivem terapeutického tlaku) vyhnout se apoptóze. Programovanou smrt buňky obejdou tyto buňky opuštěním buněčného cyklu a spustí expresi genů, které jsou spojené s jiným diferencovaným typem buněk. Nevyjasněnou otázkou zatím zůstává průběh této transformace. Zdrojem mohou být buňky, které se po přerušení terapie vyhnuly apoptóze a opět prolifерují, nebo jsou jejich zdrojem nádorové kmenové buňky. Ve vzácných případech se může GIST transformovat do high grade anaplastického sarkomu bez exprese CD117 povrchového proteinu (2). Tato změna byla pozorována u nádorů bez terapie, ale rovněž i u nádorů léčených (19). Rhabdomyoblastické buňky u rezistentních GIST s progresí onemocnění exprimují typicky desmin a myogenin (20,21).

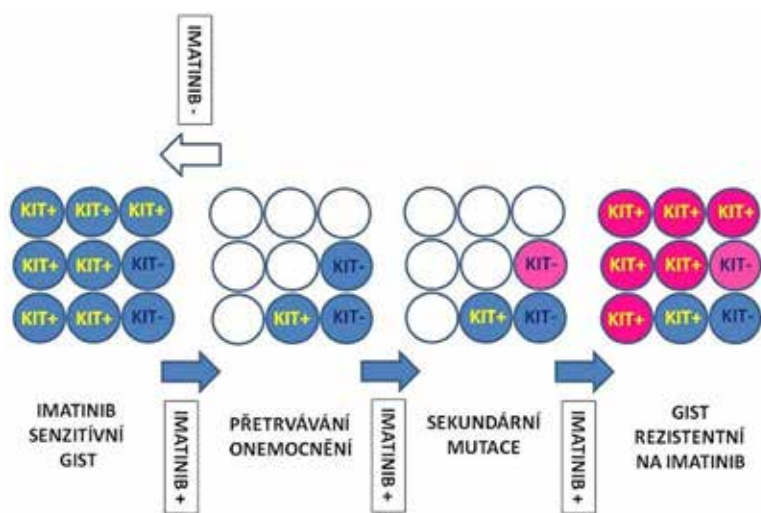
KIT/PDGFRA NEMUTOVANÉ GIST

Donedávna byl z terapeuticko-indikačního hlediska nejmýznamnější a nejčastěji sledován mutační stav genů *KIT* a *PDGFRA*. Sledování přítomnosti a lokalizace primárních mutací, výskytu sekundárních mutací při progresi onemocnění, a s tím spojené primární a/nebo získané rezistence na cílenou terapii IM, byly dlouhodobě důležitým cílem molekulárně-genetické analýzy GIST. V posledních letech se zajímavou a z terapeutického hlediska otevřenou kapitolou stávají GIST, u kterých nebyly zjištěny mutace v těchto genech.

GIST bez přítomnosti mutací v genech *KIT/PDGFRA* tvoří u dospělých 10 - 15 % případů, u mnohem vzácnějších pediatrických GIST je to až 85 % případů. Podle množství doposud publikovaných studií se u tzv. wild-type (*KIT/PDGFRA* nemutovaných) GIST jedná o komplex několika podtypů. Tyto podtypy GIST mají rozdílné molekulární znaky. Jsou jimi např. mutace v genech *BRAF*, *KRAS*, *NF1* nebo defekty v sukcinát dehydrogenázových (SDH) podjednotkách (22). Rozdělení a charakteristice *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST podle jejich molekulárních vlastností se mimo zahraniční literaturu podrobně věnovala i domácí publikace (23). Pro úplnost a zpřehlednění problematiky heterogenity *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST slouží obr. 2.

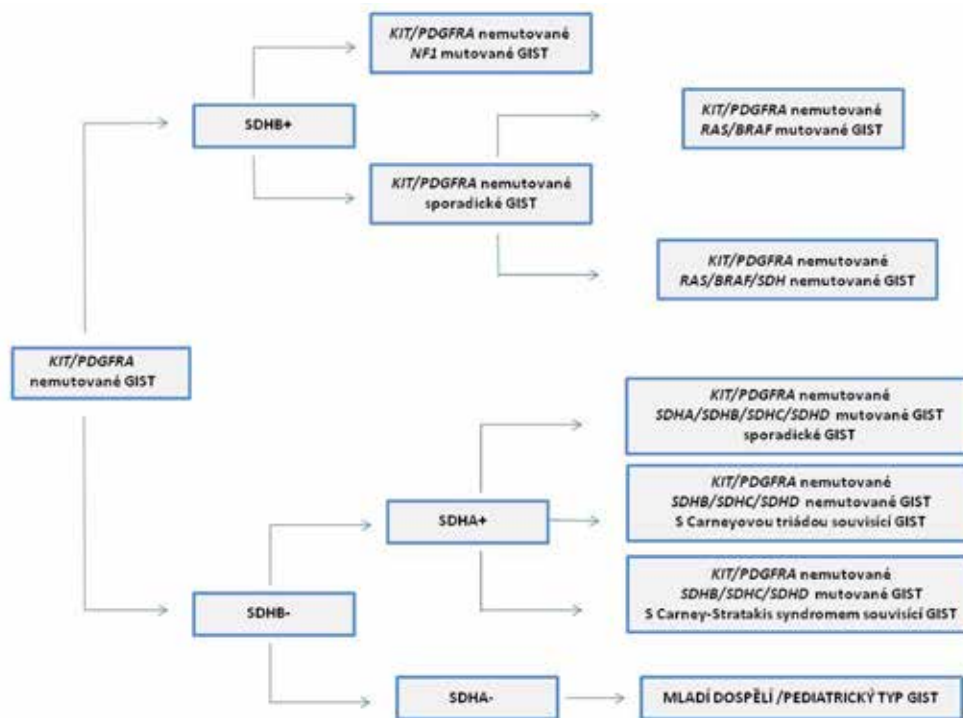
V krátkosti lze uvést, že *KIT/PDGFRA* nemutované GIST můžeme podle imunohistochemické (IHC) exprese SDHB podjednotky rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny, „typ 1“, patří GIST s expresí SDHB podjednotky (SDHB pozitivní, SDHB+). Druhou skupinu, „typ 2“, tvoří SDHB negativní (SDHB-) GIST. Do první skupiny spadají GIST se somatickou inaktivací genu *NF1* (ztráta heterozygoty nemutované *NF1* alely) a některé sporadické GIST. Jak vyplývá z charakteristiky těchto GIST nemají sporadické GIST z této skupiny mutace v genech *KIT/PDGFRA*. Přibližně v 15 % případů však mohou mít mutovány geny *BRAF* nebo *KRAS*. GIST s mutacemi v genu *NF1* se běžně vyskytují v tenkém střevě s typicky multifokálním výskytem nádoru a neexprimují protein IGF1R.

Druhou skupinu GIST SDHB- můžeme rozdělit podle IHC exprese SDHA podjednotky (exprese je ovlivněna inaktivací mutacemi genu *SDHA*) na SDHA pozitivní (SDHA+) a SDHA negativní (SDHA-). Do skupiny SDHA pozitivních GIST patří GIST jako součásti Carneyovy triády, syndromu Carney-Strakatis, a sporadické GIST. Tyto sporadické GIST opět nemají mutovány geny *KIT/PDGFRA*, mají ovšem mutované geny pro SDH komplex (*SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, méně obvykle *SDHA*). GIST jsou v těchto případech běžně lokalizovány v žaludku a je u nich známa menší prevalence ženského pohlaví. Histologicky se ovšem podobají GIST bez exprese proteinu SDHA. Ve skupině SDHA negativních



Obr. 1. Hypotetický model perzistence kmenových buněk GIST a sekundární rezistence.

Modré kruhy KIT-: KIT negativní kmenové buňky (nebo jejich prekurzory), nesou KIT mutace senzitivní na imatinib, exprese proteinu KIT je ale velmi slabá nebo není přítomná vůbec (KIT-low/KIT-). Modré kruhy KIT+: KIT pozitivní buňky, vznikající z KIT-low/KIT- (s přítomnými mutacemi senzitivními na imatinib). Prázdné, bílé kruhy: představují mrtvé buňky. Světle růžové kruhy: KIT-low/KIT- kmenové buňky nebo jejich prekurzory, které obsahují sekundární mutace rezistentní na imatinib. Tmavě růžové kruhy: KIT+ buňky vznikající z KIT-low/KIT- prekurzorů se sekundárními mutacemi rezistentními na imatinib. Modré šipky: terapie imatinibem. Bílá šipka: ukončení terapie imatinibem.



Obr. 2 Schematický přehled KIT/PDGFR nemutovaných GIST.

Podle imunohistochemické (IHC) exprese SDHB podjednotky dělíme KIT/PDGFR nemutované GIST do dvou skupin, na SDHB+ (zahrnuje GIST s mutacemi v genu *NF1* a sporadické GIST s nebo bez přítomnosti mutací v genech *BRAF* nebo *KRAS*) a na SDHB- (nebo také s defektem SDH komplexu). Skupinu SDHB- KIT/PDGFR nemutovaných GIST podle IHC exprese SDHA podjednotky dále dělíme na SDHA+ (SDHB-/SDHA+), kam patří GIST související s Carney-Stratakis syndromem (vrozené nebo somatické inaktivační mutace v genech *SDHB*, *SDHC*, nebo *SDHD*), GIST jako součást Carneyovy triády (bez přítomnosti mutací v genech SDH komplexu) a sporadické GIST s vrozenými nebo somatickými mutacemi v genech SDH komplexu. SDHB-/SDHA- GIST jsou charakterizovány vrozenými nebo somatickými inaktivačními mutacemi v genu *SDHA* (mladí dospělí/pediatrický typ GIST).

(SDHA-) GIST jsou nádory, které jsou diagnostikovány u mladých dospělých (mladých žen). Charakteristická je lokalizace v žaludku, s typickými morfologickými a fenotypovými znaky: smíšeným epiteloïdním nebo vřetenobuněčným vzhledem, difúzní pozitivitou povrchových molekul KIT a DOG1 a nadměrnou expresí proteinu IGF1R. Častý je u nich výskyt metastáz v lymfatických uzlinách. Navzdory výskytu metastáz je u těchto pacientů průběh nemoci indolentní (1,22).

KIT/PDGFR nemutované GIST s mutacemi v genech *BRAF*/*KRAS*/*PI3K*

Protein *BRAF* patří k serin/treoninovým proteinkinázám a jeho funkce spočívá v kontrole proliferace a diferenciaci buněk prostřednictvím RAS-RAF-MAPK signální dráhy. Protein *BRAF* je kódovaný stejnojmenným genem *BRAF* (24). S mutovaným genem *BRAF* se můžeme setkat u širokého spektra nádorů od benigních melanocytárních névů, hyperplastických polypů v tenkém střevě, low-grade gliomů až po melanomy, vlasatobuněčnou leukemii (hairy-cell leukemia, HCL), papilární karcinomy štítné žlázy a kolorektální karcinomy (25). Přítomnost mutací v genu *BRAF* byla detekována i u GIST (20). Zastoupení mutací v genu *BRAF* je u každé z těchto klinických jednotek rozdílné. U HCL je mutovaných případů až 100 %. V případě dalších klinických jednotek je procentuální zastoupení nižší (např. melanom 50 %, papilární karcinom štítné žlázy 45 %, low-grade gliomy 35 - 40 %, kolorektální karcinom 11 %). U GIST se počet *BRAF* mutovaných případů pohybuje v rozpětí 3 - 13 %.

Nejčastěji jsou mutace v genu *BRAF* lokalizovány v exonu 15, který kóduje kinázovou doménu proteinu. Ve většině případů se jedná o jednoduchou substituci v kodonu 600, která vede k záměně valinu za kyselinu glutamovou (V600E). Méně často

se mutace v genu *BRAF* vyskytují v exonu 11. GIST s mutacemi v genu *BRAF* jsou morfologicky nerozlišitelné od GIST s mutacemi v genech *KIT*/*PDGFR*. Přednostně se vyskytují v tenkém střevě a u ženského pohlaví (26). První analýzy ukázaly, že mutace v genech *KIT*/*PDGFR* jsou s mutacemi v genu *BRAF* mutačně exkluzivní (20,24). Následně byl ovšem prokázán současný výskyt mutací v genech *KIT* nebo *PDGFR* a *BRAF* u GIST i u melanomů.

