

Določanje mutacij v genih *c-KIT* in *PDGFRA* pri bolnikih z gastrointestinalnimi stromalnimi tumorji

Marina Grgić, Srdjan Novaković

Povzetek

Na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana smo uvedli testiranje mutacij v protoonkogenih *c-KIT* in *PDGFRA* z metodo neposrednega sekvenciranja. Uporaba zaviralcev tirozin kinaz za zdravljenje bolnikov z gastrointestinalnimi stromalnimi tumorji (GIST) je omogočila uspešnejše zdravljenje. Na izbiro najustrežnejšega zdravila za bolnike z GIST vplivajo aktivacijske mutacije v genih *c-KIT* in *PDGFRA*. Mutacije v navedenih genih najdemo pri približno 90 % bolnikov z GIST. Večina izmed teh mutacij omogoči dober odgovor na zdravljenje z zaviralci tirozin kinaz (npr. imatinibom v prvi liniji zdravljenja), nekatere izmed mutacij pa povzročijo neodzivnost bolnika na zdravljenje. Pogosto se pojavijo tudi sekundarne mutacije, ki kljub prvotnemu dobremu odgovoru na zdravljenje z zaviralci tirozin kinaz povzročijo neodzivnost bolnika na prvotno zdravilo. V tem primeru je treba izbrati drugo vrsto zaviralca tirozin kinaz (npr. sunitinib, sorafenib, nilotinib). Poznavanje mutacijskega statusa genov *c-KIT* in *PDGFRA* predstavlja pomemben podatek za zdravnika pri izbiri ustreznega zdravljenja za posameznega bolnika.

Uvod

Gastrointestinalni stromalni tumorji (GIST) spadajo med redke vrste raka mezenhimskega izvora, ki nastanejo kjerkoli vzdolž gastrointestinalnega trakta. Predstavljajo od 0,1 do 3 % vseh gastrointestinalnih rakavih bolezni. Približno polovica tumorjev se razvije v želodcu, 30 % v tankem črevesu, nekaj manj kot 20 % jih najdemo v požiralniku, debelem črevesu in tudi zunaj prebavnega trakta. Večinoma so odkriti (diagnosticirani) med 50. in 65. letom starosti.

Približno 80 do 90 % bolnikov z GIST ima mutacije v genu *c-KIT* (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog) in približno 5 do 10 % jih ima mutacije v genu *PDGFRA* (platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide). Običajno najdemo mutacijo v enem izmed navedenih genov, opisani pa so tudi primeri bolnikov z mutacijami v obeh genih hkrati. Od 10 do 15 % bolnikov z GIST nima mutacij v genih *c-KIT* in/ali *PDGFRA*. V skupini bolnikov z GIST brez mutacij v genih *c-KIT* in/ali *PDGFRA* jih ima 7 do 13 % prisotno mutacijo V600E v genu *BRAF*.

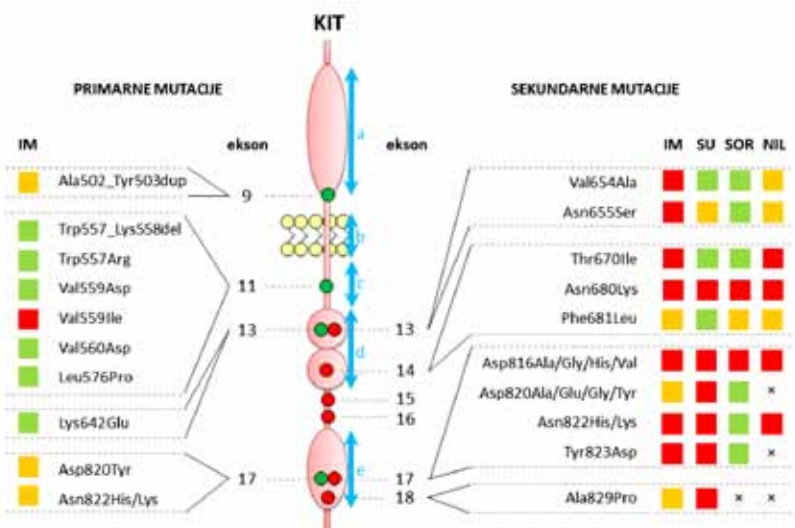
Čeprav je večina GIST-ov sporadičnih, poznamo tudi dedne oblike te bolezni. Razlik v molekularno bioloških spremembah med spora-

