Utvrđivanje c-KIT mutacije na eksonima 9 i 11 u gastrointestinalnom stromalnom tumoru

Gunjača, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:053160

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

IVANA GUNJAČA

UTVRĐIVANJE C-KIT MUTACIJE NA EKSONIMA 9 I 11 U GASTROINTESTINALNOM STROMALNOM TUMORU

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2010.

Ovaj diplomski rad, izrađen u Laboratoriju za kliničku genetiku Kliničkog bolničkog centra Split, pod vodstvom prof. dr.sc. Irene Drmić-Hofman, i suvodstvom doc. dr. sc. Maje Matulić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. inž. biologije, smjer molekularna biologija.

Prof. dr. sc. Ireni Drmić-Hofman, voditeljici rada, zahvaljujem na ukazanom povjerenju, nesebičnoj podršci i pomoći tijekom izrade ovog rada, na svim pruženim savjetima i na kritičkom čitanju rada.

Doc. dr. sc. Maji Matulić, suvoditeljici, zahvaljujem na susretljivosti, savjetima i kritičkom čitanju rada.

Veliko hvala med. lab. ing. Ivani Tomić i ostalim djelatnicima Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra u Splitu na pomoći i vodstvu u eksperimentalnom radu te na prijateljskoj podršci.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama na podršci tijekom svih ovih godina, i na nezaboravno provedenim studentskim danima.

Najljepše hvala mojim roditeljima i sestri na razumijevanju, podršci, i što su strpljivo dočekali kraj mojeg studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

UTVRĐIVANJE C-KIT MUTACIJE NA EKSONIMA 9 I 11 U GASTROINTESTINALNOM STROMALNOM TUMORU

Ivana Gunjača

Rooseveltov trg 6, Zagreb, Hrvatska

Gastrointestinalni stromalni tumori (GIST) su najčešći primarni mezenhimalni tumori gastrointestinalnog trakta, a karakterizira ih prekomjerna ekspresija i mutacije c-KIT receptora tirozin kinaze. Somatske mutacije koje su rezultat konstitutivne aktivacije KIT kinaze su utvrđene u brojnim kliničkim studijima GIST-a, iako se mutacije pojavljuju različitom učestalošću. U nekoliko izvještaja je potvrđeno da su mutacije gena *KIT* najizraženije kod malignih GIST-a nego u benignim lezijama, posebice u eksonima 9 i 11, za koje je dokazano da imaju negativni prognostički faktor. U ovom su radu analizirane mutacije direktnim sekvenciranjem umnoženih dijelova DNA eksona 9 i 11 u 12 uzoraka GIST-a. Analizom uzoraka tkiva uklopljenog u parafin od 12 bolesnika s operiranim GIST-om pronađeno ih je devet (75%) s *missense* mutacijama odnosno nukleotidnim supstitucijama u eksonu 11, jedan s mutacijom delecije baza, isto u eksonu 11, a u eksonu 9 je u jednom uzorku uz *missense* mutaciju pronađena i insercijska mutacija.

(27 stranica, 11 slika, 6 tablica, 68 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: GIST, c-KIT, imatinib mezilat, lančana reakcija polimeraze, direktno sekvenciranje

Voditelj: Dr. sc. Irena Drmić Hofman, izv. prof.
Suvoditelj: Dr. sc. Maja Matulić, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Nada Oršolić, prof.
Dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, prof.

Rad prihvaćen: 10. studenog 2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

IDENTIFICATION OF C-KIT MUTATION ON EXONS 9 I 11 IN GASTROINTESTINAL STROMAL TUMOUR

Ivana Gunjača

Rooseveltov trg 6, Zagreb, Croatia

Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are the most common primary mesenchymal tumours of the gastrointestinal tract and are characterized by overexpression and mutation of c-KIT, receptor tyrosine kinase. Somatic mutations that result in constitutive activation of KIT kinase have been identified in a number of clinical studies of GISTs, although the reported frequency of these mutations has varied over a wide range. Several reports have suggested that *KIT* gene mutations are more common in malignant GISTs than in benign lesions, and it has been proposed that mutations in exon 9 and exon 11 of *KIT* are negative prognostic factor. In this study mutations were characterised by direct DNA sequencing for screening polymerase chain reaction amplimers of exons 9 and 11 from GIST genomic DNA. Missense mutations within the exon 11 have been identified in nine (75%) of twelve patients, one patient had a deletion in exon 11 and one patient had a insertion within exon 9 of *KIT*.

(27 pages, 11 figures, 6 tables, 68 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: GIST, c-KIT, imatinib mesilat, polymerase chain reaction, direct sequencing

Supervisor: Dr. Irena Drmić-Hofman, Assoc. Prof.
Co-supervisor: Dr. Maja Matulić, Assist. Prof.

Reviewers: Dr. Nada Oršolić, Prof.
Dr. Gordana Lacković-Venturin, Prof.

Thesis accepted: November 10th 2010.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. GASTROINTESTINALNI STROMALNI TUMOR 1

1.1.1. Klinički aspekti GIST-a 3

1.1.2. Imunohistokemijski biljezi 4

1.2. LIJEČENJE PACIJENATA 6

1.3. RECEPTOR C-KIT 7

1.3.1. Građa i funkcija receptora c-KIT 7

1.4. PRIJENOS SIGNALA PREKO RECEPTORA C-KIT 8

1.5. MUTACIJE GENA *C-KIT* 10

1.5.1. Familijarni (obiteljski) GIST 12

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 13

3. MATERIJALI I METODE 14

3.1. MATERIJALI 14

3.1.1. Ispitanici 14

3.1.2. Osnovne kemikalije i materijali 14

3.1.3. Puferi i otopine 15

3.1.4. Kompleti reagencija 16

3.1.5. Uređaji 16

3.2. METODE 16

3.2.1. Izolacija DNA iz tkiva uklopljenog u parafin 16

3.2.2. PCR (lančana reakcija polimerazom) 17

3.2.3. Elektroforetsko razdvajanje fragmenata DNA u agaroznom gelu 18

3.2.4. Utvrđivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA (sekvenciranje) 19

3.2.4.1. Sekvencijska reakcija 19

3.2.4.2. Precipitacija 19

4. REZULTATI 20

4.2. ANALIZA GENA *C-KIT* AGAROZNOM GEL ELEKTROFOREZOM 20

4.3. ANALIZA MUTACIJA DOBIVENIH SEKVENCIRANJEM DNA 21

5. RASPRAVA 24

6. ZAKLJUČAK 26

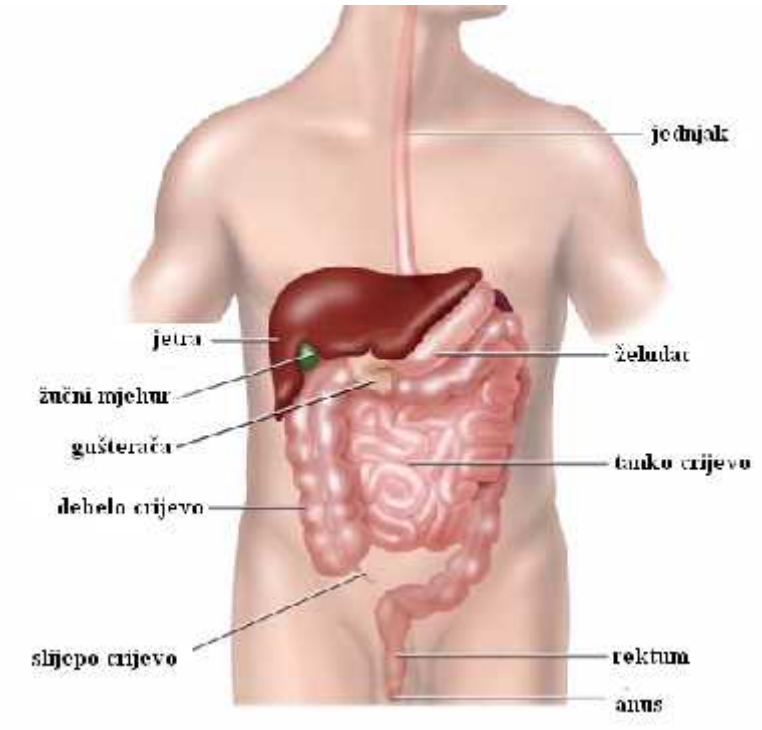
7. LITERATURA 27

1. UVOD

1.1. GASTROINTESTINALNI STROMALNI TUMOR

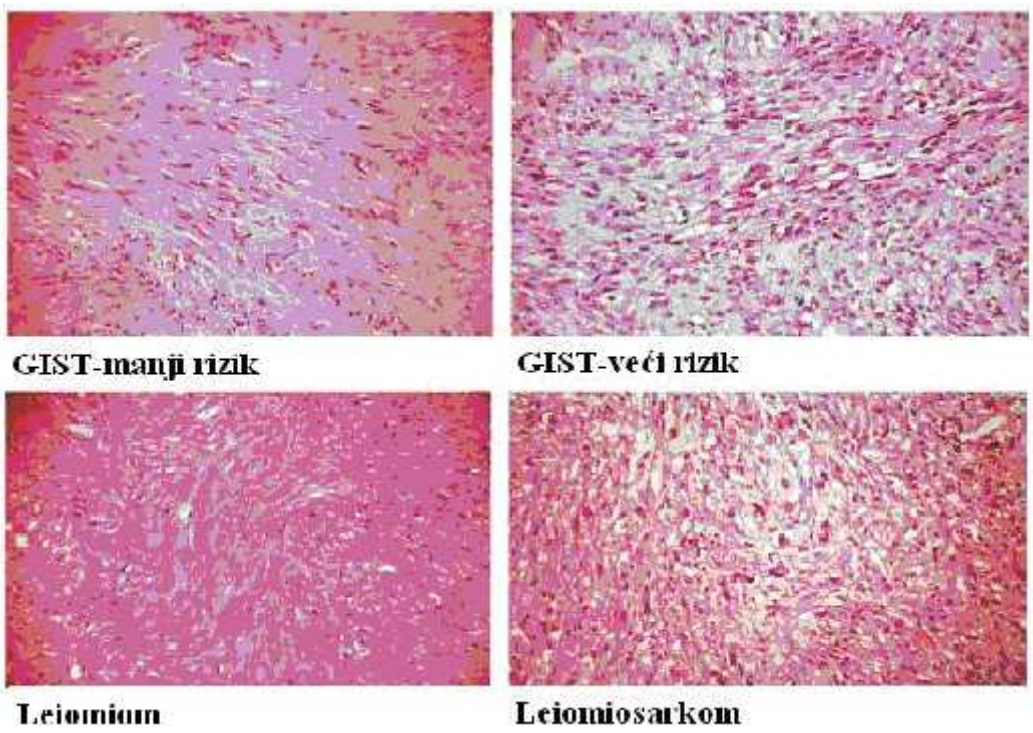
Gastrointestinalni stromalni tumor (GIST) čine sarkomi mekih tkiva koji nastaju iz matičnih stanica mezenhima u probavnom sustavu. Iako relativno rijedak, spada među najčešće primarne mezenhimalne tumore gastrointestinalnog (GI) trakta. Ovaj tip tumora rijetko se nalazi izvan GI trakta, najčešće je lokaliziran u želucu (40%-70%), zatim u tankom crijevu (20%-50%), debelom crijevu i rektumu (5%-15%) te jednjaku (<2%), ali mogu nastati i u drugim dijelovima organizma (Slika 1.1.), (Gomes i sur., 2007).