Přítomnost mutací v genu *BRAF* u *KIT*/*PDGFR* nemutovaných GIST ozřejmila patomechanismus vzniku této skupiny GIST. Mutace v genu *BRAF* u GIST vedou ke vzniku a predikují primární rezistenci na cílenou terapii IM. V experimentech na buněčných liniích se současnou expresí KIT senzitivních mutací a konstitutivně aktivovaných proteinů *KRAS* nebo *BRAF* bylo prokázáno, že cílená terapie IM inhibuje protein KIT. Neovlivní ovšem intracelulární signální dráhu aktivovanou prostřednictvím mutovaných genů *BRAF*/*KRAS* (27). Kromě primární rezistence se mutace v genu *BRAF* podílejí na vzniku sekundární rezistence. Mutace v genu *BRAF* byly zjištěny u nádorů s progresí na terapii, které prvotně odpovídaly na terapii a neměly sekundární mutace v genech *KIT* nebo *PDGFR* (20).

Mutace v genu pro fosfatidyl inositol 3 kinázu (*PI3K*) byly rovněž prokázány u rezistentních GIST s progresí na terapii. Protein *PI3K* je součástí aktivační dráhy RTK KIT a *PDGFR*. Reguluje buněčný růst, proliferaci a přežívání buněk. Pacienti s mutacemi v genech *BRAF* nebo *PI3K* (ovlivňující primární nebo sekundární rezistenci u GIST) mohou profitovat z alternativních terapeutických postupů (*BRAF* inhibitory nebo inhibitory *PI3K* signální dráhy, kterými jsou inhibitory p110 α nebo mTOR) (28). Na rozdíl od mutací v genu *BRAF* se mutace v genech ze skupiny RAS (*NRAS*, *KRAS*) vyskytují u GIST ojediněle (20,26,29,30).

KIT/PDGFRa nemutované GIST a SDH komplex

SDH (sukcinát dehydrogenázový) komplex tvoří 4 proteinové podjednotky: SDHA, SDHB, SDHC, a SDHD, které jsou kódovány příslušnými geny. SDH komplex je lokalizovaný na vnitřní membráně mitochondrií a je nepostradatelný pro buněčný metabolismus. Přítomnost inaktivačních mutací nebo poškození některé z části SDH komplexu (SDHA, SDHB, SDHC, nebo SDHD) způsobí ztrátu proteinové exprese podjednotky SDHB (31). Zatímco ztráta proteinové exprese SDHB může být ovlivněna defektem v kterémkoliv z podjednotek SDH komplexu, proteinová exprese podjednotky SDHA (pozitivita/negativita) je ovlivněna změnou pouze v genu *SDHA*. Ztráta proteinové exprese podjednotky SDHA je specificky spojena s přítomností inaktivačních mutací v genu *SDHA*.

Změny v SDH podjednotkách jsou z jedné poloviny případů ovlivněny přítomností mutací v kterémkoliv z *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, nebo *SDHD* genů. Druhá polovina mutacemi v SDH komplexu ovlivněna není. Možným patomechanismem vzniku této skupiny poruch je epigenetické utlumení aktivity SDH komplexu. V porovnání s jinými GIST byla u GIST s defekty SDH komplexu pozorována jejich značná hypermetylace (32). Mutace v SDH komplexu vedou k poruše funkce mitochondriálního komplexu II (v řetězci transportu elektronů) a následně k narušení oxidativní fosforylace. SDH komplex oxiduje sukcinát na fumarát. Porucha oxidativní fosforylace vede k hromadění sukcinátu a vzniká tak efekt pseudohypoxie prostřednictvím nadměrné exprese proteinů HIF (hypoxia inducible factor) (32). Sukcinát inhibuje degradaci HIF1 α , což následně vede ke zvýšení jeho hladin a translokaci v jádře. V jádře pak spouští transkripci růstových faktorů IGF1R a VEGFR (33,34). Zárodečné mutace v genech *SDHB*, *SDHC* a *SDHD* vedou ke vzniku syndromu Carney-Strakatis s familiárním výskytem paragangliomu a GIST.

U sporadických GIST s nemutovanými geny *KIT/PDGFRa* byly popsány somatické mutace v genech SDH komplexu. Zahraniční studie popisují přítomnost zárodečných mutací i u sporadických GIST u dospělých bez zjevné souvislosti s familiárním výskytem nebo paragangliomem. Pravděpodobným vysvětlením je, že se jedná o utlumenou formu Carney-Strakatis syndromu nebo o nejednoznačnou manifestaci či definici tohoto syndromu (35). Carneyova triáda (nefamiliární výskyt paragangliomů, GIST a plicních chondrohamartomů) je rovněž definována poruchou v SDH komplexu, ale mutace v genech *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, nebo *SDHD* nebyly u této klinické jednotky zatím popsány (36).

GIST s defektem v některé z SDH podjednotek se vyznačují epiteloidní morfologií, mnohočetným výskytem, rezistencí na terapii IM a charakteristickou lokalizací v žaludku. Ve studii čítající více než 1000 dobře definovaných GIST s defektem SDH komplexu byly všechny v žaludku (37). Na rozdíl od „klasických“ GIST, tyto GIST metastazují do lymfatických uzlin a vykazují expresi proteinu IGF1R. Jejich prognóza se nedá stanovit jen na základě velikosti nádoru, lokalizace a mitotické aktivity. Pacienti mohou i při rozvoji jaterních metastáz dlouhodobě přežívat (34).

KIT/PDGFRa nemutované GIST a IGF1R

IGF (insulin-like growth factor) systém tvoří IGF ligandy (IGF1 a IGF2), receptory (IGFR a insulinový receptor), a 6 insulin-vazebných proteinů (IGFBP1-6). Všechny tyto složky IGF systému hrají významnou roli v růstu a vývinu mnoha tkání a regulují celkový buněčný růst (33). Receptor pro růstový faktor podobný insulinu, typ 1 (insuline-like growth factor receptor 1, IGF1R), je podobně jako RTK KIT a PDGFRa, transmembránový receptor s tyrosinkinázovou aktivitou. Aktivuje signální dráhu PI3K nebo MAPK. Bylo prokázáno, že IGF1R ve spolupráci s ligandy IGF1 a IGF2 se uplatňuje v transformaci několika onkogenů. Typickým, a podle

všeho také specifickým znakem GIST s defektem SDH komplexu je nadměrná exprese proteinu IGF1R (32,35,37,38). Možným mechanismem nadměrné exprese IGF1R u GIST s defektem SDH komplexu je aktivace prostřednictvím nadměrné exprese HIF1 α faktoru (33). Aktivace IGF1R signální dráhy je možným alternativním terapeutickým cílem u GIST s defektem SDH komplexu (35).

KIT/PDGFRa nemutované GIST a NF1

Neurofibromatóza typu 1 (NF1) (von Reclinghausenova choroba) je autozomálně dominantní dědičné onemocnění, charakterizované přítomností mnohočetných neurofibromů, skvrn typu „café-au-lait“ a dalšími mezenchymálními nádory. NF1 vzniká jako následek inaktivačních mutací v genu *NF1*, který kóduje protein neurofibromin. Neurofibromin je analogem GTP aktivačních proteinů (GAP), které regulují aktivitu proteinů RAS (34,39). Přibližně u 7 % pacientů s NF1 se rozvine GIST. Početnost nádorů kolísá od jednoho ložiska po jejich mnohočetný výskyt. Nejčastější lokalizací je tenké střevo. Velká část těchto GIST má nemutované geny *KIT* a *PDGFRa*, ale podle očekávání mají buď somatické mutace v genu *NF1* nebo ztrátu nemutované *NF1* alely. Výsledkem obou molekulárních změn je aktivace signálních drah prostřednictvím MAP kinázové dráhy (2). Často jsou tyto GIST nízkého rizika s klinicky indolentním průběhem (40).

PEDIATRICKÉ GIST

Pediatrické GIST mají mutace v genech *KIT* a/nebo *PDGFRa* pouze v 15 - 20 %. S tím souvisí i horší odpověď dětských pacientů na cílenou terapii inhibitorem RTK. Pediatrické GIST a GIST s nemutovanými geny *KIT/PDGFRa* vykazují ztrátu proteinové exprese podjednotky SDHB (10). Z celkového počtu GIST v populaci tvoří dětské GIST (častěji u mladých dívek) přibližně jen 1 - 2 %. Přes absenci mutací v genech *KIT/PDGFRa* u většiny pacientů exprimují tyto GIST protein KIT stejně tak jako dospělí pacienti (13,40). Pediatrické GIST podobně jako GIST v souvislosti se syndromem Carney-Strakatis nebo s Carneyovou triádou vykazují podobné charakteristiky (33). Prakticky identické znaky jako u pediatrických GIST můžeme najít i u příležitostně se vyskytujících dospělých GIST tzv. „pediatrického typu“. Pravděpodobným vysvětlením je právě společný defekt v SDH komplexu (33).

Pediatrické GIST se vyskytují vzácně, postihují adolescentní dívky (medián věku 14 let), vyznačují se multifokálním výskytem, epiteloidní morfologií, lokalizací nádoru v žaludku (více než v 90 %), metastázami v lymfatických uzlinách a indolentním chováním (41).

TERAPEUTICKÉ MOŽNOSTI

V algoritmu cílené léčby u metastatických nebo recidivujících GIST s mutacemi v genech *KIT/PDGFRa* se v první linii terapie dosud úspěšně používá imatinib mesylát (IM). Pacienti se vzniklou rezistencí (primární nebo sekundární) na IM jsou ve druhé linii léčeni sunitinib malátem (SM). SM silně inhibuje mutace vzniklé v ATP vazebním místě. Nicméně, SM je méně účinný v inhibici mutací přítomných v aktivační smyčce (exon 17, gen *KIT*), které tvoří 50 % imatinib-rezistentních mutací (42). Ve třetí linii léčby je u pacientů s metastatickým nebo recidivujícím GIST, kteří neodpovídají na léčbu IM nebo SM schválen regorafenib. Regorafenib je dalším tyrosinkinázovým inhibitorem (TKI), který přímo inhibuje protein KIT. Kromě toho inhibuje signální molekuly RAS, BRAF v dráze aktivace přes RTK PDGFRB (43). Navíc, na rozdíl od IM, regorafenib inhibuje endotelové buňky prostřednictvím VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor 2). VEGFR-2 má rozhodující význam v normální i nádorové neovaskularizaci. Regorafenib tak působí na několika úrovních inhibice

růstu nebo proliferace buněk. Je rovněž možné, že regorafenib inhibuje i další signální dráhy (např. fibroblast growth factor receptor 1), což může prostřednictvím doposud neznámého kompenzačního mechanismu přispívat k rezistenci GIST (44).

Účinnost nových TKI, např. ponatinibu (NTC 01874665) se zkouší u pacientů, kteří neodpovídají ani na terapii regorafenibem (43). Monoterapie IM, SM, nebo regorafenibem neumožňuje obsáhnout celou šíři sekundárních mutací (přítomnost několika typů mutací v jednom ložisku) v ATP vazebním místě a stejně tak v aktivační smyčce (42). Potenciál ponatinibu vůči předchozí terapii I., II. a III. linie je podpořen inhibicí GIST se sekundárními mutacemi v exonu 17 genu *KIT*.

Zajímavou kapitolu v terapii GIST tvoří pacienti s nemutovanými geny *KIT/PDGFR*. V porovnání s *KIT/PDGFR* mutovanými GIST, je odpověď na terapii IM u nemutovaných GIST téměř o polovinu nižší (44 - 45 % vs. 70 - 71 %)(31). Nemutované GIST představují heterogenní skupinu klinických jednotek s rozdílným patomechanismem vzniku a odlišnou citlivostí na cílenou terapii. Příkladem jsou gastrické GIST s negativitou exprese proteinu SDHB a s vysokou expresí IGF1R. Prvotně neodpovídají na terapii IM, odpovídají ovšem na terapii SM.