dičnimi in dednimi oblikami ni. Manjši delež ($\leq 5\%$) GIST-ov nastane kot posledica zarodnih (germinalnih) mutacij v genih *c-KIT* in/ali *PDGFRA* pri dedni obliki GIST-a ter v sklopu nekaterih dednih sindromov (nevrobromatoza, sindrom Carney-Stratakis, Carneyeva triada), za katere je značilna odsotnost mutacij v genih *c-KIT* in/ali *PDGFRA*. Mutacije, značilne za dedno obliko GIST-a, so enake kot za sporadično obliko raka in se dedujejo avtosomalno dominantno. V svetovni literaturi je bilo do danes opisanih 22 družin z dedno obliko GIST-a, od tega je imelo germinalno mutacijo v genu *c-KIT* 19 družin in v genu *PDGFRA* le tri družine.

Sorodniki z dednimi mutacijami v genih *c-KIT* in/ali *PDGFRA* zbolevalo zgodaj za multiplo obliko GIST na želodcu ali tankemu črevesu. Značilen je hkraten pojav več primarnih tumorjev, običajno pri mlajših letih, in sopojav hiperpigmentacije ter mastocitoze.

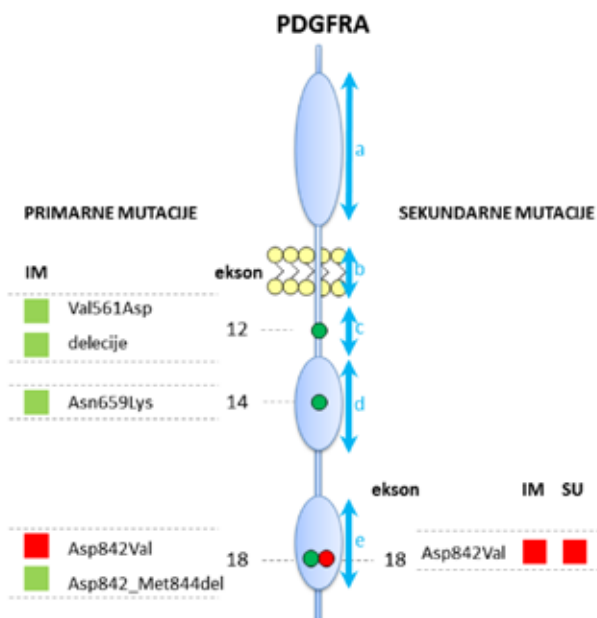
Določanje mutacijskega statusa genov *c-KIT* in *PDGFRA* ima tako **prognostično kot napovedno vrednost**. Glede na mesto in vrsto mutacije lahko napovemo bolj oz. manj agresivno obnašanje tumorja in odgovor bolnikov z GIST-om na zdravljenje z zaviralci tirozin kinaz.

Slika 1. Struktura receptorja KIT z označenimi domenami (a, b, c, d, e) in eksoni, v katerih najdemo značilne primarne (●) in sekundarne (●) mutacije ter odgovor tumorjev (■, ■, ■) s temi mutacijami na tarčna zdravila (IM, SU, SOR, NIL).



a – zunajcelična regija, b – transmembranska regija, c – povezovalna domena, d – kinazna domena 1, e – kinazna domena 2, ■ – ni odgovora na zdravljenje, ■ – delni odgovor na zdravljenje, ■ – dober odgovor na zdravljenje, IM – imatinib, SU – sunitinib, SOR – sorafenib, NIL – nilotinib.

Slika 2. Struktura receptorja PDGFRA z označenimi domenami (a, b, c, d, e) in eksoni, v katerih najdemo značilne primarne (●) in sekundarne (●) mutacije ter odgovor tumorjev (■, ■) s temi mutacijami na tarčna zdravila (IM, SU).



a – zunajcelična regija, b – transmembranska regija, c – povezovalna domena, d – kinazna domena 1, e – kinazna domena 2, ■ – ni odgovora na zdravljenje, ■ – dober odgovor na zdravljenje, IM – imatinib, SU – sunitinib.

