

# 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:053160>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-05**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

IVANA GUNJA A

**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 Drmi -Hofman, voditeljici rada, zahvaljujem na ukazanom povjerenju, nesebičnoj podršci i pomoći tijekom izrade ovog rada, na svim pruženim savjetima i na kritičkom proučavanju rada.

Doc. dr. sc. Maji Matuli, suvoditeljici, zahvaljujem na susretljivosti, savjetima i kritičkom proučavanju rada.

Veliko hvala med. lab. ing. Ivani Tomić i ostalim djelatnicima Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra u Splitu na pomoć 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.

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

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

Ivana Gunjača

Rooseveltova 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 studijama GIST-a, iako se mutacije pojavljuju različito učestalo. 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 baze, 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 Gunja a

Rooseveltovo 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 Drmi -Hofman, Assoc. Prof.

Co-supervisor: Dr. Maja Matuli , Assist. Prof.

Reviewers: Dr. Nada Oršoli , Prof.

Dr. Gordana Lackovi -Venturin, Prof.

Thesis accepted: November 10<sup>th</sup> 2010.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
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. Građevina i funkcija receptora c-KIT .....	7
1.4. PRIJENOS SIGNALA PREKO RECEPTORA C-KIT .....	8
1.5. MUTACIJE GENA <i>C-KIT</i> .....	10
1.5.1. Familijarni (obiteljski) GIST.....	12
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>14</b>
3.1. <i>MATERIJALI</i> .....	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. <i>METODE</i> .....	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
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>20</b>
4.2. ANALIZA GENA <i>C-KIT</i> AGAROZNOM GEL ELEKTROFOREZOM.....	20
4.3. ANALIZA MUTACIJA DOBIVENIH SEKVENCIRANJEM DNA .....	21

<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>24</b>
<b>6. ZAKLJU AK.....</b>	<b>26</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>27</b>