Další možnosti terapie pomocí inhibitorů BRAF, nebo inhibitorů PI3K signální dráhy (inhibitory p110 α a/nebo mTOR) se využívají ve skupině *KIT/PDGFR* nemutovaných GIST s aktivací BRAF nebo PI3K signální dráhy. U *KIT/PDGFR* nemutovaných GIST je slibnou alternativní cestou léčby inhibice receptoru IGF1R. Aktuálně probíhají klinické studie cílené terapie proti uvedenému receptoru (např. NCT01560260)(10,31). Zdá se, že v cílené terapii GIST bude v budoucnu vhodnější a účinnější vzájemná kombinace terapie TKI (monoterapie TKI není dostatečná), společně s jinými léčivými (např. kombinace inhibitoru PI3K a IM – zejména u bodové mutace D842V, která je rezistentní na IM)(43), popřípadě imunoterapie (ipilimumab). Možnosti ovlivnění GIST se během několika let značně rozšířili a lze očekávat, že cílená terapie bude při kombinaci léčiv mnohem účinnější než dosavadní terapeutické přístupy. Precizní molekulární diagnostika GIST bude mít i nadále svou roli při indikaci přiměřených kombinací biologických léků.

MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKA GIST - SOUČASNÝ STAV

Zdrojem materiálu pro molekulární analýzu mutačního stavu genů *KIT* a *PDGFR* jsou vzorky primárních nádorů, recidiv nádorů nebo metastáz. Kvalita DNA má pro molekulárně genetické vyšetřování zcela zásadní a významnou roli. Nejvyšší kvalitu izolované DNA získáváme z nativního bioptického materiálu ve formě zmrazených vzorků. U archivních vzorků dochází v procesu fixace ve formolu a zalévání do parafínu k degradaci DNA. Modifikace primární struktury DNA, fragmentace DNA a křížové vazby s proteiny znesnadňují izolaci DNA a následně negativně ovlivňují průběh jednotlivých molekulárně genetických analýz. Přesto lze, s určitými omezeními molekulární analýzu provést i z formolem fixované tkáně. Kontrola kvality a integrity izolované DNA, společně s volbou vhodných reakčních podmínek je nevyhnutnou součástí mutační analýzy GIST.

Přítomnost primárních mutací vyšetřujeme v exonech 9, 11, 13, a 17 genu *KIT* a v exonech 12, 14, a 18 genu *PDGFR*. Mutace ve všech uvedených exonech analyzujeme najednou. Každou detekovanou mutaci ověřujeme opětovnou nezávislou amplifikací s následným zjištěním pořadí nukleotidů pomocí kapilární elektroforézy na genetickém analyzátoru. V případě, že se v analyzovaných exonech mutace nevyskytují, můžeme mutační analýzu rozšířit o zjištění přítomnosti mutací v exonu 8 genu *KIT*. U pacientů s GIST bez mutací v genech *KIT* a *PDGFR* pokračujeme v mutační analýze genu *BRAF*. Konkrétně vyšetřujeme exony 11 a 15 uvedeného genu. Nejprve vyšetřujeme exon 15 genu *BRAF*, kde se mutace vyskytují nejčastěji. Následně doplníme mutační analýzu o vyšetření exonu 11 genu *BRAF*. U *KIT/PDGFR* nemutovaných GIST mohou být v ojedinělých případech mutace přítomny rovněž v genech *KRAS* (event. *NRAS*) nebo *PI3K*. Mutační stav těchto genů vyšetřujeme jen v případech GIST, u kterých nejsou zjištěny mutace genů *KIT*, *PDGFR* a *BRAF*.

V menší míře se u sporadických GIST s nemutovanými geny *KIT/PDGFR*, případně u GIST, které tvoří součást syndromu Carney-Stratakis setkáváme s defektem a ztrátou funkce SDH komplexu. Defekt SDH komplexu je způsoben přítomností mutací v genech *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, nebo *SDHD*. Na analýze mutačního stavu genů SDH komplexu spolupracujeme s Klinikou dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol.

U pacientů s progresí onemocnění na terapii IM vyšetřujeme přítomnost sekundárních mutací. Opětovně analyzujeme vzorky, u kterých byly zjištěny primární mutace. Neprovádíme ovšem detekci mutací ve všech exonech genů *KIT* a *PDGFR*. Vyšetřujeme pouze exon s přítomnou primární mutací a exony 13 a 17 genu *KIT*, kde se sekundární mutace vyskytují nejčastěji. V případě, že byla primární mutace zjištěna v některém z exonu genu *PDGFR*, analyzujeme pouze gen *PDGFR*. Za podmínky, že mutace v exonech 13 a 17 nedetekujeme, rozšiřujeme mutační analýzu o vyšetření přítomnosti mutací v exonech 14 a 18 genu *KIT*. Analýzu sekundární rezistence nádorů bez přítomnosti sekundárních mutací v exonech 13, 14, 17, a 18 genu *KIT* doplňujeme o zjištění mutačního stavu genu *BRAF*. Molekulární analýzu sekundárních mutací s ohledem na jejich velkou heterogenitu „v“ i „mezi“ jednotlivými metastatickými ložisky vždy provádíme ze všech dostupných bioptických vzorků.

Správně a precizně provedená mutační analýza se neobejde bez výběru vhodného vzorku, určení procentuálního zastoupení nádorových buněk ve vyšetřovaném materiálu, případně posouzení nenádorové příměsi či nekrotických ložisek, které významně ovlivňují výsledek molekulárního vyšetření. Přesnost molekulární diagnostiky GIST tak velmi významně závisí na úzké spolupráci s patologem.

PODĚKOVÁNÍ

Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN MOTOL) - IG VZ 6006 a OPVK CZ.2.16/3.1.00/24022.

PROHLÁŠENÍ

Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou. Toto prohlášení se týká i všech spoluautorů.

LITERATURA

1. **Ordog T, Zörnig M, Hayashi Y.** Targeting disease persistence in gastrointestinal stromal tumors. *Stem Cells Trans Med* 2015; 4: 702-707.
2. **Corless CL.** Gastrointestinal stromal tumors: what do we know now? *Mod Pathol* 2014; 27: S1-S16.
3. **Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al.** Gain-of-function mutations of c-kit gene in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998; 279: 577-580.
4. **Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al.** *PDGFR* activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003; 299: 708-710.
5. **Drucker BJ, Tamura S, Buchdunker E, et al.** Effects of a selective inhibitor of the abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature Medicine* 1996; 2(5): 561-566.
6. **Al Ali HK, Heinrich MC, Lange T, et al.** High incidence of BCR-ABL kinase domain mutations and absence of mutations of the *PDGFR*

- and KIT activation loops in CML patients with secondary resistance to imatinib. *Hematol J* 2004; 5(1): 55-60.
7. **Gorre ME, Mohhamed M, Ellwood K, et al.** Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; 293: 876-880.
 8. **Antonescu CR, Besmer P, Guo T, et al.** Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4182-4190.
 9. **Augustiňáková A, Kodet R.** Molekulární diagnostika gastrointestinálních stromálních tumorů ve vztahu k predikci terapeutické odpovědi na cílenou biologickou léčbu. *Cesk Patol* 2011; 47(4): 148-152.
 10. **Gounder MM, Maki RG.** Molecular basis for primary and secondary tyrosine kinase inhibitor resistance in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 67(Suppl 1): 25-43.
 11. **Heinrich MC.** Molecular basis for treatment of gastrointestinal stromal tumours. *EJC Supplements* 2006; 10-16.
 12. **Nishida T, Kanda T, Nishitani A, et al.** Secondary mutations in the kinase domain of the *KIT* gene are predominant in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Sci* 2008; 99(4): 799-804.
 13. **Gramza AW, Corless CL, Heinrich MC.** Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2009; 15(24): 7510-7518.
 14. **Agaram NP, Besmer P, Wong GC, et al.** Pathologic and molecular heterogeneity in imatinib-stable or imatinib-responsive gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 170-181.
 15. **Wardelmann E, Thomas N, Merkelbach-Bruse S, et al.** Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumors caused by multiple *KIT* mutations. *Lancet Oncol* 2005; 6: 249-251.
 16. **Liegl B, Kepten I, Le C, et al.** Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *J Pathol* 2008; 216(1): 64-74.
 17. **Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, et al.** Polyclonal evolution of multiple secondary *KIT* mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* 2006; 12(6): 1743-1749.
 18. **Maleddu A, Pantaleo MA, Nannini M, et al.** Mechanisms of secondary resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors (Review). *Oncology Reports* 2009; 21: 1359-1366.
 19. **Antonescu CR, Romeo S, Zhang L, et al.** 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. *J Am Surg Pathol* 2013; 37(3): 385-392.
 20. **Agaram NP, Wong GC, Guo T, et al.** Novel V600E *BRAF* mutations in imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47(10): 853-859.
 21. **Zheng S, Huang K, Jia J, et al.** Rhabdomyosarcomatous differentiation in gastrointestinal stromal tumors after imatinib resistance: a potential diagnostic pitfall. *Exp Biol Med* 2013; 238: 120-124.
 22. **Nannini M, Astolfi A, Urbini M, et al.** Integrated genomic study of quadruple-wt GIST (*KIT*/*PDGFRA*/*SDH*/*RAS* pathway wild type GIST). *BMC Cancer* 2014; 14: 685.
 23. **Daum O, Šedivcová M.** Gastrointestinální stromální tumor (GIST): Pokroky do roku 2013. *Cesk Patol* 2014; 50(2): 76-80.
 24. **Hostein I, Faur N, Primois Ch, et al.** *BRAF* mutation status in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 141-148.
 25. **Rossi S, Sbaraglia M, Campo Dell'Orto M, et al.** Concomitant *KIT*/*BRAF* and *PDGFRA*/*BRAF* mutations are rare events in gastrointestinal stromal tumors. *Oncotarget* 2016; 7(21): 30109-30118.
 26. **Agaimy A, Terracciano LM, Dirnhofer S, et al.** V600E *BRAF* mutations are alternative early molecular events in a subset of *KIT*/*PDGFRA* wild-type gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Pathol* 2009; 62: 613-616.
 27. **Miranda C, Nucifora M, Molinari F, et al.** *KRAS* and *BRAF* mutations predict primary resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2012; 18(6): 1769-1776.
 28. **Daniels M, Lurkin I, Pauli R, et al.** Spectrum of *KIT*/*PDGFRA*/*BRAF* mutations and phosphatidylinositol-3-kinase pathway gene alterations in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Cancer Lett* 2011; 312(1): 43-54.
 29. **Belinsky MG, Skorobogatko YV, Rink L, et al.** High density DNA array analysis reveals distinct genomic profiles in a subset of gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48(10): 886-896.
 30. **Lasota J, Xi L, Coates T, et al.** No *KRAS* mutations found in gastrointestinal stromal tumors (GISTs): molecular genetic study of 514 cases. *Mod Pathol* 2013; 26: 1488-1491.
 31. **Beadling C, Patterson J, Justusson E, et al.** Gene expression of the IGF pathway family distinguishes subsets of gastrointestinal stromal tumors wild type or *KIT* and *PDGFRA*. *Cancer Med* 2013; 2(1): 21-31.
 32. **Miettinen M, Lasota J.** Succinate dehydrogenase deficient gastrointestinal stromal tumors (GISTs) – a review. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 53: 514-519.
 33. **Wang YM, Gu MI, Ji F.** Succinate dehydrogenase-deficient gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2015; 21(8): 2303-2314.
 34. **Tornillo L.** Gastrointestinal stromal tumor – involving concept. *Front Medicine* 2014; 1:43.
 35. **Pantaleo MA, Astolfi A, Urbini M, et al.** Analysis of all subunits, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD* of the succinate dehydrogenase complex in *KIT*/*PDGFRA* wild-type GIST. *Eur J Hum Genet* 2014; 22(1): 32-39.
 36. **Celestino L, Lima J, Faustino A, et al.** Molecular alterations and expression of succinate dehydrogenase complex in wild-type *KIT*/*PDGFRA*/*BRAF* gastrointestinal stromal tumors. *Eur J Hum Genet* 2013; 21(5): 503-510.
 37. **Lasota J, Wang Z, Kim SY, et al.** Expression of the receptor type 1 insuline-like growth factor (*IGF1R*) in gastrointestinal stromal tumor. An immunohistochemical study of 1078 cases with diagnostic and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 2013; 37(1): 114-119.
 38. **Janeway KA, Zhu MJ, Barretina J, et al.** Strong expression of *IGF1R* in pediatric gastrointestinal stromal tumors without *IGF1R* genomic amplification. *Int J Cancer* 2010; 127(11): 2718-2722.
 39. **Belinski MG, Rink L, Cai KQ, et al.** 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* 2015; 15: 887.
 40. **Zhao X, Yue Ch.** Gastrointestinal stromal tumor. *J Gastrointest Oncol* 2012; 3(3): 189-208.
 41. **Bajciová V.** Pediatrický GIST. *Onkologie* 2016; 10(5): 218-223.
 42. **Garner AP, Gozgit JM, Anjum R, et al.** Ponatinib inhibits polyclonal drug-resistant *KIT* oncoproteins and shows therapeutic potential in heavily pretreated gastrointestinal stromal tumor (GIST) patients. *Clin Cancer Res* 2014; 20(22): 5745-5755.
 43. **Schroeder B, Li Z, Cranmer LD, et al.** Targeting gastrointestinal stromal tumors: the role of regorafenib. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 3009-3016.
 44. **George S, Wang Q, Heinrich MC, et al.** 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. *J Clin Oncol* 2012; 30(19): 2401-2407.



