

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Bartosz Wasąg

Analiza profilu i aktywności mutacji genu *KIT* w mastocytozie i piebaldyzmie oraz genów *KIT* i *PDGFRA* w guzach podścieliska przewodu pokarmowego (GIST). Ocena wrażliwości wybranych izoform receptorów KIT i PDGFRA na inhibitory kinaz tyrozynowych

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Zakład Biologii i Genetyki
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Janusz Limon

GDAŃSK 2012

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Wydawca: Gdański Uniwersytet Medyczny
Druk: Dział Wydawnictw GUMed
Gdańsk, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a
Zlecenie KW/125/12

SPIS TREŚCI

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	5
WYKAZ PUBLIKACJI AUTORSKICH BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ.....	6
1. WSTĘP	7
1.1. Receptory KIT i PDGFRA	7
1.2. Mutacje inaktywujące gen <i>KIT</i>	7
1.3. Mutacje aktywujące gen <i>KIT</i>	8
1.4. Mutacje aktywujące gen <i>PDGFRA</i>	9
1.5. Mutacje genów <i>KIT</i> i <i>PDGFRA</i> jako czynnik rokowniczy	9
1.6. Mutacje genów <i>KIT</i> i <i>PDGFRA</i> jako czynnik predykcyjny	10
2. CELE PRACY	12
3. MATERIAŁY I METODY	13
3.1. Materiał.....	13
3.2. Metody.....	13
3.2.1. Izolacja DNA i RNA	13
3.2.2. Analiza molekularna genów <i>KIT</i> i <i>PDGFRA</i>	13
3.2.3. Stosowane inhibitory kinaz tyrozynowych oraz białek szoku cieplnego.....	13
3.2.4. Konstrukcja wektorów wirusowych, transfekcja, transdukcja oraz hodowla komórkowa.....	13
3.2.5. Test proliferacji	14
3.2.6. Analiza apoptozy	14
3.2.7. Technika <i>western blotting</i>	14
4. OMÓWIENIE WYNIKÓW	15
4.1. Opracowanie czułych i specyficznych metod diagnostycznych służących do identyfikacji mutacji genu <i>KIT</i> w GIST oraz mastocytozie	15
4.1.1. Identyfikacja duplikacji w eksonie 11 genu <i>KIT</i> w guzach GIST.....	15
4.1.2. Porównanie czułości czterech metod biologii molekularnej służących do identyfikacji mutacji p.D816V genu <i>KIT</i>	16
4.2. Analiza częstości występowania mutacji genów <i>KIT</i> i <i>PDGFRA</i> oraz korelacja wyników badań molekularnych z danymi klinicznymi pacjentów z GIST.....	18
4.2.1. Częstość występowania mutacji homozygotycznych w eksonie 11 genu <i>KIT</i> w guzach GIST.....	18
4.2.2. Mechanizm molekularny prowadzący do powstania homozygotycznych mutacji w eksonie 11 genu <i>KIT</i> w guzach GIST.....	19

4.2.3. Znaczenie rokownicze mutacji homozygotycznych w eksonie 11 genu <i>KIT</i> w guzach GIST	19
4.2.4. Znaczenie predycyjne mutacji homozygotycznych w eksonie 11 genu <i>KIT</i> w guzach GIST	20
4.2.5. Częstość występowania i rodzaj mutacji genów <i>KIT</i> i <i>PDGFRA</i> oraz korelacja wyników badań molekularnych z danymi klinicznymi pacjentów z GIST z północnej Norwegii.....	21
4.3. Identyfikacja mutacji p.D816V genu <i>KIT</i> u pacjentów z mastocytozą	22
4.4. Analiza aktywności wybranych izoform receptora KIT	23
4.4.1. Inaktywacja receptorów KIT-T437dup oraz KIT-T619A w piebaldyzmie	23
4.4.2. Konstytutywna aktywacja receptora KIT-N822I w mastocytozie	24
4.5. Ocena <i>in vitro</i> i <i>ex vivo</i> wrażliwości transdukowanych komórek Ba/F3 oraz pierwotnych komórek GIST na działanie inhibitorów kinaz tyrozynowych oraz inhibitora HSP90	25
4.5.1. Ocena wrażliwości transdukowanych komórek Ba/F3: KIT-V559D, -D816V, -N822I na imatynib i dazatynib	26
4.5.2. Ocena wrażliwości transdukowanych komórek Ba/F3 oraz komórek pierwotnych GIST: KIT-V654A, -T670I oraz PDGFRA-D842V na imatynib i PKC412	27
4.5.3. Ocena wrażliwości transdukowanych komórek Ba/F3 oraz komórek pierwotnych GIST: PDGFRA-D842V oraz –DIM842-844del na inhibitory kinazy tyrozynowej i IPI-504	27
4.6. Określenie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za oporność wtórną u pacjentów z GIST	29
5. WNIOSKI.....	31
6. PIŚMIENNICTWO	32
7. PRACE BEDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY	43
8. ZAŁĄCZNIK NR 1	105

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

17-AAG	<i>17-allylamino-demethoxy geldanamycin</i> / 17-allylamino-18-demethoxy-geladamycyna
AML	<i>acute myelogenous leukemia</i> / ostra białaczka szpikowa
ASM	<i>aggressive systemic mastocytosis</i> / agresywna mastocytoza układowa
Ba/F3	pro-B limfoidalne komórki mysie
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i> / technika porównawczej hybrydyzacji genomowej
CM	<i>cutaneous mastocytosis</i> / mastocytoza skórna
CML	<i>chronic myelogenous leukemia</i> / przewlekła białaczka szpikowa
DHPLC	<i>denaturing high-performance liquid chromatography</i> / wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa
FISH	<i>fluorescent in situ hybridization</i> / fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> ,
GIST	<i>gastrointestinal stromal tumors</i> / guzy podścieliska przewodu pokarmowego
HSP90	<i>heat shock proteins</i> / białka szoku cieplnego 90
IC50	<i>inhibitory concentration</i> / wartość stężenia badanego czynnika hamującego żywotność komórki
IL-3	<i>interleukin 3</i> / interleukina 3
ISM	<i>indolent systemic mastocytosis</i> / mastocytoza układowa o powolnym przebiegu
KIT	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i> / utrata heterozygotyczności
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / reakcja łańcuchowa polimerazy
PDGFRA	<i>platelet-derived growth factor receptor alpha</i> / receptor alfa płytkopochodnego czynnika wzrostu
PNA-PCR	<i>peptide nucleic acid mediated-PCR</i>
qPCR	<i>quantitative PCR</i> / ilościowa amplifikacja DNA w czasie rzeczywistym
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> / polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
UP	<i>urticaria pigmentosa</i> / mastocytoza skórna grudkowo-plamista
SCF	<i>stem cell factor</i> / czynnik wzrostowy komórek pnia
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> / polimorfizm pojedynczego nukleotydu
SNAI2	<i>snail homolog 2 (SLUG)</i>
WT	<i>wild type</i> / typ dziki

WYKAZ PUBLIKACJI AUTORSKICH BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ

- I. Wasag B, Chmara M, Legius E.: Molecular characterization of two novel KIT mutations in patients with piebaldism. *J. Dermatol. Sci.* 2012, 66, 1, 78-79. IF 3,718
- II. Wasag B, Niedożytko M, Piskorz A, Lange M, Renke J, Jassem E, Biernat W, Debiec-Rychter M, Limon J.: Novel, activating KIT-N822I mutation in familial cutaneous mastocytosis. *Exp. Hematol.* 2011, 39, 8, 859-865.e852. IF 2,905
- III. Dewaele B, Wasag B, Cools J, Sciot R, Prenen H, Vandenberghe P, Wozniak A, Schöffski P, Marynen P, Debiec-Rychter M.: Activity of dasatinib, a dual SRC/ABL kinase inhibitor, and IPI-504, a heat shock protein 90 inhibitor, against gastrointestinal stromal tumor-associated PDGFRA D842V mutation. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14, 18, 5749-5758. IF 6,488
- IV. Lasota J, vel Dobosz AJ, Wasag B, Wozniak A, Kraszewska E, Michej W, Ptaszynski K, Rutkowski P, Sarlomo-Rikala M, Steigen SE, Schneider-Stock R, Stachura J, Chosia M, Ogun G, Ruka W, Siedlecki JA, Miettinen M.: Presence of homozygous KIT exon 11 mutations is strongly associated with malignant clinical behavior in gastrointestinal stromal tumors. *Lab. Invest.* 2007, 87, 10, 1029-1041. IF 4,479
- V. Lasota J, Wasag B, Steigen SE, Limon J, Miettinen M.: Improved detection of KIT exon 11 duplications in formalin-fixed, paraffin-embedded gastrointestinal stromal tumors. *J. Mol. Diagn.* 2007, 9, 1, 89-94. IF 3,478
- VI. Steigen SE, Eide TJ, Wasag B, Lasota J, Miettinen M.: Mutations in gastrointestinal stromal tumors--a population-based study from Northern Norway. *APMIS* 2007, 115, 4, 289-298. IF 1,421
- VII. Debiec-Rychter M, Cools J, Dumez H, Sciot R, Stul M, Mentens N, Vranckx H, Wasag B, Prenen H, Roesel J, Hagemeyer A, Van Oosterom A, Marynen P.: Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants. *Gastroenterology* 2005, 128, 2, 270-279. IF 12,386

