



Postępy w diagnostyce molekularnej GIST

Barbara Pieńkowska-Grela



IV AKADEMIA ONKOLOGII
„GUZY NEUROENDOKRYNNE
I GUZY STROMALNE (GIST)
UKŁADU POKARMOWEGO”

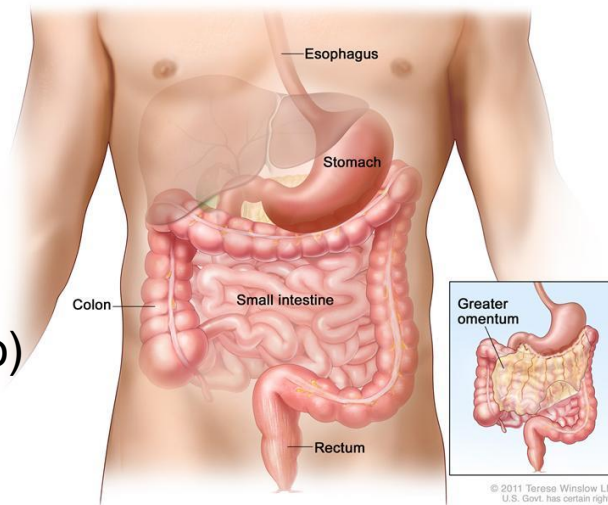
WARSZAWA

28 marca 2015 r.

Prezentacja kliniczna

GIST może wystąpić w dowolnym miejscu wzdłuż przewodu pokarmowego

Żołądek (60%)
Jelito cienkie (30%)
Odbytnica (3%)
Okrężnica (1-2%).
Rak przełyku (<1%)
Omentum /krezka (rzadko)
inne



Klinicznie agresywne:
20% ~ 25% GIST żołądka
40% ~ 50% małych GIST jelita
choroba przerzutowa
Ok. 10% ~ 25% pacjentów

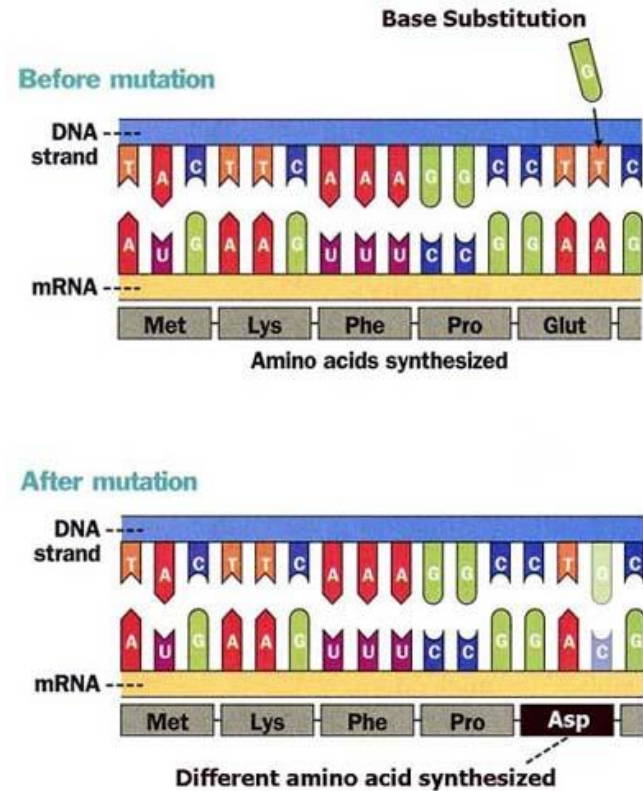
Gastrointestinal stromal tumor. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: AJCC Cancer Staging Manual., 2010, pp 175-80.

- Joensuu H: *Gastrointestinal stromal tumor (GIST).* *Ann Oncol* 17 (Suppl 10): 280-6, 2006.
- Miettinen M, Lasota J: *Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis.* *Arch Pathol Lab Med* 130:1466-78,2006.
 - DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, et al.: *Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival.* *Ann Surg* 231: 51-8, 2000

Zaburzenia DNA mutacje



© R.G. Steane



Aktywacja genów w patogenezie guzów podścieliska

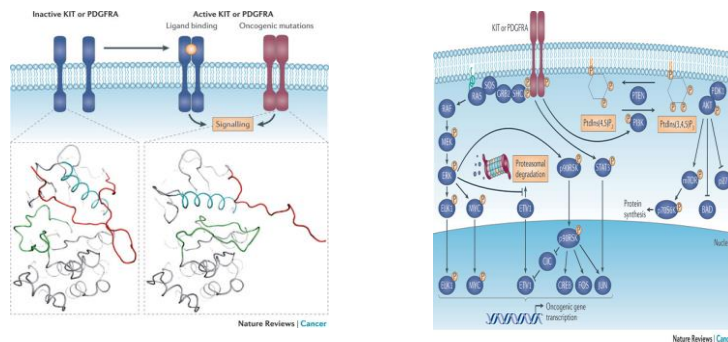
Gen *c-KIT* koduje białko, marker receptorów CD117 o aktywności kinazy tyrozynowej

Gen *PDGFRA* koduje receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu PDGFR- α o aktywności kinazy tyrozynowej

**Mutacja ► Konstytutywna aktywacja receptora
KIT lub **PDGFRA****

- liczba podziałów komórkowych wzrasta
- proces nowotworzenia

Aktywacja genów *KIT*, *PDGFRA* w patogenezie *GIST*



Skutki molekularne:

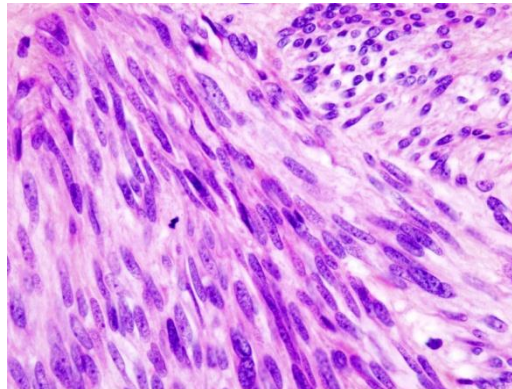
- nadekspresja genu ► **nadprodukcja białka**
- inicjuje różne drogi sygnałów prowadzące do jądra i powodujące **ekspresję innych genów** „kaskada sygnałowa”
- fosforylacja kolejnych białek szlaków przekazywania sygnałów (***PI3K/AKT*, *SHC*, *SRC*, *JUN*, *STAT***)

Aktywacja genów *KIT*, *PDGFRA* w patogenezie **GIST**

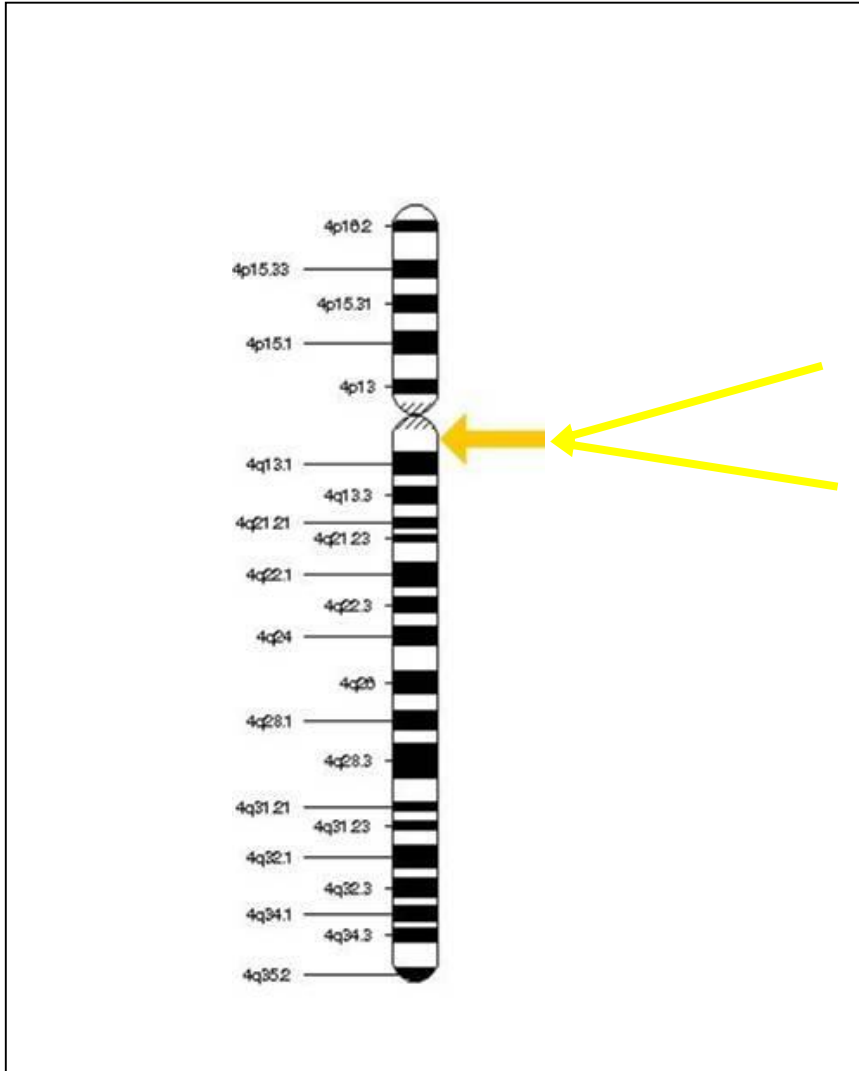
Skutki kliniczne

- ▶ niekontrolowana proliferacja komórek
- ▶ oporność na apoptozę
- ▶ zmiany adhezji oraz różnicowania określonych typów komórek (w tym komórek Cajala)

▶ ▶ **GIST**



Aktywacja genów w patogenezie guzów podścieliska



Lokalizacja cytogenetyczna:

4q12

Lokalizacja molekularna
na chromosomie 4:

KIT - base pairs 54,657,927 - 54,740,714

PDGFRA - base pairs 54,229,096 - 54,298,244

MUTACJE PIERWOTNE

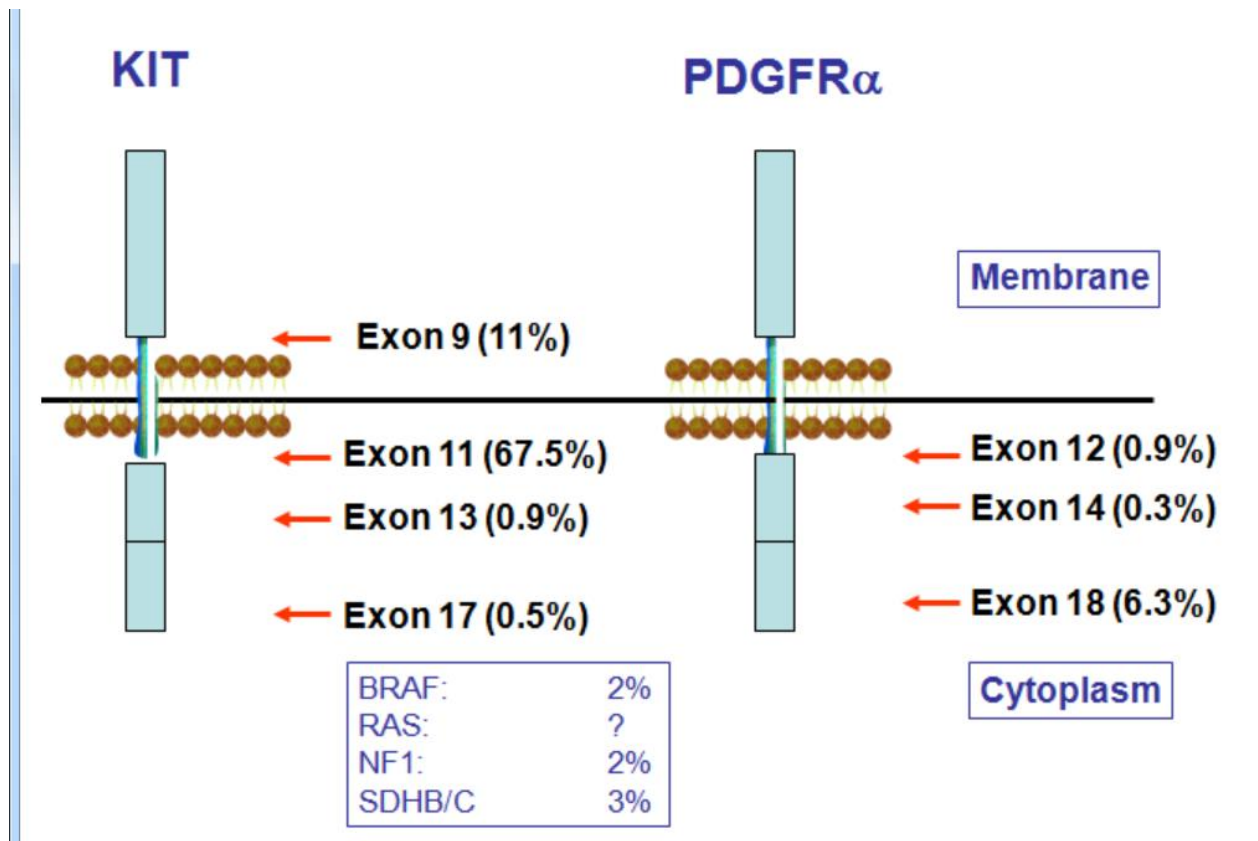
KIT lub *PDGFRA*

(mutacje wykluczające)

Każda jest alternatywą ścieżki prowadzącą do niekontrolowanego wzrostu komórek

***KIT* ~ 80% GIST**

***PDGFRA* 5-7% GIST**



Pozostałe ~15% GIST - brak mutacji *KIT* i *PDGFRA*

Diagnostyka molekularna

- Izolacja DNA (z bloczków parafinowych)
- Sekwencjonowanie genów *KIT* i *PDGFRA*

Wykazanie obecności mutacji *KIT/PDGFRA*

- obecność mutacji
- określenie jej rodzaju

Standard materiału do oznaczania mutacji KIT/PDGFRA w GIST metodą sekwencjonowania

Rodzaj materiału do oznaczenia mutacji: Bloczek parafinowy czytelnie podpisany numerem identyfikacyjnym. Materiał do badania to fragment tkanki z przerzutu lub zmiany pierwotnej GIST, utrwalony w formalinie (zbuforowanej) i zatopiony w parafinie.

Wymogi dotyczące materiału do oznaczenia mutacji:

1. **Materiał do analizy powinien zawierać minimum 50% komórek nowotworowych**
2. W przypadku niższego odsetka komórek nowotworowych badanie mutacji można wykonać na wybranym fragmencie tkanki o wystarczającym zagęszczeniu komórek nowotworowych (makrodysekcja odpowiedniego obszaru tkanki bez zniszczenia bloczka).
3. Wskazane - dołączenie preparatu barwionego hematoksyliną i eozyną (HE).

Przesyłanie materiału do laboratorium

1. Opakowanie zewnętrzne z adresem nadawcy i odbiorcy
2. Materiał oraz szkiełka zabezpieczone przed zanieczyszczeniem i uszkodzeniem.

Dokumenty, które należy dostarczyć wraz z materiałem do oznaczania mutacji:

1. Skierowanie na oznaczanie mutacji w KIT/PDGFRA z kontaktem telefonicznym do lekarza zlecającego badanie oraz (w miarę możliwości) z kopią wyniku his-pat z rozpoznaniem

Po wykonaniu oznaczenia mutacji materiał oraz preparat HE (jeśli był dostarczony) zostanie odesłany do zlecniodawcy badania.

Standard materiału do oznaczania mutacji KIT/PDGFRA w GIST metodą sekwencjonowania

Rodzaj materiału do oznaczenia mutacji: Bloczek parafinowy czytelnie podpisany numerem identyfikacyjnym. Materiał do badania to fragment tkanki z przerzutu lub zmiany pierwotnej GIST, utrwalony w formalinie (zbuforowanej) i zatopiony w parafinie.

Wymogi dotyczące materiału do oznaczenia mutacji:

1. **Materiał do analizy powinien zawierać minimum 50% komórek nowotworowych**
2. W przypadku niższego odsetka komórek nowotworowych badanie mutacji można wykonać na wybranym fragmencie tkanki o wystarczającym zagęszczeniu komórek nowotworowych (makrodysekcja odpowiedniego obszaru tkanki bez zniszczenia bloczka).
3. Wskazane - dołączenie preparatu barwionego hematoksyliną i eozyną (HE).

Przesyłanie materiału do laboratorium

1. Opakowanie zewnętrzne z adresem nadawcy i odbiorcy
2. Materiał oraz szkiełka zabezpieczone przed zanieczyszczeniem i uszkodzeniem.

Dokumenty, które należy dostarczyć wraz z materiałem do oznaczania mutacji:

1. Skierowanie na oznaczanie mutacji w KIT/PDGFRA z kontaktem telefonicznym do lekarza zlecającego badanie oraz (w miarę możliwości) z kopią wyniku his-pat z rozpoznaniem

Po wykonaniu oznaczenia mutacji materiał oraz preparat HE (jeśli był dostarczony) zostanie odesłany do zleceniodawcy badania.

