

Molekulární genetika u gastrointestinálních stromálních tumorů

Magdalena Uvírová^{1,2}, Jarmila Šimová^{1,2}, Barbora Kubová², Jana Žmolíková^{1,2}, Irena Urbanovská^{1,2},
Jana Dvořáčková^{1,2,3}, Arnošt Martínek^{1,4}, Dušan Žiak², Petr Dítě^{1,2,4}

¹Lékařská fakulta Ostravské univerzity v Ostravě

²CGB laboratoř a.s., Ostrava

³Ústav patologie FN Ostrava

⁴Interní klinika FN Ostrava

Gastrointestinální stromální nádory (GISTy) jsou mezenchymální nádory gastrointestinálního traktu (GI), pocházející z intestinálních Cajalových buněk převážně ze žaludku a tenkého střeva. V posledním desetiletí došlo k rozvoji cílené molekulární léčby mnoha solidních nádorů a s objevem onkogenních mutací kináz u GISTů došlo k rychlému pochopení molekulárně biologické povahy těchto nádorů a přispělo k zavedení inhibitorů tyrozinkináz do klinické praxe i u tohoto typu nádorů. Proto v současné době hraje významnou úlohu molekulární genotypizace těchto lézí, především z hlediska prognózy, léčebné odpovědi, respektive primární nebo sekundární rezistence na cílenou léčbu.

Klíčová slova: gastrointestinální stromální tumor, mutace, *KIT* gen, *PDGFRA* gen.

Molecular genetics in gastrointestinal stromal tumors

Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract (GI) arising from the interstitial cells of Cajal, primarily of the stomach and small intestine. During the past decade came up to progress of molecular targeted therapies for many solid tumors and in association with discovery of onkogenic kinase mutations in GISTs to rapid evolution in understanding of molecular biology features of these tumors and to implementation tyrosine kinase inhibitors in clinical practice. Therefore molecular genotyping of this lesions is very important for prognosis, therapy, primary or secondary resistance to targeted therapy respectively.

Key words: Gastrointestinal stromal tumor, mutation, *KIT* gene, *PDGFRA* gene.

Onkologie 2014; 8(6): 257–258

Úvod

Gastrointestinální stromální tumory (GIST) se vyskytují převážně u pacientů staršího věku (medián věku 60–65 let), bez rozdílu pohlaví, s incidencí 1,5/100 000/rok (1). Za jeden z klíčových dějů v onkogenezi GISTů se považují aktivační mutace genů kódujících receptorové tyrozinkinázy *KIT* a *PDGFRA*.

Molekulární genetika

U přibližně 75 % GISTů se vyskytují mutace v *KIT* genu, které způsobují independentní konstitutivní kinázovou aktivaci, přičemž nejčastější je mutace v exonu 11, kódujícího intracelulární juxtamembránovou doménu proteinu. Tyto mutace zahrnují delece, inserce a substituce, případně jejich vzájemnou kombinaci a mají za následek změnu sekundární struktury proteinu v jeho aktivní formu (aktivní konformaci). Delece jsou asociované s kratším Progression Free (PFS) intervalem a celkovým přežitím (OS) v porovnání s ostatními typy mutací. Kromě mutací v exonu 11 (~ 70 %) se u 7–11 % GISTů vyskytují mutace v exonu 9 a vzácně v exonu 13 a 17 *KIT* genu (2).

Přibližně 80 % *KIT* negativních GISTů nese mutaci v *PDGFRA* genu. V některých studiích byla prokázána spojitost s predominantní žaludeční lokalizací, epiteloidní morfologií *PDGFRA* mutovaných GISTů. Mutace v genu *PDGFRA* se vyskytují přibližně v 8–10 %. Nejčastěji se nacházejí v exonu 18 a raritně v exonech 12 a 14 (3). Mutace v *KIT* genu a *PDGFRA* genu jsou u GISTů vzájemně exkluzivní (2).