Prema podacima dobivenim u populacijskim studijama godišnja učestalost gastrointestinalnog stromalnog tumora u Švedskoj je 14.5/1 000 000 (Nillson i sur., 2005), u Islandu 11 na 1 000 000 (Tryggvason i sur., 2005). Oboljevaju najčešće osobe starije od 50 godina, medijan dobi je 60 godina, oko 5% osoba su mlađe od 40 godina, dok su ti tumori jako rijetki u djece (<1%).



Slika 1.1.Gastrointestinalni trakt (prilagođeno prema: www.emc.org)

Od 1930. do 1950.godine, za stromalne tumore gastrointestinalnog trakta se smatralo da su neoplazme glatkog mišićja te su klasificirani kao GI leiomiomi, leiomiosarkomi (Slika 1.2.) i leiomioblastomi, sve do kraja 60-ih i ranih 70-ih godina prošlog stoljeća, kada je elektronskim mikroskopom i imunohistokemijskim analizama potvrđeno da samo male frakcije tumora pokazuju diferencijaciju glatkog mišićja (Tornillo i Terracciano, 2006). Današnji termin, stromalni tumor, su uveli Mazur i Clark 1983.godine, no u tom su razdoblju pod tim nazivom bile obuhvaćene i druge vrste tumora poput švanoma i neuroendokrinih tumora. Nazvan je gastrointestinalni autonomni tumor živca, ali danas je ustanovljeno da je GI autonomni tumor morfološka varijanta GIST-a (Corless i sur., 2004.).



Slika 1.2. Morfološke sličnosti gastrointestinalnog stromalnog tumora (GIST) manjeg rizika i leiomioma te GIST-a viskog rizika i leiomiosarkoma (Corlees i sur., 2007)

Tek 1998. godine, Hirota i suradnici su došli do otkrića da GIST eksprimira protein KIT (c-KIT ili CD117) kao i da većina GIST-a pokazuje mutacije gena *KIT*. Otad se KIT (CD117), produkt protoonkogena c-kit, pokazao kao vrlo koristan biljeg u dijagnozi GIST-a. Više od 95% dijagnosticiranih GIST-a je pozitivno na c-KIT, pa je samim time GIST razdvojen od ostalih gastrointestinalnih mezenhimalnih tumora (glatkih mišićnih tumora, neurogenskih tumora, itd.). Hirota i suradnici su prvi opisali prisutnost aktiviranja konstitutivnih mutacija protonkogena c-KIT u GIST-u, a zahvaljujući njihovom radu je

potvrđeno da je mutacija c-KIT presudan faktor u razvoju GIST-a, neovisno o njegovom postanku, veličini tumora ili morfologiji (Rossi i sur., 2004). Još kasnije, 2003.godine, Heinrich i sur., su otkrili da osim gena *KIT*, GIST sadrži i aktivirane mutacije u genu za čimbenik rasta trombocita, *PDGFRA* (eng. *platelet-derived growth factor-alpha*).

Danas prevladava stav da GIST potječe od intersticijskih Cajalovih stanica (ICC), specijaliziranih stanica trbušnog živčanog sustava, vretenastog oblika, koje se protežu duž GI trakta, formirajući mrežu mijenteričnog pleksusunog sloja i time kontrolirajući pokretljivost GI. Kasnih 1990-ih godina je dokazano da GIST dijeli morfološke, imunofenotipske i genetičke karakteristike s ICC, zbog slične pozitivne imunoreakcije na CD34 i CD117 (c-KIT) te nedostatka imunoreakcije za desmin i S-100 protein (Gomes i sur., 2007). U pokusima rađenim na miševima, mijenterični pleksus intersticijskih stanica se nije razvio zbog manjka ekspresije receptora KIT tirozin kinaze ili njegova liganda, faktora matičnih stanica SCF (eng. *steam cell factor*) što je ukazalo na to da je KIT-SCF jako bitan faktor u razvoju tih stanica . To otkriće je samo potvrdilo hipotezu da GIST potječe od ICC stanica, a i to je bio još jedan dokaz da se Kit eksprimira u većini GIST-a (Kitamura i sur., 1998).

1.1.1. Klinički aspekti GIST-a

GIST je teško dijagnosticirati, jer u ranom stadiju bolest ne izaziva nikakve fizičke simptome, ali u kasnijoj fazi se javljaju:

- bol u trbuhu
- povećanje mase u trbušnoj šupljini
- osjećaj punoće (sitosti) trbuha
- povraćanje
- gubitak težine
- abdominalno krvarenje (krv u stolici ili povraćanje), koje u kroničnim slučajevima dovodi do anemije

Tumor često bude otkriven slučajno, i to tijekom rutinske pretrage pacijenta laparoskopijom, endoskopijom, ili kompjutoriziranom tomografijom (*eng. computed tomography scan, CT*) (Joensuu i sur., 2002). Više od 40% dijagnosticiranih GIST-a su maligni, a može se proširiti i na druge lokacije izvan primarnog tumora. Najčešće metastaze

su u jetri i abdominalnoj šupljini, a rjeđe se pojavljuju u limfnim čvorovima, plućima, i koštanom tkivu.

Standardni tretman za GIST je kirurško uklanjanje tumora, što daje dobre rezultate kod pacijenata s jakom malim i srednjim rizikom tumora (Tablica 1.) (DeMatteo i sur., 2000, Singer i sur., 2002) dok su pacijenti, čiji tumori nisu bili operabilni ili su imali česte metastaze, tretirani inhibitorom tirozin kinaza KIT/PDGFR, to jest, imatinibom, te je većina pacijenata vrlo dobro reagirala na oralni tretman (400-800 mg/dnevno) te postigla kompletnu ili parcijalnu remisiju (Demetri i sur., 2002, Casali i sur., 2008).

Tablica 1. Progonoze primarnog GIST-a (Fletcher i sur., 2002)

	Veličina (cm)	**Mitotski indeks (/50 HPF)**
Vrlo mali rizik	<2	<5
Nizak rizik	2-5	<5
Srednji rizik	<5	6-10
	5-10	<5
Visok rizik	>5	>5
	>10	Bilo koja mitotička rata

1.1.2. Imunohistokemijski biljezi

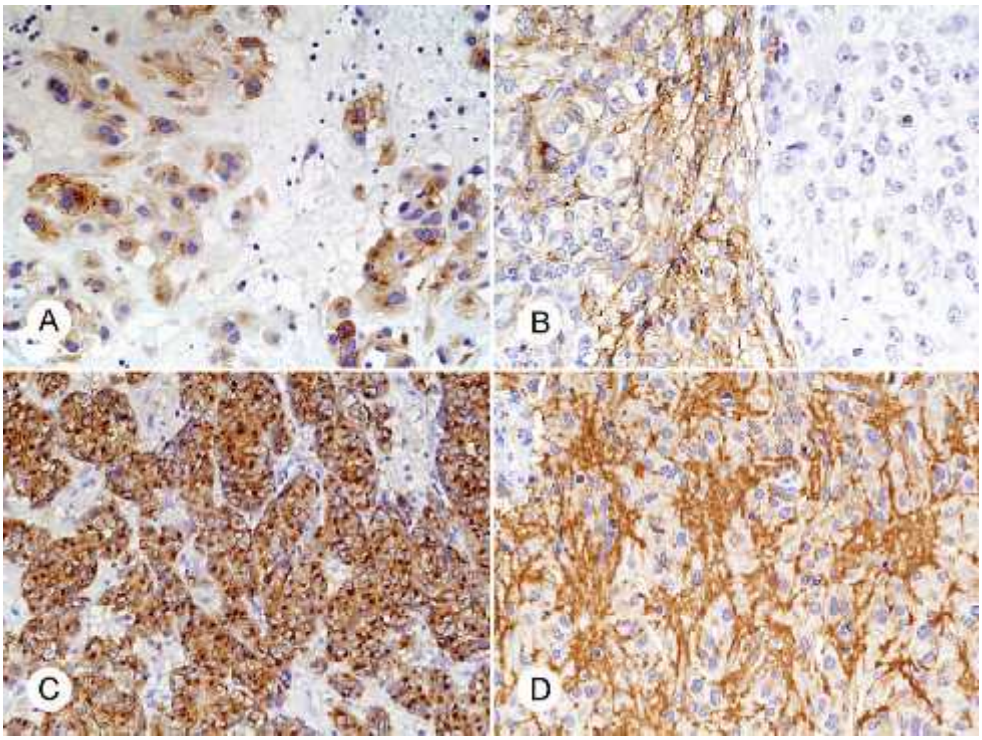
U mnogim kliničko-patološkim studijama je dokazano da su najvažniji kriteriji za procjenu biološkog potencijala GIST-a veličina tumora i mitotički indeks (Tablica 1.)