Standard materiału do oznaczania mutacji KIT/PDGFR α w GIST metodą sekwencjonowania

Rodzaj materiału do oznaczenia mutacji: Błoczek parafinowy czytelnie podpisany numerem identyfikacyjnym. Materiał do badania to fragment tkanki z przerzutu lub zmiany pierwotnej GIST, utrwalony w formalinie (zbuforowanej) i zatopiony w parafinie.

Wymogi dotyczące materiału do oznaczenia mutacji:

1. **Materiał do analizy powinien zawierać minimum 50% komórek nowotworowych**
2. W przypadku niższego odsetka komórek nowotworowych badanie mutacji można wykonać na wybranym fragmencie tkanki o wystarczającym zagęszczeniu komórek nowotworowych (makrodysekcja odpowiedniego obszaru tkanki bez zniszczenia błoczka).
3. Wskazane - dołączenie preparatu barwionego hematoksyliną i eozyną (HE).

Przesyłanie materiału do laboratorium

1. Opakowanie zewnętrzne z adresem nadawcy i odbiorcy
2. Materiał oraz szkiełka zabezpieczone przed zanieczyszczeniem i uszkodzeniem.

Dokumenty, które należy dostarczyć wraz z materiałem do oznaczania mutacji:

1. Skierowanie na oznaczanie mutacji w KIT/PDGFR α z kontaktem telefonicznym do lekarza zlecającego badanie oraz (w miarę możliwości) z kopią wyniku hispat z rozpoznaniem

Po wykonaniu oznaczenia mutacji materiał zostanie odesłany do zleceniodawcy

Diagnostyka molekularna

- Izolacja DNA (z bloczków parafinowych)
- Sekwencjonowanie genów *KIT* i *PDGFRA*

Wykazanie obecności mutacji *KIT/PDGFRA*

- obecność mutacji
- określenie jej rodzaju

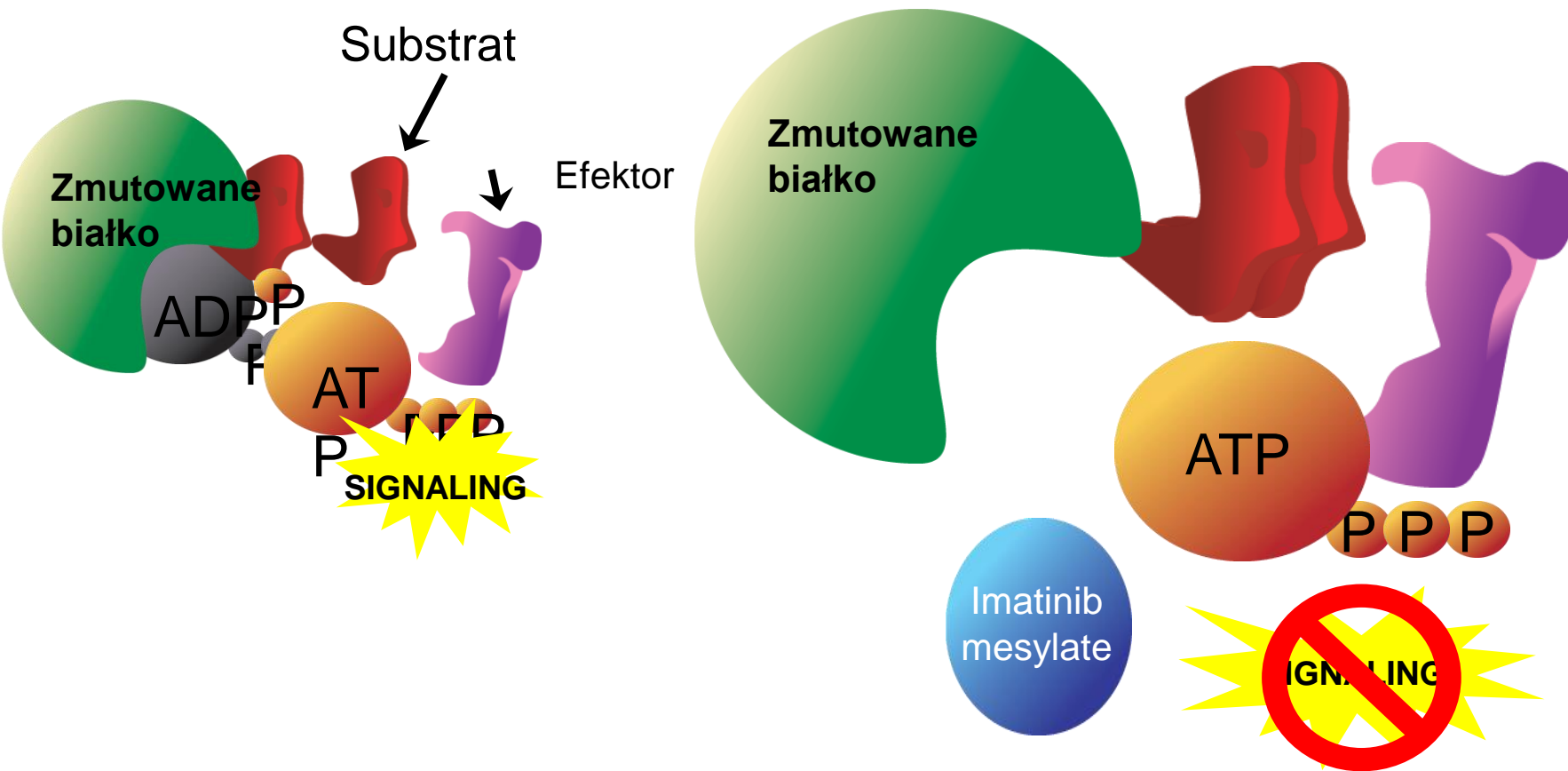
LECZENIE

celowane molekularnie

- Celem terapeutycznym jest zahamowanie aktywności **KIT** lub **PDGFRA**
- Efektywnymi lekami okazały się **ITK**
- Przez bezpośrednie hamowanie autofosforylacji kinazy prowadzi do zahamowania podziałów komórkowych