Ponadto, w pracy przedstawiono nieopublikowane wyniki badań nad mutacjami genu *KIT* u pacjentów z mastocytozą:

4.1.2. Identyfikacja mutacji p.D816V genu *KIT* u pacjentów z mastocytozą.

4.3. Określenie częstości występowania mutacji p.D816V genu *KIT* w grupie pacjentów z mastocytozą.

1. WSTĘP

1.1. Receptory KIT i PDGFRA

KIT i PDGFRA są powierzchniowymi receptorami komórkowymi o aktywności kinazy tyrozynowej. Oba białka mają podobną strukturę i należą do rodziny receptorów klasy III. Zbudowane są z trzech regionów: zewnątrzkomórkowego, śródbłonowego oraz cytoplazmatycznego (wewnątrzkomórkowego). W obrębie regionu zewnątrzkomórkowego występuje pięć pętli immunoglobino(Ig)-podobnych, odpowiedzialnych za rozpoznanie i wiązanie określonego czynnika wzrostu. Region śródbłonowy receptora łączy część zewnątrzkomórkową z cytoplazmatyczną. Część cytoplazmatyczna receptora składa się z dwóch domen strukturalnych, okołobłonowej i o aktywności kinazy tyrozynowej. Domena okołobłonowa pełni kluczową rolę w procesie autoregulacji fosforylacji receptora. Natomiast w domenie o aktywności kinazy tyrozynowej wyodrębnić można rejon wiążący ATP (kinaza tyrozynowa I) i rejon fosfotransferazy (kinaza tyrozynowa II), które oddzielone są hydrofilową wstawką [96].

KIT (*v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*) jest powierzchniowym receptorem komórkowym dla czynnika wzrostu komórek macierzystych (*stem cell factor*, SCF), który kodowany jest przez gen *KIT* zlokalizowany w długich ramionach chromosomu 4q12. Aktywacja KIT przez ligand prowadzi do dimeryzacji i fosforylacji receptora oraz aktywacji białek sygnalizacji komórkowej regulującej procesy proliferacji, apoptozy, chemotaksji i adhezji oraz różnicowania komórek. Ekspresja KIT jest niezbędna do rozwoju szpikowych komórek pnia, komórek tucznych, melanocytów, gametocytów i komórek Cajala. Te ostatnie występują w ścianie przewodu pokarmowego i odgrywają wiodącą rolę w motoryce jelita. [10, 74].

Receptor PDGFRA (*platelet derived growth factor receptor α*) kodowany jest przez gen *PDGFRA* zlokalizowany w chromosomie 4q12, w pobliżu genu *KIT*. Receptor ten wiąże płytkopochodne czynniki wzrostu PDGF (*platelet derived growth factors*), które działają przede wszystkim na fibroblasty i komórki mięśni gładkich. Receptor PDGFRA aktywowany przez PDGF stymuluje między innymi wzrost komórek mezenchymalnych. Ekspresja PDGFRA jest również niezbędna do rozwoju układu kostnego, płuc, skóry, jelit i jąder oraz ośrodkowego układu nerwowego (OUN) [56, 60].

1.2. Mutacje inaktywujące gen *KIT*

Mutacje inaktywujące gen *KIT* opisano jedynie w piebaldyzmie. **Piebaldyzm** (OMIM 172800), nazywany albinizmem zlokalizowanym, jest rzadką chorobą dziedziczną w sposób autosomalny dominujący, której charakterystycznym objawem są wrodzone odbarwienia skóry przede wszystkim czoła, klatki piersiowej, brzucha oraz kończyn [45]. Podłoże molekularne tej choroby stanowią mutacje genów *KIT* oraz *SNAI2* (*snail homolog 2*, *SLUG*) zlokalizowanego w chromosomie 8q11 [33]. Gen *SNAI2* koduje czynnik transkrypcyjny z motywem palców cynkowych, którego ekspresja jest regulowana przez sygnalizację komórkową SCF/KIT [113].

Mutacje genu *KIT* obniżają aktywność receptora kinazy tyrozynowej, co prowadzi do zahamowania rozwoju melanoblastów i zaburzenia melanogenezy [12]. U pacjentów z piebaldyzmem wykryto dotychczas ponad 40 różnych mutacji inaktywujących *KIT*. Zidentyfikowane mutacje są zróżnicowane i obejmują zarówno mutacje zmiany sensu, typu nonsens, zmiany ramki odczytu, mutacje miejsc składania RNA, jak i częściowe lub całkowite delecje genu [132]. Generalnie mutacje te zaburzają ekspresję receptora KIT na powierzchni melanocytów. Istnieje związek pomiędzy rodzajem i lokalizacją mutacji a objawami choroby. W przypadku mutacji zmiany ramki odczytu zazwyczaj dochodzi do zmniejszenia o 50% liczby aktywnych receptorów. Chorzy z tego typu mutacjami charakteryzują się umiarkowa-

nymi objawami klinicznymi [110]. Mutacje zmiany sensu, szczególnie te zlokalizowane w obrębie domeny o aktywności kinazy tyrozynowej, prowadzą do powstania nieaktywnej formy receptora KIT. Obecność nieaktywnej formy receptora KIT powoduje powstawanie heterodimerów, co prowadzi do redukcji o 75% aktywności sygnalizacji komórkowej zależnej od tego receptora. Tak znaczne obniżenie aktywności prowadzi do wyraźniej zaznaczonych objawów piebaldyzmu [110]. Ze względu na różnorodność identyfikowanych mutacji oraz istnienie związku pomiędzy rodzajem mutacji a fenotypem choroby wskazana jest analiza molekularna całej sekwencji kodującej genu *KIT*. W przypadku nie wykrycia mutacji punktowej konieczne jest przeprowadzenie analizy genetycznej mającej na celu identyfikację delekcji całego genu *KIT* lub mutacji punktowej/delecji genu *SNAI2*.

1.3. Mutacje aktywujące gen *KIT*

Mutacje aktywujące prowadzą do konstytutywnej autofosforylacji receptora KIT niezależnej od obecności jego liganda, czynnika SCF [57]. Patologiczna aktywacja KIT prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek. Mutacje aktywujące *KIT* zidentyfikowano dotychczas w komórkach guzów podścieliska przewodu pokarmowego (GIST), przewlekłej białaczki szpikowej (CML), ostrej białaczki szpikowej (AML), nasieniaków, rozrodczaków, mastocytozy oraz czerniaków złośliwych skóry [44, 57, 90, 100, 116, 118, 129].

Guzy podścieliska przewodu pokarmowego (GIST) stanowią najczęściej występujące nowotwory mezenchymalne przewodu pokarmowego. GIST wywodzą się z komórek Cajala lub ich prekursorów [102]. W większości guzów stwierdza się ekspresję KIT, którą potwierdza pozytywna reakcja immunohistochemiczna dla antygeny KIT (CD-117) [40]. W guzach GIST mutacje aktywujące *KIT* zidentyfikowano w obrębie eksonów 9, 11, 13 i 17. Zdecydowana większość tych mutacji występuje w eksonie 11 (65-70%). Mutacje w eksonie 9 stwierdza się w około 10% guzów GIST, podczas gdy mutacje w eksonach 13 i 17 występują bardzo rzadko – zaledwie w 1-2% analizowanych przypadków [21, 73]. Mutacje w eksonie 11 stanowią zazwyczaj delekcje jednego lub kilku, wyjątkowo kilkunastu kodonów, często obejmujące kodony 557-558 [26]. Drugi, co do częstości występowania typ mutacji w tym eksonie to substytucje jednego nukleotydu. Najrzadziej wykrywa się duplikacje, które są lokalizują się w dystalnej części eksonu 11. W eksonie 9 genu *KIT* zdecydowaną większość dotychczas zidentyfikowanych mutacji stanowią duplikacje kodonów 502 i 503 (p.AY502-503dup). Natomiast w eksonie 13 najczęściej obserwuje się substytucję nukleotydu prowadzącą do zamiany lizyny na kwas glutaminowy w kodonie 642 (p.K642E) [5].