Načeloma velja, da večina bolnikov z GIST-om, vsaj na začetku, dobro odgovori na zdravljenje z zaviralci tirozin kinaz - srednje preživetje bolnikov na Onkološkem inštitutu Ljubljana je po članku iz 2008, kjer so opisovali tarčno zdravljenje razsejanih gastrointestinalnih stromalnih tumorjev v Sloveniji, 66 mesecev. Pri določenem številu bolnikov pa je takšno zdravljenje manj uspešno oz. popolnoma neuspešno. Razlog za to so različne aktivacijske mutacije v genih *c-KIT* in *PDGFRA*. Nekatere izmed aktivacijskih mutacij povzročijo, da tumorji dobro odgovorijo na zdravljenje z zaviralci tirozin kinaz, medtem ko druge delujejo nasprotno – zmanjšajo občutljivost tumorjev na zdravljenje (delna ali popolna neobčutljivost – rezistenca). Pogosto se zgodi, da se pri bolnikih, ki so odgovorili na zdravljenje z zaviralci tirozin kinaz, po določenem času bolezen ponovi, kar pomeni, da so njihovi tumorji postali neobčutljivi za tovrstno zdravljenje. Poglavitni razlog za to je nastanek sekundarnih mutacij, ki povzročijo neodzivnost na trenutno zdravljenje.

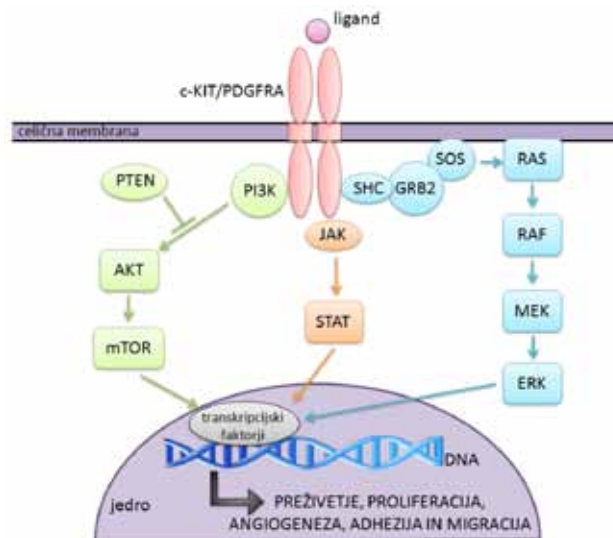
Vloga transmembranskih receptorjev *c-KIT* in *PDGFRA*

GIST se razvijejo iz intersticijskih Cajalovih celic ali njihovih progenitornih celic. Te na površini izražajo transmembranska receptorja *KIT* in *PDGFRA*, ki pripadata družini tirozin kinaznih receptorjev tipa III. Receptorji te družine so zgrajeni iz zunajcelične regije, na katero se veže ligand, transmembranske regije in znotrajcelične regije. Slednje sestavljajo povezovalna (»juxtamembran«) domena in dve kinazni domeni (sliki 1 in 2). Povezovalna (»juxtamembran«) domena je odgovorna za avtoinhibicijo v odsotnosti liganda, kinazna domena 1 predstavlja vezavno mesto za ATP in kinazna

domena 2 sestavlja aktivacijsko zanko, ki regulira dostopnost ATP vezavnega mesta.

Receptorja *KIT* in *PDGFRA* sodelujeta v več signalnih poteh, ki uravnavajo različne celične procese, kot so delitev, diferenciacija, preživetje, adhezija in migracija celic (slika 3). Receptorja sta produkta protoonkogenov *c-KIT* in *PDGFRA*, ki se nahajata na kromosomski regiji 4q12. Mutacije v genih *c-KIT* in *PDGFRA* povzročijo aktivacijo receptorjev v odsotnosti liganda. Rezultat tega je, da receptor neprestano stimulira molekule nižje v signalnih poteh, kar privede do nenadzorovane delitve celic in maligne transformacije. Eden od načinov delovanja zaviralcev tirozin kinaz je, da se kompetitivno vežejo na del receptorja, ki je odgovoren za vezavo ATP (vezavno mesto tirozin kinaz). S tem blokirajo vezavo tirozinskih kinaz in prenos signala navzdol po signalni poti ter zavrejo napredovanje bolezni.