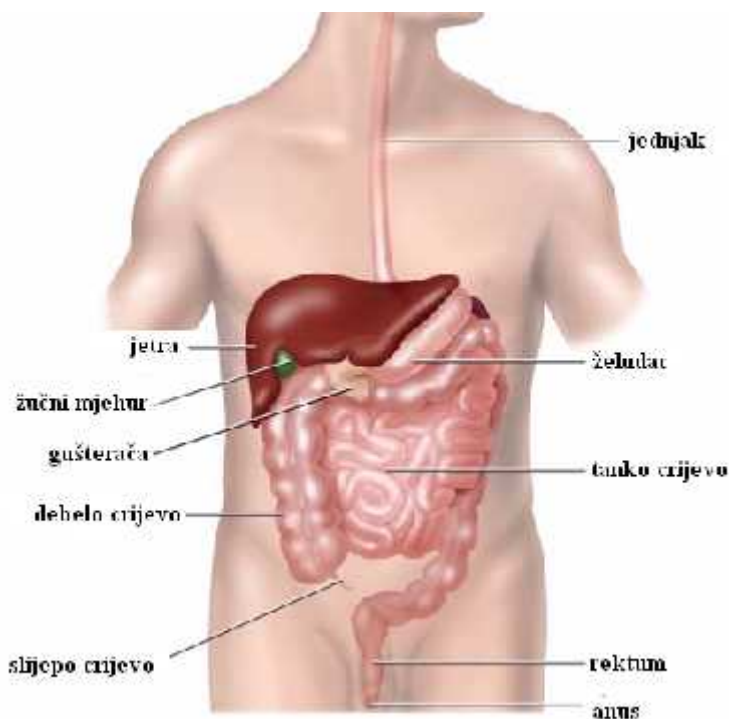


# 1. UVOD

## 1.1. GASTROINTESTINALNI STROMALNI TUMOR

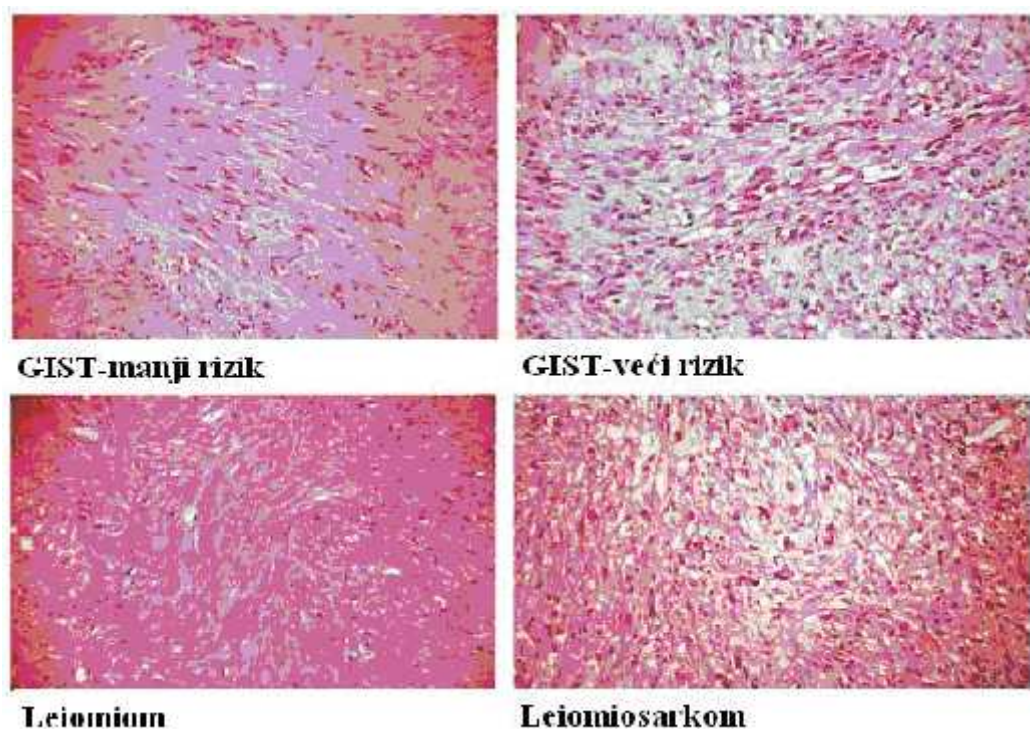
Gastrointestinalni stromalni tumor (GIST) ine sarkomi mekih tkiva koji nastaju iz mati nih stanica mezenhima u probavnom sustavu. Iako relativno rijedak, spada me u naj eš e primarne mezenhimalne tumore gastrointestinalnog (GI) trakta. Ovaj tip tumora rijetko se nalazi izvan GI trakta, naj eš e je lokaliziran 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 uсталost 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 naj eš e osobe starije od 50 godina, medijan dobi je 60 godina, oko 5% osoba su mla e od 40 godina, dok su ti tumori jako rijetki u djece (<1%).



Slika 1.1. Gastrointestinalni trakt ( prilago eno prema: [www.emc.org](http://www.emc.org))

Od 1930. do 1950.godine, za stromalne tumore gastrointestinalnog trakta se smatralo da su neoplazme glatkog mišića 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 mišića (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 slike gastrointestinalnog stromalnog tumora (GIST) manjeg rizika i leiomioma te GIST-a visokog rizika i leiomiosarkoma (Corless i sur., 2007 )

Tek 1998. godine, Hirota i suradnici su došli do otkrića da GIST eksplicira protein KIT (c-KIT ili CD117) kao i da većina GIST-a pokazuje mutacije gena *KIT*. Otad se KIT (CD117), produkt protoonkogenog 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 aktiviranih konstitutivnih mutacija protoonkogenog c-KIT u GIST-u, a zahvaljuju i 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 imbenik 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, formiraju i mrežu mijenteričnog pleksusnog sloja i time kontroliraju i pokretljivost GI. Kasnih 1990-ih godina je dokazano da GIST dijeli morfološke, imunofenotipske i genetičke karakteristike s ICC, zbog prisutnosti 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. *stem 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 eksplicira 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 su metastaze

su u jetri i abdominalnoj šupljini, a rjeđe se pojavljuju u limfnim vorovima, plućima, i koštanoj hrskavici.