Rodzinne występowanie GIST jest zjawiskiem bardzo rzadkim. Dotychczas opisano około dwudziestu takich rodzin [67]. U pacjentów z rodzinnym GIST zazwyczaj wykrywa się guzy u kilku członków rodziny, które pojawiają się w młodszym wieku w porównaniu do pacjentów ze sporadycznym guzem. Mutacje genu *KIT* stwierdzono w sekwencjach kodujących domenę okołobłonową jak i domeny o aktywności kinazy tyrozynowej TKI i TKII. Najczęściej obserwowaną zmianą w rodzinnym GIST jest mutacja w kodonie 559 (p.V559A) [67].

Mastocytoza to bardzo heterogenna grupa chorób szpiku kostnego, w których stwierdza się patologiczny rozrost komórek tucznych. Choroba zazwyczaj ujawnia się w dzieciństwie lub we wczesnym wieku dojrzałym. W 1996 wykazano, że mastocytoza u dorosłych jest związana z klonalną proliferacją mastocytów będącą efektem mutacji aktywujących gen *KIT* [80]. W mastocytozie zidentyfikowano kilkanaście różnych mutacji tego genu, głównie o charakterze substytucji jednego nukleotydu. Zdecydowanie najczęściej identyfikowaną zmianą jest mutacja p.D816V w eksonach kodujących domenę o aktywności kinazy tyrozynowej (TKII) [93]. Rzadziej obserwuje się mutację p.V560G, której efektem jest modyfikacja domeny okołobłonowej [93]. Przez wiele lat klonalność rozrostów mastocytarnych u dzieci oraz obecność mutacji genu *KIT* w tych rozrostach były przedmiotem dyskusji. Dopiero niedawno przeprowadzone badania potwierdziły, że podobnie jak u dorosłych, mastocytoza u dzieci jest

klonalnym rozrostem komórkowym z mutacjami genu *KIT* [11]. W tych dwóch grupach pacjentów obserwuje się jednak różnice zarówno w częstości występowania jak i rodzaju mutacji. Choć u dzieci najczęściej występującą mutacją jest również substytucja p.D816V, to jednak jest ona identyfikowana zdecydowanie rzadziej niż u dorosłych pacjentów. W wielu przypadkach mastocytozy u dzieci wykryto mutacje w eksonach 8 i 9 kodujących część zewnątrzkomórkową oraz w eksonie 11 kodującym domenę okołobłonową genu *KIT* [11]. Przypadki rodzinnego występowania mastocytozy są bardzo rzadkie. Dotychczas zidentyfikowano tylko pięć takich rodzin [II]. Mutacje aktywujące *KIT* w tych rodzinach stwierdzono w eksonach kodujących domeny śród- i okołobłonową.

1.4. Mutacje aktywujące gen *PDGFRA*

Mutacje aktywujące genu *PDGFRA* zidentyfikowano w ok. 7-14% przypadków GIST, u których nie stwierdzono obecności mutacji *KIT* [55]. Mutacje te wykryto w eksonie 12 kodującym domenę okołobłonową oraz w eksonach 14 i 18 kodujących odpowiednio domeny o aktywności kinazy tyrozynowej I (TKI) oraz kinazy tyrozynowej II (TKII). Ponad 80% mutacji genu *PDGFRA* zlokalizowanych jest w eksonie 18. Wykryte mutacje to głównie substytucje w kodonie 842 (najczęstsza p.D842V) oraz delecje i insercje w okolicy tego kodonu. Wyniki uprzednio przeprowadzonych badań wykazały, że mutacje genu *PDGFRA* występują zdecydowanie częściej w epitelioidalnych GIST wywodzących się z żołądka [69, 123, 125]. Dotychczas tylko w trzech rodzinach opisano występowanie germinalnej mutacji genu *PDGFRA* [19, 25, 95]. Dwie mutacje zostały zidentyfikowane w eksonach kodujących domenę okołobłonową (p.Y555C oraz p.V561D) natomiast trzecią substytucję w eksonie kodującym domenę TKII (p.A820Y).

Zwiększoną ekspresję zarówno PDGF jak i *PDGFRA* wykazują komórki raka prostaty, glejaków złośliwych i raka piersi. Amplifikację genu *PDGFRA* obserwuje się w glejakach złośliwych, podczas gdy translokacje chromosomowe obejmujące region, w którym znajduje się *PDGFRA* opisano w CML i zespole hipereozynofilowym [6, 20, 39, 47, 66].

1.5. Mutacje genów *KIT* i *PDGFRA* jako czynnik rokowniczy

Podstawową i najskuteczniejszą metodą leczenia GIST jest leczenie chirurgiczne. Niestety, nawet po radykalnej interwencji chirurgicznej u chorych z GIST pięcioletni okres przeżycia wynosi około 50%, a czas przeżycia bez objawów choroby dotyczy około 45% chorych [30, 46]. Wielkość guza i indeks mitotyczny analizowane razem w kontekście lokalizacji guza to powszechnie uznane czynniki rokownicze dla pacjentów z GIST [40, 87]. Jednak wymienione powyżej parametry kliniczne nie zawsze precyzyjnie określają przebieg choroby. Dlatego też, istnieje potrzeba zidentyfikowania innych, dodatkowych czynników rokowniczych. Od wielu lat trwają próby określenia związku pomiędzy obecnością i typem mutacji genów *KIT* i *PDGFRA* w GIST a przebiegiem klinicznym choroby.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że pięcioletni czas przeżycia jest krótszy u pacjentów z mutacją genu *KIT* w porównaniu do chorych, u których nie stwierdzono obecności mutacji tego protoonkogenu w guzie [63]. Ponadto, zaobserwowano częstsze występowanie mutacji *KIT* w guzach o wyższym indeksie mitotycznym [63]. Na przestrzeni wielu lat wskazywano również na istnienie związku pomiędzy obecnością mutacji w obrębie eksonu 11 genu *KIT* a stopniem złośliwości nowotworu. W dwóch niezależnych badaniach stwierdzono, że mutacje w tym eksonie występują częściej w guzach złośliwych [71, 114]. Wyniki innych badań wykazały, że istnieje zależność pomiędzy obecnością delecji kodonów 557 i/lub 558 w eksonie 11 genu *KIT* a obserwowanym krótszym czasem przeżycia chorych [3, 84, 124]. Wyniki ostatnio opublikowanych badań wykazały również, że delecje kodonów 557 i 558 zwiększają ryzyko wystąpienia wznowy nowotworu [29, 83].

Wysoki stopień złośliwości zaobserwowano także w grupie guzów z mutacjami w eksonach 9 i 13 genu *KIT* [73, 105]. Ponadto wykazano, że istnieje zależność pomiędzy obecno-

ścią mutacji w eksonie 9 a lokalizacją guza. Mutacje w tym eksonie występują zdecydowanie częściej w GIST wywodzących się z jelita cienkiego i to obecnie uznawane jest za główną przyczynę większej złośliwości tych guzów [5, 73].

Mutacje genu *PDGFRA* występują zazwyczaj w guzach typu epitelioidalnego wywodzących się z żołądka [69, 72, 123, 125]. Mutacje *PDGFRA* są charakterystyczne dla guzów łącznych i pacjentów o mniejszym ryzyku wystąpienia przerzutów [69, 72]. Jednak mutacje *PDGFRA* nie są traktowane jako niezależny czynnik rokowniczy.

Identyfikacja mutacji p.D816V w obrębie eksonu 17 genu *KIT* stanowi tzw. mniejsze kryterium rozpoznania mastocytozy układowej [118]. Zależność pomiędzy obecnością mutacji p.D816V a nasileniem objawów klinicznych u pacjentów z mastocytozą jest trudna do ustalenia ze względu na niezwykle rzadkość tej choroby. Jednakże w badaniu przeprowadzonym w grupie pacjentów z mastocytozą układową o powolnym przebiegu (ISM) wykazano, że podwyższony poziom β_2 -mikroglobuliny i obecność mutacji p.D816V stanowią niezależny czynnik rokowniczy i są charakterystyczne dla chorych z większym ryzykiem progresji choroby [37].

1.6. Mutacje genów *KIT* i *PDGFRA* jako czynnik predykcyjny

Guzy podścieliska przewodu pokarmowego są odporne na radioterapię i konwencjonalną chemioterapię, dlatego też w przypadku zmian nieoperacyjnych i/lub przerzutowych szacowana długość przeżycia wynosiła około 12 miesięcy. Przełomem w leczeniu chorych na GIST było zastosowanie terapii ukierunkowanej. Obecność i rodzaj mutacji genów *KIT* i *PDGFRA* to powszechnie uznany czynnik predykcyjny warunkujący odpowiedź pacjentów z GIST na leczenie przy użyciu inhibitorów kinazy tyrozynowej. Mutacje genów kodujących receptory o aktywności kinazy tyrozynowej warunkują zarówno oporność pojawiającą się na początku leczenia (oporność pierwotna) jak i oporność nabytą w trakcie leczenia (oporność wtórna).