Slika 3. Signalne poti receptorjev *KIT* in *PDGFRA*. Ob vezavi liganda na receptor pride do dimerizacije dveh molekul receptorja in avtofosforilacije tirozinskih ostankov ter aktivacije molekul v signalnih poteh *RAS/RAF/MEK/ERK*, *JAK/STAT* in *PI3K/AKT/mTOR*, ki vplivajo na številne celične procese.



Mutacije v genu *c-KIT* in njihov vpliv na zdravljenje

V genu *c-KIT* so najpogostejše primarne mutacije v eksonu 11 (70 %). Večino ostalih primarnih mutacij najdemo v eksonih 9 (10 do 15 %), 13 (1 do 3 %) in 17 (1 do 3 %) (slika 1).

Ekson 11 kodira regijo v povezovalni (»juxtamembran«) domeni receptorja, odgovorni za avtoinhibicijo v odsotnosti liganda. Mutacije v eksonu 11 povzročijo izgubo sposobnosti avtoinhibicije receptorja *KIT* in posledično spontano aktivacijo molekul nižje v signalnih poteh. Najpogostejša vrsta mutacij v eksonu 11 so tako heterozigotne kot tudi homozigotne delecije (izbrisi) znotraj bralnega okvirja, velike od 3 do 30 nukleotidov. Običajno vključujejo kodone od Lys550 do Glu561. Najpogostejša je delecija kodonov Trp557_Lys558. Delecije so povezane z bolj agresivnim obnašanjem tumorja. Po pogostosti sledijo substitucije (zamenjave) na kodonih Trp557, Val559, Val560 in Leu576 ter duplikacije (podvojitve) na kodonih od Ile571 do Phe591, ki napovedujejo boljšo prognozo pri GIST v želodcu. Redko so prisotne insercije (vrivki). Na splošno mutacije v eksonu 11 napovejo dober

odziv bolnika na zdravljenje z imatinibom. Sicer pa obstajajo izjeme, kot je redka substitucija Val559Ile, ki povzroči neodzivnost bolnika na zdravljenje z imatinibom.

Ekson 9 kodira regijo v zunajcelični regiji, ki je odgovorna za vezavo liganda in posledično dimerizacijo receptorja. Mutacije v eksonu 9 verjetno porušijo strukturo receptorja na takšen način, da lahko pride do spontane dimerizacije receptorja, kar vodi v avtofosforilacijo in prenos signala na molekule nižje v signalnih poteh. V eksonu 9 je v večini primerov prisotna duplikacija kodonov Ala502_Tyr503. V 90 % to mutacijo najdemo pri GIST-ih v tankem črevesu in je povezana s slabšo prognozo bolezni. Bolniki s temi mutacijami slabše odgovorijo na zdravljenje z imatinibom, zato je zanje priporočljiv večji odmerek zdravila (800 mg dnevno).

Ekson 13 kodira del kinazne domene 1, ki ima vlogo vezavnega mesta za ATP. Mutacije v eksonu 13 lahko spremenijo obliko vezavnega mesta za ATP. Vejavno mesto lahko postane neprestano dostopno za ATP, kar povzroči stimulacijo molekul nižje v signalnih poteh. V tem primeru je pomembno tudi to, kako ta sprememba vpliva na vezavo tarčnega zdravila. Lahko se mesto tako spremeni, da je vezava tarčnega zdravila mogoča in bolnik na zdravljenje dobro odgovori. Lahko pa je mesto tako spremenjeno, da omogoča vezavo ATP in hkrati onemogoča vezavo tarčnega zdravila. V takšnem primeru zdravljenje nima učinka. V eksonu 13 najdemo substitucije, večinoma Lys642Glu, ki je povezana z dobro odzivnostjo bolnikov na zdravljenje z imatinibom.

Ekson 17 kodira kinazno domeno 2, ki sestavlja aktivacijsko zanko. Mutacije v eksonu 17 lahko povzročijo spremembo aktivacijske zanke v takšni meri, da je vezavno mesto za ATP prosto dostopno. Kot že rečeno, to povzroči neprestano vezavo ATP in stimulacijo molekul nižje v signalnih poteh ter lahko vpliva na vezavo tarčnega zdravila. Za ekson 17 so značilne substitucije, večinoma na kodonu Asn822. Bolniki s temi mutacijami na zdravljenje z imatinibom le delno odgovorijo oz. ne odgovorijo.