KIT gen – oficiální název je "v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog", (často je uváděn pod jinými názvy, např. *CD117*, *c-kit*, *apod.*) – je lokalizován na dlouhém ramenu chromozomu 4 v lokusu 4q12. Gen řídí produkci proteinu buněčné membrány patřící do rodiny tyrozinkinázových receptorů (RTKs). Signální dráha stimulovaná *KIT* proteinem kontroluje řadu významných procesů v buňce. Jedná se především o buněčný růst, proliferaci, přežití (resp. apoptózu) a migraci. Signální dráha vedoucí od tohoto proteinu má zásadní význam především pro určité druhy buněk, např. reprodukční buňky, hematopoetické buňky, mastocyty, buňky v gastrointestinálním traktu (Cajalovy buňky) a melanocyty (4).

Mutace *KIT* genu jsou ve srovnání s nádory GIST nesoucími mutace v *PDGFRA* genu spojovány s horší prognózou a vyšším maligním potenciálem (5).

PDGFRA gen – oficiální název – „platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide“ – je lokalizován také na dlouhém ramenu chromozomu 4, lokus 4q12. Gen kóduje alfa podjednotku receptoru tyrozin kinázy PDGF, která náleží do podskupiny typu III tyrozin kinázových receptorů. Protein je lokalizován v buněčné membráně a podílí se na transdukcii signálů a ovlivňuje procesy buněčného cyklu, především růst, proliferaci a přežití (4).

Přibližně 10–15 % GISTů nemá mutaci ani *KIT* ani *PDGFRA* genu (tzv. *KIT/PDGFRA* „wild type“ GIST). Jsou klinicky nerozlišitelné od mutantních tumorů – mají identickou morfologii, vysokou hladinu exprese *KIT* proteinu a mohou se nacházet kdekoli v GI traktu. Recentní studie ukazují, že wild type GIST jsou heterogenní skupinou a vykazují různé druhy mutací jiných genů, např. *BRAF* a jeho mutace V600E (ve 13 % wild type GISTů) a *SDH* (succinate dehydrogenase) (6). Přibližně 50 % wild type GISTů vykazuje ztrátu enzymatické aktivity v mi-

tochondriálním respiračním řetězcí komplexu II (SDH-deficientní GISTy). Tento komplex tvoří čtyři podjednotky (SDHA, SDHB, SDHC a SDHD). Ztráta kterékoliv této podjednotky vlivem mutace nebo poruchy posttranskripční regulace vede k akumulaci sukcinátů. Mechanismus, jakým vede ztráta sukcináddehydrogenázového komplexu ke vzniku nádoru není zcela objasněn, předpokládá se zvýšení transkripce HIF1- α (hypoxia-inducible factor 1- α) regulovaných genů a pokles DNA demethylace. Obecně SDH-deficientní GISTy s mutací nebo bez mutace *SDHx* vykazují zvýšení DNA metylace (podobně jako gliomy a leukémie s *IDH1* a *IDH2* mutací) a tvoří skupinu nádorů s odlišnými klinickými projevy od *KIT*/*PDGFRA* mutovaných GISTů. Mají převážně lokalizaci v žaludku s epiteloidní histologií, vykazují lymfovaskulární invazi a plexiformní fenotyp, jsou multifokální s časným metastázováním do lymfatických uzlin, avšak s pomalým růstem (2, 7).

Raritně byly nalezeny také mutace *HRAS*, *NRAS* a *PIK3CA* genů. Vzhledem k tomu, že BRAF a RAS proteiny jsou součástí MAP kinázové kaskády mohou způsobit KIT independentní stimulaci růstu a tímto způsobit rezistenci na KIT/*PDGFRA* kinázové inhibitory (2).