Pierwszym badaniem, które wykazało istnienie **oporności pierwotnej** polegającej na zależności pomiędzy obecnością i rodzajem mutacji w GIST a odpowiedzią pacjentów na leczenie imatynibem była praca opublikowana przez Heinrich i wsp. [54]. W pracy tej wykazano, że częściową odpowiedzią na imatynib występuje zdecydowanie częściej w grupie pacjentów z mutacjami w eksonie 11 w porównaniu do osób, u których stwierdzono obecność mutacji w eksonie 9 genu *KIT* [54]. Badania fazy I i II prowadzone przez *The European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) wykazały, że pacjenci z mutacjami w eksonie 11 odpowiadają lepiej na imatynib oraz mają dłuższy czas przeżycia nie tylko w stosunku do pacjentów z mutacjami w eksonie 9, ale również do tych chorych, u których nie stwierdzono obecności mutacji genu *KIT* [26, 32, 121]. Wyniki innych badań wykazały, że istnieje podgrupa pacjentów z mutacjami w eksonie 11, którzy gorzej odpowiadają na leczenie inhibitorem kinazy tyrozynowej [28]. Są to pacjenci, u których wykryto duże delecje, szczególnie te obejmujące kodony 557 i 558 w eksonie 11 genu *KIT*. Ponadto w badaniu tym stwierdzono, że zwiększenie dawki imatynibu znacznie poprawia odpowiedź pacjentów z mutacją w eksonie 9 na leczenie tym inhibitorem [28]. Niezależne badanie przeprowadzone przez kolejny ośrodek badawczy potwierdziło istnienie tej zależności oraz użyteczność oceny obecności mutacji w eksonie 9 jako czynnika predykcyjnego [1].

Mutacja p.D842V genu *PDGFRA* warunkuje pierwotną oporność na imatynib, podczas gdy inne mutacje w obrębie eksonu 18 oraz mutacje zlokalizowane w eksonie 12 są wrażliwe na działanie tego inhibitora [24].

Oporność wtórna może pojawić się po około 24 miesiącach leczenia przy użyciu inhibitorów kinazy tyrozynowej. Istnieje kilka mechanizmów odpowiedzialnych za występowanie tego zjawiska, takich jak aktywacja alternatywnej sygnalizacji komórkowej AKT/mTOR, aktywacja alternatywnego receptora kinazy tyrozynowej i jednoczesna utrata receptora *KIT*, amplifikacja *KIT*, czy obecność mutacji wtórnych w genach *KIT* i *PDGFRA* [9, 16]. Zdecydowanie najczęściej za oporność wtórną odpowiadają mutacje wtórne, które pojawiają się

w eksonie 13, 14 i 17 genu *KIT* [4, 9]. Najczęściej występującą mutacją wtórną jest substytucja w kodonie 654 (p.V654A) znajdowana głównie w guzach z mutacją pierwotną w eksonie 11, podczas gdy mutacje wtórne genu *PDGFRA* występują rzadko [53]. Zaobserwowano, że w guzach, w których nie zidentyfikowano mutacji pierwotnej nie wykrywa się mutacji wtórnej warunkujących oporność na imatynib [4].

W mastocytozie identyfikacja mutacji p.D816V w eksonie 17 genu *KIT* stanowi nie tylko kryterium diagnostyczne, ale również ma znaczenie terapeutyczne. Powszechnie wiadomo, że obecność mutacji p.D816V warunkuje oporność pacjentów z mastocytozą na imatynib [2, 119]. Natomiast pacjenci, u których nie stwierdzono mutacji lub wykryto mutację w innym eksonie niż 17 genu *KIT*, odpowiadają na leczenie przy użyciu tego inhibitora kinazy tyrozynowej [89, 119, 133]. Dlatego też, u pacjentów z mastocytozą istotne jest również przeprowadzenie prawidłowej diagnostyki molekularnej.

Podsumowanie: Mutacje genów kodujących receptory *KIT* i *PDGFRA* stanowią podłoże molekularne wielu jednostek chorobowych. Identyfikacja mutacji *KIT* i *PDGFRA* ma istotne znaczenie kliniczne, gdyż obecność i rodzaj określonych mutacji wpływa na przebieg choroby i/lub warunkuje odpowiedź pacjentów na leczenie ukierunkowane. Dlatego też, niezwykle istotne jest opracowanie czułych i specyficznych metod analiz molekularnych mających na celu identyfikację mutacji genów *KIT* i *PDGFRA*. Równie ważne jest prowadzenie dalszych korelacji wyników badań molekularnych i danych klinicznych w celu określenia nowych czynników rokowniczych. Ponadto, ze względu na coraz szersze stosowanie i rozwój nowych leków w terapii ukierunkowanej, konieczne jest prowadzenie badań funkcjonalnych mających na celu określenie aktywności oraz wrażliwości receptorów na działanie inhibitorów kinaz tyrozynowych oraz innych związków stosowanych w leczeniu ukierunkowanym. Niniejsza praca habilitacyjna stanowi cykl siedmiu artykułów poświęconych tym zagadnieniom.

2. CELE PRACY

Celem pracy była identyfikacja mutacji genu *KIT* u pacjentów z mastocytozą i piebaldyzmem a także genów *KIT* i *PDGFRA* w guzach podścieliska przewodu pokarmowego (GIST) oraz zbadanie aktywności i wrażliwości izoform receptorów KIT/PDGFRA na inhibitory kinaz tyrozynowych oraz inhibitor białek szoku cieplnego 90 (HSP90).

Cele szczegółowe:

1. Opracowanie czułych i specyficznych metod diagnostycznych służących do identyfikacji mutacji genu *KIT* w guzach GIST oraz mastocytozie.
2. Określenie częstości występowania i rodzaju mutacji genów *KIT* i *PDGFRA* w guzach GIST oraz przeprowadzenie korelacji wyników badań molekularnych z obrazem klinicznym.
3. Określenie częstości występowania mutacji p.D816V genu *KIT* u pacjentów z mastocytozą.
4. Ocena *in vitro* aktywności receptorów kodowanych przez warianty genetyczne genu *KIT* (-T437dup, -T619A, -N822I).
5. Ocena wrażliwości na inhibitory kinaz tyrozynowych i inhibitor HSP90 komórek pierwotnych GIST oraz komórek Ba/F3 transdukowanych wektorami retrowirusowymi zawierającymi określone warianty genów *KIT* i *PDGFRA*.
6. Określenie znaczenia mutacji w genach *KIT* i *PDGFRA* w mechanizmie molekularnym oporności guzów GIST na działanie imatynibu.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiał

Materiał kliniczny w postaci fragmentów tkanek guzów i krwi obwodowej pochodzący od pacjentów i wykorzystany do badań molekularnych został opisany w poszczególnych pracach I-VII. Na wykonanie badań uzyskano zgodę odpowiednich Komisji Bioetycznych.

Materiał wykorzystany do przeprowadzenia nieopublikowanych badań dotyczących identyfikacji mutacji p.D816V w eksonie 17 genu *KIT* opisano w Zał. 1.

3.2. Metody

Wszystkie zastosowane metody zostały szczegółowo opisane w poszczególnych pracach I-VII. Poniżej przedstawiono krótkie opisy najważniejszych metod.

Szczegółowy opis metod wykorzystanych do analizy molekularnej u pacjentów z mastocytozą został przedstawiony w Zał. 1.

3.2.1. Izolacja DNA i RNA

Izolację DNA przeprowadzono z użyciem komercyjnych zestawów oraz standardowych metod opartych o lizę komórek, trawienie proteinazą K, ekstrakcję fenol/chloroform i precipitację. Do izolacji RNA wykorzystano odczynnik *Trizol* firmy Life Technologies (www.lifetechnologies.com).

3.2.2. Analiza molekularna genów *KIT* i *PDGFRA*

Do amplifikacji genów wykorzystywano technikę PCR i/lub *semi-nested* PCR [I-VII]. Obecność mutacji wykrywano przy pomocy techniki wysokosprawnej denaturującej chromatografii cieczerwowej (DHPLC) i/lub sekwencjonowania bezpośredniego.

W zależności od potrzeb w poszczególnych pracach analizowano różne eksony genów *KIT* i/lub *PDGFRA*. W pracach I i II zbadano całą sekwencję kodującą genu *KIT*. W pracy III analizowano tylko ekson 18 genu *PDGFRA*. Analizę mutacji w obrębie eksonów 9, 11, 13 i 17 genu *KIT* oraz eksonu 12, 14 i 18 genu *PDGFRA* wykonano w pracach V i VI. Natomiast w pracy IV badano eksony 11, 13, 14 oraz 17 genu *KIT*. W badaniach opisanych w pracy VII analizę mutacji przeprowadzono dla eksonów 9, 11, 13, 14, 15 i 17 genu *KIT* oraz 12 i 18 genu *PDGFRA*.