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 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)

	<b>Veličina (cm)</b>	<b>Mitotski indeks (/50 HPF)</b>
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

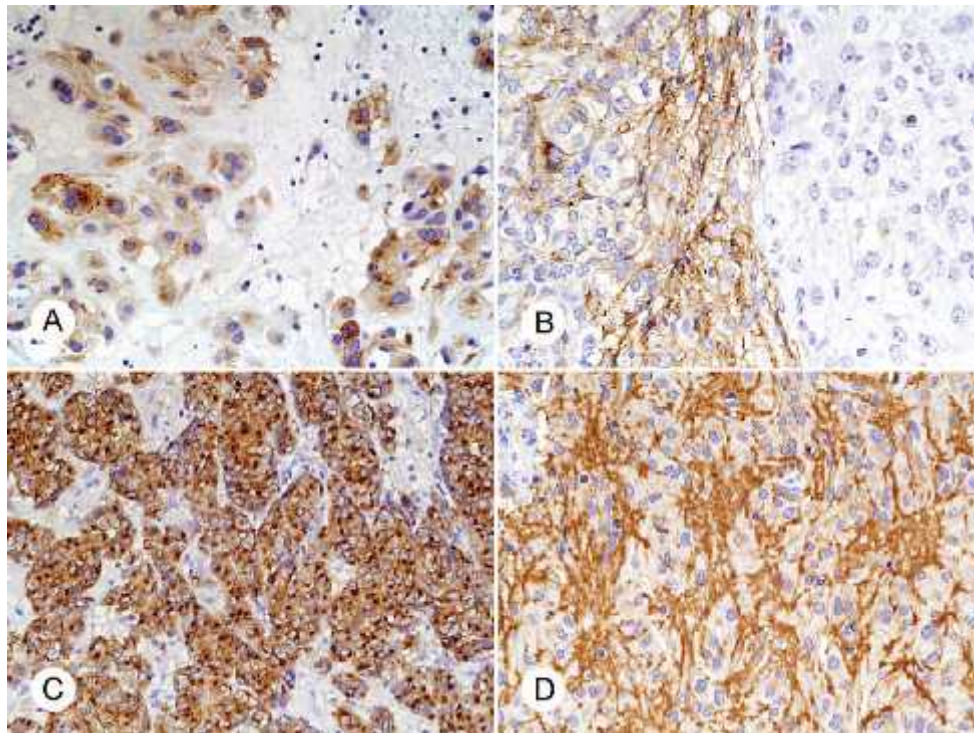
U mnogim kliničko-patološkim studijama je dokazano da su najvažniji kriteriji za procjenu biološkog potencijala GIST-a veličina tumora i mitotički indeks (Tablica 1.)

Uz visoku specifičnost i mitotičku aktivnost ključan imbenik 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 imbenik 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 ekspimiraju 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 ekspimiran 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 sprečava daljnju fosforilaciju signalnih molekula nizvodno od receptora. U početku se koristio za tretman kronične mijeloidne leukemije, i to vrlo uspješno, blokirajući BCR-ABL kinaznu aktivnost. Poslije je otkriveno da je djelotvoran i za metastatski 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 kliničan terapijski učinak, pacijenti s mutacijama 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 nastale 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 sunitinib, 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

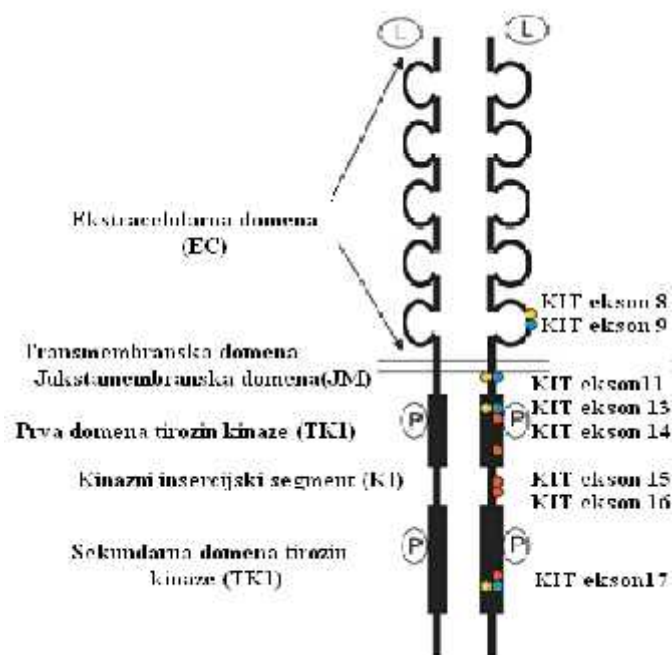
#### 1.3.1. Gra a i funkcija receptora c-KIT

Geni *KIT*, kao i *PDGFGRA*, su mapirani na kromosomu 4q12 (Slika 1.4.) te se smatra da su genskom duplikacijom i evoluirali iz zajedni ko naslije enog 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 aktivnoš u (RTK). Povezan je s receptorom za imbenik rasta trombocita (PDGF), imbenikom stimulacije kolonija I (CSF I) i FLT3 ligandom. Sve RTKIII imaju specifi nu 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 vezuju u adenzin-trifosfat (ATP) i fosfotransferaznu regiju (Lasota i sur., 2008), što je prikazano na slici 1.5.