Inhibitor kinazy (imatinib, sunitynib)

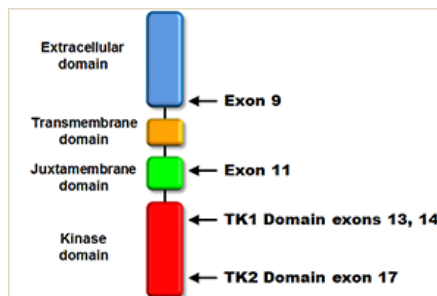
blokuje miejsce odłączania aktywnego fosforu odcząsteczki ATP i indukuje apoptozę komórek GIST



Przed włączeniem leczenia IKT
konieczne jest potwierdzenie obecności mutacji
KIT lub *PDGFRA*

Klasyfikacja molekularna GIST

I. Mutacje genu *KIT* (80–85% wszystkich GIST)



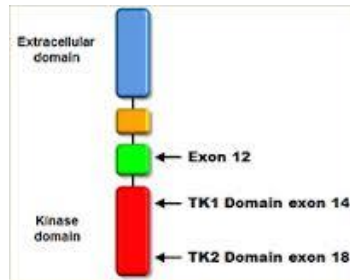
ekson 11. najczęstsza w **sporadycznym** GIST (ok. 60~70%) z **najlepszą odpowiedzią na imatynib**; obserwowana również w przypadku rodzinnych GIST

ekson 9. częściej w GIST wywodzących się z **jelita cienkiego**; **gorsza odpowiedź na imatynib**, korzyść z większej dobowej dawki imatynibu (800 mg); dobra odpowiedź na sunitynib

eksyony 13. i 17. bardzo rzadkie mutacje; opisywane w rodzinnych GIST; obserwowano odpowiedź kliniczną na imatynib

Klasyfikacja molekularna GIST cd.

II. Mutacje genu *PDGFRA* (5–7% GIST)



ekson 18. większość guzów z tego rodzaju mutacją wywodzi się z żołądka; mutacja **D842V** wiąże się z **opornością na imatynib i sunitynib**;
w przypadku **innych mutacji ex.18** wrażliwość na te leki jest zachowana

ekson 12. wrażliwe na imatynib np. **V561D**

ekson 14. opisano jedynie kilka przypadków

Klasyfikacja molekularna GIST cd.

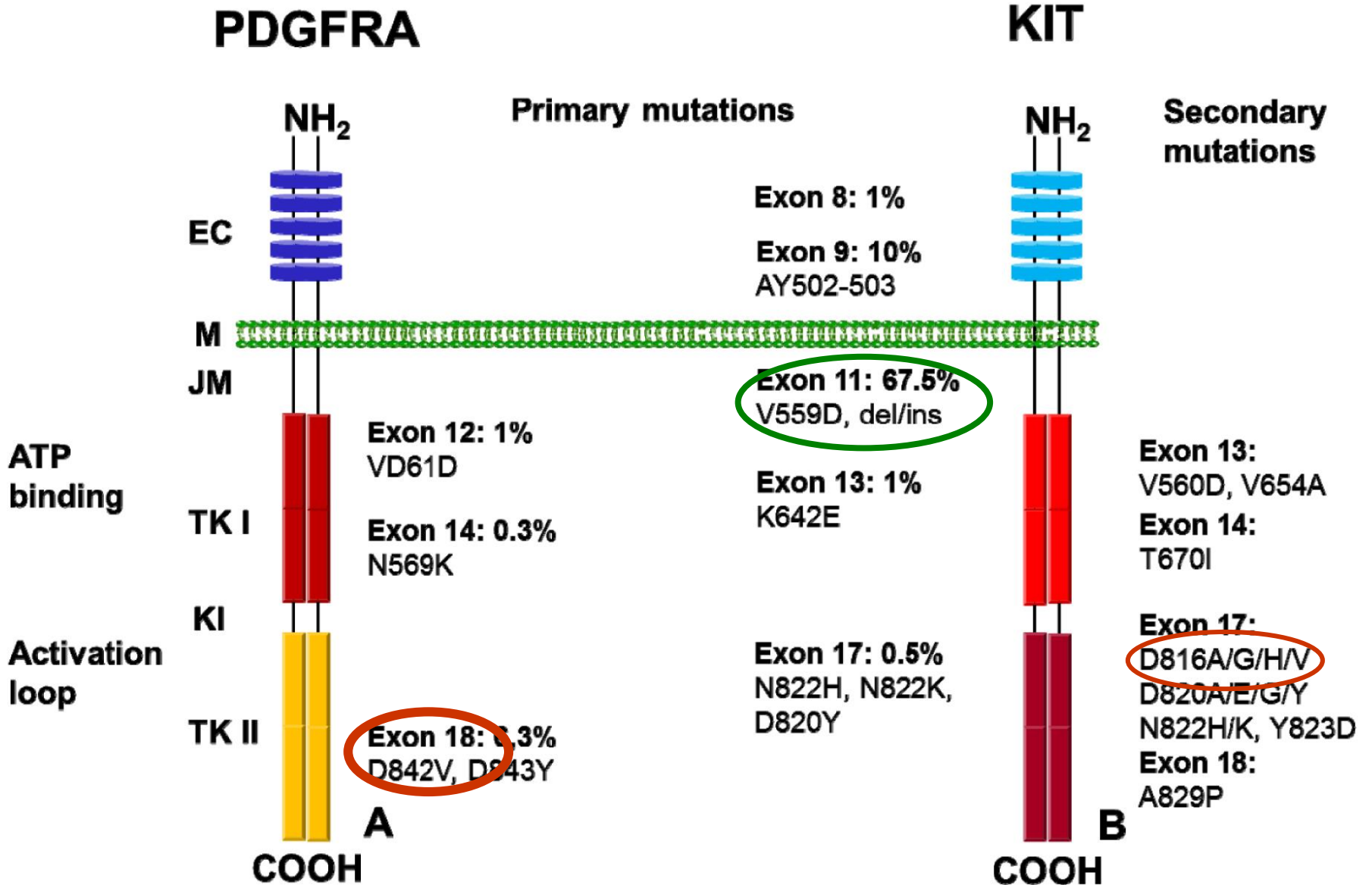
III. brak mutacji (12–15% wszystkich GIST)