Uz visoku staničnost i mitotičku aktivnost ključan čimbenik u identifikaciji GIST je i pozitivnost na protein KIT (Slika 1.3.), receptor tirozin kinaze a to je i ujedno jedan od najranijih pokazatelja dijagnoze GIST-a (Corless, 2002).

Osim proteina KIT, drugi bitan čimbenik je i pozitivnost na protein CD34, normalno eksprimiran u hematopoetskim progenitorskim stanicama i nekim intersticijskim Cajalovim stanicama (prije otkrića proteina KIT, CD34 je bio najbolji pokazatelj dijagnoze GIST-a, ali ipak nije bio toliko specifičan).

Sveukupno, oko 60-70% GIST-a je pozitivno na CD34, u želucu je najveća ekspresija CD34 (85%), dok je u tankom crijevu ekspresija samo 50% (Romagnoli i sur., 2005).

Manji postotak GIST-a pokazuje pozitivnost na aktin glatkih mišića (*eng. smooth muscle actin*, SMA), desmin ili S-100, dok ima i tumora (svega 5%) koji histološki izgledaju kao GIST , ali ne eksprimiraju CD117 i manjka im i drugih biljega (CD34, SMA, desmin). Zbog tih slučajeva su u posljednjih nekoliko godina razvijeni i dodatni biljezi, kao pomoć u identifikaciji, a to su protein kinaza *theta* (PKC theta), nizvodni efektor u signalnom putu KIT i DOG1 (*eng. discovered on GIST*), gen koji kodira protein nepoznate funkcije, ali je eksprimiran u GIST (Miettinen i sur., 2009).



Slika 1.3. Primjeri pozitivnog imunohistokemijskog bojenja uzoraka na KIT u GIST-u A. epitel želuca GIST B.Tumor s pozitivnim i negativnim područjem na KIT C. Jako pozitivan tumor s citoplazmatskim obojenjem D. Vretenaste stanice GIST-a (Miettinen i sur., 2006).

1.2. LIJEČENJE PACIJENATA

Glavna terapija za GIST je kirurška resekcija, no ne i za neoperabilne i metastatske maligne tumore. Tretman koji se preporuča za takve tumore jest inhibitor receptora tirozin kinaze, imatinib mezilat.

Imatinib je derivat 2-fenilaminopirimidina, koji blokira vezanje adenozin trifosfata na vezujuće mjesto kinaza, te tako sprječava daljnu fosoforilaciju signalnih molekula nizvodno od receptora. U početku se koristio za tretman kronične mijeloične leukemije, i to vrlo uspješno, blokirajući BCR-ABL kinaznu aktivnost. Poslije je otkriveno da je djelotvoran i za metastatički GIST koji ima mutacije gena *c-KIT i PDGFRA*, kad su se već i kemoterapija i radioterapija pokazale bezuspješnima. Odgovor na terapiju imatinibom ovisi i o prisutnosti aktivirajućih mutacija KIT. Dvije su kategorije mutacija KIT:

i. mutacije dijagnosticirane u primarnim tumorima prije tretmana s inhibitorom TK, povezane s GIST patologijom, i
ii. sekundarne mutacije koje su utvrđene tijekom tretmana uzrokujući otpornost na lijek.

Kliničke studije i eksperimenti su pokazali da tumori s mutacijama KIT na eksonu 11 (u jukstamembranskoj domeni) generalno bolje reagiraju na tretman s imatinibom nego oni s mutacijama KIT na eksonu 9 (u ekstracelularnoj domeni) nazvane i mutacije KT-WT (Heinrich i sur., 2003, Debiec-Rychter i sur., 2006). No, da bi se postigao sličan terapeutski učinak, pacijenti s muatcijama KIT na eksonu 9 trebaju veću dnevnu dozu imatiniba (Lasota i Miettinen, 2008, Casali i sur., 2008). Tijekom tretmana s imatinibom, sekundarne mutacije rezistentne na inhibitor TK su nađene većinom na eksonu 13 (TK1) i eksonu 17 (TK2) i to nukleotidne supstitucije V654A i W670I, te D816V i T823D.

U slučaju progresije ili netolerancije na imatinib, novi inhibitor RTK, koji je odobren rane 2006. godine, je sutinib, koji se pokazao efikasnim kod prethodno opisanih mutacija rezistentnih na imatinib, ali i kod divljih tipova RTK (Gomes i sur., 2007).

1.3. RECEPTOR C-KIT

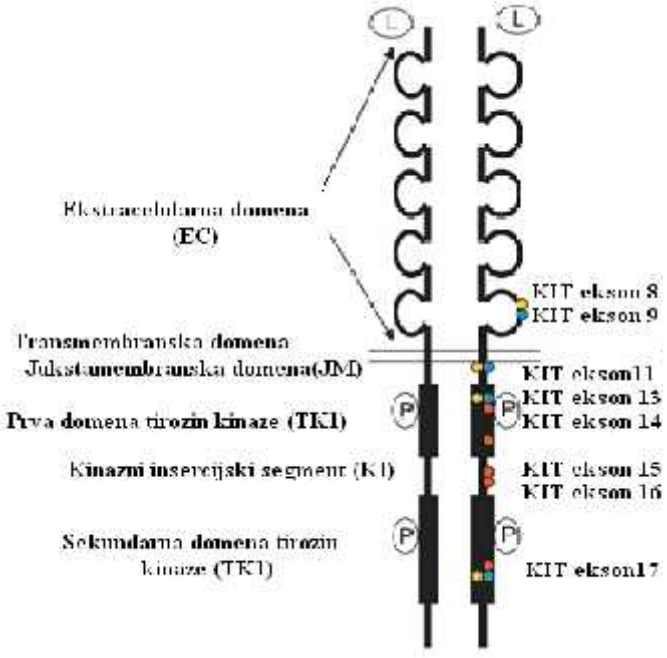
1.3.1. Građa i funkcija receptora c-KIT

Geni *KIT*, kao i *PDFGRA*, su mapirani na kromosomu 4q12 (Slika 1.4.) te se smatra da su genskom duplikacijom i evoluirali iz zajedničko naslijeđenog gena (Stenmann i sur., 1989).



Slika 1.4. Položaj gena *KIT* na ljudskom kromosomu 4 (www.genecards.org)

c-KIT je transmembranski glikoprotein od 145 kD, receptor faktora rasta SCF, a pripada obitelji receptora razreda III s tirozin kinaznom aktivnošću (RTK). Povezan je s receptorom za čimbenik rasta trombocita (PDGF), čimbenikom stimulacije kolonija I (CSF I) i FLT3 ligandom. Sve RTKIII imaju specifičnu molekularnu strukturu koja se sastoji od pet ekstracelularnih (EC) domena nalik imunoglobulinu, i citoplazmatske domene s jukstamembranskom (JM) regijom i razdvojenom tirozin kinaznom (TK) domenom, koja je podijeljena kinaznim insercijskim segmentom na vezujuću adenozin-trifosfat (ATP) i fosfotransferaznu regiju (Lasota i sur., 2008), što je prikazano na slici 1.5.



Slika 1.5. Građa receptora c-KIT (preuzeto iz Lasota i Miettinen, 2008)

Receptori c-KIT u normalnom okruženju potiču proliferaciju stanica vezanjem liganda (faktora matičnih stanica, SCF) na ekstracelularnu domenu receptora. Vezanje SCF inducira dimerizaciju, odnosno homodimerizaciju receptora, i fosforilaciju tirozinskih ostataka citoplazmatske TK domene što vodi do aktivacije višestrukih signalnih puteva i prijenosa signala uključujući signalnu mrežu Ras/MAP kinazu, Rac/Rho-JNK, PI3/AKT i SFK/STAT (Fletcher J.A., 2004). Aktivnost KIT-TK je regulirana jukstamembranskom domenom, koja inhibira kinaznu aktivnost KIT u odsutnosti liganda KIT (Mol i sur., 2004).

Zajedno sa svojim ligandom receptor c-KIT ima kritičnu ulogu u razvoju i održavanju različitih tipova stanica (hematopoetskih matičnih stanica, mastocita, melanocita, gametocita i ICC). Funkcija receptora c-KIT je u provođenju signala iz vlastitog okoliša u unutrašnjost stanice, što utječe na nastanak složenih staničnih odgovora poput proliferacije, migracije, preživljenja i diferencijacije. Mnogi od ovih odgovora su poremećeni nastankom tumora, čije je obilježje nekontrolirana stanična proliferacija, neosjetljivost na apoptozu, metastatski potencijal i u nekim slučajevima blokiranje diferencijacije, ostavljajući stanice u nezrelom, proliferativnom stanju.

Osim u GIST-u, pronađene su aktivirajuće mutacije u kinaznoj domeni c-KIT-a u mastocitima (Arber i sur., 1998), a nefunkcionalna aktivnost ove RTK je otkrivena i u melanomima (Montone i sur., 1997), karcinomima pluća malih stanica (Rossi i sur., 2003), akutnoj mijeloičnoj leukemiji (Crosier i sur., 1993), neuroblastomu (Uccini i sur., 2005), karcinomu jajnika (Raspollini i sur., 2004) i karcinomu testisa i dojki (Ulivi i sur., 2004).