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

Receptori c-KIT u normalnom okruženju potiču u 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 i 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 ključnu 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 stanica njihov odgovor poput proliferacije, migracije, preživljenja i diferencijacije. Mnogi od ovih odgovora su poremećeni nastankom tumora, a čije je obilježje nekontrolirana stanica na proliferacija, neosjetljivost na apoptozu, metastatski potencijal i u nekim slučajevima blokiranje diferencijacije, ostavljaju i 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 mijeloidnoj 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 stanice linije. c-KIT se eksprimira na hematopoetskim matičnim i progenitorskim stanicama, no tijekom diferencijacije se utišava (Ogawa 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 mijeloidne leukemije (AML) gdje je c-KIT konstitutivno fosforiliran (Heinrich i sur., 2002.)

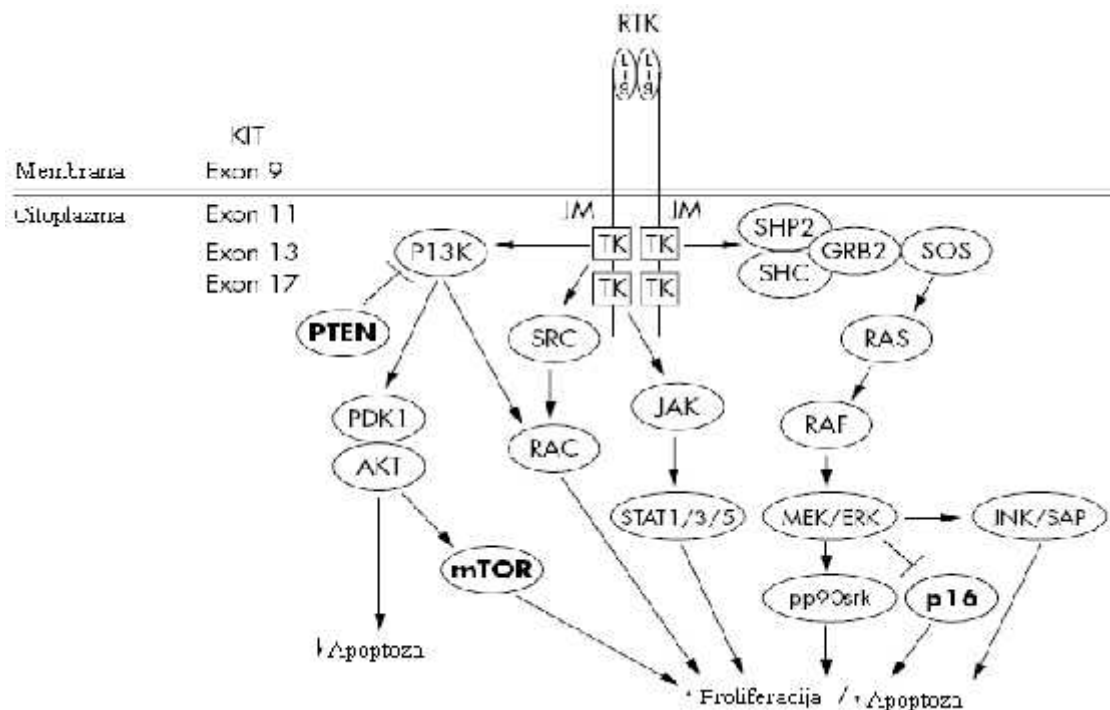
c-KIT je uključen i u procese oogeneze, folikulogeneze i spermatogeneze. Funkcija receptora c-KIT u spolnim stanicama je strogo ovisna o njegovoj sposobnosti da aktivira PI3



kinazu, koja pripada razredu lipidnih kinaza koje fosforiraju 3'-hidroksilnu skupinu fosfoinozitida. Ostatak Y721 unutar receptora c-KIT direktno djeluje s PI3- kinazom (Serve i sur., 1995) te tako *in vivo* potiče preživljenje preko aktivacije Akt proteina ovisne o PI3-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 PI3-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 tirozinskim 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 najčešće u četiri 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 enzimske 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 najčešće 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<sup>550</sup> i Glu<sup>561</sup> (Taniguchi i sur., 1999), a najčešća delecija je gubitak Trp<sup>557</sup> i Lys<sup>558</sup>.