Contents lists available at ScienceDirect

Pathology - Research and Practice

journal homepage: www.elsevier.com/locate/prp

Gastrointestinal stromal tumors – Summary of mutational status of the primary/secondary KIT/PDGFR α mutations, BRAF mutations and SDH defects

Alena Kalfusova^{a,*}, Zdenek Linke^b, Marketa Kalinova^a, Lenka Krskova^a, Irena Hilska^a, Jana Szabova^a, Ales Vicha^c, Roman Kodet^a

^a Department of Pathology and Molecular Medicine, Charles University - 2nd Faculty of Medicine and Faculty Hospital Motol, Czech Republic

^b Department of Oncology, Charles University - 2nd Faculty of Medicine and Faculty Hospital Motol, Czech Republic

^c Department of Paediatric Haematology and Oncology, Charles University - 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Primary/secondary KIT/PDGFR α mutations
BRAF mutations
SDH complex
Resistance

ABSTRACT

The most important findings revealing pathogenesis, molecular characteristics, genotyping and targeted therapy of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are activated oncogenic mutations in *KIT* and *PDGFR α* genes. Imatinib mesylate (IM), which inhibits both KIT and PDGFR α receptors, significantly improved treatment of advanced (metastatic, recurrent, and/or inoperable) GISTs. However, in a significant number of patients the treatment fails due to the primary or secondary resistance to targeted therapy. Most common cause of secondary resistance is a presence of secondary mutations. Approximately 15% of adult patients with GISTs are negative for mutations in *KIT* or *PDGFR α* genes. These so-called wild-type GISTs appear to be characterized by other oncogenetic drivers, including mutations in *BRAF*, *RAS*, *NF1* genes, and subunits of succinate dehydrogenase (SDH) complex.

In the present study we investigated 261 tumour specimens from 239 patients with GIST. Primary mutations were detected in 82 % tumor specimens. 66 of them were in *KIT*, and 16 % in *PDGFR α* genes. Remaining 18 % were *KIT/PDGFR α* wild-type. Secondary *KIT* mutations were detected in 10 from 133 (7 %) patients treated with IM. We examined secondary *KIT* mutations in exons 13 and 17 and secondary *PDGFR α* mutation in exon 18 in sixteen progressive tumors and/or metastasis (from overall 22 samples). We identified *BRAF* V600E point mutation in 4 % of *KIT/PDGFR α* wild-type GIST patients. Moreover, we analysed SDH complex mutations in 4 younger patients (15, 33, 37, and 45 years old) from 44 patients without *KIT*, *PDGFR α* , and *BRAF* mutations. Two patients (a 37-year old man, and a 33-year old woman) had defects of the SDH complex.

Our findings of mutational status of the primary and secondary *KIT/PDGFR α* mutations in patients with GIST confirm mechanisms of primary and secondary resistance, and also intralesional and interlesional heterogeneity of secondary mutations within and between progressive lesions. Moreover, detection of V600E *BRAF* mutation and defects of SDH complex in *KIT/PDGFR α* wild-type GISTs confirm their activation and allow for a selection of targeted therapy.

1. Introduction

The most important finding contributing to identification of pathogenesis, molecular characteristics, genotyping and targeted therapy of gastrointestinal stromal tumours (GISTs) was the presence of activated oncogenic mutations in the *KIT* [1] and *PDGFR α* [2] genes. Tyrosine kinase inhibitor (TKI) Imatinib mesylate (IM) (Gleevec®/Gleevec®, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland), which inhibits both KIT and PDGFR α receptors, significantly improved treatment of

advanced (metastatic, recurrent, and/or unresectable) GIST [3]. Unfortunately, most patients on IM treatment will eventually develop resistance to this agent as well as to other drugs such as sunitinib, regorafenib – used in the 2nd and 3rd line TKI treatment. Resistance can be divided into primary (early) and secondary (late). Approximately 10–15 % of patients with GIST fail to respond on their initial exposure to IM [4]. Most common cause of the primary resistance to IM rests in the tumor inherent mutations in the molecular target of the drug [4]. About 50 % of the patients who benefit initially from IM treatment

* Corresponding author at: Department of Pathology and Molecular Medicine, Charles University - 2nd Faculty of Medicine and Faculty Hospital Motol V Uvalu 84, 150 06, Prague 5, Czech Republic.

E-mail address: alena.kalfusova@fnmotol.cz (A. Kalfusova).

<https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152708>

Received 8 July 2019; Received in revised form 18 October 2019; Accepted 19 October 2019

0 3 4 4 - 0 3 3 8 / © 2 0 1 9 Elsevier GmbH. All rights reserved.

develop eventually secondary/acquired resistance [5]. The main cause of development of the secondary resistance (50–80 %) is a presence of secondary mutations. Secondary mutations are single substitutions and affect different exons than the primary mutations but on the same allele [6–8]. Secondary mutations may arise also in a distinct receptor than that affected by primary mutations but this phenomenon is uncommon [9]. An unfavourable factor of the tumor resistance is a high intralesional and interlesional variability of the secondary mutations [6]. Approximately 15 % of adult GISTs are negative for mutations in *KIT* or *PDGFRA* genes. These so-called wild-type GISTs were identified with a number of other oncogenetic drivers, including mutations in *BRAF*, *RAS*, *NF1* genes, and subunits of the succinate dehydrogenase complex [10].

In the present study, we aimed to disclose the frequency and mutational status of the primary mutations of *KIT/PDGFRA*, and most importantly, secondary *KIT/PDGFRA* mutations in patients with GIST analysed in our department. Mutational status of the patients with secondary resistance was correlated with their clinical and pathologic data.

2. Materials and methods

2.1. Patients

The study was performed using specimens of primary GISTs diagnosed at the Department of Pathology and Molecular Medicine. We analysed 261 tumor specimens from 239 patients with GIST. From 239 investigated patients, 125 (52 %) were men and 114 (48 %) women. Median age was 68 years (range, 15–100 years). The primary tumors were predominantly in the stomach (104 tumor samples, 40 %). 46 (18 %) arose in the small intestine, 6 (2 %) in the esophagus, and 9 (3 %) in the colon and rectum. Extragastrintestinal samples formed 6.5 % (17 cases). Within the latter group the tumors were localised in the omentum, peritoneum, mesentery, epigastrium, and ovary. Further, we examined 59 (23 %) metastatic specimens (in the liver, peritoneal cavity, mesentery, and kidney). In 7.5 % of cases (20 samples) data as to the primary or metastatic site were not available. From 261 tumor samples, 188 (72 %) had spindle cell morphology, 48 (18 %) were epithelioid, and 20 (8 %) tumors displayed a mixed morphology. The results of morphological examinations in 5 cases (2 %) were not specified.

All patients enrolled in the study were processed through a standard histopathological investigation involving immunohistochemical detection of CD117, CD34, DOG-1, smooth muscle actin, desmin, H-caldesmon, S100 protein, and Ki-67 (Fig. 1). The results were considered to be a basis for a further molecular evaluation, and are not a subject reported in this article. Molecular diagnosis focused on primary and secondary mutations in *KIT* and *PDGFRA* genes with regards to sensitivity or primary/secondary resistance to IM targeted treatment. A group of *KIT/PDGFRA* wild-type GISTs is characterized by a complexity and a high heterogeneity of molecular features, resistance to IM, and it is a challenge for new molecular-targeted therapeutic strategies. Because of comprehensive molecular diagnosis of GISTs, we extended mutational analysis to *BRAF* mutations and defects of *SDH* complex.

Diagnostic tumor tissues were collected and tested for mutational status after an informed consent by the patients, and with the approval of the Ethical committee.

2.2. Sequence analysis

We performed mutational analysis of the *KIT* and *PDGFRA* genes from formalin-fixed, paraffin embedded (FFPE) (210 samples, 81 %) or fresh frozen tumor (51 samples, 19 %) specimens. Total DNA for molecular investigation from archival (FFPE) tumor tissues was extracted using QIAamp DNA Tissue FFPE Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). In case of

frozen tissues, DNA was extracted using Tri-Reagent (Invitrogen Ltd., Carlsbad, CA, US) according to the manufacturer's instruction. Exons 9, 11, 13, and 17 of the *KIT* gene and exons 12, 14, and 18 of the *PDGFRA* gene were amplified using PCR BIO HS Taq Mix Red (PCR Biosystems Ltd., London, UK) as previously described [11]. Amplification conditions and sequence of primers of the *BRAF* gene were used as published by Hostein et al. [12]. Amplification of the exon 14 (*KIT* gene) was performed as reported by Antonescu et al. [6]. The PCR products were purified with GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit (GENEAID Biotech Ltd., New Taipei, Taiwan). Bidirectional DNA sequencing of the complete exons was done with BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US.). Cycle sequencing products were purified using NucleoSEQ® Columns (Macherey-Nagel GmbH&Co. KG, Düren, Germany) and analysed on GENETIC ANALYSER 3130 capillary electrophoresis system (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US.). All sequence alterations were confirmed by an independent PCR amplification and sequencing to exclude PCR artefacts. The identity of the relevant nucleotide sequences were confirmed by database search. All investigated samples, which were analysed for presence of *KIT*, *PDGFRA* and *BRAF* mutations were morphologically reviewed. All included more than 20 % of tumor cells. Thus, we were able to use the technique of Sanger sequencing for mutational analyses. In cases with confirmation of primary *KIT* mutation and two different secondary *KIT* mutations in the same tumor nodule, two point *PDGFRA* mutations in exon 14, and *PDGFRA* mutations in exons 14 and 18, the molecular finding using the above described techniques was confirmed by Next-generation sequencing (NGS) - (TruSight® Tumor 26, Illumina® Inc. San Diego, CA, US.). NGS data were analyzed using software Illumina VariantStudio™ 3.0, Illumina® Inc. San Diego, CA, US.

3. Results

3.1. Primary *KIT/PDGFRA* mutations

Of the 261 specimens from 239 patients with GISTs we identified primary mutations in 214 (82 %) tumor specimens from 193 (80 %) patients. Primary mutations in the *KIT* gene were discovered in 173 (66 %) tumor samples from 154 patients, and in the gene *PDGFRA* in 41 (16 %) samples from 39 patients. The remaining 47 (18 %) specimens from 46 (20 %) patients were *KIT/PDGFRA* wild-type.

In 154 tumor samples from 142 patients we detected primary *KIT* mutations in exon 11 (59 %). Simple deletions were found most frequent (54 samples from 51 patients, 35 %). Deletions were located between codons 551–565, and a spectrum of in-frame deletions included 3–51 base pairs. Most commonly we detected deletions of two codons (557–558) (19 cases). Single substitutions were discovered in 42 specimens from 40 patients (27 %). The substitutions were localized in three codons: 557, 559 and 560, with exception of 5 cases (point mutations present in codons 558, 566, and 576). Duplications (internal tandem duplications) were third most common mutations in exon 11 (11 cases, 7 %). Simple insertions were present in 3 patients (2 %). The inserted codons were 558 and 559 (same insertions in 2 patients). Complex mutations (deletion-insertion, duplication-substitution, deletion-substitution) were found in 44 samples (29 %). These mutations consisted of one to several nucleotide deletion or duplication coexisting with small insertions or substitutions, respectively. Primary mutations in *KIT* exon 9 were found in 13 specimens from 10 patients (5 %). In all of these specimens we detected identical 2 codon duplication introducing a tandem alanine-tyrosine pair (AY502-503). Single nucleotide substitutions in *KIT* exon 13 were identified in 6 specimens of 2 patients (2 %). In all these 6 specimens there were same point mutations, which involve codon 642 (K642E). No primary *KIT* mutations were found in exon 17.