3.2.3. Stosowane inhibitory kinaz tyrozynowych oraz białek szoku cieplnego

Do badań przeprowadzonych w pracach II, III i VII wykorzystano następujące inhibitory kinaz tyrozynowych

- imatynib (*imatinib mesylate*, Glivec/Gleevec, Novartis, www.novartis.com),
- sorafenib (*sorafenib*, BAY-43-9006, Bayer, www.pharma.bayer.com),
- nilotynib (*nilotinib*, AMN107, Novartis, www.novartis.com),
- dazatynib (*dasatinib*, BMS-354825, Bristol-Meyers-Squibb, www.bms.com),
- PKC412 (PKC412, Novartis, www.novartis.com).

W doświadczeniach przedstawionych w pracy III wykorzystano również związek IPI-504 (Infinity Pharmaceuticals, www.infi.com), który jest inhibitorem HSP90.

3.2.4. Konstrukcja wektorów wirusowych, transfekcja, transdukcja oraz hodowla komórkowa

Szczegółowy opis produkcji wektorów plazmidowych oraz wirusowych, transdukcji oraz hodowli komórkowej został przedstawiony w pracach I-III i VII.

W badaniach I i II mających na celu porównanie aktywności receptorów kodowanych przez wybrane warianty genetyczne genu *KIT* (-T437dup, -T619A, -N822I) z aktywnością

receptora typu dzikiego (KIT-WT) wykorzystano wektor plazmidowy pcDNA3.1 (Life Technologies (www.lifetechnologies.com)) oraz komórki HEK293T.

Analizę aktywności poszczególnych inhibitorów kinaz tyrozynowych oraz inhibitora IPI-504 na komórki transdukowane wybranymi wariantami genetycznymi genu *KIT* lub *PDGFRA* (KIT-V559D, -D816V, -N822I, -WK557-558del/p.T670I oraz PDGFRA-D842V, -DIM842-844del) przeprowadzono przy wykorzystaniu mysich komórek Ba/F3 oraz wektorów retrowirusowych [II, III, VII].

Ponadto, w pracach III i VII badano wrażliwość komórek pierwotnych GIST na aktywność inhibitorów kinaz tyrozynowych oraz inhibitora IPI-504.

3.2.5. Test proliferacji

Metoda ta, pozwalająca na ocenę wrażliwości komórek na działanie środków terapeutycznych, została użyta w pracach II, III, VII. Transdukowane odpowiednim wektorem retrowirusowym mysie komórki Ba/F3 były hodowane w odpowiednim medium, w obecności różnych stężeń poszczególnych inhibitorów kinaz tyrozynowych lub inhibitora IPI-504. Ponadto, do niektórych hodowli dodawano IL-3. Liczba żywych komórek Ba/F3 była określana na początku hodowli i po 48 godz. Test proliferacji wykonano przy użyciu *CellTiter 96 AQueous One Solution Proliferation Assay* firmy Promega (www.promega.com).

3.2.6. Analiza apoptozy

Analiza indukcji apoptozy w transdukowanych mysich komórkach Ba/F3 została wykonana w pracach II, III. Komórki Ba/F3 były hodowane przez 48 godz. w obecności różnych stężeń inhibitorów kinaz tyrozynowych lub inhibitora IPI-504. Do badań wykorzystano odczynnik *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* zgodnie z instrukcją producenta (Roche Applied Science, www.roche-applied-science.com). Analiza próbek została przeprowadzona za pomocą cytometrii przepływowej przy użyciu analizatora *BD FACSCanto System* oraz oprogramowania *BD FACSDiVa* firmy BD Biosciences (www.bdbiosciences.com).

3.2.7. Technika western blotting

Wyniki badań przeprowadzonych przy użyciu techniki *western blotting* zostały wykorzystane w pracach I-III, VII. Komórki Ba/F3 lub HEK293T inkubowano przez 2 godz. w obecności inhibitora kinaz tyrozynowych lub inhibitora IPI-504. Następnie komórki były poddawane lizie i przemywane roztworem soli fizjologicznej (PBS). Stężenie białek było określone przy użyciu odczynnika *Bio-Rad Protein Assay* firmy Bio-Rad (www.bio-rad.com). Białka były rozdzielane za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej i przenoszone na membranę. Następnie dodawano przeciwciała specyficzne do białek KIT i PDGFRA oraz do wybranych białek aktywowanych przez te receptory. Detekcja została przeprowadzona przy użyciu chemiluminescencji.

Szczegółowa procedura izolacji oraz analizy białek uzyskanych z komórek pierwotnych GIST została opisana w pracach III i VII.

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW

4.1. Opracowanie czułych i specyficznych metod diagnostycznych służących do identyfikacji mutacji genu *KIT* w GIST oraz mastocytozie

4.1.1. Identyfikacja duplikacji w eksonie 11 genu *KIT* w guzach GIST

Praca V

Częstość występowania duplikacji w eksonie 11 genu *KIT* waha się od 3,6% do 13,6% guzów GIST [3, 59, 70, 84]. Tak duża rozpiętość obserwowanych wyników może być spowodowana różnicą w liczbie guzów wywodzących się z żołądka zakwalifikowanych do poszczególnych badań. Wpływ na obserwowaną częstość występowania duplikacji mogą mieć również wykorzystany materiał oraz metody stosowane do detekcji mutacji. Wyniki uprzednio przeprowadzonych badań wykazały, że wraz z procesem starzenia się bloczków parafinowych wykorzystywanych do badań molekularnych, maleje liczba wykrywanych mutacji genu *KIT* [3, 88]. Dotychczas nie poznano mechanizmu odpowiedzialnego za to zjawisko. Na jakość utrwalonego materiału i stopień degradacji kwasów nukleinowych ma także wpływ czas pomiędzy pozyskaniem materiału a jego utrwaleniem, długotrwała ekspozycja tkanki na temperaturę pokojową oraz jakość stosowanej formaliny lub parafiny.

Celem pracy V było opracowanie czułej i wiarygodnej metody badawczej służącej do detekcji duplikacji zlokalizowanych na końcu 3' eksonu 11 genu *KIT* w DNA izolowanym z bloczków parafinowych. Do badań molekularnych wykorzystano 16 guzów GIST, w których przy wykorzystaniu standardowych metod diagnostycznych nie stwierdzono obecności mutacji w eksonach 9, 11, 13 i 17 genu *KIT* oraz 12, 14 i 18 genu *PDGFRA*. W pracy V dokonano modyfikacji techniki PCR polegającej na zaprojektowaniu starterów pozwalających na specyficzną amplifikację regionu, w którym często występują duplikacje eksonu 11 genu *KIT*. Czułość opracowanej metody porównano z powszechnie stosowanym protokołem reakcji PCR i analizą obecności mutacji przy zastosowaniu techniki DHPLC.

Spośród 16 przypadków GIST, w których pierwotnie nie stwierdzono mutacji genu *KIT*, powtórna analiza wykonana przy użyciu zmodyfikowanego PCR wykazała obecność duplikacji w czterech guzach (25%). W trzech z czterech badanych przypadków GIST opisanych w pracy V stwierdzono obecność duplikacji obejmujących od 39 do 42 nukleotydów, podczas gdy w jednym przypadku stwierdzono duplikacje 18 nukleotydów.

Wyniki opublikowanych badań innych autorów wykazały, że użycie techniki DHPLC pozwala na wykrywanie mutacji genu *KIT* z większą czułością w porównaniu do techniki sekwencjonowania bezpośredniego [36]. Obserwacje te potwierdzają wyniki badań uzyskane w niniejszej pracy. Aczkolwiek przeprowadzone badania wykazały również ograniczenia techniki DHPLC opartej na analizie konwencjonalnych produktów reakcji PCR. Zastosowanie standardowego protokołu reakcji PCR oraz techniki DHPLC pozwoliło na potwierdzenie obecności mutacji genu *KIT* tylko w trzech z czterech badanych próbek pozytywnych w badaniu przy użyciu zmodyfikowanej reakcji PCR. Ta obserwacja wskazuje, że zastosowanie standardowego protokołu amplifikacji PCR powoduje preferencyjną amplifikację krótszego allelu typu dzikiego, co prowadzić może do uzyskania fałszywie negatywnych wyników badań molekularnych.

Podsumowanie: Powszechnie wiadomo, że obecność oraz rodzaj mutacji genów *KIT* i *PDGFRA* ma wpływ na odpowiedź pacjentów na leczenie imatynibem. Dlatego też stosowanie czułych i wiarygodnych metod biologii molekularnej pozwalających na identyfikację mutacji genów *KIT* i *PDGFRA* jest niezbędne do przeprowadzenia prawidłowej diagnostyki pacjentów z GIST. Opisana w niniejszej pracy modyfikacja techniki PCR polega na specyficznej amplifikacji regionu, w którym często występują duplikacje eksonu 11 genu *KIT*, przy

użyciu nowo opracowanej pary starterów. Zastosowywanie tej metody do analizy DNA izolowanego z bloczków parafinowych stanowiących najczęstszy materiał diagnostyczny, zwiększa czułość oraz wiarygodność uzyskiwanych wyników badań molekularnych a tym samym wydatnie obniża ryzyko wydania fałszywie negatywnego wyniku.