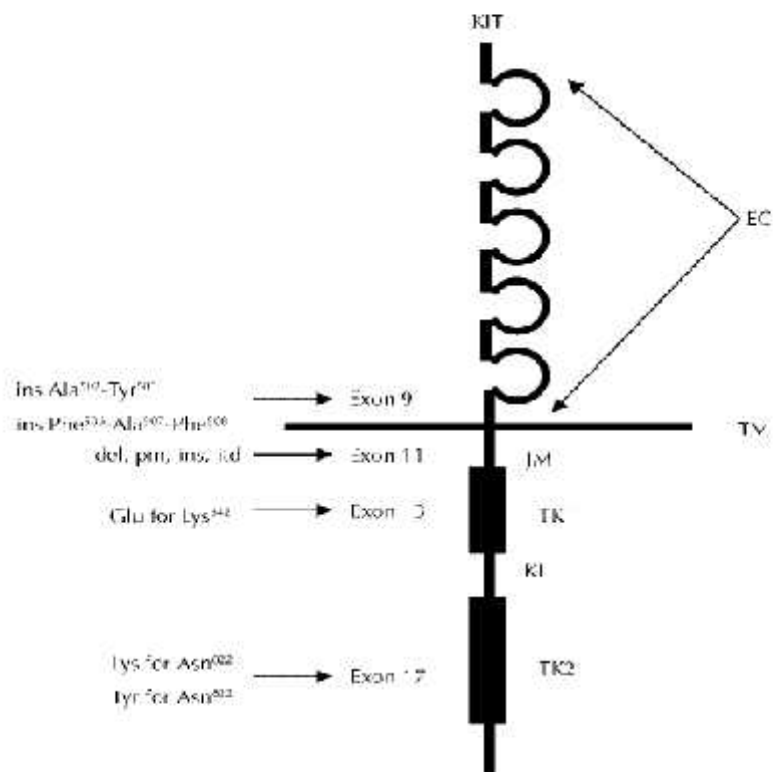
Nukleotidne supstitucije se javljaju u 20 do 30% slučajeva GIST-a, također pogađaju ekson 11, a uključuju kodone Trp<sup>557</sup>Arg, Val<sup>559</sup>Ala i Val<sup>560</sup>Asp u proksimalnom dijelu eksona 11 i Leu<sup>576</sup>Pro u distalnom dijelu (Lasota i sur., 1999, Taniguchi i sur., 1999). Također 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<sup>502</sup>-Tyr<sup>503</sup> (Lux i sur., 2000). Nedavno je pronađena i duplikacija Phe<sup>506</sup>-Ala<sup>507</sup>-Phe<sup>508</sup> (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.** este 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
	<b>duplikacije</b>	
	Ala502_Tyr503	9
	Phe506_Phe508	9



**Slika 1.7.** Shematski prikaz uсталih 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 nasljednim mutacijama razvijaju me u 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. hiperpigmentacije 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 lije enih u Klini kom bolni kom centru Split, te su ciljevi istraživanja bili:

1. Izolirati DNA iz uzoraka tumorskog tkiva uklopljenog u parafin pacijenata s GIST-om
2. Lan anom reakcijom polimeraze (PCR) umnožiti regije u eksonima 9 i 11 gena *c-kit*
3. Napraviti sekvenciranje produkata PCR reakcije i utvrditi mogu e 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. Pufferi i otopine

#### **Pufferi korišteni za izolaciju DNA iz tkiva uklopljenog u parafin**

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

#### **Pufferi, reagensije i enzimi korišteni u lančanoj reakciji polimeraze (PCR)**

- AmpliTag Gold™ DNA polimeraza, 5 U/μl
- PCR-puffer, 10x
- MgCl<sub>2</sub>, 25mM
- Deoskinukleozid-trifosfati (dATP,dTTP, dCTP,dGTP), 2.5 mM
- Nizvodne po etnice, 10μM
- Uzvodne po etnice, 10μM
- Voda, redestilirana

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

#### **Pufferi i otopine korišteni za elektroforezu u gelu agaroze**

- Elektroforetski puffer 10x TBE (Tris, Edta-Na<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub>O, bori na kiselina), Euroclone, Italy
- Agarozni gel (2%)
  - Agaroz, 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 reagensija