Most common primary *PDGFRA* mutations (34 samples/32 patients,

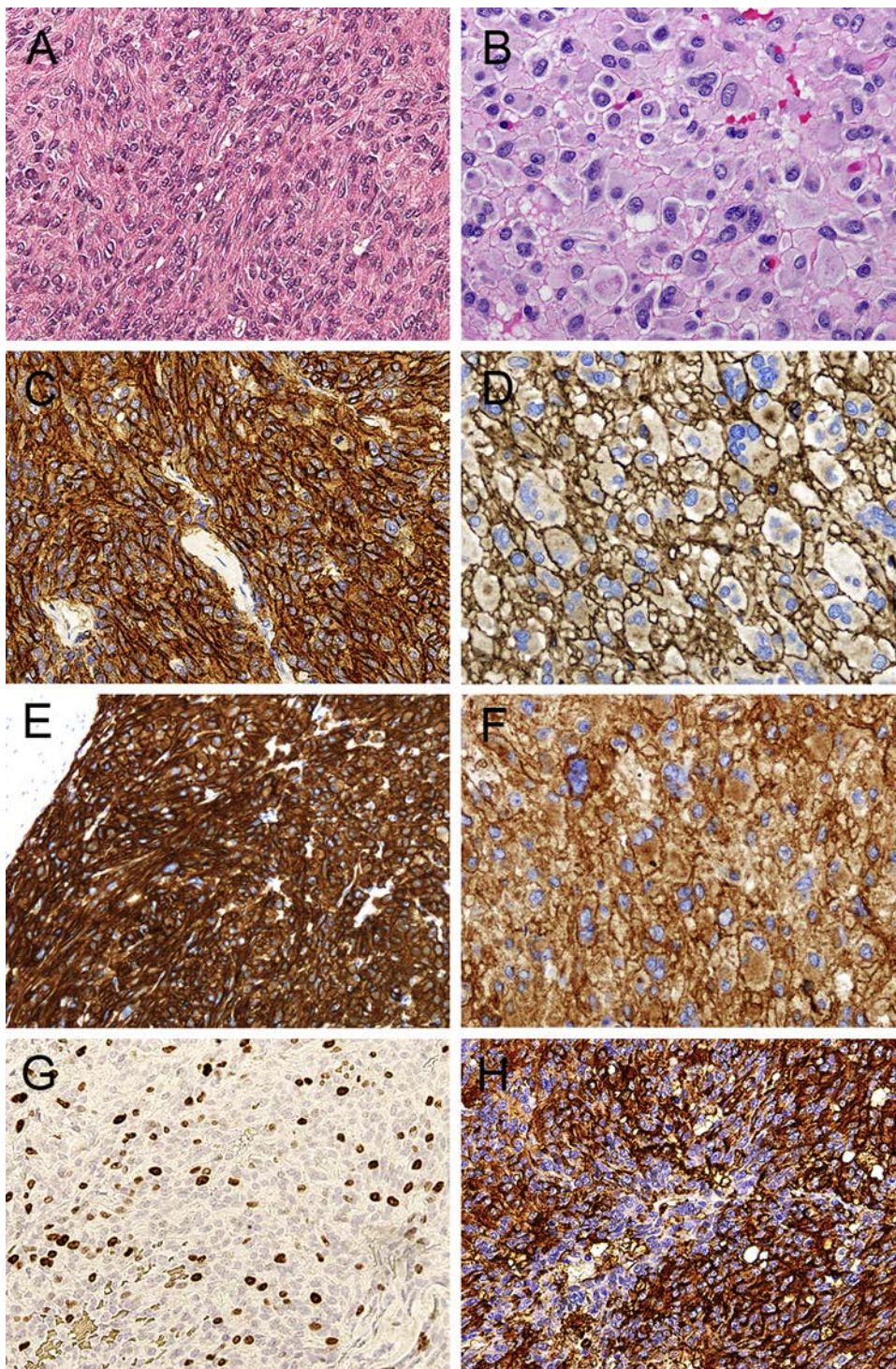


Fig. 1. GIST – histopathology findings: A- B. Haematoxylin-eosin staining: A. Spindle cell GIST; B. Epitheloid GIST; C.- H. Immunohistochemical staining: C. CD117, spindle cell GIST, a strong membrane and a weaker cytoplasmic positivity; D. CD34, epitheloid GIST, a strong membrane positivity; E. DOG1, spindle cell GIST, membrane and cytoplasmic positivity; F. DOG1, epitheloid GIST, membrane and a weak cytoplasmic positivity; G. Ki-67 antigen, spindle cell GIST, nuclear positivity in about 10% of the tumor cell population; H. Smooth muscle actin in a combined spindle and epitheloid GIST, a strong cytoplasmic positivity (relatively an uncommon feature). Kalfusová et al.

13 %) were localized in exon 18. A majority of *PDGFRA* exon 18 mutations were single nucleotide substitutions in codon 842 (25 samples/23 patients, 75 %), leading to D842 V mutation. D842 V primary mutation is resistant to targeted IM therapy. Simple deletions and deletions-insertions in exon 18 were detected in 9 patients (25 %). Mutations in *PDGFRA* exon 12 were detected in 5 samples from 5 patients (2 %). There were missense mutations leading to D561 V substitution (3 cases). However, simple deletion (one case), and in frame deletion and insertion were also identified (one case). Mutations in *PDGFRA* exon 14 are found rarely. We detected nucleotide substitutions in two patients. One patient had two point mutations in one biopsy

specimen, specifically M642 T and H659 N (see data A in Supplementary Table). Both cases with *PDGFRA* mutations in exon 14 were confirmed using NGS technique.

3.2. Secondary *KIT*/*PDGFRA* mutations

Secondary *KIT* mutations were detected in 10 from 133 (7 %) patients treated with IM. Overview of the secondary mutations and clinicopathological data are summarized in [Tables 1 and 2](#). We investigated 16 progressive lesions (from a total 22 tumor tissue samples) and found secondary *KIT* mutations in exons 13 and 17, and secondary *PDGFRA*

Table 1
Summary of the primary and secondary KIT/PDGFR mutations.

PATIENT No.	SEX	TUMOR LOCALIZATION	TUMOR MORPHOLOGY	TIME OF EXAMINATION	PRIMARY MUTATION	EXAMINATED SAMPLES No.	SECONDARY MUTATION
1.	F	primary tumor (peritoneal cavity)	spindle cell morphology, high mitotic activity	September 2009	KIT gene exon 9 (DUP AY 502/503)	1	-
		relapse of the disease specimen from retroperitoneum	spindle cells with circular nucleus, focal epithelioid cells with perinuclear vacuolization of cytoplasm and greater nucleus	April 2016	KIT gene exon 9 (DUP AY 502/503)	3 nodules	D820Y exon 17 KIT gene - D820Y exon 17 KIT gene
2.	M	primary tumor (stomach)	spindle cells with vacuolization of cytoplasm/ in part of tumor cells with epithelioid appearance	June 2006	KIT gene exon 11 (SUB/DEL)	1	-
		relapse of the disease specimen from stomach	part of tumor with spindle cells/part with greater polygonal cells	April 2009	KIT gene exon 11 (SUB/DEL)	1	V654A exon 13 KIT gene
3.	M	metastasis into subcutaneous	spindle cell morphology, nuclear atypia and high mitotic activity	February 2007	KIT gene exon 11 (SUB/DEL)	1	-
		2 samples from necropsy	spindle cell morphology	June 2008	KIT gene exon 11 (SUB/DEL)	2 nodules	N822 K exon 17 KIT gene N822 K exon 17 KIT gene
4.	M	relapse of the small intestine tumor	spindle cell morphology focal tumor cell vacuolization	February 2007	KIT gene exon 11 (ITD)	1	V654A exon 13 KIT gene
5.	M	relapse of the disease	spindle cell morphology	August 2007	KIT gene exon 11 (SUB/DEL)	1	V654A exon 13 KIT gene
6.	M	primary tumor (peritoneal cavity)	spindle cell morphology with focal epithelioid morphology mitotically active cells	October 2002	KIT gene exon 11 (SUB)	1	-
		metastasis of the liver	spindle cell morphology with focal epithelioid morphology	December 2008	KIT gene exon 11 (SUB)	1	V654A exon 13 KIT gene
7.	M	specimen from abdominal wall	spindle cell morphology with focal nuclear atypia high mitotic activity	October 2014	KIT gene exon 11 (SUB)	1	D820E exon 17 KIT gene N822 K exon 17 KIT gene
8.	M	relapse of the disease (colon)	polygonal cells with oval-shaped nucleus and nucleolus	March 2011	KIT gene exon 11 (INDEL)	1	D823Y exon 17 KIT gene
		relapse of the disease (rectum)	polygonal cells with epithelioid morphology focal mitotically active	April 2012	KIT gene exon 11 (INDEL)	1	D823Y exon 17 KIT gene
9.	F	residuum after chemotherapy	mixed morphology (spindle/ epithelioid)	May 2005	KIT gene exon 13 (SUB) K642E	1	-
		relapse of the disease	epithelioid morphology	May 2005	KIT gene exon 13 (SUB) K642E	1	-
		metastasis of the abdominal wall	spindle morphology	October 2008	KIT gene exon 13 (SUB) K642E	1	N822 K exon 17 KIT gene
		metastasis of the peritoneum	spindle morphology	October 2008	KIT gene exon 13 (SUB) K642E	1	D820 G exon 17 KIT gene
		metastasis of the retroperitoneum	spindle morphology, slight nuclear atypia high mitotic activity	May 2009	KIT gene exon 13 (SUB) K642E	1	D820A exon 17 KIT gene
10.	M	expansion in omentum	epithelioid morphology with focal spindle cells, nuclear atypia mitotically active	September 2013	PDGFRA gene exon 14 (SUB) P653L	1	D846H exon 18 PDGFRA gene

mutation in exon 18, respective. We did not find secondary *KIT* mutations in exon 14. Nine patients died of the disease progression, one patient with the disease (No. 9) committed suicide. In patient No. 1 we examined three tumor tissue samples during the disease progression. Interestingly, in two tumor samples of the latter case we detected two identical secondary *KIT* mutations in codon 820 (ex 17), but a third tumor nodule was *KIT* wild-type. This was the only patient with secondary mutations whose GIST also changed morphological appearance. A thoroughly sampled tumor from September 2009 showed spindle cell morphology; but specimen from April 2016 showed mixed spindle/epithelioid morphology. Secondary V654A mutation (exon 13) was revealed in four patients. Secondary D823Y mutation was detected in patient No. 8. We analysed two biopsy specimens of the latter patient. First specimen was examined on March 2011 (tissue of a progressive

tumor – recurrent GIST in the colon) and a second on April 2012 (a tumor tissue of the rectum). Both samples showed the same primary *KIT* mutation in exon 17 (insertion and deletion) and a secondary mutation in exon 17 (D823Y). In patient No. 7 we identified two different secondary point mutations (D820E, and N822 K) in the same lesion (a needle biopsy of the neoplastic nodule from the abdominal wall). Both secondary *KIT* mutations in exon 17 were confirmed using NGS technique (see data B in Supplementary Table). Patient No. 9 had three different secondary *KIT* missense mutations in exon 17 (see Fig. 2), each from a different tumor sample (metastasis in the abdominal wall, metastasis in the peritoneum - both from October 2008, and metastasis in the retroperitoneum from May 2009). We identified two point *PDGFRA* mutations in patient No. 10. The first single substitution was detected in codon 653 (specifically P653L, exon 14) and a second mutation in

Table 2
Summary of the clinicopathological data of patients with secondary mutations.