1.4. PRIJENOS SIGNALA PREKO RECEPTORA C-KIT

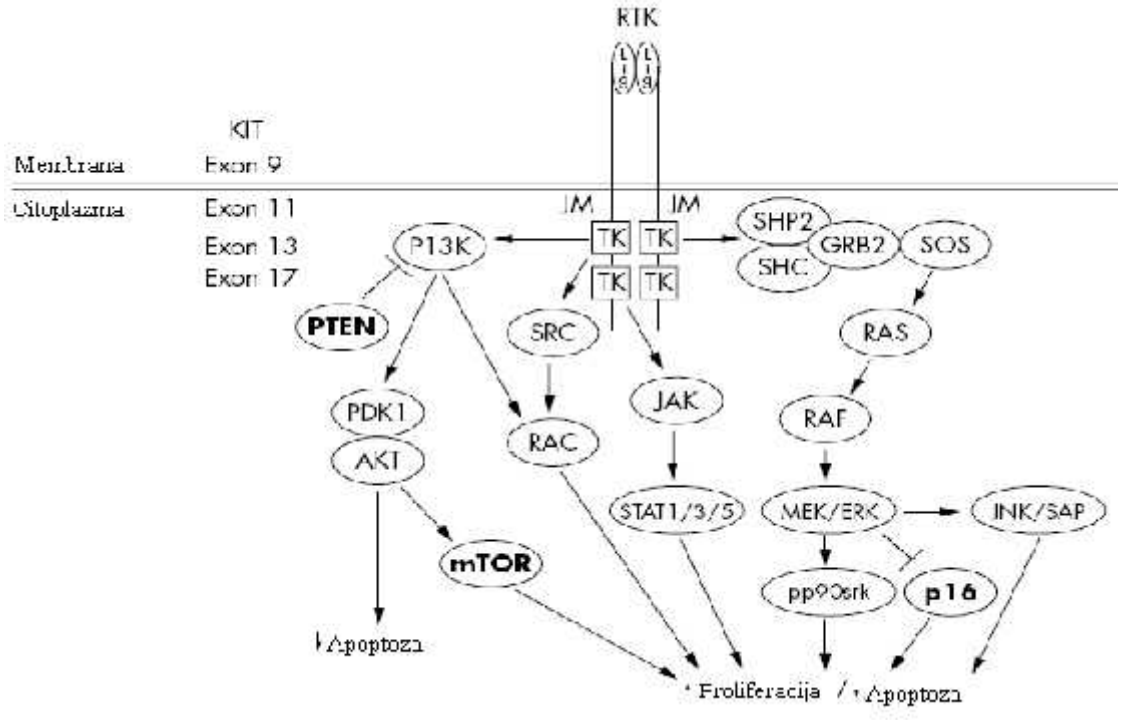
Hematopoetske matične stanice imaju sposobnost mitoze, ali se mogu diferencirati u različite hematopoetske stanične linije. c-KIT se eskprimira na hematopoetskim matičnim i progenitorskim stanicama, no tijekom diferencijacije se utišava (Ogava i sur., 1991, Broudy, 1997). Za razliku od ostalih hematopoetskih stanica gdje c-KIT ima malu ulogu u diferencijaciji, mastociti posjeduju visoku ekspresiju c-KIT i kao potpuno diferencirane stanice ovise o prijenosu signala putem receptora c-KIT za preživljenje, rast i druge biološke funkcije (Oliveira i Lukacs, 2003). Ekspresija receptora c-KIT je pronađena i u humanim stanicama akutne mijeloične leukemije (AML) gdje je c-KIT konstitutivno fosfriliran (Heinrich i sur., 2002.)

c-KIT je uključen i u procese oogeneze, folikulogeneze i spermatogeneze. Funkcija receptora c-KIT u spolnim stanicama je strogo ovisna o njegovoj sposobnosti da aktivira Pl3

kinazu, koja pripada razredu lipidnih kinaza koje fosfoliraju 3'-hidroksilnu skupinu fosfoinozitida. Ostatak Y721 unutar receptora c-KIT direktno djeluje s Pl3- kinazom (Serve i sur., 1995) te tako *in vivo* potiče preživljenje preko aktivacije Akt proteina ovisne o Pl3-kinazi i fosforilacije proteina Bad, koji je proapoptozna molekula (Slika 1.6.)

Općenito, proteini RTK aktiviraju proteine Ras (mali G-proteini koji mogu postojati u obliku aktivnog GTP-vezujućeg oblika i neaktivnog GDP-vezujućeg oblika i mogu aktivirati brojne signalno prijenosne molekule kao Pl3-kinaze i proteine Rac) preko proteina Sos, koji olakšava izmjenu GDP za GTP (Buday i Downward, 1993). U stanici Sos postoji u kompleksu s adapterskim proteinom Grb2 (Slika 1.6.), koji se povezuje preko svoje domene SH2 s fosforiliranim tirozinskom ostacima unutar sekvence pXYN. Protein Grb2 se može direktno vezati i na c-KIT preko fosforiliranih Y703 i Y936 ostataka unutar receptora c-KIT (Thömmes i sur., 1999).

Brojna su istraživanja potvrdila i da aktivacija receptora c-KIT nakon vezanja liganda, dovodi do brzog povećanja aktivnosti porodice tirozin kinaza Src (Linnekin i sur., 1997), te da c-KIT može stimulirati tirozinsku fosforilaciju proteina JAK2 (Janus kinaza) (Brizzi i sur., 1994).



Slika 1.6. Prijenos signala preko kinaze KIT (Tornillo i Terracciano, 2006)

1.5. MUTACIJE GENA *C-KIT*

Aktivirajuće mutacije gena *KIT* u GIST-u su nađene u četri regije i to u eksonima 9, 11, 13 i 17. Ovisno o lokaciji, mutacije se mogu podijeliti u 2 kategorije:

1) mutacije receptora regulatorne domene (EC i JM)
2) mutacije enzimatske domene (TK1 i TK2)

Većina mutacija KIT (Slika 1.7) se nalazi u jukstamembranskoj (JM) domeni (ekson 11), a potom u ekstracelularnoj (EC) domeni (ekson 9). Mutacije u JM domeni pogađaju njenu autoregulatornu funkciju te dolazi do spontane aktivacije kinaze (Ma i sur., 1999, Chan i sur., 2003), a mutacije u domeni EC mogu raskinuti antidimerizacijski motiv dovodeći do spontane homodimerizacije receptora (Heinrich i sur., 2003). Kontinuirana aktivacija liganda kinaze KIT aktivira nizvodne prijenose signala promičući proliferaciju i preživljenje stanice.

Najčešće mutacije KIT (Tablica 2.) su delecije (više od 70%), te su isključivo nađene u eksonu 11 (JM domena) a čine ih gubitak tri do 30 nukleotida, ili više. Većina tih mutacija obuhvaća proksimalni dio eksona 11 i to između kodona Gln^{550} i Glu^{561} (Taniguchi i sur., 1999), a najčešća delecija je gubitak Trp^{557} i Lys^{558}.

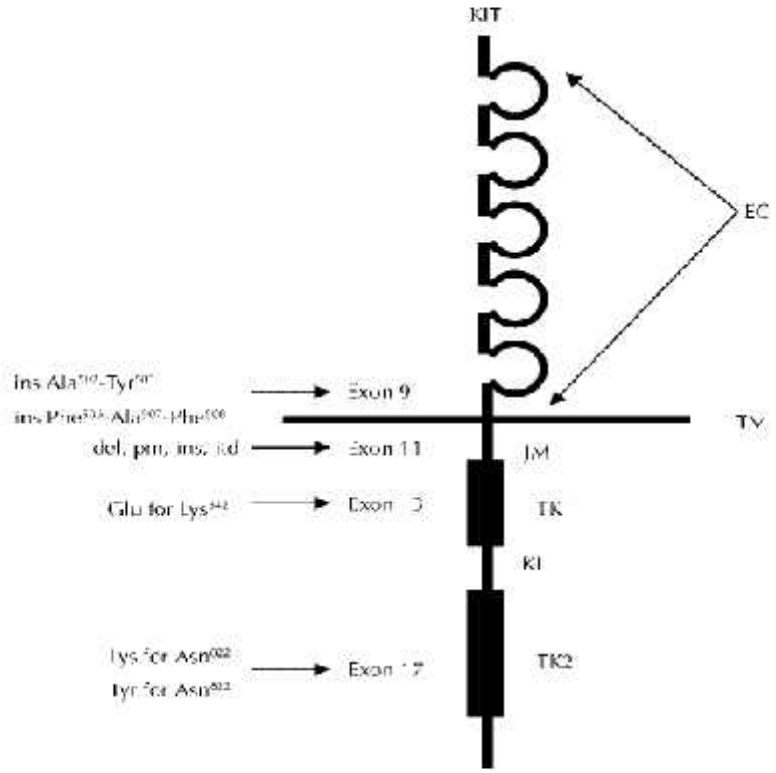
Nukleotidne supstitucije se javljaju u 20 do 30% slučajeva GIST-a, također pogađaju ekson 11, a uključuju kodone Trp^{557}Arg, Val^{559}Ala i Val^{560}Asp u proksimalnom dijelu eksona 11 i Leu^{576} Pro u distalnom dijelu (Lasota i sur., 1999, Taniguchi i sur., 1999). Također su supstitucije pronađene i u eksonima 13 (TK1 domena) i 17 (TK2 domena), jako rijetko u eksonu 9.

Duplikacije su po učestalosti treće mutacije KIT, pronađene su u distalnom dijelu eksona 9, rjeđe se pojavljuju, ali su sve pronađene mutacije bile identične duplikacije 6 nukleotida kodirane Ala^{502}- Tyr^{503} (Lux i sur.,2000). Nedavno je pronađena i duplikacija Phe^{506}-Ala^{507}-Phe^{508} (Lasota i sur., 2006, Heinrich i sur., 2003). Jako rijetko se pojavljuju insercije, a dosad je zabilježena samo na eksonu 11 i to u kodonu 558.

Javljaju se još i kompleksne mutacije, i to delecije-insercije i duplikacije-insercije i to u eksonu 11. Mutacije se sastoje od jedne do nekoliko delecija i duplikacija nukleotida s malim brojem insercija.