- 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 ponavlja 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 °C. U osušeno tkivo je dodano 50 µl proteinaze K, te se ostavi preko noći na 37 °C. Idući dan u tkivo je dodano još 50 µl proteinaze K i inkubirano je dva sata na 56 °C. Uporabom "High pure PCR template preparation kit" (Roche Diagnostics, Njemačka) je iz tkiva potom izolirana DNA prema



uputama proizvoda. 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 (lan ana reakcija polimerazom)

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

**Tablica 3.** Po etnicima korištene u lananoj reakciji polimerazom (Li Gong i sur. 2009, S. Romagnoli i sur. 2005), veličina produkta, i njihove temperature taljenja ( $T_m$ )

Po etnicima	Velikina PCR produkta (pb)	$T_m$ (°C)
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  $\mu$ l koja je sadržavala : 2,5  $\mu$ l 1xPCR buffer (Applied Biosystem), 2  $\mu$ l 25 mM  $MgCl_2$ , 2  $\mu$ l 2,5 mM smjese dNTP-ova, 0,25  $\mu$ l AmpliTaq Gold polimeraze (Applied Biosystem, 5U/ $\mu$ L), 1 $\mu$ l specifičnih po etnicima, 1 $\mu$ l genomske DNA (2 ng/ $\mu$ l) 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 po etnicima 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

<b>Komponenta</b>	<b>Volumen u reakciji (µl)</b>
PCR pufer (1x)	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2
dNTP (2,5mM)	2
po etnice	1
Tag polimeraza (5U/µl)	0,25
DNA (2ng/µl)	1
dH <sub>2</sub> O	do 25
ukupno	25

**Tablica 5.** Uvjeti PCR

<b>Korak PCR –a</b>	<b>Temperatura i trajanje</b>
Predenaturacija	94°C, 10 min
Denaturacija	94°C, 1 min
Prianjanje po etnica	56/58 °C, 1min 40x
Elonagacija/sinteza	72°C, 1min
Završna elongacija/sinteza	72°C, 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 agarozna 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 nosa i prieka se dok se stvrdne. Gel se potom stavi u kadu 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 ljestvicom za veličinu DNA (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 centrifugira 30 do 60 sekundi. Odbaci se eluat i doda se 750  $\mu$ l 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 istu 1,5 mL tubicu, te se doda 30  $\mu$ l 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 molekulama DNA (sekvenciranje)**

Prije sekvenciranja PCR produkti se još dodatno pročišćavaju egzonukleazom I i SAP (*engl. Shrimp Alkaline Phosphatase*) za uklanjanje zaostalih primera i nukleotida. Na 5  $\mu$ l PCR produkta doda se 0,2  $\mu$ l Exo I (*eng. exonuclease I*, 5U/ $\mu$ l) i 0,5  $\mu$ l SAP (1U/ $\mu$ l) te 4,3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. inkubira se 20 minuta na 37°C i 15 minuta na 80° za deaktivaciju enzima.

##### **3.2.4.1. Sekvencijska reakcija**

Pripremi se 5  $\mu$ l reakcijske smjese koji sadržava: 2  $\mu$ l pročišćenog PCR produkta, 1  $\mu$ l miksa (BIGDye Terminator 3.1, Applied Biosystems, SAD), 0,3  $\mu$ l primera i 1,7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. PCR za sekvencijsku reakciju se provede na uređaju GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, SAD). Program umnažanja započinje predenaturacijom 1 min na 96°C, nastavlja se s 25 ciklusa: denaturacija 10 s na 96°C, prijanjanje primera 5 s na 50°C, i produljivanje lanca 4 minute na 60°C.

##### **3.2.4.2. Precipitacija**

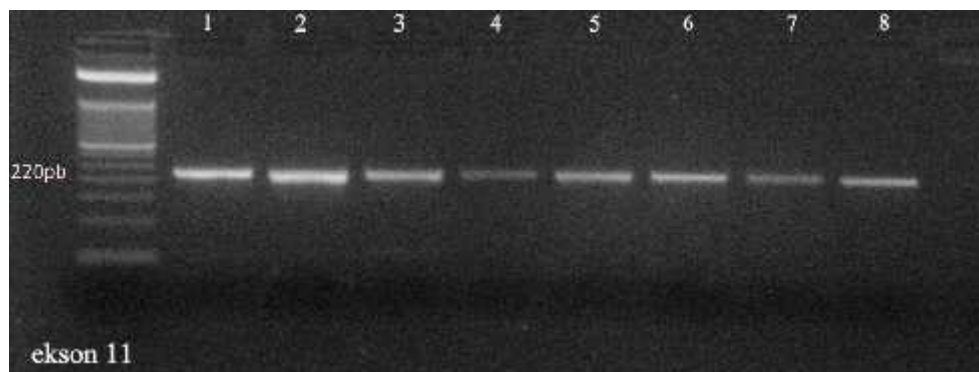
PCR reakcijska smjesa pročišćena se precipitacijom s etanolom. U svaki uzorak se doda 15  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l 125 mM EDTA, 2  $\mu$ l 3 mM natrijevog acetata i 50  $\mu$ l 100% etanola. Inkubira se