PATIENT No.	DIAGNOSIS	1st LINE THERAPY	PROGRESSION	2nd/3rd LINE THERAPY	FOLLOW UP
1.	09/09 tumor of the peritoneal cavity ●PM	10/09-10/10 adjuvant IM	05/11 relapse of the disease 07/11 palliative IM 04/14 escalation of IM (800 mg/day) (partial regression) 11/15 progression	12/15 2nd line: SM (primary progression) 04/16 relapse of the disease ●●PM and SeM 05/16 3rd line: regorafenib 5/17 progression	DOD 2017
2.	06/06 inoperable tumor of the stomach ●PM	09/06 paliative IM 400 mg/day regression until 05/07	10/07 progression (PET/CT) 02/09 local relapse (radical resection) ●●PM and SeM 06/09 paliative IM (400 mg/day) decrease IM (200 mg/day): renal insufficiency 08/09 IM interrupted		DOD 01/2010
3.	04/01 radical resection of the tumor (jejunum and ileum)	06/04 initial dose of IM (400 mg/day) 06/04-07/06 stable disease	07/06 progression 08/06 escalation of IM (800 mg/day) 02/07 metastases into subcutaneous ●PM 04/07 progression of disease	04/07-06/07 2nd line: SM 07/07 progression on SM	DOD 06/2008 ●●PM and SeM
4.	06/01 surgical resection of the tumor (small intestine) 02/04 metastasis	05/04 initial dose of IM (partial remission)	01/07 progression 01/07 escalation of IM (800 mg/day) 02/07 relapse of the disease ●PM and SeM		DOD 02/2007
5.	10/02 malignant GIST 07/03 metastasis	08/03 initial dose of IM (strong partial remission) 06/04 regression of tumor			since 06/2004 loss of contact (according last information died) investigation biopsy from 08/07 ●PM and SeM
6.	01/01 surgical resection of tumor (peritoneal cavity) 10/02 progression in abdominal cavity ●PM	01/03 IM 400 mg/day 10/03 300 mg/day (hepatotoxicity) 11/03 progression of disease	01/05-11/05: 400 mg/day progression of the disease 11/05-02/06: 600 mg/day progression of the disease 02/06-08/06: 800 mg/day progression of the disease 08/06 IM interrupted	09/06 2nd line: SM 50 mg/day (4 weeks) 10/06 reduction of SM 37.5 mg/day (hepatotoxicity) SM until 3/07 progression 05/07-02/08 3rd line: nilotinib 02/08 progression 03/08-04/09 IM 800 mg/day progression of the disease 12/08 biopsy metastasis of the liver ●●PM and SeM 05/09 chemotherapy 08/09 progression of the disease	09/2009 loss of contact (according last information died)
7.	10/06 advanced GIST of the peritoneal cavity (with metastases in the liver)	10/06 IM 400 mg/day	03/10 local progression 04/10 escalation of IM dose 800 mg/day 10/10 local progression	08/11 2nd line: SM 50 mg/day 05/13 progression 05/13 started 3rd line: regorafenib 10/13 finish regorafenib because of progression 08/14 salvage therapy by IM 09/14 interrupted 10/14 palliative surgery ●PM and SeM	DOD 2014
8.	03/05 resection of the tumor (colon)	06/07 IM 400 mg/day	03/11 local progression ●PM and SeM 04/12 surgical resection of tumor ●●PM and SeM 11/12 remission (PET/CT) 02/13 subileosis status 03/13 kidney failure inoperable GIST	03/13 2nd line: SM 50 mg/day massive progression 3rd line: regorefenib	DOD 11/2013
9.	since 1991 pain of abdomen 1996 surgery of small intestine 04/05 2nd relapse ●PM 04/06 3rd relapse ●●PM	09/06 IM 400 mg/day (complete remission) 10/08 progression ●●●●●●●● PM and SeM/PM and SeM	05/09 surgery of the metastases ●●●●●PM and SeM 06/09 escalation of the IM (800 mg/day) progression of the disease	10/09 2nd line: SM (50 mg/day) progression of the disease 5/10 salvage IM (600 mg/day)	Suicide 07/2012

(continued on next page)

Table 2 (continued)

PATIENT No.	DIAGNOSIS	1st LINE THERAPY	PROGRESSION	2nd/3rd LINE THERAPY	FOLLOW UP
10.	09/13 tumor of the omentum ●PM and SeM	10/13-12/13 IM 400 mg/day 12/13 IM 300 mg/day IM interrupted (urinary inflammation and bronchial pneumonia)	progression of the disease before IM therapy/primary progression?	palliative therapy	DOD 03/2014

Legend: ● first molecular analysis, ●● second molecular analysis, ●●● third molecular analysis, ●●●● fourth molecular analysis, ●●●●● fifth molecular analysis, DOD – died on disease, IM – imatinib mesylate, SM – sunitinib malate, PM – primary mutation, SeM- secondary mutation.
Note: In each molecular analysis primary and secondary mutations were detected and verified.

codon 846 (specifically D846H, exon 18) of the *PDGFRA* gene (see data C in Supplementary Table). Only one progressive tumor from the omentum (September 2013) was available for molecular investigation. Therefore, we were not able to distinguish whether this case had two primary *PDGFRA* mutations or whether these mutations represented one primary and one secondary *PDGFRA* mutation. We suppose that missense mutation in exon 14 (P653 L) may be a primary mutation, and point mutation in exon 18 (D846 H) a secondary mutation. All the primary mutations were always detectable along with the secondary mutations in each tumor.

3.3. *BRAF* mutations

We identified *BRAF* V600E point mutation in two patients (a 30-year old woman, and a 77-year old man) out of 46 patients (4 %) without *KIT* and *PDGFRA* mutations. Both patients had the tumor localized in the small bowel. There were differences in the morphology and results of immunohistochemical investigations in both tumors. In the first case, the tumor showed a spindle cell morphology, positivity of CD117, and in the second case the tumor had a mixed spindle cell/epithelioid morphology, and it was CD117 negative.

3.4. *SDH* complex mutations

In four younger (15, 33, 37 and 45-year old) patients out of 44 patients without *KIT*, *PDGFRA*, and *BRAF* mutations we examined DNA for the presence of *SDH* complex mutations (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC* and *SDHD* genes). Two patients (a 37-year old man, and a 33-year old woman) had defects in the *SDH* complex. Analysis of the other two patients did not establish any defects of this complex. Defects of the *SDH* complex were detected using MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) technique. In a specimen from the 37-year old man we found deletion of the whole *SDHB* gene, deletion of exons 2–4 of the *SDHC* gene, and deletion of exons 2–4 of the *SDHD* gene. This patient had GIST of the small intestine which presented with a number of small tumors in a length of 100 cm in the intestine, and they all had spindle cell morphology. Analysis of DNA sample from the 33-year old woman showed deletion of *SDHAF2* exons 1–4 and deletion of *SDHD* exons 1–4. Tumor cells of this patient showed spindle cell morphology with markedly anaplastic cells. The tumor was bulky and it was localized in the pelvic peritoneum.

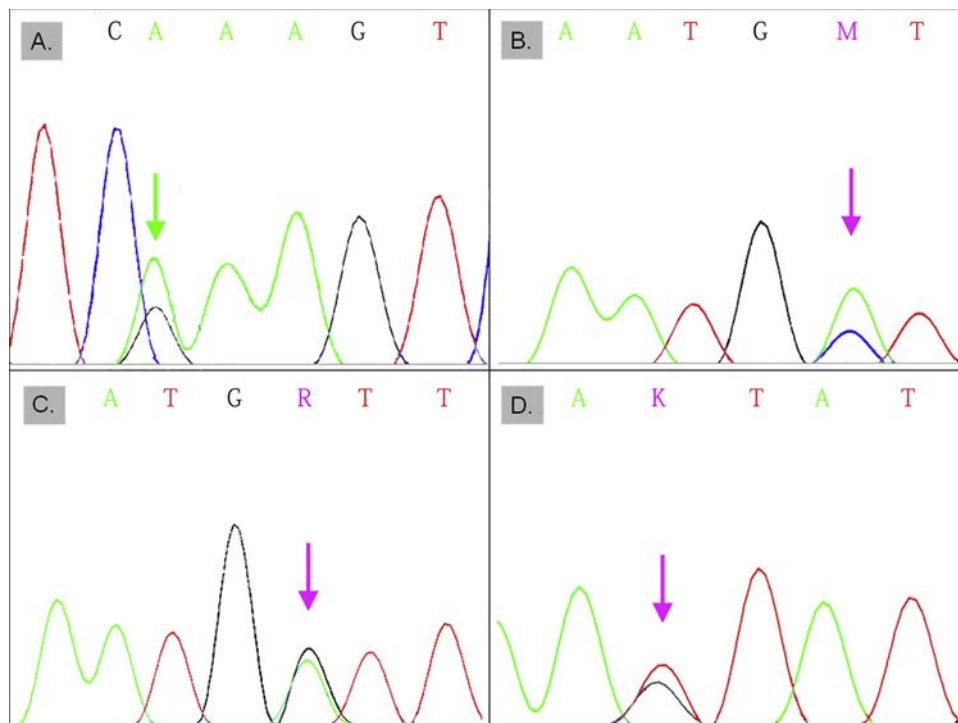


Fig. 2. Sequencing chromatogram of mutational analysis of the *KIT* gene (patient No. 8). A. primary *KIT* mutation in exon 13 (K642E), B. secondary *KIT* mutation in exon 17 (N822 K), biopsy specimen from metastasis of the abdominal wall, October 2008, C. secondary *KIT* mutation in exon 17 (D820 G), biopsy specimen from metastasis of the peritoneum, October 2008, D. secondary *KIT* mutation in exon 17 (D820A), biopsy specimen from metastasis of retroperitoneum, May 2009.

4. Discussion

GISTs constitute a majority of primary mesenchymal tumors of the gastrointestinal system [13]. The most powerful predictor of targeted therapy efficacy of the GISTs is *KIT* and *PDGFRA* gene mutational status [14,15]. In this study we detected primary *KIT*/*PDGFRA* mutations in 82 % of tumor tissue specimens. The vast majority of *KIT* mutations are present in exon 11 [16]. Mutations in exon 11 affect autoregulatory function of *KIT* protein, and promote spontaneous kinase activation [17]. *KIT* exon 9 mutations, characterized by A502-Y503 codon tandem duplications are almost exclusively localized in intestinal tract. They have been associated with a more aggressive phenotype [16] and lead to spontaneous receptor dimerization [17]. Primary mutation in exon 13 (K642E) encoding the ATP-binding region are rare and may be activating by alteration of the three-dimensional structure of the mutant protein [18]. Mutations in exon 17 encoding the activation loop of the kinase seem to stabilize the active conformation [17]. *PDGFRA* mutations are mutually exclusive with *KIT* mutations. These mutations represent a mechanism alternative to *KIT* mutation for pathologic activation of tyrosine kinase receptor signalling pathways. Mutations in *PDGFRA* gene affecting the most common the activation loop (exon 18), and rarely in juxtamembrane domain (exon 12) and kinase I domain (exon 14) [19,20]. A majority of *PDGFRA* exon 18 mutations were single nucleotide substitution in codon 842 (75 %), leading to D842 V mutation. Although the most common D842 V *PDGFRA* mutation is intrinsically imatinib resistant, approximately 30 % of the *PDGFRA*-mutated GISTs other than D842 V, are known to be potentially imatinib sensitive [21]. Mutations in exon 12 are associated with good response to IM [20]. In exon 14 is described one single rare mutation (N659 K) [20].

Secondary resistance to IM is a critical problem in patients with advanced GISTs [3]. Secondary *KIT* mutations associated with IM resistance are preferentially located in the first (TK1, encoded by *KIT* exons 13 and 14), or in the second (TK2, encoded by *KIT* exons 17 and 18) *KIT* tyrosine kinase domain [14,22,23]. In the present study we identified secondary V654A mutation (exon 13, *KIT* gene) in four patients (4/9). Furthermore, we found secondary *KIT* mutations in exon 17 in five patients (5/9). Unlike primary IM resistance, secondary resistance is most often associated with expansion of the tumor clones with secondary *KIT* or *PDGFRA* mutations. More importantly, Gramza et al. [24] reported a clinical study of patients who progressed on IM therapy. They revealed that approximately 70 % of patients with acquired resistance had tumor clones with one or more secondary kinase mutations. Intralesional and interlesional heterogeneity of the secondary mutations were detected by others authors either [7,23,25,26]. These authors described an occurrence of two to five different secondary mutations in separate metastases or a presence more than one acquired mutation in the same metastasis. Furthermore, these authors pointed out that each tumor nodule under progression developed an individual clonal evolution. The most effective clones with regard of proliferation will lead to the tumor progression, which may vary in individual metastases. Beside establishing unfavourable prognosis of patients with secondary resistance some authors focused on patients with secondary *KIT* mutations in activation loop (A-loop, exon 17). Wang et al. reported molecular mechanisms, which stabilize the open active conformation of the A-loop [4]. They identified secondary *KIT* mutations in 4/10 imatinib-resistant GIST patients (40 %). Each of these four patients developed an identical type of secondary *KIT* mutation, specifically D823Y (exon 17). More importantly, Guo et al. [27] found that secondary *KIT* mutations in the A-loop are associated with sunitinib resistance. Furthermore, Yeh et al. [28] investigated the effect of targeted therapy using regorafenib (3rd line of targeted therapy) on prolonged PFS (progression free survival) in patients with *KIT* secondary mutations in exon 17. The authors focused on intra-tumoral and inter-tumoral heterogeneity which represents always a substantial problem for therapy. GIST heterogeneity may explain different treatment efficacies of regorafenib between patients with secondary *KIT*

mutations. Beside establishing new therapeutic strategies in patients with resistant or wild-type GISTs, some authors focused on alternative therapeutics targets [29,30].