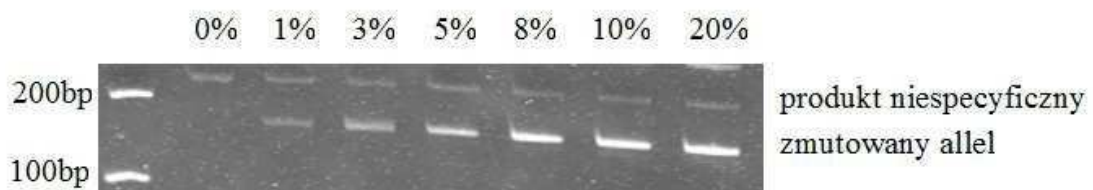
4.1.2. Porównanie czułości czterech metod biologii molekularnej służących do identyfikacji mutacji p.D816V genu *KIT*

Nieopublikowane wyniki

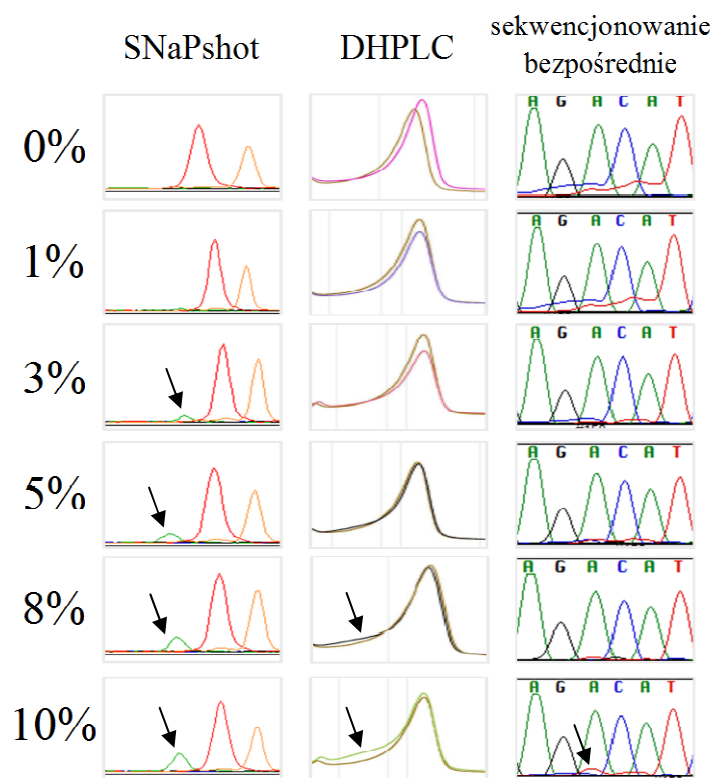
Obecność mutacji p.D816V w eksonie 17 genu *KIT* stanowi jedno z tzw. mniejszych kryteriów rozpoznania mastocytozy układowej [118]. Obserwowana częstość występowania mutacji u dorosłych chorych na mastocytozę układową waha się od ok. 14% do ponad 90% [43, 94]. Wśród czynników odpowiedzialnych za tak dużą rozpiętość uzyskiwanych wyników wymienia się dobór badanych pacjentów i różnice czułości wykrywania mutacji stosowanych technik diagnostycznych [109]. Wykrycie mutacji w genie *KIT* wykorzystywane jest nie tylko do diagnostyki, ale również do określenia strategii leczenia chorych z agresywnymi postaciami mastocytozy. W związku z tym stosowanie odpowiednich metod molekularnych pozwalających na czułą i specyficzną identyfikację mutacji ma istotne znaczenie kliniczne.

Badania prezentowane w tym rozdziale miały na celu porównanie czułości czterech technik biologii molekularnej: allelospecyficznego *semi-nested* PCR, SNaPshot, DHPLC oraz sekwencjonowania bezpośredniego w identyfikacji mutacji p.D816V u pacjentów z różnymi postaciami klinicznymi mastocytozy.

W pierwszym etapie przeprowadzono walidację czterech wyżej wymienionych technik. Eksperymenty przeprowadzone na kontrolnym plazmidowym DNA zawierającym różne stężenia zmutowanego allelu (p.D816V), wykazały że najbardziej czułą techniką jest allelospecyficzny *semi-nested* PCR. Wysoka czułość tej metody pozwala na wykrycie mutacji p.D816V w próbkach zawierających 1% zmutowanego DNA. Wysoką czułość obserwowano również stosując technikę SNaPshot, przy użyciu której mutacje stwierdzano w próbkach, w których zmutowany produkt reakcji PCR stanowił 3% badanego DNA. Dla porównania, techniki DHPLC i bezpośredniego sekwencjonowania pozwoliły na wykrycie mutacji p.D816V w próbkach zawierających około 10% zmutowanego DNA. W żadnym z eksperymentów nie zaobserwowano fałszywie pozytywnych wyników. Rezultaty przeprowadzonych badań przedstawione są na ryc. 1 oraz ryc. 2.



Rycina 1. Wyniki amplifikacji plazmidowego DNA zawierającego różne stężenia zmutowanego allelu p.D816V przy użyciu reakcji allelospecyficznego *semi-nested* PCR



Rycina 2. Wykrycie mutacji p.D816V przy użyciu technik SNaPshot, DHPLC oraz bezpośredniego sekwencjonowania z wykorzystaniem plazmidowego DNA zawierającego różne stężenia zmutowanego allele

W drugim etapie analizie poddano DNA wyizolowany od pacjentów z mastocytozą. Badania przeprowadzone na materiale uzyskanym od 47 pacjentów potwierdziły różnice w czułości wykrywania p.D816V przez cztery analizowane techniki biologii molekularnej. Stosując allelospecyficzny *semi-nested* PCR mutację p.D816V wykryto u 66% pacjentów z mastocytozą. Tymczasem SNaPshot, DHPLC i bezpośrednie sekwencjonowanie pozwoliły na identyfikację mutacji odpowiednio w 28%, 21% i 6% badanych próbek.

Ze względu na zazwyczaj niewielki odsetek liczby komórek, w których występuje mutacja p.D816V oraz stosowanie różnych technik wykrywania mutacji, takich jak sekwencjonowanie bezpośrednie, pirosekwencjonowanie, RFLP, qPCR oraz *PNA-mediated* PCR, istnieją duże rozbieżności w czułości wykrywania p.D816V. Dotychczas najbardziej czułą metodą jest *PNA-mediated* PCR, który pozwala na identyfikację mutacji nawet w próbkach zawierających tylko 0,01% zmutowanego DNA [43, 109]. Zastosowanie tej metody do analizy DNA z wyselekcjonowanych komórek szpiku kostnego, pozwala na wykrycie mutacji u ponad 90% chorych z SM [109]. qPCR jest inną również niezwykle skuteczną metodą służącą do wykrywania mutacji p.D816V [65]. W jednym z badań metoda qPCR pozwoliła na identyfikację 0,03% zmutowanego allele i potwierdziła obecność p.D816V w nieselekcjonowanych komórkach szpiku kostnego u 95% pacjentów z SM [65]. Ograniczeniem obu metod jest potrzeba zastosowania specjalistycznego sprzętu analitycznego, który nie jest powszechnie dostępny w ośrodkach prowadzących diagnostykę molekularną. Ponadto, tak wysoka czułość wykrywania mutacji nie jest wymagana, gdyż populacja monoklonalnych komórek tucznych w szpiku kostnym musi być odpowiednio liczna, aby mogła odgrywać istotną rolę w rozwoju mastocytozy. Dlatego też istnieje potrzeba opracowania czułych, specyficznych oraz po-

wszechnie dostępnych metod, które spełniają wszystkie kryteria niezbędne do uzyskania odpowiednich certyfikatów jakości przyznawanych zarówno przez narodowe jak i międzynarodowe organizacje nadzorujące wykonywanie diagnostycznych badań molekularnych. Do takich metod należy przedstawiony allelospecyficzny *semi-nested* PCR, który pozwala na szybką, czułą i specyficzną diagnostykę pacjentów z mastocytozą. Czułość tej metody została potwierdzona w serii eksperymentów przy użyciu różnych rozcieńczeń kontrolnego, plazmidowego DNA zawierającego różne stężenia zmutowanego allelu p.D816V. Allelospecyficzny *semi-nested* PCR pozwala na wykrycie mutacji w próbkach zawierających 1% zmutowanego DNA.