Sekundarne mutacije, ki nastanejo med zdravljenjem, najdemo v eksonih 13, 14, 15, 16, 17 in 18. Najpogostejše sekundarne mutacije v eksonih 13 (Val654Ala) in 14 (Thr670Ile) povzročijo neodzivnost bolnika na zdravljenje z imatinibom, vendar pa bolniki s temi mutacijami dobro odgovorijo na zdravljenje s sunitinibom. Bolniki s sekundarnimi mutacijami v eksonu 17, ki vključujejo substitucije na kodonih Asp816, Asp820, Asn822 in Tyr823, slabo odgovorijo oz. ne odgovorijo na zdravljenje z imatinibom ter ne odgovorijo na zdravljenje s sunitinibom. Za bolnike z nekaterimi od teh mutacij bodo v prihodnje prišla v poštev nova tarčna zdravila, ki so se *in vitro* že izkazala kot učinkovita (npr. sorafenib).

Mutacije v genu *PDGFRA* in njihov vpliv na zdravljenje

V genu *PDGFRA* so najpogostejše primarne mutacije v eksonu 18, sledijo mutacije v eksonu 12 in redko tudi v eksonu 14 (slika 2). Glede na vrsto mutacij so najpogostejše substitucije, sledijo delecije in zelo redko duplikacije ter insercije.

Ekson 18 kodira regijo v kinazni domeni 2. Mutacije v eksonu 18 spremenijo strukturo aktivacijske zanke, ki regulira vezavo ATP na vezavno mesto, in povzročijo spontano kinazno aktivnost receptorja. Najpogostejša oblika mutacij v eksonu

18 so substitucije, ki predstavljajo več kot 80 % vseh mutacij v genu *PDGFRA*. Med njimi je najpogostejša substitucija Asp842Val, ki povzroči neodzivnost bolnika na zdravljenje z imatinibom. Redkeje so prisotne delecije, ki so značilne za kodone Ala840_Asn848. Te večinoma napovejo dober odgovor bolnika na zdravljenje z imatinibom.

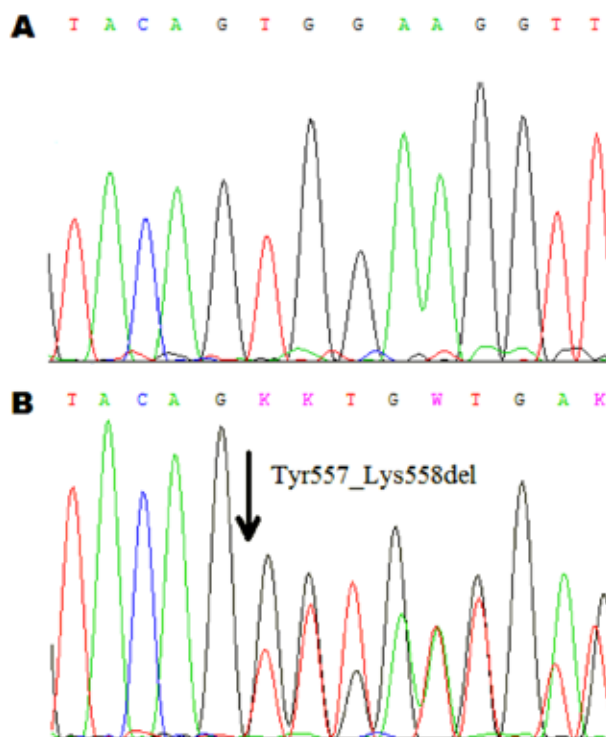
Ekson 12 kodira regijo v povezovalni (»juxtamembrane«) domeni receptorja in ekson 14 kodira kinazno domeno 1 (vezavno mesto za ATP). V eksonu 12 so pogosta oblika mutacij substitucije, najpogosteje Val561Asp. Sledijo delecije, ki so značilne za kodone Trp559_Tyr572. Enako velja za ekson 14, kjer so sicer na splošno mutacije zelo redke, med njimi pa prevladujejo substitucije, najpogosteje na kodonu Asn659. Delecije v eksonu 14 zajemajo kodone Ala840_Asn848.