Wild-type

słaba odpowiedź na **imatynib**, **lepsz**a na **sunitynib**;

często w przebiegu GIST u dzieci, typowo w przypadku GIST związanych z neurofibromatozą typu 1 (NF 1) lub triadą Carneya (GIST żołądka + chrzęstniaki płuc +/- paraganglioma); w części przypadków amplifikacja *IGFR-1* (genu receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1)

MUTACJE PIERWOTNE I WTÓRNE



Oporność pierwotna

Brak lub słaba odpowiedź na leczenie ITK

- **PRZYCZYNA**

- 1) **PDGFRA** ekson 18 mutacja **D842V** wiąże się z **opornością na imatynib i sunitynib**;
- 2) mutacja **KIT** ekson 9. częściej w GIST wywodzących się z **jelita cienkiego**; **gorsza odpowiedź na imatynib**, korzyść z większej dobowej dawki imatynibu (800 mg); dobra odpowiedź na sunitynib
 - Mutacja prowadzi do innych zmian **konformacyjnych** w cząsteczce białka c-KIT (zmniejszenie powinowactw leku do miejsca wiążącego ATP)
- 3) **Wild-type** – brak mutacji
słaba odpowiedź na **imatynib**, **lepsza na sunitynib**,

SKUTEK- obniżona wrażliwość/ oporność na imatinib

Oporność wtórna

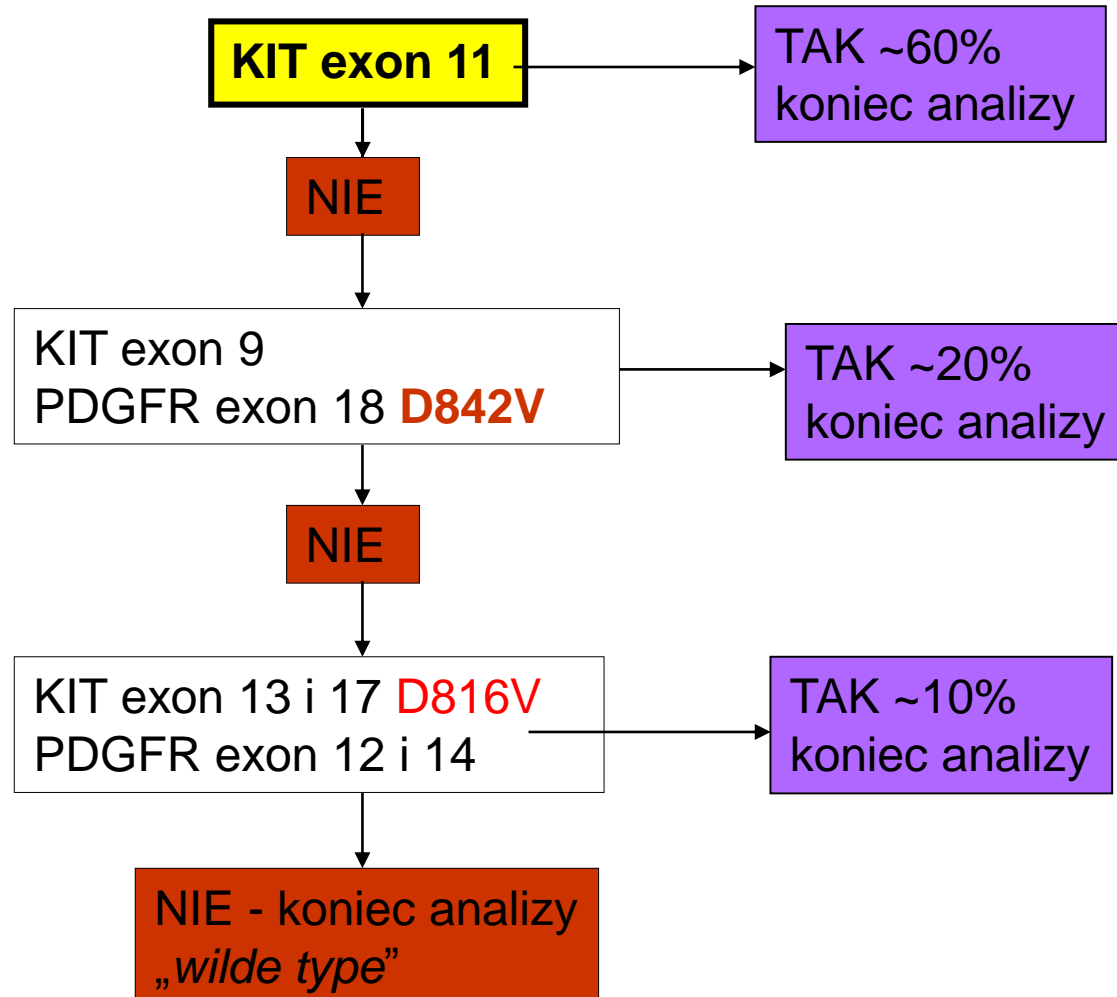
Pojawia się u pacjentów z pierwotnie dobrą odpowiedzią na imatinib - progresja