Tablica 2. Česte mutacije u genu *c-kit* (Lasota i Miettinen, 2008, Corless i sur., 2006)

delecije	**supstitucije aminokiselina**	**ekson**
Gln550_Glu561	Val559Asp	11
Trp557_Lys558	Val560Asp	11
Asp579	Trp557Arg	11
	Val559Ala	11
	Val559Gly	11
	Leu576Pro	11
	Glu490Gly	9
	duplikacije	
	Ala502_Tyr503	9
	Phe506_Phe508	9



Slika 1.7. Shematski prikaz učestalih mutacija KIT (Miettinen i Lasota, 2006)

1.5.1. Familijarni (obiteljski) GIST

Nakon studija *in vitro*, analizom bolesnika i njihovih obitelji utvrđene su i nasljedne mutacije KIT, koje su kao i PDGFRA, slične onima u sporadičnim GIST-ima. To su mutacije u eksonima 8, 9 i 11, kao i 13 i 17, a najčešće pronađene mutacije u jukstamembranskoj regiji eksona 11 su delecije jednog ili dva valina (kodon 559, 560), te supstitucija V559A. U ljudskom familijarnom sindromu GIST osobe sa naslijeđenim mutacijama razviju među ostalim simptomima, i hiperplaziju intersticijskih Cajalovih stanica i multipli GIST (Nishida i sur., 1998, Li i sur., 2005), s tim da su obitelji u kojima su pronađene različite mutacije gena *KIT*, pronađeni i drugi različiti simptomi (npr. hiperpigmenatcije kože, urtikarija pigmentoza, disfagija, itd.) (Robson i sur., 2004, Beghini i sur., 2001).

Osim familijarnog GIST sindroma, GIST-i su usko povezani s još dva sindroma: neurofibromatozom tipa 1 (NF1) i trijadom *Carney*.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U ovom je radu analizirana pojava mutacije u genu *c-KIT* , na uzorcima tumora 12 pacijenata oboljelih od gastrointestinalnog stromalnog tumora liječenih u Kliničkom bolničkom centru Split, te su ciljevi istraživanja bili:

1. Izolirati DNA iz uzoraka tumorskog tkiva uklopljenog u parafin pacijenata s GIST-om
2. Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) umnožiti regije u eksonima 9 i 11 gena *c-kit*
3. Napraviti sekvenciranje produkata PCR reakcije i utvrditi moguće mutacije u navedenim eksonima
4. Dobivene podatke usporediti s podacima iz dostupne relevantne literature

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 12 uzoraka tkiva uklopljenog u parafin od pacijenata kojima je dijagnosticiran GIST (gastrointestinalni stromalni tumor). Uzorci tumora prikupljeni su u Kliničkom bolničkom centru Split, u Zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju od 1994. do 2005. godine. Dijagnoza GIST-a je potvrđena histopatološkim i imunohistokemijskim metodama (bojenje na c-kit/CD117), te su svi uzorci bili pozitivni na c-KIT.

3.1.2. Osnovne kemikalije i materijali

- Ksilol, Merck , Njemačka
- Etanol (100%, 70%, 50%), Merck, Njemačka
- Izopropanol, 100% Sigma, SAD
- Proteinaza K, Invitrogen, SAD
- Egzonukleaza I, Takara, Japan
- SAP (eng. *Shrimp Alkaline Phosphatase*), Takara, Japan
- 3 mM Natrijev acetat, Invitrogen, SAD
- 125 mM EDTA, Invitrogen, SAD
- Formamid, Invitrogen, SAD

3.1.3. Puferi i otopine

Puferi korišteni za izolaciju DNA iz tkiva uklopljenog u parafin

- Puferi sadržani u kompletu reagencija *High pure PCR template preparation Kit,* Roche (Njemačka)
    - Pufer za lizu tkiva (eng. *Tissue Lysis Buffer*)
    - Pufer za vezanje (eng. *Binding Buffer*)
    - Pufer za uklanjanje inhibitora (eng. *Inhibitor Removal Buffer*)
    - Pufer za ispiranje (eng. *Wash Buffer*)
    - Pufer za eluiranje (eng. *Elution Buffer*)
- Izopropanol, 100%, Sigma, SAD

Puferi, reagencije i enzimi korišteni u lančanoj reakciji polimeraze (PCR)

- AmpliTag Gold™ DNA polimeraza, 5 U/µl
- PCR-pufer, 10x
- $MgCl_2$, 25mM
- Deoskinukleozid-trifosfati (dATP,dTTP, dCTP,dGTP), 2.5 mM
- Nizvodne početnice, 10µM
- Uzvodne početnice, 10µM
- Voda, redestilirana

Sve reagencije su proizvod Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Puferi i otopine korišteni za elektroforezu u gelu agaroze

- Elektroforetski pufer 10x TBE (Tris, Edta-Na_2 + $2H_2O$, borična kiselina), Euroclone, Italy
- Agarozni gel (2%)
    - Agaroza, Electrophoresis grade, Invitrogen™ Life Technologies, 2g
    - Syber green, Invitrogen ™ Life Technologies, SAD, 15µl
    - TBE, 10x
    - Voda, redestilirana, do 100mL
- Blue juice Gel DNA Loading Buffer, Invitrogen™ Life Technologies, SAD
- Biljeg veličine fragmenata : 50pb Dna Ladder, Invitrogen™ Life Technologies, SAD

3.1.4. Kompleti reagencija

- Komplet "High pure PCR template preparation Kit" za izolaciju DNA iz tkiva uklopljenog u parafin, Roche, Njemačka
- Komplet "QIAquick PCR Purification Kit" za pročišćavanje produkata PCR reakcije; QIAGEN, SAD
- Komplet "Quantifiler® Human DNA Quantification Kit", za detekciju humane DNA , Applied Biosystems, SAD

3.1.5. Uređaji

Značajniji uređaji koji su korišteni u eksperimentalnom radu su: PCR uređaj (Gene Amp, PCR system 9700, Applied Biosystems), genetički analizator (ABI PRISM 3130), QRT-PCR (*eng*. Quantitative Real-time PCR, 7000 Sequence Detection System; Applied Biosystem), mikrotom (Reichert, Austrija), sustav za elektroforezu (Consort, 400V-400mA), UV iluminator sa sustavom za snimanje agaroznih gelova (180W), stolna mikrocentrifuga (Eppendorf), mikrovalna pećnica jačine 1300W, električna vaga (Kern & Sohn), termostatski inkubator, digitalna kamera Canon.

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija DNA iz tkiva uklopljenog u parafin

Za ekstrakciju genomske DNA izrezani su tkivni rezovi na dijelove tanke 15µm. Sterilno izrezani parafinski rezovi (2-3 reza) su stavljeni u 1,5 ml eppendorf tubice. U svaku tubicu je dodano 1 ml ksilola ostavljeno 30 minuta. Uzorak se centrifugira (3 min, 13000 *x* g), odvoji se supernatant i postupak se opet ponovi. Slijedi dehidriranje preparata u 100% etanolu, 1 minutu. Supernatant se odvoji, a postupak se ponovlja dodavanjem silaznog niza alkohola (70% i 50% etanol). Odbaci se posljednji alkohol i tkivo je 2 puta isprano u 1 ml deionizirane vode. Tkivo se osuši u tubici na 56 ºC. U osušeno tkivo je dodano 50 µl proteinaze K, te se ostavi preko noći na 37 ºC. Idući dan u tkivo je dodano još 50 µl proteinaze K i inkubirano je dva sata na 56 ºC. Uporabom "High pure PCR template preparation kit" (Roche Diagnostics, Njemačka) je iz tkiva potom izolirana DNA prema

uputama proizvođača. Koncentracija genomske DNA je potom izmjerena metodom qRT-PCR-om (*engl*. *Quantitative real-time PCR*), na instrumentu ABI 7000 (Applied Biosystems, SAD).

3.2.2. PCR (lančana reakcija polimerazom)

Prisutnost određene tumorske DNA je utvrđivana lančanom reakcijom polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) koristeći specifične početnice kao kalup. (Tablica 3.)

Tablica 3. Početnice korištene u lančanoj reakciji polimerazom (Li Gong i sur. 2009, S. Romagnoli i sur. 2005), veličina produkta, i njihove temeperature taljenja (Tm)

Početnice	**Veličina PCR produkta (pb)**	**Tm(ºC)**
Ekson 9 nizvodna 5' TCC TAG AGT AAG CCA GGG CTT T 3'	280	58
Ekson 9 uzvodna 5' TGG TAG ACA GAG CCT AAA CAT CC	280	58
Ekson 11 nizvodna 5' AGG TGA TCT ATT TTT CCC TTT C 3'	220	56
Ekson 11 uzvodna 5' CTT AAA GTC ACT GTT ATG TGT A 3'	220	56

3.2.2.1. PCR reakcijska smjesa i uvjeti reakcije

Amplifikacija DNA PCR-om je provedena u ukupnom volumenu reakcijske smjese (Tablica 4.) od 25 µl koja je sadržavala : 2,5 µl 1xPCR buffer (Applied Biosystem), 2 µl 25 mM $MgCl_2$, 2 µl 2,5 mM smjese dNTP-ova, 0,25 µl AmpliTaq Gold polimeraze (Applied Biosystem, 5U/µL), 1µl specifičnih početnica, 1µl genomske DNA (2 ng/µl) i dH_2O. Program umnažanja započinjao je predenaturacijom 10 min na 94°C, nastavljao se s 40 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacije 1 min na 94°C, sparivanja početnica s homolognim sljedovima 1

min na 56 / 58°C i produljivanja lanca 1 min na 72°C, a završno produljivanje lanca bilo je 7 min na 72°C (Tablica 5.).

Tablica 4. Sastav PCR reakcije

Komponenta	Volumen u reakciji (µl)
PCR pufer (1x)	2,5
$MgCl_2$ (25mM)	2
dNTP (2,5mM)	2
početnice	1
Tag polimeraza (5U/µl)	0,25
DNA (2ng/µl)	1
dH_2O	do 25
ukupno	25

Tablica 5. Uvjeti PCR

Korak PCR –a	Temperatura i trajanje
Predenaturacija	94ºC, 10 min
Denaturacija	94ºC, 1 min
Prianjanje početnica	56/58 ºC, 1min 40x
Elonagacija/sinteza	72ºC, 1min
Završna elongacija/sinteza	72ºC, 7min

PCR reakcija se napravi uporabom instrumenta GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, SAD).