Mutacije v genu *PDGFRA* so značilne za bolnike z GIST želodca, epiteloidno morfologijo in manj agresivno obliko bolezni. Sekundarne mutacije, ki nastanejo med zdravljenjem, najdemo v eksonu 18. Najpogosteje je to mutacija Asp842Val, ki pri bolnikih povzroči neodzivnost na zdravljenje z imatinibom in sunitinibom.

Metoda za določanje mutacij v genih *c-KIT* in *PDGFRA*

Na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana trenutno določamo mutacije v eksonih 9, 11, 13 in 17 gena *c-KIT* ter eksonih 12 in 18 gena *PDGFRA*. Morebitno prisotnost somatskih mutacij določamo v vzorcu DNA, izolirane iz tumorskega tkiva, fiksiranega v formalinu in vklopljenega v parafin. Za dokazovanje dedne oblike GIST mutacije določamo v vzorcih DNA izolirane iz periferne krvi.

Slika 4. Elektroferogram dela zaporedja eksona 11 gena *c-KIT*: A – nemutiran vzorec (divji tip), B – mutiran vzorec, s heterozigotno delecijo Trp557_Lys558del.



Mutacije določamo z metodo neposrednega sekvenciranja. Dele genov *c-KIT* in *PDGFRA* pomnožimo z metodo PCR (verižna reakcija s polimerazo). Pri tem uporabljamo specifične začetne oligonukleotide za posamezen ekson. Produkta PCR očistimo, pripravimo sekvenčno reakcijo in analiziramo na sekvenciraju ABI3500 (Applied Biosystems). Dobljena nukleotidna zaporedja izbranih eksonov primerjamo z referenčnima zaporedjema genov *c-KIT* in *PDGFRA* in odčitamo morebitne razlike (slika 4). DNA iz vzorcev tumorskega tkiva, vključenega v parafin, je bolj fragmentirana, zato za določanje nukleotidnega zaporedja posameznega eksona uporabljamo več kompletov začetnih oligonuklotidov, da dobimo več krajših odsekov zaporedja. S prekrivanjem teh lahko preverimo celotno zaporedje določenega eksona.

Zaključek

Z metodo neposrednega sekvenciranja lahko v izbranih eksonih genov *c-KIT* in *PDGFRA* dokažemo različne vrste mutacij. Somatske mutacije lahko določimo iz vzorca DNA, izoliranega iz tumorskega tkiva, vključenega v parafin. Pri tem je treba za zanesljivo analizo pridobiti dele tumorskega tkiva z največjim deležem tumorskih celic. Mutacijski status genov *c-KIT* in *PDGFRA* predstavlja pomemben podatek, na podlagi katerega zdravnik izbere zdravilo, ki bo za bolnika najbolj koristno. Ker pri polovici bolnikov pride v prvih dveh letih do napredovanja bolezni zaradi pojava sekundarnih mutacij, je priporočljivo, v primeru možnega ponovnega odvzema vzorca tumorskega tkiva, ponovno določanje mutacij v genih *c-KIT* in *PDGFRA*.

Literatura

1. Agaimy A., Hartmann A. Hereditäre und nichthereditäre syndromale gastrointestinale Stromatumoren. *Pathologe*, 2010. 31 (6): 430-7.
2. Al-Batran S. E., et al. Focal progression in patients with gastrointestinal stromal tumors after initial response to imatinib mesylate: a three-center-based study of 38 patients. *Gastric Cancer*, 2007. 10 (3): 145-52.
3. Debiec-Rychter M., et al. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Cancer*, 2006. 42 (8): 1093-103.
4. Demetri G. D., et al. Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 2013. 381 (9863): 295-302.
5. Lasota J., Miettinen M. Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology*, 2008. 53 (3): 245-66.
6. Patil D. T., Rubin B.P. Gastrointestinal stromal tumor: advances in diagnosis and management. *Arch Pathol Lab Med*, 2011. 135 (10): 1298-310.
7. Repar A., Matos E., Zakotnik B. Tarčno zdravljenje razsejanih gastrointestinalnih stromalnih tumorjev v Sloveniji. *Onkologija*, 2008. 12 (1): 13-16.
8. Veiga I., et al. Hereditary gastrointestinal stromal tumors sharing the KIT Exon 17 germline mutation p.Asp820Tyr develop through different cytogenetic progression pathways. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010. 49 (2): 91-8.