In contrast to secondary *KIT* kinase mutation, secondary *PDGFRA* kinase mutation is much less common in imatinib-resistant GISTs [31]. In the present study, we found *PDGFRA* mutations in exon 14 (P653 L) and exon 18 (D846 H) in one patient (patient No. 10 with omental GIST, data C in Supplementary Table). Tumor cells in this case showed epitheloid morphology. Murayama et al. [32] focused on a patient with omental (extragastrointestinal) GIST and mutations in *PDGFRA* gene and reviewed data published in the literature. Authors reported that a majority of *KIT*-negative extra-gastrointestinal omental tumors is characterized by epitheloid cell morphology, and all cases of omental GISTs had mutations in *PDGFRA* gene.

Approximately 15 % of GISTs do not have detectable mutations in either *KIT* or *PDGFRA* genes. These *KIT*/*PDGFRA* wild-type GISTs are clinically indistinguishable from *KIT*/*PDGFRA* mutated GISTs. They have identical morphology, express high levels of *KIT* protein, and occur anywhere in the GI tract. Phosphorylated *KIT* is detectable in these tumors, suggesting that *KIT* is still activated, but tumor cells use alternative mechanisms of their activation [10]. Mutations of the *BRAF* gene are commonly detected in diverse benign and malignant tumors, including benign melanocytic nevi (81 %), melanomas (50–70 %), thyroid papillary carcinomas (35–60 %), colorectal adenomas/carcinomas (5–20 %), and other tumors [33]. V600E *BRAF* mutations were also reported in a subset of GISTs [34]. We identified primary V600E *BRAF* mutations in 2/46 of adult *KIT*/*PDGFRA* wild-type patients (4%). The frequency of V600E *BRAF* mutations in literature varies from 3.5 to 7% of the wild-type GISTs [33–38]. Jasek et al. concluded that mutational analysis of wild-type GISTs should include the *BRAF* gene because of their mutational status contributes to understanding of pathogenesis and might be important for therapy [37]. In contrast, Huss et al. [38] pointed out that *BRAF* mutations are rare events in wild-type GISTs. However, they underline an important role of *BRAF* inhibition as a therapeutic option to control the disease in advanced stages. The *BRAF* mutation causes both, primary resistance to imatinib treatment, and acquired resistance when it occurs as a secondary event in *KIT*/*PDGFRA*-mutated GISTs relapsing under therapy [39]. The aim of the present study was to ascertain whether secondary resistance of GIST patients without *KIT*/*PDGFRA* secondary mutations is generated by the presence of *BRAF* mutations. We analysed 76 patients under the treatment of IM. No *BRAF* mutations were observed. In contrast with our results, Agaram et al. [34] investigated presence of *BRAF* mutation in patients with secondary IM resistance. The resistant tumor clone of the patient harboured a primary *PDGFRA* mutation (deletion) and a secondary V600E *BRAF* mutation. Interestingly, Miranda et al. [40] reported GIST with dual *BRAF* and *KIT* activating mutations in an untreated patient. This finding challenges the concept of the *KIT*/*PDGFRA* and *BRAF* mutations are mutually exclusive in primary GISTs. None of the patients carrying concomitant mutations of *KIT* and *KRAS* or *BRAF* genes were treated with imatinib. These data suggest, that the concomitance of *KIT* and *BRAF* mutations might explain the resistance phenomena observed in a fraction of patients with GISTs carrying imatinib-sensitive *KIT* mutations (about 5 %) [39]. First study of treatment *BRAF* – mutated GIST was reported by Falchook 2013 et al. [41]. The authors described a patient with V600E *BRAF* mutated GIST treated with dabrafenib, a potent ATP-competitive inhibitor of *BRAF* kinase. After 8 months of therapy they identified tumor progression. Because of an intratumoral heterogeneity, which can be a factor in tumor adaptation and treatment failure, the authors analyzed three progressive lesions. All three lesions were clonally related by identical V600E *BRAF* mutations (and an aberration in *CDKN2A* gene). In one of the three lesions (lesion 1) they identified somatic gain-of-function *PIK3CA* mutation (H1047R). Lesions 2 and 3 were *PIK3CA* wild-type. Somatic *PIK3CA* mutation (H1047R) as well as a *CDKN2A* aberration may have contributed to the eventual resistance to treatment.

Approximately half of all wild-type GISTs show defects of SDH complex [10]. SDH deficiency characterizes subsets of several tumors (GISTs, paragangliomas, renal cell carcinomas, and pituitary adenomas) [42]. GISTs with the defect of SDH complex demonstrate specific pathological and clinical features, including the absence of activating mutations of *KIT* and *PDGFRA* genes, and primary resistance to imatinib [43]. They are always found in the stomach, show epithelioid morphology and are often multiple. Moreover, in contrast to GISTs with *KIT/PDGFRA* mutations, they metastasize to lymph nodes and show activation of insulin growth factor receptor (IGFR). They have an indolent course and even with liver metastases, the patients live long. A majority of pediatric GISTs have defects of SDH complex. SDH deficient GISTs comprise two syndromes: Carney triade and Carney-Stratakis syndrome [42,44]. We investigated defects of SDH complex in two patients. Interestingly, in one patient (33-year old woman), we ascertained deletion of exons 1–4 of the *SDHAF2* gene. *SDHAF2* (succinate dehydrogenase complex assembly factor 2) gene encodes a mitochondrial protein needed for the flavination of SDH complex subunit A (SDHA) required for activity of this complex. Mutations in this gene were described recently and they are associated with paraganglioma [45]. No paraganglioma was found in our patient so far. Celestino et al. [46] evaluated SDH mutations in a series of 25 primary sporadic wild-type *KIT/PDGFRA/BRAF* GISTs. They detected *SDHB* germline mutations in 12 % of the patients. All patients had no apparent personal or familial history of paraganglioma and/or pulmonary chondroma. Same results were reported by Janeway et al. [45]. These authors tested 34 wild-type GISTs without personal or family history of paraganglioma and found that 12 % of the patients had germline mutations in *SDHB* or *SDHC* genes.

According recent studies, GISTs lacking mutations in *KIT*, *PDGFRA*, *BRAF*, *SDH*, *NF1* and/or *RAS* signalling pathway may include other genomic alteration, e.g. point mutations or fusions (*FGFR1/HOOK3*, *FGFR1/TACC1*) in *FGFR1* gene, *NTRK* fusions (specifically *ETV6/NTRK3* fusion), mutations in *TP53*, *MAX*, *MEN1*, *CHD4*, *CTDNN2*, *BCOR*, *ARID1A* and *APC* genes [47–50]. This small subgroup of GISTs could represent another unique group of GIST family with alternative therapeutic possibilities [51].

5. Conclusions

Targeted TKI therapy significantly improved prognosis of patients with advanced GIST. Unfortunately, a vast majority of responding patients fail due to the primary or secondary resistance to targeted therapy. Our findings of mutational status of the primary and secondary *KIT/PDGFRA* mutations in patients with GIST confirm mechanisms of primary and secondary resistance, and also confirm an intralesional and interlesional heterogeneity of the secondary mutations within and between progressive lesions. Moreover, V600E *BRAF* mutation and defects of SDH complex in *KIT/PDGFRA* wild-type GIST confirm mechanism of their activation and allow for a selection of appropriate targeted therapy. A growing knowledge of the complexity of primary and secondary resistance (multiple and intra/interlesional variability of secondary mutations), and molecular identifications of individual subgroups of *KIT/PDGFRA* wild-type GISTs may improve strategies of individual targeted therapies.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest in this study.

Acknowledgements

This study was supported by the project (Ministry of Health, Czech Republic) for conceptual development of research organization 00064203 (University Hospital Motol, Czech Republic).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152708>.

References

- [1] S. Hirota, K. Isozaki, Y. Moriyama, K. Hashimoto, T. Nishida, S. Ishiguro, K. Kawano, M. Hanada, A. Kurata, M. Takeda, G. Muhammad Tunio, Y. Matsuzawa, Y. Kanakura, Y. Shinomura, Y. Kitamura, Gain-of-function mutations of c-kit gene in human gastrointestinal stromal tumor, *Science* 279 (1998) 577–580.
- [2] M.C. Heinrich, C.L. Corless, A. Duensing, L. McGreevey, C.J. Chen, N. Joseph, S. Singer, D.J. Griffith, A. Haley, A. Town, G.D. Demetri, C.D. Fletcher, J.A. Fletcher, *PDGFRA* activating mutations in gastrointestinal stromal tumor, *Science* 299 (2003) 708–710.
- [3] F. Bertucci, A. Goncalves, G. Monges, A. Madroszyk, J. Guiraman, V. Moutardier, T. Noguchi, P. Dubreuil, H. Sobol, Acquired resistance to imatinib and secondary *KIT* exon 13 mutation in gastrointestinal stromal tumour, *Oncol. Rep.* 16 (2006) 97–101.
- [4] W.L. Wang, A. Conley, D. Reynoso, L. Nolden, A.J. Lazar, S. George, J.C. Trent, Mechanisms of resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 167 (Suppl 1) (2011) S15–S24.
- [5] C.R. Antonescu, Gastrointestinal stromal tumors, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (2011).
- [6] C.R. Antonescu, P. Besmer, T. Guo, K. Arkun, G. Hom, B. Koryotowski, M.A. Leversha, P.D. Jeffrey, D. Desantis, S. Singer, M.F. Brennan, R.G. Maki, R.P. DeMatteo, Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation, *Cancer Ther. Preclin.* 11 (2005) 4182–4190.
- [7] T. Nishida, T. Kanda, A. Nishitani, T. Takahashi, K. Nakajima, T. Ishikawa, S. Hirota, Secondary mutations in the kinase domain of the *KIT* gene are predominant in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor, *Cancer Sci.* 99 (2008) 799–804.
- [8] A. Maleddu, M.A. Pantaleo, M. Nannini, M. Di Battista, M. Saponara, C. Lolli, G. Biasco, Mechanisms of secondary resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumours (Review), *Oncol. Rep.* 21 (2009) 1359–1366.
- [9] M. Debiec-Rychter, J. Cools, H. Dumez, R. Sciot, M. Stul, N. Mentens, H. Vranckx, B. Wasag, H. Prenen, J. Roessel, A. Hagemeijer, A. Van Oosterom, P. Marynen, Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants, *Gastroenterology* 128 (2005) 270–279.
- [10] C.L. Corless, Gastrointestinal stromal tumors: what do we know now? *Mod. Pathol.* 27 (suppl 1) (2014) S1–S16.
- [11] O. Daum, P. Grossmann, T. Vanecek, R. Sima, P. Mukensnabl, M. Michal, Diagnostic morphological features of the *PDGFRA*-mutated gastrointestinal stromal tumors: molecular genetic and histologic analysis of 60 cases of gastric gastrointestinal stromal tumors, *Ann. Diagn. Pathol.* 11 (2007) 27–33.
- [12] I. Hostein, N. Faur, C. Primois, F. Boury, J. Denard, J.F. Emile, P.P. Bringuier, J.Y. Scoazec, J.M. Coindre, *BRAF* mutation status in gastrointestinal stromal tumors, *Am. J. Clin. Pathol.* 133 (2010) 141–148.
- [13] T.W. Kim, H. Lee, Y.K. Kang, M.S. Choe, M.H. Ryu, H.M. Chang, J.S. Kim, J.H. Yook, B.S. Kim, J.S. Lee, Prognostic significance of c-kit mutation in localized gastrointestinal stromal tumors, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 3076–3081.
- [14] M.M. Gounder, R.G. Maki, Molecular basis for primary and secondary tyrosine kinase inhibitor resistance in gastrointestinal stromal tumor, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 67 (Suppl 1) (2011) S25–S43.
- [15] M. Miettinen, W. El-Rifai, L.H. Sobin, J. Lasota, Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review, *Human Pathol.* 33 (2003) 478–483.
- [16] Z. Szucs, K. Thway, C. Fisher, R. Bulusu, A. Constantinidou, C. Benson, W.T. van der Graaf, R.L. Jones, Molecular subtypes of gastrointestinal stromal tumors and their prognostic and therapeutic implications, *Future Oncol.* 13 (2017) 93–107.
- [17] M. Nannini, G. Tarantino, V. Indio, G. Ravagnani, A. Astolfi, M. Urbini, A. De Leo, D. Santini, C. Ceccarelli, E. Gruppioni, A. Altimari, P. Castellucci, S. Fanti, V.D. Scioscio, M. Saponara, L. Gatto, A. Pession, P.L. Martelli, R. Casadio, M.A. Pantaleo, Molecular modelling evaluation of exon 18 His845_Asn848delinsPro *PDGFRA* mutation in a metastatic GIST patient responding to imatinib, *Sci. Rep.* 9 (2019) 2172.
- [18] E. Wardelmann, I. Neidt, E. Bierhoff, N. Speidel, C. Manegold, H.P. Fisher, U. Pfeifer, T. Pietsch, c-kit mutations in gastrointestinal stromal tumors occur preferentially in the spindle rather than in epithelioid cell variant, *Mod. Pathol.* 15 (2002) 125–136.
- [19] J. Lasota, A. Dansonka-Mieszkowska, L.H. Sobin, M. Miettinen, A great majority of GISTs with *PDGFRA* mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential, *Lab. Invest.* 84 (2004) 874–883.
- [20] L. Tornillo, L.M. Terracciano, An update on molecular genetics of gastrointestinal stromal tumours, *J. Clin. Pathol.* 59 (2006) 557–563.
- [21] S. Tajima, A. Ohata, K. Koda, Y. Maruyama, Myxoid epithelioid gastrointestinal stromal tumor harboring an unreported *PDGFRA* mutation: report of a case and review of the literature, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8 (2015) 5821–5829.
- [22] C.D. Heinrich, Molecular basis for treatment of gastrointestinal stromal tumours, *EJC Suppl.* 4 (2006) 10–18.
- [23] E. Wardelmann, S. Merkelbach-Bruse, K. Pauls, N. Thomas, H.U. Schildhaus, T. Heinicke, N. Speidel, T. Pietsch, R. Buettner, D. Pink, P. Reichardt,