Wszystkie pozostałe metody wykorzystane w niniejszym badaniu charakteryzowały się niższą czułością. Techniki SNaPshot, DHPLC oraz sekwencjonowanie bezpośrednie pozwoliły na wykrycie mutacji p.D816V odpowiednio u 28%, 21% i 6% pacjentów (N=47). Technika SNaPshot nie została dotychczas zastosowana w diagnostyce pacjentów z mastocytozą. Wbrew oczekiwaniom, metoda ta okazała się mniej czuła niż allelospecyficzny *semi-nested* PCR. Technika DHPLC pozwoliła na wykrycie mutacji tylko u 21% badanych chorych, co stanowi 45% pacjentów pozytywnych na obecność mutacji *KIT* w badaniu z wykorzystaniem allelospecyficznego *semi-nested* PCR. Uzyskany wynik jest zbliżony do ostatnio opublikowanych wyników badań, w których używając DHPLC zidentyfikowano p.D816V tylko u 55% pacjentów pozytywnych w badaniu przeprowadzonym przy użyciu *semi-nested* PCR [22]. Sekwencjonowanie bezpośrednie okazała się najmniej czułą techniką. Zastosowanie tej metody pozwoliło na wykrycie mutacji zaledwie u 6% pacjentów. Uzyskana wartość jest zbliżona do opublikowanych wyników podobnych badań [65]. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że DHPLC i sekwencjonowanie bezpośredniego pozwoliły na wykrycie konstytutywnej mutacji p.N822I u pacjenta z CM w badanej grupie przypadków.

Powyższe obserwacje wskazują, że wybór techniki wykrywania mutacji powinien być dostosowany do potrzeb klinicznych i rodzaju badanego materiału. Na przykład techniki DHPLC i/lub sekwencjonowania bezpośredniego mają zastosowanie w diagnostyce molekularnej guzów GIST lub nasieniaków, natomiast w przypadku pacjentów z mastocytozą generują wysoki odsetek wyników fałszywie negatywnych. Chociaż techniki te mogą i powinny być wykorzystywane do identyfikacji mutacji konstytutywnych oraz w sytuacjach w których pożądane jest przeprowadzenie analizy całej sekwencji kodującej genu *KIT*.

4.2. Analiza częstości występowania mutacji genów *KIT* i *PDGFRA* oraz korelacja wyników badań molekularnych z danymi klinicznymi pacjentów z GIST

Prace IV i VI

4.2.1. Częstość występowania mutacji homozygotycznych w eksonie 11 genu *KIT* w guzach GIST

Praca IV

Celem badań była charakterystyka kliniczna, patologiczna i molekularna 36 pierwotnych i przerzutowych GIST, w których stwierdzono obecność homozygotycznej mutacji w eksonie 11 genu *KIT*. Ponadto, wykazano istnienie zależności pomiędzy rodzajem obserwowanych mutacji a obrazem klinicznym pacjentów z GIST. Homozygotyczne mutacje eksonu 11 genu *KIT* wykryto tylko u 36/732 (4%) badanych przypadków GIST. Podobną częstość występowania tego typu mutacji uzyskano w badaniu opisanym w pracy VI, przeprowadzonym na GIST pochodzących od nieselekcjonowanych pacjentów leczonych w północnej Norwegii. Natomiast Corless i wsp. w badaniu 322 przypadków, wśród których było 127 złośliwych, rozsianych guzów GIST od pacjentów biorących udział w badaniu klinicznym, homozygotyczne mutacje genu *KIT* zidentyfikowali w 17,8% przypadków [21]. Podobną, wyższą częstość występowania homozygotycznych mutacji zaobserwowano w niniejszym badaniu, w grupie guzów pochodzących od pacjentów ze złośliwymi GIST leczonych w Centrum On-

kologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie [IV]. Te obserwacje potwierdzają hipotezę, że homozygotyczne mutacje genu *KIT* występują częściej w GIST wysokiego ryzyka.

4.2.2. Mechanizm molekularny prowadzący do powstania homozygotycznych mutacji w eksonie 11 genu *KIT* w guzach GIST

Praca IV

Zdecydowana większość mutacji genu *KIT* identyfikowanych w GIST to mutacje heterozygotyczne. Jednakże istnieje grupa guzów z homozygotycznymi mutacjami tego genu. Mutacje homozygotyczne mogą powstać na skutek: a) występowania określonej mutacji na obydwu allelach badanego genu (prawdziwe mutacje homozygotyczne), b) obecności mutacji na jednym allelu i jednoczesnej utracie allelu typu dzikiego (mutacja hemizygotyczna), c) specyficznej amplifikacji *locus* zmutowanego genu *KIT*, lub polisomii chromosomu zawierającego zmutowany gen.

Dlatego też, celem pracy IV było przeprowadzenie badań mających na celu określenie mechanizmu prowadzącego do powstania homozygotycznych mutacji genu *KIT* w guzach GIST. W większości badanych guzów z homozygotyczną mutacją *KIT* stwierdzono utratę heterozygotyczności (LOH) w obrębie *locus* genu jak i innych *loci* zlokalizowanych w chromosomie 4, co sugerowało utratę chromosomu zawierającego allel typu dzikiego (KIT-WT). Jednakże, badania przeprowadzone przy użyciu techniki FISH ujawniły obecność dwóch lub licznych kopii genu *KIT* i chromosomu 4. W jednym przypadku zaobserwowano monosomię chromosomu 4 w guzie pierwotnym, podczas gdy w guzie wtórnym stwierdzono obecność dwóch kopii tego chromosomu. Przedstawione powyżej wyniki badań wykazały, że w pewnej liczbie guzów, po utracie chromosomu zawierającego KIT-WT, następuje duplikacja chromosomu zawierającego zmutowany *KIT* (KIT-MUT). Podobny mechanizm został opisany w dwóch przypadkach GIST, w których stwierdzono obecność mutacji w eksonie 13 genu *KIT* [81].

W jednym z badanych guzów wykazano wysoką heterozygotyczność zdecydowanej większości markerów polimorficznych zlokalizowanych w chromosomie 4. Tylko miejsca polimorficzne zlokalizowane w bliskim sąsiedztwie genu *KIT* wykazywały utratę heterozygotyczności. W tym przypadku utrata całego chromosomu 4 nie wyjaśnia mechanizmu molekularnego prowadzącego do powstania homozygotycznej mutacji genu *KIT*. Możliwym wytłumaczeniem tych wyników jest rozległa delecja obejmująca gen KIT-WT albo złożona rearanżacja genomowa. Ze względu na rodzaj materiału użytego do badań, który stanowił częściowo zdegradowany DNA z bloków parafinowych, wykonanie dodatkowych badań genetycznych potwierdzających ta tej hipotezę nie było możliwe.

W klasycznych badaniach cytogenetycznych oraz w badaniach opartych na technikach FISH, aberracje liczbowe chromosomu 4, gdzie zlokalizowany jest gen *KIT*, zidentyfikowano tylko w nielicznych przypadkach GIST [27, 50]. Również badania przy użyciu techniki porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH), nie wykazały w guzach GIST utraty lub amplifikacji materiału genetycznego pochodzącego z tego chromosomu [35]. Obserwacje te potwierdzają wyniki badań przeprowadzonych w pracy IV, które wykazały że użycie cytogenetyki klasycznej lub techniki CGH nie pozwala na identyfikację zaburzeń genetycznych, w których utrata całego lub fragmentu chromosomu 4 zawierającego gen KIT-WT jest maskowana przez duplikację całego lub fragmentu tego chromosomu zawierającego KIT-MUT.

4.2.3. Znaczenie rokownicze mutacji homozygotycznych w eksonie 11 genu *KIT* w guzach GIST

Praca IV

Wyniki dotychczas opublikowanych badań wykazały, że delecje kodonów 557-558 w eksonie 11 genu *KIT* stanowią niekorzystny czynnik prognostyczny [84, 124]. W niniej-

szym badaniu, delecja ta została zidentyfikowana w dwóch złośliwych guzach wywodzących się z żołądka oraz w jednym zlokalizowanym w jelicie cienkim. Duplikacje na końcu 3' eksonu 11 genu *KIT* zidentyfikowane są natomiast w guzach łagodnych wywodzących się z żołądka [5, 70]. W przedstawionej pracy, w przeciwieństwie do wcześniej opublikowanych badań, ten rodzaj mutacji został wykryty w dwóch guzach złośliwych.

Wyniki niniejszej pracy wykazały istnienie zależności pomiędzy obecnością homozygotycznej mutacji w eksonie 11 genu *KIT* a wysokim stopniem złośliwości GIST. Guzy z tymi mutacjami dawały przerzuty w obrębie jamy brzusznej i do wątroby.