3.2.3. Elektroforetsko razdvajanje fragmenata DNA u agaroznom gelu

Za potvrđivanje amplifikacije, PCR produkti su razdvajani na 2% agaroznom gelu, pripremljenom dodatkom 2g agaroze u 90ml otopine pufera 10x TBE (Tris-Borna kiselina-EDTA). Otopina se zagrijava, uz povremeno miješanje, sve dok se agaroza u potpunosti ne otopi. Nakon što se gel malo ohladi, doda se 15 µl boje Syber greena (Invitrogen, SAD), te se gel izlije u pripremljeni nosač i pričeka se dok se stvrdne. Gel se potom stavi u kadicu za elektroforezu i nadopuni se istim puferom do malo iznad površine gela. Pomiješa se 10 µl uzorka s 2 µl nabojnog pufera (eng. *Loading buffer,* Invitrogen, SAD) te se nanese u jažice

gela. Elektroforeza se odvija u električnom polju jakosti 100V. Veličina razdvojenih fragmenata je određivana usporedbom s biljegom za veličinu DNA odsječka (Invitrogen, SAD), a fragmenti su vizualizirani UV transiluminatorom.

Produkti PCR-a su za daljnju analizu pročišćeni uporabom "QIAquick PCR Purification Kit" (Qiagen, SAD). Jednom volumenu PCR uzorka je dodano pet volumena pufera PBI. Na pripremljene 2 mL tubice za skupljanje uzoraka su stavljene QIAquick spin kolone. U spin kolonu je dodan uzorak, da bi se DNA vezala na silikatnu membranu, te se centifugira 30 do 60 sekundi. Odbaci se eluat i doda se 750 µl pufera PE za ispiranje u spin kolonu. Centrifugira se dvaput po 60 sekundi da bi se u potpunosti uklonili ostaci etanola iz pufera PE. Zatim se QIAquick kolona stavi u čistu 1,5 mL tubicu, te se doda 30 µl elucijskog pufera EB u središte silikatne membrane za otapanje DNA, ostavi se stajati 1 minutu i potom se centrifugira. Pročišćena DNA se potom analizira na gelu.

3.2.4. Utvrđivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA (sekvenciranje)

Prije sekvenciranja PCR produkti se još dodatno pročiste egzonukleazom I i SAP (*engl. Shrimp Alkaline Phosphatase*) za uklanjanje zaostalih početnica i nukleotida. Na 5µl PCR produkta doda se 0,2µl Exo I (*eng. exonuclease I,* 5U/µl) i 0,5 µl SAP (1U/µl) te 4,3 µl H_2O. inkubira se 20 minuta na 37ºC i 15 minuta na 80º za deaktivaciju enzima.

3.2.4.1. Sekvencijska reakcija

Pripremi se 5µl reakcijske smjese koji sadržava: 2µl pročišćenog PCR produkta, 1µl miksa (BIGDye Terminator 3.1, Applied Biosystems, SAD), 0,3 µl početnica i 1,7µl H_2O. PCR za sekvencijsku reakciju se provede na uređaju GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, SAD). Program umnažanja započinje predenaturacijom 1 min na 96ºC, nastavlja se s 25 ciklusa: denaturacija 10 s na 96ºC, prianjanje početnica 5 s na 50ºC, i produljivanje lanca 4 minute na 60ºC.

3.2.4.2. Precipitacija

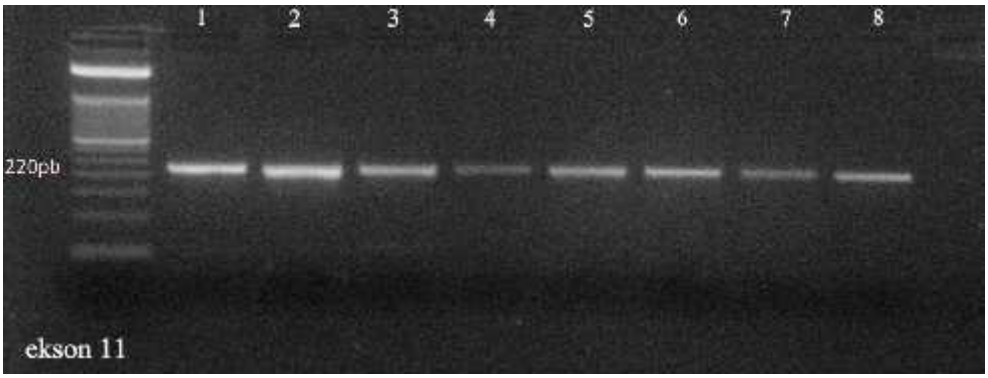
PCR reakcijska smjesa pročisti se precipitacijom s etanolom. U svaki uzorak se doda 15 µl H_2O, 2 µl 125 mM EDTA, 2 µl 3 mM natrijevog acetata i 50 µl 100% etanola. Inkubira se

30 minuta na sobnoj temperaturi, potom centrifugira 30 minuta na 3300 rpm. Vakum sisaljkom se usiše sve osim taloga, te se na talog doda 70 µl 70% etanola te se opet centrifugira 10 minuta na 3300 rpm. Ukloni se etanol i stavi se u termostat na 37ºC da se osuši u potpunosti. Nakon sušenja, u svaki uzorak, se doda 15 µl formamida, te se uzorci stave u PCR uređaj, 5 minuta na 95 ºC za denaturaciju. Uzorci se stave na led i potom u sekvencioner ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, SAD).

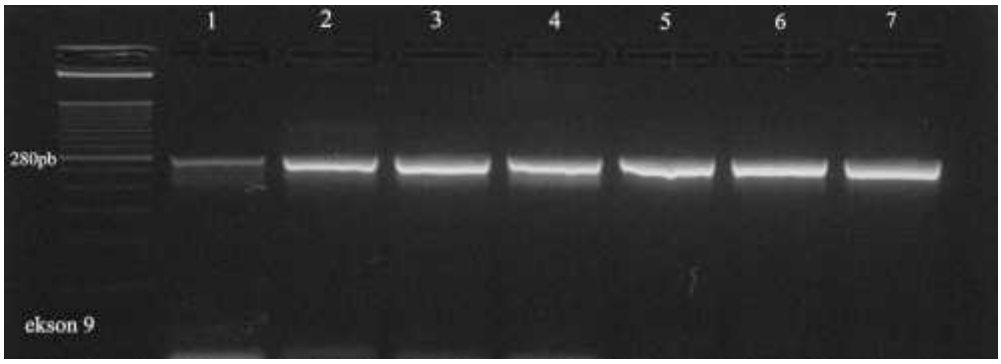
4. REZULTATI

4.2. ANALIZA GENA *C-KIT* AGAROZNOM GEL ELEKTROFOREZOM

U ovom radu analizirano je 12 uzoraka tumorskog tkiva uklopljenog u parafin od pacijenata kojima je dijagnosticiran GIST. Nakon izolacije DNA iz tkiva, lančanom reakcijom polimeraze (PCR) su umnožene kodirajuće regije u eksonima 9 i 11 gena *c-kit*. Analiza uspješnosti reakcije PCR provedena je gel elektroforezom (slika 1.8. i slika 1.9.).



Slika 1.8. Prikaz rezultata PCR amplifikacije za ekson 11 (za 8 uzoraka); ciljni odsječak je veličine 220 pb.



Slika 1.9. Prikaz rezultata PCR amplifikacije za ekson 9 (za 7 uzoraka); ciljni odsječak je veličine 280 pb.

4.3. ANALIZA MUTACIJA DOBIVENIH SEKVENCIRANJEM DNA

Od 12 analiziranih uzoraka u njih deset su utvrđene mutacije. U eksonu 11 su nađene mutacije u 8 uzoraka, a u eksonu 9 su nađene u 2 uzorka (Tablica 6.).

Nukleotidne supstitucije odnosno *missense* mutacije su pronađene u devet ispitanika, od toga je u dva uzorka GIST-a nađena mutacija 560 G → T na eksonu 11, što za posljedicu ima promjenu aminokiseline Val → Gly u kodonu 555.

Također, na eksonu 11 su u tri uzorka nađene iste mutacije 245 C → G, što rezultira promjenom aminokiseline Gln → Val. Osim *missense* mutacija je potvrđena i delecija kodona i to Glu554 → Trp557.

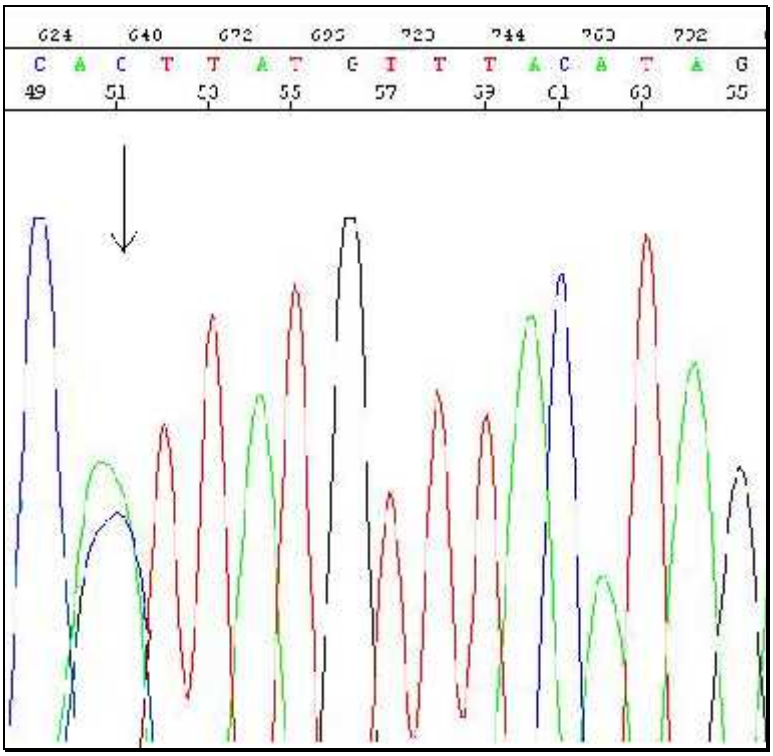
U ostala četiri uzorka su nađene *missense* mutacije u eksonu 11 koje dovode do promjena aminokiselina Asn → Thr, Asn → Phe, Asn → Ile u kodonima 566 i 567, te Trp → Leu u kodonu 557.