- P. Hohenberger, Polyclonal evolution of multiple secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 1743–1749.
- [24] A.W. Gramza, C.L. Corless, M.C. Heinrich, Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 7510–7518.
- [25] B. Liegl, I. Kepten, C. Le, M. Zhu, G.D. Demetri, M.C. Heinrich, C.D.M. Fletcher, C.L. Corless, J.A. Fletcher, Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST, *J. Pathol.* 216 (2008) 64–74.
- [26] J. Desai, S. Shankar, M.C. Heinrich, J.A. Fletcher, C.D. Fletcher, J. Manola, J.A. Morgan, C.L. Corless, S. George, K. Tuncali, S.G. Silverman, A.D. Van den Abbeele, E. van Sonnenberg, G.D. Demetri, Clonal evolution of resistance to imatinib in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 5398–5405.
- [27] T. Guo, M. Hajdu, N.P. Agaram, H. Shinoda, D. Veach, B.D. Clarkson, R.G. Maki, S. Singer, R.P. DeMatteo, P. Besmer, C.R. Antonescu, Mechanisms of sunitinib resistance in gastrointestinal stromal tumors harboring KITAY502-503ins mutations an in vitro mutagenesis screen for drug resistance, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 6862–6870.
- [28] C.N. Yeh, M.H. Chen, Y.Y. Chen, C.Y. Yang, C.C. Yen, C.Y. Tzen, L.T. Chen, J.S. Chen, A phase II of regorafenib in patients with metastatic and/or a unresectable gastrointestinal stromal tumor harboring secondary mutations of exon 17, *Oncotarget* 8 (2017) 44121–44130.
- [29] W. Chen, Y. Kuang, H.B. Qiu, Z. Cao, Y. Tu, Q. Sheng, G. Eilers, Q. He, H.L. Li, M. Zhu, Y. Wang, R. Zhang, Y. Wu, F. Meng, J.A. Fletcher, W.B. Ou, Dual targeting of insulin receptor and KIT in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors, *Cancer Res.* 77 (2017) 5107–5117.
- [30] Y.M. Wang, M.L. Gu, F. Ji, Succinate dehydrogenase-deficient gastrointestinal stromal tumors, *World J. Gastroenterol.* 21 (2015) 2303–2314.
- [31] K.H. Lim, M.J. Huang, L.T. Chen, T.E. Wang, C.L. Liu, C.S. Chang, M.C. Liu, R.K. Hsich, C.Y. Tzen, Molecular analysis of secondary kinase mutations in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors, *Med. Oncol.* 25 (2008) 207–213.
- [32] Y. Murayama, M. Yamamoto, R. Iwasaki, T. Miyazaki, Y. Saji, Y. Doi, H. Fukuda, S. Hirota, M. Hiratsuka, Greater omentum gastrointestinal stromal tumor with PDGFRA-mutation and hemoperitoneum, *World J. Gastrointest. Oncol.* 4 (2012) 119–124.
- [33] A. Agaimy, L.M. Terracciano, S. Dirnhöfer, L. Tornillo, A. Foerster, A. Hartmann, M.P. Bihl, V600E BRAF mutations are alternative early molecular events in a subset of KIT/PDGFRα wild-type gastrointestinal stromal tumors, *J. Clin. Pathol.* 62 (2009) 613–616.
- [34] N.P. Agaram, G.C. Wong, T. Guo, R.G. Maki, S. Singer, R.P. DeMatteo, P. Besmer, C.R. Antonescu, Novel V600E BRAF mutations in imatinib-naïve and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors, *Genes Chromosomes Cancer* 47 (2008) 853–859.
- [35] M. Daniels, I. Lurkin, R. Pauli, E. Erbstößer, U. Hildebrandt, K. Hellwig, U. Zschille, P. Lüders, G. Krüger, J. Knolle, B. Stengel, F. Prall, K. Hertel, H. Lobeck, B. Popp, F. Theissig, P. Wünsch, E. Zwarthoff, A. Agaimy, R. Schneider-Stock, Spectrum of KIT/PDGFRα/BRAF mutations and Phosphatidylinositol-3-Kinase pathway gene alterations in gastrointestinal stromal tumors (GIST), *Cancer Lett.* 312 (2011) 43–54.
- [36] S.S. Shi, X. Wang, Q.Y. Xia, Q. Rao, Q. Shen, S.B. Ye, R. Li, Q.L. Shi, Z.F. Lu, H.H. Ma, X.J. Zhou, P16 overexpression in BRAF-mutated gastrointestinal stromal tumors, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 17 (2017) 195–201.
- [37] K. Jasek, V. Buzalkova, G. Minarik, A. Stanclova, P. Szepe, L. Plank, Z. Lasabova, Detection of mutations in the BRAF gene in patients with KIT and PDGFRA wild-type gastrointestinal stromal tumors, *Virchows Arch.* 470 (2017) 29–36.
- [38] S. Huss, H. Pasternack, M.A. Ihle, S. Merkelbach-Bruse, B. Heitkotter, W. Hartmann, M. Trautmann, H. Gevensleben, R. Buttner, H.U. Schildhaus, E. Wardelmann, Clinicopathological and molecular features of a large cohort of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) and review of the literature: BRAF mutations in KIT/PDGFRα wild-type GISTs are rare events, *Hum. Pathol.* 62 (2017) 206–214.
- [39] S. Rossi, M. Sbaraglia, M. Campo Dell’Orto, D. Gasparotto, M. Cacciatore, E. Boscato, V. Carraro, L. Toffolatti, G. Gallina, M. Niero, E. Pillozzi, A. Mandolesi, F. Sessa, A. Sonzogni, C. Mancini, G. Mazzoleni, S. Romeo, R. Maestro, A.P. Dei, Tos Concomitant KIT/BRAF and PDGFRA/BRAF mutations are rare events in gastrointestinal stromal tumors, *Oncotarget* 7 (2015) 30109–30118.
- [40] C. Miranda, M. Nucifora, F. Molinari, E. Conca, M.C. Anania, A. Bordoni, P. Saletti, L. Mazzucchelli, S. Pilotti, M.A. Pierotti, E. Tamborini, A. Greco, M. Frattini, KRAS and BRAF mutations predict primary resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumors (GIST), *Clin. Cancer Res.* 18 (2012) 1769–1776.
- [41] G.S. Falchook, J.C. Trent, M.C. Heinrich, C. Beadling, J. Patterson, C.C. Bastida, S.C. Blackman, R. Kurzrock, 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 (2013) 310–315.
- [42] L. Tornillo, Gastrointestinal stromal tumor – an evolving concept, *Front. Med.* (2014).
- [43] A. Chou, J. Chen, A. Clarkson, J.S. Samra, R.J. Clifton-Bligh, T.J. Hugh, A.J. Gill, Succinate dehydrogenase – deficient GISTs are characterized by IGF1R overexpression, *Mod. Pathol.* 25 (2012) 1307–1313.
- [44] A.J. Gill, Succinate dehydrogenase (SDH) - deficient neoplasia, *Histopathology* 72 (2018) 106–116.
- [45] K.A. Janeway, S.Y. Kim, M. Lodish, V. Nose, P. Rustin, J. Gaal, P.L.M. Dahia, B. Liegl, E.R. Ball, M. Raygada, A.H. Lai, L. Kelly, J.L. Hornick, N.I.H. Pediatric, W.T.G.I.S.T. Clinic, M. O’Sullivan, R.R. de Krijger, W.N.M. Dinjens, G.D. Demetri, C.R. Antonescu, J.A. Fletcher, L. Helman, C.A. Stratakis, Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 314–318.
- [46] R. Celestino, J. Lima, A. Faustino, J. Vinagre, V. Maximo, A. Gouveia, P. Soares, J.M. Lopes, Molecular alterations and expression of succinate dehydrogenase complex in wild-type KIT/PDGFRα/BRAF gastrointestinal stromal tumors, *Eur. J. Hum. Genet.* 21 (2013) 503–510.
- [47] E. Shi, J. Chmielecki, C.M. Tang, K. Wang, M.C. Heinrich, G. Kang, C.L. Corless, D. Hong, K.E. Fero, J.D. Murphy, P.T. Fanta, S.M. Ali, M. De Siena, A.M. Burgoyne, S. Movva, L. Madlensky, G.M. Heestand, J.C. Trent, R. Kurzrock, D. Morosini, J.S. Ross, O. Harismendy, J.K. Sicklick, FGFR1 and NTRK3 actionable alterations in “Wild-Type” gastrointestinal stromal tumors, *J. Transl. Med.* 14 (2016) 339–349.
- [48] M. Brenca, S. Rossi, F. Polano, D. Gasparotto, L. Zanatta, D. Racaneli, L. Valori, S. Lamon, A.P. Dei Tos, R. Maestro, Transcriptome sequencing identifies ETV6 – NTRK3 as a gene fusion involved in GIST, *J. Pathol.* 238 (2016) 543–549.
- [49] M. Nannini, M. Urbini, A. Astolfi, G. Biasco, M.A. Pantaleo, The progressive fragmentation of the wild-type (WT) gastrointestinal stromal tumors (GIST), *J. Transl. Med.* 15 (2017) 113–116.
- [50] Y. Mou, Q. Wang, B. Li, The “Wild”-type gastrointestinal stromal tumors: heterogeneity on molecule characteristics and clinical features, *Cancer Transl. Med.* 4 (2018) 75–82.
- [51] B. Ricciuti, C. Genova, L. Crino, M. Libra, G.C. Leonardi, Antitumor activity of larotrectinib in tumors harboring NTRK gene fusions: a short review on the current evidence, *OncoTargets Ther.* 12 (2019) 3171–3179.