PRZYCZYNA

- 1) pojawia się **dodatkowa (wtórna) mutacja w genie *KIT*** w obrębie eksonów 13, 14, 17 i 18, które kodują regiony położone w sąsiedztwie miejsca wiążącego ATP w białku c-KIT
 - Mutacje te prowadzą do zmian **konformacyjnych** w cząsteczce białka c-KIT (zmniejszenie powinowactw leku do miejsca wiążącego ATP)
- 2) intensywna **amplifikacja genu *KIT***
prowadzi do podwyższenia stężenia produktu białkowego
– **ilość białka przekracza możliwości inhibitorowe imatinibu**
- 3) ***PDGFRA* ekson 18 mutacja *D842V*** jako mutacja wtórna

SKUTEK- utrata wrażliwości na imatinib i sunitinib

Kolejność analizy molekularnej



Leki obecnie dostępne

Imatynib:

hamuje proliferację i prowadzi do apoptozy komórek wykazujących ekspresję KIT. W Polsce imatynib został zarejestrowany ze wskazaniem do leczenia chorych dorosłych ze złośliwymi, KIT(CD117)-pozytywnymi nowotworami podścieliska przewodu pokarmowego nieoperacyjnymi i/lub z przerzutami

Sunitynib:

w chwili obecnej jedynym zarejestrowanym w Polsce lekiem drugiej linii leczenia chorych na nieoperacyjny i/lub uogólniony GIST oporny na leczenie imatynibem lub chorych z objawami nietolerancji imatynibu jest jabłczan sunitynibu – inhibitor wielokinazowy, który działa na kinazy tyrozynowe receptora KIT, PDGFR, naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (*vascular-endothelial growth factor receptor*, VEGFR) i FLT3. Sunitynib może blokować aktywność konstytutywnego receptora KIT lub PDGFR w komórkach GIST, jak również hamować rozwój naczyń towarzyszący progresji nowotworu.

Leczenie

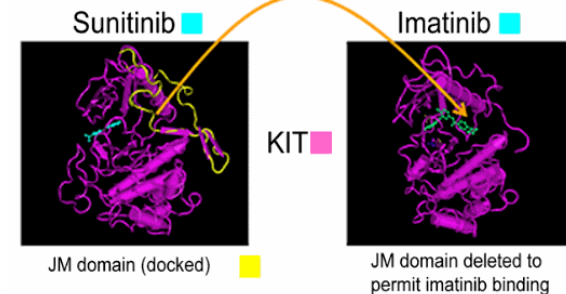
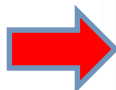


Table 1 : Drug Response by Mutations

	Gleevec (as first-line)	Sutent (as second-line)
KIT		
Exon 9	Intermediate – appears to require higher doses	Good
Exon 11	Good	Poor
PDGFRA		
Exon 12	Good	N/A
Exon 18 - except D842V	Good?	?
Exon 18 - D842V	Resistant	Resistant
Exon 18 - D842Y	Good (lab results)	N/A
Wild-type GIST	Poor to fair	Good



LECZENIE NOWOTWORÓW PODŚCIELISKA PRZEWODU POKARMOWEGO (GIST)

ICD-10 C15, C16, C17, C18, C20, C48

1.1. Kryteria kwalifikacji do leczenia imatynibem

- 1) rozpoznanie mięsaka podścieliskowego przewodu pokarmowego potwierdzone histologicznie;
- 2) ekspresja CD117 potwierdzona immunohistochemicznie;
- 3) leczenie adjuwantowe: obecność wysokiego ryzyka $\geq 50\%$ nawrotu po zabiegu radykalnego usunięcia nowotworu z KIT (CD117-dodatniego GIST żołądka, dwunastnicy, jelita cienkiego i odbytnicy, określonego według klasyfikacji AJCC-NCCN-AFIP); czas od operacji pierwotnego GIST, a wdrożeniem leczenia uzupełniającego nie powinien przekroczyć 4 miesiące; **obecność mutacji KIT lub PDGFR- α z wykluczeniem mutacji PDGFR- α D842V;**
- 4) leczenie choroby zaawansowanej: brak możliwości wykonania resekcji lub obecność przerzutów udokumentowana na podstawie badania klinicznego lub wyników badań obrazowych;
- 5) obecność zmian możliwych do zmierzenia w badaniu tomografii komputerowej;

Mutacja D842V

w PDGFRA

Powoduje oporność na imatinib i sunitynib

Mutacja D842V jest najczęstszą **pierwotną mutacją PDGFRA** znajdowaną w GIST

ale też rozwija się jako

Wtórna mutacja powodująca oporność w trakcie leczenia imatinibem w **nowotworach z inną pierwotną mutacją PDGFRA**

Mutację *PDGFRA* **D842V** można podejrzewać na wielu poziomach

1. Anatomicznie

ok. 90% GIST z mutacją PDGFRA - w żołądku

GIST z mutacją KIT występuje w całym przewodzie pokarmowym

2. Morfologicznie

PDGFRA - zazwyczaj morfologia komórki epiteloidalnej, większość KIT - kształt wrzecionowaty

3. IHC

do 40 % guzów PDGFRA - słaba lub negatywna ekspresja CD117; w większości guzów KIT CD117 jest silny

Podtypy molekularne GIST

Typowe mutacje:

KIT exon 9, 11, 13, 14, 17, 18

PDGFRA (w tym D842V)

Nietypowe mutacje (brak mutacji *KIT* i *PDGFRA*: wild-type)

NF1

BRAF V600E

KRAS lub *NRAS*

SDHB lub *SDHC*

Overexpres *IGF1R*

<http://www.targetedonc.com/conference/gi-2015/Biomarker-Analysis-of-GIST-Tumors-Suggests-New-Potential-for-Old-Treatments#sthash.y9ldopc7>