U eksonu 9 su nađene *missense* mutacije u dva ispitivana uzorka i to 1355 G→C (Gly →Ala) i 1176 C→A (Ala → Asp), a u jednom uzorku je osim nukleotidne supustitcije nađena i insercija Gln1039.

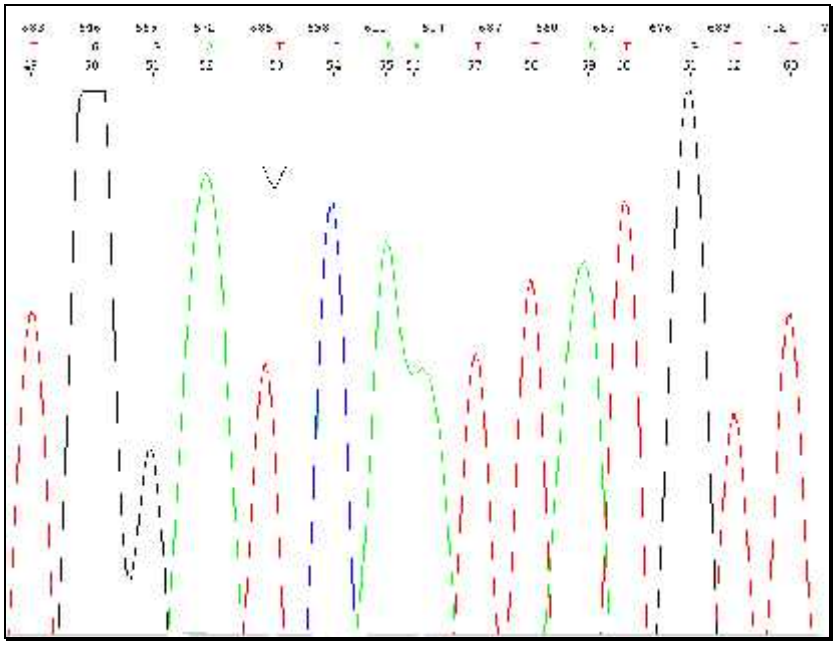
U dva uzorka nisu pronađene mutacije *c-KIT* u eksonima 9 i 11.

Tablica 6. Rezultati analize DNA sekvenciranja, prikaz mutacija pojedinih uzoraka

Uzorak br.	Mutacije baza	Promjene aminokiselina	Ekson
1	640 A → C	Asn → Thr	11
2	281 G → T	Trp → Leu	11
3	550 A→G 560 A→C	Gly → Val Asn → Phe	11
4	589 A →T	Asn → Ile	11
5	245 C→G 560 G →T	Gln → Val Val → Gly	11
6	245 C→G 560 G→T 620 A→T	Gln → Val Val → Gly Asn → Phe	11
8	245 C→G	Gln → Val	11
9	Glu554_Trp557del		11
11	1355 G→ C	Gly → Ala	9
12	1176 C → A insercija Gln1039	Ala → Asp	9



Slika 1.10. Prikaz rezultata sekvenciranja DNA u genu *c-kit*. Dati su primjeri uzoraka broj 1 i 3 koji pokazuju točkastu mutaciju u eksonu 11 (A→C) što za posljedicu ima promjenu aminokiseline (N567F)



Slika 1.11. Prikaz rezultata sekvenciranja DNA u genu *c-kit*. Primjer uzorka broj 4 pokazuje točkastu mutaciju (A→T, N566I)

5. RASPRAVA

Gastrointestinalni stromalni tumori (GIST), iako relativno rijetki, spadaju među najčešće primarne mezenhimalne tumore gastrointestinalnog (GI) trakta. Čine ih sarkomi mekih tkiva koji nastaju iz matičnih stanica mezenhima u probavnom sustavu (Gomes i sur., 2007). GIST eksprimira tirozin kinazni onkoprotein KIT, te somatske mutacije koje su rezultat konstitutivne aktivacije kinaze KIT utvrđene su u brojnim kliničkim studijima GIST-a, iako se pojavljuju različitom učestalošću (20 do 92%) (Corless i sur., 2002). Više od 95% dijagnosticiranih GIST-a je pozitivno na c-KIT, te se c-KIT pokazao kao vrlo koristan biljeg u dijagnostici, time razlikujući GIST od ostalih gastrointestinalnih mezenhimalnih neoplazmi (Rossi i sur., 2005).

Hirota i suradnici (1988) su prvi dokazali prisutnost aktivirajućih konstitutivnih mutacija protoonkogena c-KIT u GIST, a još je nekoliko autora potvrdilo da su te mutacije ključne za razvoj GIST (Lux i sur., 2000, Rubin i sur., 2001, Kitamura i sur., 2003). Osim njegove uloge u dijagnostici, imaju i veliko terapeutsko značenje u liječenju naprednih i metastatskih GIST-a sa selektivnim inhibitorima KIT poput imatinib mezilata, što je potvrdilo nekoliko kliničkih studija (Joensuu i sur., 2001, Van Oosterom i sur., 2001., Demetri i sur., 2002).

Najčešće mutacije KIT, povezane s metastaskim ponašanjem GIST-a , nalaze se na eksonu 11 i to u jukstamembranskoj domeni, pogađajući regiju između kodona 550 i 561, dok su velikom većinom kodoni 557 i 558 deletirani. U ovom istraživanju je u jednom uzorku pronađena delecija na eksonu 11 i to Glu554_Trp557del, što odgovara učestalim mutacijama rađenim na većem broju ispitanika (Debiec-Rychter M. i sur., 2004).

Osim delecija, u eksonima 9 i 11, učestale su i nukleotidne supstitucije odnosno *missense* mutacije koje su pronađene kod devet ispitanika, te su u dva uzorka GIST-a nađene promjene nukleotida 560 G → T što za posljedicu ima promjenu aminokiseline Val → Gly.

U tri uzorka su također nađene iste mutacije i to promjene nukleotida 245 C→G (promjena aminokiseline Gln → Val). Za *missense* mutacije Val → Gly i Gln→ Val je dokazano da uzrokuju konstitutivnu fosforilaciju KIT i izazivaju transfomaciju limfoblastnih staničnih linija *in vitro* (Corless i sur., 2004).

U ostala četri uzorka su nađene *missense* mutacije u eksonu 11, zapravo nukleotidne supstitucije koje dovode do promjena aminokiselina Asn → Thr, Asn → Phe, Asn → Ile i Trp → Leu. U eksonu 9 su u dva ispitanika nađene dvije *missense* mutacije, te je u jednom uzorku osim nukleotidne supustitcije nađena i insercija Gln1039.

Prethodno spomenute mutacije ponešto odstupaju od rezultata drugih autora, a razlozi mogu biti višestruki. Različitosti u ekspresiji proteina, to jest, u ekspresiji c-KIT, mogu biti rezultat upotrebe drugih proba u istraživanju ili zbog raznolikosti populacije, kao što je opisano u nekim australskim i skandinavskim studijama (Morey i sur., 2002, Wasag i sur., 2004) gdje je potvrđena manja ekspresija c-KIT (78%) iako su nekoliko studija pokazale mutaciju gena *c-KIT* u svim uzorcima. Ne treba zanemariti ni činjenicu da su uzorci tumora bili uklopljeni u parafin. Time je učinkovitost detekcije mutacija gena *KIT* nešto manja, što potvrđuju nedavne studije (Andersson i sur., 2006, Miettinen i sur., 2005). Uspješnost detekcije mutacija *KIT* može opadati s povećanjem starosti parafinskih blokova (Steigen i sur., 2007) a u ovom je istraživanju čak korišteno tkivo uklopljeno u parafin iz 1994 godine.

Također, većina mutacija KIT se detektira direktnim sekvenciranjem PCR produkata, kao što je napravljeno i u ovom istraživanju. No, različite studije (Emmerson P. i sur., 2003, Metaxa-Mariatou V. i sur., 2004) su pokazale da je znatno bolja metoda denaturacijske tekućinske kromatografije (*engl*. *denaturing high performance liquid chromatography*, DHPLC), no danas sve više izlaze na tržište i nove generacije sekvencionera što će naravno poboljšati uvjete sekvenciranja u budućnosti.

6. ZAKLJUČAK

Nakon provedene analize gena *c-KIT* lančanom reakcijom polimeraze (PCR) i direktnim sekvenciranjem mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. Analizom uzoraka tkiva uklopljenog u parafin od 12 bolesnika s operiranim GIST-om pronađeno ih je devet (75%) s *missense* mutacijama odnosno nukleotidnim supstitucijama u eksonu 11, jedan s mutacijom delecije baza, isto u eksonu 11, a u eksonu 9 je u jednom uzorku uz *missense* mutaciju pronađena i insercijska mutacija.

2. Najčešće mutacije se javljaju u eksonu 11 (8/10) što je bilo za očekivati, te su većinom nađene nukleotidne supstitucije, koje dovode do promjene aminokiselina.

3. U dva ispitivana uzorka nije pronađena mutacija u genu *c-KIT* u eksonima 11 i 9 te bi bilo potrebno sekvencirati ostale eksone gena.

7. LITERATURA

Andersson J., Sihto H., Meis-Kindblom J.M., Joensuu H., Nupponen N, Kindblom L.G. (2005) NF1-associated gastrointestinal stromal tumors have unique clinical, phenotypic, and genotypic characteristics. *Am J Surg Pathol.* **29**; 1170–1176.