30 minuta na sobnoj temperaturi, potom centrifugira 30 minuta na 3300 rpm. Vakuum 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 37°C 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 °C za denaturaciju. Uzorci se stave na led i potom u sekvencioner ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, SAD).

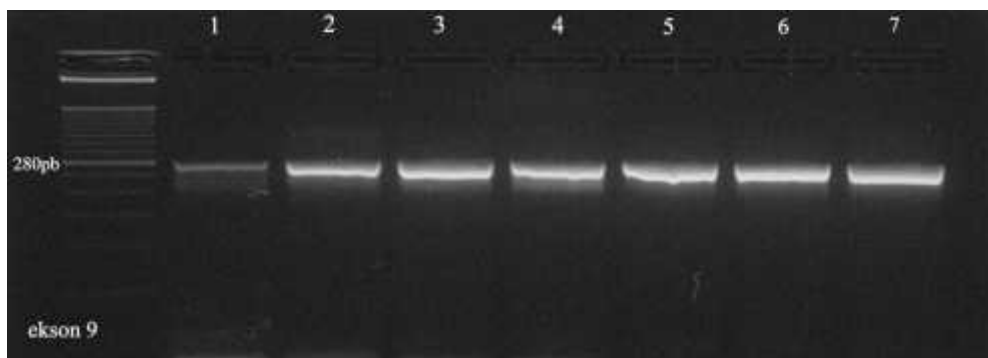
## 4. REZULTATI

### 4.2. ANALIZA GENA C-KIT AGAROSNOM 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); ciljnih odsjeka je veličine 220 pb.



**Slika 1.9.** Prikaz rezultata PCR amplifikacije za ekson 9 (za 7 uzoraka); ciljni odsjek 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.

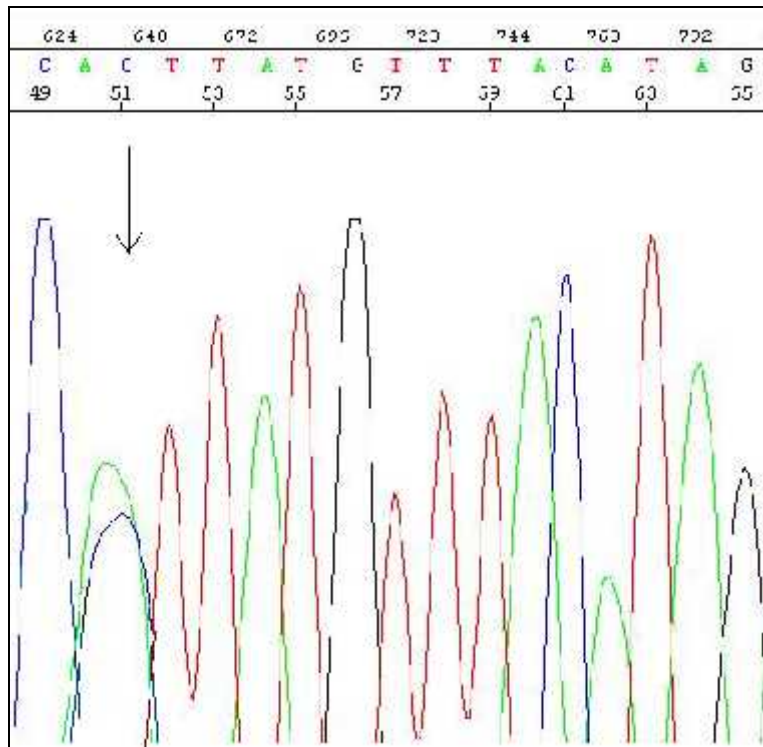
U ostala četiri uzorka su nađene *missense* mutacije u eksonu 11 koje dovode do promjena aminokiselina Asn → Thr, Asn → Phe, Asn → Ile u kodonima 566 i 567, te Trp → Leu u kodonu 557.