Přesto, že onkogenní mutace kináz hrají důležitou roli v rozvoji GISTů, pro progresi a rozvoj onemocnění jsou nutné také další genetické události. Přibližně dvě třetiny GISTů vykazují buďto monosomii chromozomu 14 nebo ztrátu v oblasti 14q. Tyto chromozomové abnormality se vyskytují jak u *KIT* mutovaných, tak *PDGFRA* mutovaných GISTů. U přibližně 50% GISTů se vyskytuje delece dlouhého ramena chromozomu 22 (22q). Ztráty v chromozomových oblastech 1p, 9p, 11p a 17p jsou méně časté než delece 14q avšak jsou významnější pro malignitu. U GISTů byly nalezeny také delece 13q a 15q nebo monozomie chromozomu 10. Zmnožení oblasti 8q (zahrnuje *MYC* gen), 3q a 17q jsou asociována s metastatickým chováním tumoru. Žádná z výše uvedených chromozomových změn se nevyskytuje u dětských typů GISTů, které jsou spíše diploidní. Naproti tomu GISTy vznikající u pacientů s neurofibromatózou typu 1 vykazují časté ztráty 14q a 22q. Signifikantní část GISTů vyazuje inaktivaci tumor supresorového genu *CDKN2A*, kódujícího protein p16 (regulátor buněčného cyklu), ke které dochází buď bialeickou delecí lokusu p21 na chromozomu 9 nebo v kombinaci s mutací, popřípadě metylací promotoru. Také mutace *TP53* a snížení exprese p53 v imunohistochemii koreluje se špatnou prognózou. Rovněž amplifikace genů *MDM2* a *CCND1* (cyclin D1) jsou asociovány s malignitou (u GIST jsou však málo časté) (2, 8).

MikroRNA

Je známo, že v progresi mnoha typů nádorů hrají významnou roli změny expresních profilů a dysregulace mikroRNA, nádory GIST nejsou výjimkou. Recentní studie prokazují, že mikroRNA přímo regulují KIT expresi a inhibují buněčnou proliferaci u GISTů (11), případně mohou být asociovány s rezistencí na imatinib (11, 9).

Cílená terapie

Před nástupem cílené terapie byla prognóza u pokročilých gastrointestinálních stromálních tumorů špatná vzhledem k jejich rezistenci jak na chemoterapii, tak na radioterapii. Do roku 2000 byla odpověď na léčbu konvenční chemoterapií méně než 5 % a medián přežití pacientů s pokročilým onemocněním 18 měsíců. Tyrozin kinázové inhibitory byly původně vyvinuty v 90. letech 20. století pro léčbu chronické myeloidní leukémie (pro jejich schopnost inhibice fúzního onkoproteinu BCR-ABL). Protože *ABL* má strukturální podobnost s KIT genem, byl imatinib testován i na buňkách nesoucích mutantní formu *KIT* genu a ověřena jeho účinnost (2).

Přibližně 10 % pacientů s GIST však vyazuje primární rezistenci na léčbu inhibitory TKs, která je definována jako progresi v průběhu prvních 6 měsíců léčby. Podle prvních studií odpověď na léčbu imatinibem koreluje s kinázovým genotypem nádoru. Pravděpodobnost primární rezistence na imatinib pro mutace v exonu 11 *KIT* genu je 5%, v exonu 9 je 16% a pro wild type GIST 23%. Molekulární genotypizace GISTů je důležitá především pro identifikaci *KIT* exon 9 mutantních tumorů, které vyžadují vyšší dávky imatinibu pro optimální léčbu onemocnění. Poddávování u tohoto typu GISTu je zjevnou příčinou rezistence na léčbu. Na základě in vitro dat je zřejmé, že nejčastější mutace v *PDGFRA* genu, D842V způsobuje absolutní rezistenci na imatinib. Toto je potvrzeno klinickými výsledky. Pacient s *PDGFRA* D842V mutací má nízkou odpověď na léčbu imatinibem a velice krátký PF a OS, zatímco jiné mutace *PDGFRA* vykazují trvalou odpověď na léčbu imatinibem. Sekundární rezistence je způsobena různými mechanismy, zejména získanými mutacemi v *KIT* a *PDGFRA* genu v průběhu léčby, které jsou odlišné od původní onkogenní mutace (2).