Terapie alternatywne (nie TKI)

- nowotwór nie posiada mutacji KIT/PDGFRA
- cytotoksyczność terapii - względnie często: niski poziom ekspresji genów naprawy DNA MGMT (47%), thymidylate synthase (TS, 70%), and RRM1 (79%)
- obecność znanych białek oporności wielolekowej: *p-glykoproteine (PGP)*, *multidrug resistance protein 1 (MRP1)* lub oba jednocześnie

Cecha	Odsetek przypadków	Możliwość leczenia (?)
niska ekspresja <i>tubulin beta 3 (TUBB3)</i>	70%	<i>paclitaxel, docetaxel</i> lub alkaloidy barwinka (<i>vincristine, vinblastine, vinorelbine</i>)
ekspresja enzymów topoizomerazy 1 2a	34% 32%	antracykliny lub inhibitory topoizomerazy (topotekan, irinotekan, etopozyd lub doksorubicyna)
Ekspresja białka <i>programmed cell death protein 1 (PD-1)</i> i <i>PD-1 ligand</i>	33%	inhibitory PD-1 (dopuszczone w US w 2014 dla leczenia <i>melanoma: pembrolizumab i nivolumab</i>)

Laboratorium Diagnostyki Molekularnej

Mgr Agnieszka Budziłowska, dr Agnieszka Dansonka-Mieszkowska,
inż. Renata Łotocka, dr Bożena Konopka, mgr Martyna Łukasik,
dr Joanna Moes-Sosnowska, mgr Agnieszka Podgórska,
dr Iwona Rzepecka, mgr Anna Stachurska, dr Łukasz Szafron



Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej
Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa

tel: 22 546 24 25
e-mail: pgn@coi.pl

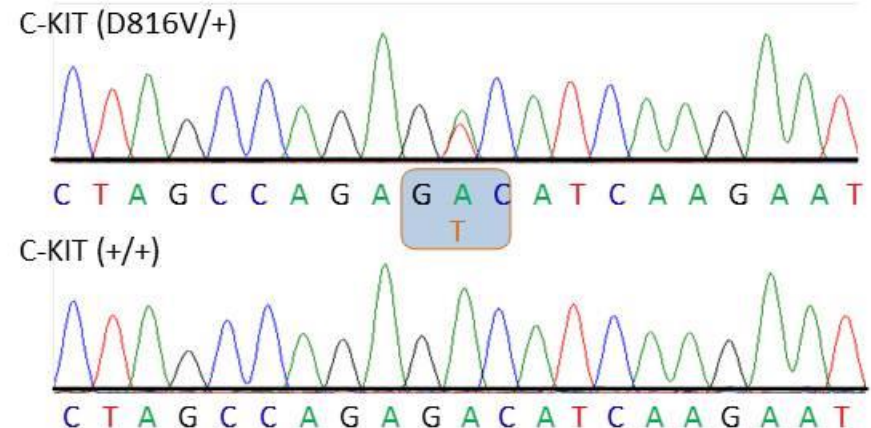
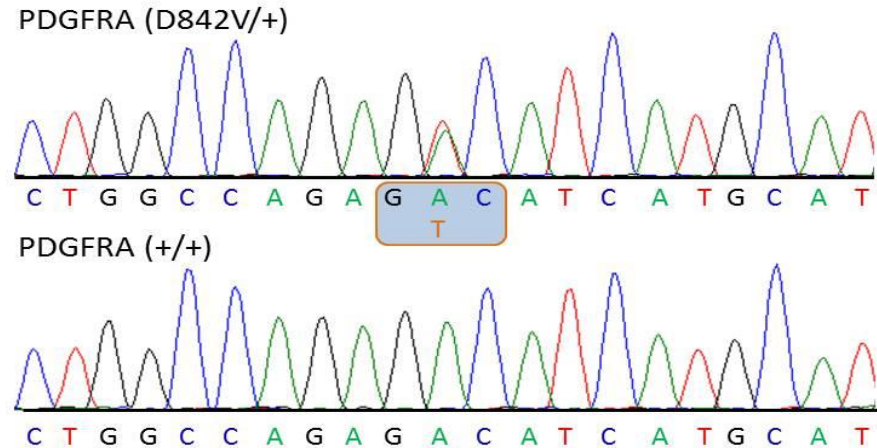
info: www.coi.pl
(zakładka dla lekarzy)



**Wesołych Świąt
Wielkiej NOOCY!**

Mutacje powodujące oporność

[Home / \(...\) Genomic DNA Reference Standard](#)



- Obydwie mutacje zmieniają tę samą resztę kwasu asparaginowego (D) na walinę (V)
- umiejscowioną w analogicznych rejonach PDGFRA i KIT

Wskazuje na wspólną strukturalną przyczynę oporności (?)

Porównanie profilu działania ITK

Imatinib

KIT

PDGFRA

PDGFRB

ABL (BCR-ABL)

VEGFR-2

VEGFR-3

RET, FGFR-1

FGFR-1 FLT-3

CSF-1R TIE-2

RET

p38 MAPK

Sunitinib

KIT

PDGFRA

PDGFRB

VEGFR-1

RAF-1

BRAF

BRAF

FGFR-1

Sorafenib

KIT

PDGFRB

VEGFR-2

VEGFR-3

VEGFR-3

RAF-1

Regorafenib

PDGFRB

VEGFR-1

VEGFR-2

Boichuk S. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy* 2014:4

Crenolanib - was 135-fold more potent than imatinib against **D842V**.
Imatinib was at least 10-fold more potent than crenolanib in inhibiting
the **V561D** mutation

[Heinrich MC. Clin Cancer Res. 2012:4375-84](#)

Koszt analizy