Andersson J., Bumming P., Meis-Kindblom J.M., i sur. (2006) Gastrointestinal stromal tumors with *KIT* exon 11 deletions are associated with poor prognosis. *Gastroenter*. **130**; 1573-1581

Arber D.A., Tamayo R., Weiss L.M (1998) Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Hum Pathol*. **29**; 498-504

Beghini A., Tibiletti M.G., Roversi G., i sur (2001) Germline mutation in the juxtamembrane domain of the KIT gene in a family with gastrointestinal stromal tumors and urticaria pigmentosa. Cancer **92**; 657-662

Blay P., Astudillo A., Buesa J.M., i sur. (2004) Protein kinase C theta is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias.*Clin Cancer Res.* **10**; 4089–4095.

Brizzi M.F., Zini M.G., Aronica M.G., Blechman J.M., Yarden Y., Pegoraro L. (1994) Convergence of signaling by interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and mast cell growth factor on JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem*. **269(50);** 31680-4.

Buday L., Downward J. (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell*. **73(3);** 611-20.

Casali P.G., Jost L., Reichardt P., Schlemmer M., Blay J.-Y. (2008) Gastrointestinal stromal tumors: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* **19**; 35-38

Chan P.M., Ilangumaran S., La Rose J., Chakrabartty A., Rottapel R. (2003) Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. *Mol. Cell. Biol*. **23**; 3067-3078

Corless C.L., McGreevey L., Haley A. i sur. (2002) KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *Am J Pathol*. **160**; 1567-1572

Crosier P.S., Ricciardi S.T., Hall L.R., i sur. (1993) Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c-kit in leukemic cell lines and acute myeloid leukemia. *Blood* **82**; 1151-1158

Debiec-Rychter M., Sciot R., Le Cesne A. i sur. (2006) KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors. *Eur. J. Cancer* **42**; 1093-1103

Debiec-Rychter M., Dumez H., Judson I., i sur. (2004) Use of *c-KIT/PDGFRA* mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone sarcoma Group. *Eur. J. Cancer* **40**; 689-695

DeMatteo R.P., Lewis J.J., Leung D., i sur. (2000) Two hundred gastrointestinal stromal tumors:Recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* **231**; 51-58

Demetri G., van Mehren M., Blanke C.D., i sur. (2002) Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* **347**; 472–480.

Emmerson P., Maynard J., Jones S., i sur. (2003) Characterizing mutations in samples with low-level mosaicism by collection and analysis of DHPLC fractionated heteroduplexes. *Hum. Mutat.* **21**; 112-115

Fletcher J.A. (2004) Role of KIT and platelet-derived growth factor receptors as oncoproteins. *Semin. Oncol* **31**; 4-11

Fletcher C., Berman J., Corless C., i sur. (2002) Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* **33**; 459-465

Gomes Ana L., Bardales Ricardo H., Milanezi F., Reis Rui M., Schmitt F., (2007) Molecular analysis of c-KIT and PDGFRA in GISTs. *J Clin Pathol* **127**; 89-96

Heinrich M.C., Corless C.L., Duensing A. i sur. (2003) PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Science* **299**; 708-710

Heinrich M.C., Corless C.L., Demetri G.D. i sur. (2003) Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J. Clin. Oncol*. **21**; 4342-4349

Heinrich M.C., Rubin B.P., Longley B.J., i sur. (2002) Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum Pathol*. **33**; 484-95

Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, i sur. (1998) Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* **279**; 577-580

Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, i sur., (1995) W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* **373**; 347-349

http://www.genecards.org

http://www.emc.org

Joensuu H., Fletcher C., Dimitrijevic S., Silberman S., Roberts P., Demetri G. (2002) Management of malignant gastrointestinal stromal tumours. *Lancet Oncol*.**3**; 655-664.

Kitamura Y., Hirota S., Nishida T. (2003) Gastrointestinal stromal tumors (GIST): a model for molecule-based diagnosis and treatment of solid tumors. *Cancer Sci*. **94**: 315-320

Lasota J., Miettien M., (2008) Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* **53**; 245-266

Lasota J., Jasinski M., Salomo-Rikala M. i sur. (1999) Mutations in exon 11 of c-kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am. J. Pathol*. **154**; 53-60

Lasota J., Miettinen M. (2006) KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Semin. Diagn. Pathol*. **23**; 91-102

Lee J.R., Joshi V., Griffin J.W. Jr, i sur. (2001) Gastrointestinal autonomic nerve tumor: Immunohistochemical and molecular identity with gastrointestinal stromal tumor. *J Surg Pathol* **25**; 979-987

Li F.P., Fletcher J.A., Heinrich M.C., i sur. (2005) Familial gastrointestinal stromal tumor syndrome: phenotypic and molecular features in a kindred. *J.Clin.Oncol*. **23**; 2735-2743

Linnekin D., DeBerry C.S., Mou S. (1997) Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *J Biol Chem.* **272(43**); 27450-5.

Lux M.L., Rubin B.P., Biase T.L., i sur. (2000) KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am. J. Pathol*. **156**; 791-795

Ma Y., Cunningham M., Wang X., Ghosh I., Regan L., Longley B. (1999) Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by resudies in putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. *J.Biol.Chem*. **274**; 13399-13402

Metaxa-Mariatou V., Papadopoulos S., Papadopoulos E., i sur. (2004) Molecular analysis of GISTs: evaluation of sequencing and dHPLC. *DNA Cell Biol*. **23**; 777-782

Miettinen M., Lasota J., (2006) Gastrointestinal Stromal Tumors Review on Morphology, Molecular Pathology, Prognosis, Differential Diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* — Vol 130

Miettinen M., Fetsch J.F., Sobin L.H., Lasota J. (2006) Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic study of 45 patients with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol.* **30**; 90–96.

Miettinen M., Sobin L.H., Lasota J. (2005) Gastrointestinal stromal tumors (GIST) of the stomach-a clinicopathologic, immunohistochemical and molecular genetic study of 1756 cases with long-term follow-up. *Am. J. Surg. Pathol.* **29**;52-68

Mol C.D., Dougan D.R., Schneider T.R., i sur. (2004) Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *J.Biol.Chem*. **279**; 31655-31663

Montone K.T., van Belle P., Elenitsas R., i sur. (1997) Proto-oncogene c-kit expression in malignant melanoma: protein loss with tumor progression. *Mod Pathol*. **10**; 939-944

Morey A.L., Wanigesekera G.D., Hawkins N.J. i sur. (2002) c-kit mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Pathology*. **34**; 315-319

Nakahara M., Isozaki K., Hirota S., i sur. (1998) A novel gain-of-function mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* **115**; 1090-1095

Nishida T., Hirota S., Taniguchi M., i sur. (1998) Familial gastrointestinal stromal tumors with germline mutations of the KIT gene. *Nat. Genet*. **19**; 323-324

Oliveira S.H., Lukacs N.W. (2003) Stem cell factor: a hemopoietic cytokine with important targets in asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **2(4);** 313-8

Raspollini M.R., Amunni G., Villanucci A. i sur. (2004) c-KIT expression and corelation with chemoteraphy resistance in ovarian carcinoma: an immunocytochemical study. *Ann Oncol*. **15;** 594-597

Robson M.E., Glogowski E., Sommer G., i sur. (2004) Pleomorphic charateristics of a germ-line KIT mutation in a large kindred with gastrintestinal stromal tumors, hyperpigmentation and dysphagia. *Clin. Cancer Res.* **10**; 1250-1254

Romagnoli S., Graziani D., Bramerio M., i sur. (2005) Immunohistocemical profile and *c-kit* mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Pathology- Research and Practise* **201;** 71-81

Rossi G., Valli R., i sur. (2005) PDGFR expression in differential diagnosis between KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and other primary soft-tissue of the gastrointestinal tract. *Histopathology* **46**; 522-531

Rossi G., Cavazza A., Marchioni A, i sur. (2003) Kit expression in small cell carcinomas of the lung: effects of chemotherapy. *Mod Pathol*. **16**; 1041-1047

Rubin B.P., Singer S., Tsao C, i sur. (2001) KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal tumors. *Cancer Res.* **61**; 8118-8121

Serve H**.**, Yee N**.**S**.**, Stella G**.**, Sepp-Lorenzino L**.**, Tan J**.**C**.**, Besmer P. (1995) Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells. *EMBO J.* **14(3**); 473-83.

Singer S., Rubin B.P., Lux M.L., i sur. (2002) Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* **20**; 3898-3905

Steigen S.E., Eide T.J., Wasag B., i sur. (2007) Mutations in gastrointestinal stromal tumors- a population- based study from Northern Norway. *APMIS* **115**; 289-298

Stenman G., Eriksson A., Claesson-Welsh L. (1989) Human PDGFA receptor maps to the same region on chromosome 4 as the KIT oncogene. *Genes Chromosomes Cancer*. **1**; 155–158.

Taniguchi M., Nishida T., Hirota S. i sur. (1999) Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Res***. 59;** 4297-4300

Tarn C., Skorobogatko Y.V., i sur (2006) Therapeutic effect of imatinib in gastrointestinal stromal tumors: AKT signaling dependent and independent mechanisms. *Cancer Res*. **66**; 5477-5486

Thömmes K., Lennartsson J., Carlberg M., Rönnstrand L. (1999) Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor. *Biochem J*. **341(Pt 1**); 211-6.

Tornillo L., Terracciano L.M. (2006) Un update on molecular genetics of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Pathol* **59**; 557-563

Uccini S., Mannarino O., McDowell H.P., i sur. (2005) Clinical and molecular evidence for c-kit receptor as a therapeutic target in neuroblastic tumors. *Clin Cancer Res*. **11**; 380-389

Ulivi P., Zoli W., Medri L., i sur. (2004) c-kit and SCF expression in normal and tumor breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*. **83**; 33-42

Van Oosterom A.T., Judson I., Verweji J., i sur. (2001) Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metasatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* **358**: 1421-1423

Wasag B., Debiec-Rychter M., Pauwels P. i sur. (2004) Differential expression of KIT/PDGFRA mutant isoforms in epithelioid amd mixed variants of gastrointestinal stromal tumours depends predominantly on the tumor site. *Mod. Pathol.* **17**; 889-894

West R.B., Corless C.L., Chen X., i sur. (2004) The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol.* **165**; 107–113.