Závěr

Molekulárně genetické vyšetření nádorů GIST má význam nejen diferenciálně diagnostický, ale i prediktivní. Genotypování nádorů je důležité pro optimální management pacientů s GIST léčených pomocí inhibitorů tyrozin kináz

(typ, dávka TKI). Pro další molekulární subtypy GIST (např. SDH-deficientní a *PDGFRA* D842V GIST), které neodpovídají na konvenční léčbu TKI inhibitory, by optimální léčebná strategie zahrnovala látky/inhibitory cílené na další molekuly postižené signální dráhy.

Literatura

1. The ESMO/European Sarcoma Network Working Group, Gastrointestinal stromal tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow up., Annals of Oncology 23 (Supplement 7):vi49-vi55,2012doi: 10.1093/annonc/mds252.
2. Christopher L Corless, Gastrointestinal stromal tumors: what do we know now?, Modern Pathology (2014)27, S1-S16
3. Le Cesne Axel, Domont Julien, Blésius Aurore, Cioffi Angela, Mutational Analysis in gastrointestinal Stromal Tumors, EJC MO 2011;3: (1).February 2011.
4. GENETICS HOME REFERENCE <http://ghr.nlm.nih.gov>.
5. Lian Zong and Ping Chen, Prognostic value of KIT/*PDGFRA* mutations in gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis, Journal of Surgical Oncology 2014; 12: 71.
6. Heikki Joensuu, MD; Mikael Erikson, MD; Kirsten Sundby Hall, MD; Jörg Hartmann, MD; Daniel Pink, MD; Jochen Schütte, MD; Giuliano Ramadori, MD; Peter Hohenberger, MD; Justus Duyster, MD; Salah Eddin Al-Batran, MD; Marcus Schlemmer, MD; Sebastian Bauer, MD; Eva Wardelmann, MD; Maarit Sarlomo-Rikala, MD; Bengt Nilsson, MD; Harri Sihto, PhD; Karla V.Ballman, PhD; Mika Leinonen, MSc; Ronald P. DeMatteo, MD; and Peter Reichardt, MD, Risk Factors for Gastrointestinal Stromal Tumor Recurrence in Patients treated With Adjuvant Imatinib, Cancer, Month 00,2014.
7. Sospitros A. Boikos, MD: Current Concepts, New Perspectives on the Genetic Basis of GISTs Lacking KIT and *PDGFRA* Mutations. The GIST Cancer Journal, Volume 1, Number 2 Spring 2014, www.thegistcancerjournal.org.
8. Leona A Doyle & Jason L. Hornick: gastrointestinal stromal tumors: from KIT to succinate dehydrogenase, Histo-pathology 2014, 64, 53–67.DOI: 10.1111/his.12302.
9. Gao X, Shen K, Wang C, Ling J, Wang H, Fang Y, Shi Y, Hou Y, Qin J, Sun Y, Qin X.: MiR -320a downregulation is associated with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors., Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2014; 46(1): 72–75. doi: 10.1093/abbs/gmt118. Epub 2013 Nov 10.
10. Susie Bae and Jayesh Desai: Personalised Management: Inoperable Gastrointestinal Stromal Tumors, Clinical Gastroenterology and Hepatology 2014; 12: 130–134.
11. Ju-Han Lee, Younghye Kim, Jung-Woo Choi, Young-Sik Kim. Correlation of Imatinib Resistance with the Mutational Status of KIT and *PDGFRA* Genes in Gastrointestinal Stromal Tumors: a Meta-analysis.
12. Jurečková A, Kocáková I, Vyzula R. Klinický registr GIST, Klin Onkol 2012; 25(2): 135–138.
13. KimWK, Yang HK, Kim H. MicroRNA involvement in gastrointestinal stromal tumor tumorigenesis, Curr Pharm Des.2013; 19(7): 1227–1235.

Článek přijat redakcí: 29. 8. 2014

Článek přijat k publikaci: 29. 10. 2014

RNDr. Magdalena Uvírová

CGB laboratoř a.s.

Košenského 10, 703 00 Ostrava

uvirova@pathology.cz