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 supstitucije nađena i insercija Gln1039.

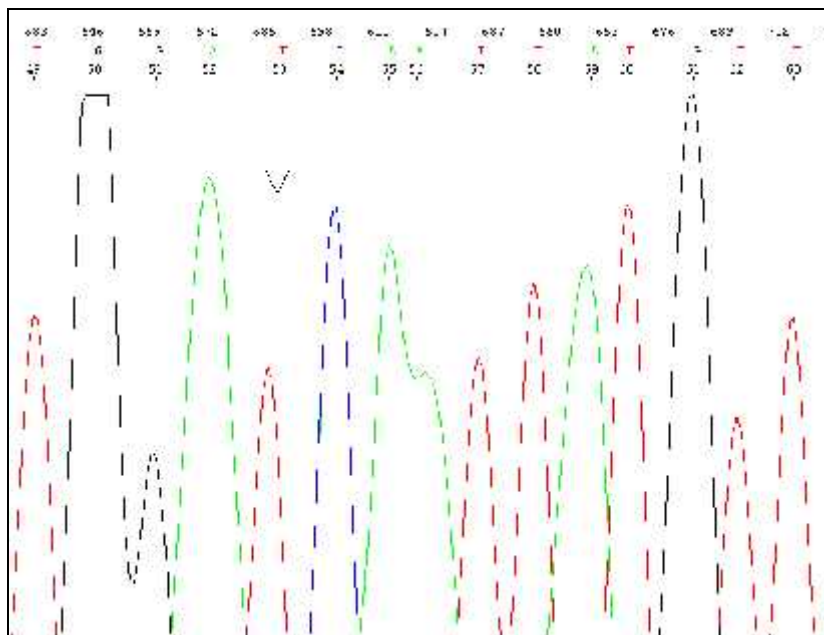
U dva uzorka nisu pronađene mutacije *c-KIT* u eksonima 9 i 11.

**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 to kastu 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 to kastu mutaciju (A T, N566I)

## 5. RASPRAVA

Gastrointestinalni stromalni tumori (GIST), iako relativno rijetki, spadaju među najčešće primarne mezenhimalne tumore gastrointestinalnog (GI) trakta. One su sarkomi mekih tkiva koji nastaju iz matičnih stanica mezenhima u probavnom sustavu (Gomes i sur., 2007). GIST ekspresira tirozin kinazni onkoprotein KIT, te somatske mutacije koje su rezultat konstitutivne aktivacije kinaze KIT utvrđene su u brojnim kliničkim studijama GIST-a, iako se pojavljuju različitim učestalostima (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 razlikuju i GIST od ostalih gastrointestinalnih mezenhimalnih neoplazmi (Rossi i sur., 2005).

Hirota i suradnici (1988) su prvi dokazali prisutnost aktivirajućih konstitutivnih mutacija protoonkogene 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 terapijsko 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 metastatskim ponašanjem GIST-a, nalaze se na eksonu 11 i to u jukstamembranskoj domeni, pogotku u regiji 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 raenim na većem broju ispitanika (Debiec-Rychter M. i sur., 2004).

Osim delecija, u eksonima 9 i 11, uočene 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 transformaciju limfoblastnih stanica u linija *in vitro* (Corless i sur., 2004).



U ostala etri uzorka su na ene *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 na ene dvije *missense* mutacije, te je u jednom uzorku osim nukleotidne supstitucije na ena 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 uinkovitost 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 naene 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., Bummig 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/PDGFR*A 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., Miettinen 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 residues 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., Wanigasekera 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 correlation with chemotherapy resistance in ovarian carcinoma: an immunocytochemical study. *Ann Oncol.* **15**; 594-597
- Robson M.E., Glogowski E., Sommer G., i sur. (2004) Pleomorphic characteristics of a germline KIT mutation in a large kindred with gastrointestinal stromal tumors, hyperpigmentation and dysphagia. *Clin. Cancer Res.* **10**; 1250-1254

- Romagnoli S., Graziani D., Bramerio M., i sur. (2005) Immunohistochemical 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 metastatic 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/PDGFR $\alpha$  mutant isoforms in epithelioid and 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 PDGFR $\alpha$  mutation status. *Am J Pathol.* **165**; 107–113.