W większości przypadków homozygotyczną mutację genu *KIT* zidentyfikowano już w guzie pierwotnym. Aczkolwiek, w dwóch przypadkach zaobserwowano obecność mutacji heterozygotycznej w guzie pierwotnym i mutacji homozygotycznej w guzie wtórnym. Na podstawie tej obserwacji można wysnuć hipotezę, że komórki KIT-MUT(+)/KIT-WT(-) są bardziej złośliwe niż KIT-MUT(+)/KIT-WT(+). Upřednio zamianę statusu mutacji z heterozygotycznej na homozygotyczną zidentyfikowano w pięciu guzach wtórnych, co sugeruje że homozygotyczne mutacje powstają w trakcie progresji nowotworu [18, 28]. Aczkolwiek, obecność homozygotycznej mutacji zaobserwowano również w dwóch guzach, których wielkość nie przekraczała 1 cm [23]. A zatem, homozygotyczne mutacje genu *KIT* mogą również występować na wczesnym etapie rozwoju nowotworu. Istnieje możliwość, że mechanizm prowadzący do powstania mutacji homozygotycznych w małych i łagodnych GIST różni się od mechanizmu obserwowanego w dużych guzach złośliwych. Jednak wykazanie ewentualnych różnic wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań.

4.2.4. Znaczenie predycyjne mutacji homozygotycznych w eksonie 11 genu *KIT* w guzach GIST

Praca IV

W niniejszym badaniu, u czterech z siedmiu pacjentów z mutacją homozygotyczną, leczonych imatynibem - selektywnym inhibitorem receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej, po stosunkowo krótkim okresie czasu, doszło do wznowy. Ponadto, średni czas przeżycia tej grupy pacjentów leczonych imatynibem był porównywalny do czasu przeżycia obserwowanego u chorych nieleczonych inhibitorem kinazy tyrozynowej. W jednym przypadku, oprócz mutacji homozygotycznej w eksonie 11 genu *KIT* wykryto heterozygotyczną mutację p.V654A. Oznacza to, że mutacja p.V654A, warunkująca oporność na imatynib, powstała dopiero po duplikacji chromosomu 4. Jednakże, oprócz mutacji wtórnej wpływ na większą złośliwość guza oraz jego oporność na działanie imatynibu może mieć również obserwowana rearanżacja chromosomu 4. Rearanżacja prowadząca do wzrostu ekspresji allela KIT-MUT na skutek duplikacji, poprzedzonej utratą allelu KIT-WT. Obserwacja ta wymaga jednak potwierdzenia na większej liczbie przypadków.

Upřednio, zamianę mutacji heterozygotycznej na homozygotyczną opisano w dwóch przypadkach GIST opornych na działanie imatynibu [62]. W obydwu przypadkach, oprócz mutacji homozygotycznej, wykryto również wtórną mutację *KIT* co nie pozwoliło na określenie jednoznacznego związku pomiędzy obecnością mutacji homozygotycznej a opornością na imatynib [62]. W innym badaniu utratę heterozygotyczności stwierdzono w guzie pierwotnym jak i w guzie wtórnym zlokalizowanym w wątrobie, opornym na działanie imatynibu [28].

Podsumowanie: w niniejszym badaniu przedstawiono utratę allelu typu dzikiego (KIT-WT) i duplikację zmutowanego allelu (KIT-MUT) jako mechanizm powodujący powstanie mutacji homozygotycznych w eksonie 11 genu *KIT* w GIST. Ryzyko wznowy było zdecydowanie większe w grupie guzów z homozygotycznymi delecjami lub mutacjami typu delecja-insercja w porównaniu do guzów z heterozygotycznymi mutacjami tego genu. Ponadto wykazano, że obecność homozygotycznej mutacji świadczy o progresji choroby i agresywnym przebiegu klinicznym.

4.2.5. Częstość występowania i rodzaj mutacji genów *KIT* i *PDGFRA* oraz korelacja wyników badań molekularnych z danymi klinicznymi pacjentów z GIST z północnej Norwegii

Praca VI

W pracy przedstawiono wyniki badań molekularnych mających na celu określenie częstości i rodzaju mutacji genów *KIT* i *PDGFRA* u chorych z GIST pochodzących z północnego regionu Norwegii. Do badań molekularnych zakwalifikowano 102 próbki tkanek guzów od pacjentów z GIST zdiagnozowanych na przestrzeni 30 lat.

Wyniki badań molekularnych wykazały, że częstość występowania mutacji *KIT* i *PDGFRA* wynosiła 85,4%. Mutacje genu *KIT* zostały wykryte w 75,3% przypadków i najczęściej były zlokalizowane w eksonie 11 (65,2%). Częstości występowania mutacji genu *KIT* w populacji północnej Norwegii są wyższe niż te obserwowane w populacji szwedzkiej, które wynosiły odpowiednio 64% i 57% [3]. Różnice pomiędzy badanymi grupami mogą wynikać z jakości bloków parafinowych wykorzystywanych do badań oraz stosownych metod biologii molekularnej użytych do wykrycia mutacji tych genów.

Analiza danych klinicznych i typu mutacji ujawniła, że mutacje punktowe w eksonie 11 występują w mniejszych guzach o niższej aktywności mitotycznej. Ponadto u pacjentów, w których guzach wykryto mutacje punktowe obserwowano dłuższy czas przeżycia w porównaniu do pacjentów z GIST, w których stwierdzono obecność delecji. Podobne obserwacje zostały opublikowane na podstawie badań przeprowadzonych na populacjach chorych ze Szwecji i USA [3, 88].

Duplikacje w eksonie 11, należą po delecjach i mutacjach punktowych, do trzeciej najczęstszej kategorii mutacji genu *KIT* w GIST. Występowanie duplikacji w eksonie 11 było uprzednio łączone z guzami GIST o relatywnie łagodniejszym przebiegu rozwijającymi się w żołądku, głównie u starszych kobiet [5, 70]. W niniejszym badaniu aż siedem z ośmiu GIST, w których stwierdzono obecność duplikacji w eksonie 11 genu *KIT*, zlokalizowanych było w żołądku. Nie zaobserwowano natomiast zależności pomiędzy obecnością duplikacji a płcią pacjentów lub obrazem klinicznym choroby.

Mutacje w eksonie 9 genu *KIT* stwierdzono u 5,6% badanych pacjentów. Za wyjątkiem jednego guza, wszystkie mutacje w tym eksonie zostały zidentyfikowane w GIST wywodzących się z jelita cienkiego. Uzyskane wyniki częściowo potwierdzają poprzednio opublikowane obserwacje innych autorów [5, 73]. Natomiast badanie to nie potwierdziło zależności pomiędzy obecnością mutacji w eksonie 9 *KIT* a stopniem złośliwości guza. Średni czas przeżycia w tej grupie pacjentów był porównywalny do czasu przeżycia obserwowanego zarówno w całej badanej grupie pacjentów jak i grupie chorych z innymi mutacjami genu *KIT*. Z wyników badań klinicznych poświęconych zależności pomiędzy typem mutacji *KIT* a odpowiedzią na leczenie imatynibem wiadomo jednak, że obecność mutacji w eksonie 9 genu *KIT* zmniejsza wrażliwość GIST na imatynib. Dlatego też, u pacjentów z GIST, w których guzach wykryto mutację eksonu 9 sugeruje się stosowanie wyższych dawek tego leku [28].

W badanej grupie, mutacje w obrębie eksonu 13 i 17 genu *KIT* zidentyfikowano odpowiednio u trzech i jednego pacjenta. Stwierdzona niska częstość występowania mutacji w eksonach kodujących domeny o aktywności kinazy tyrozynowej potwierdza wcześniejsze wyniki badań innych autorów [64, 98, 104, 114].

Mutacje genu *PDGFRA* zostały zidentyfikowane w grupie dziewięciu guzów (10,1%). Zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami zdecydowaną większość guzów, w których zidentyfikowano mutacje tego genu stanowiły epitheloidalne GIST wywodzące się z żołądka [34, 69, 88, 125]. Obserwowane częstości występowania mutacji genu *PDGFRA* różnią się pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi. W grupie złośliwych GIST wywodzących się z różnych odcinków przewodu pokarmowego mutację *PDGFRA* zidentyfikowano w 7,2% badanych przypadków, tymczasem w grupie guzów wywodzących się z żołądka wykryto mutację

aż u 22,6% pacjentów [24, 88]. Powyższe różnice wynikają z przeprowadzonego doboru pacjentów do poszczególnych badań. W badaniach GIST z tzw. prób klinicznych dominują guzy złośliwe, często pochodzące z jelita cienkiego. W tego typach guzach mutacje genu *PDGFRA* należą do rzadkości. Natomiast w badaniach opartych na całej populacji chorych dominują łagodne guzy GIST pochodzące z żołądka, w których mutacje genu *PDGFRA* są częściej wykrywane.

Ponadto, zaobserwowano, że 33% guzów, w których stwierdzono obecność mutacji genu *PDGFRA*, wykazuje słabą lub negatywną odpowiedź immunohistochemiczną na antygen CD117 (KIT). Dla porównania, słaba lub negatywna reakcja immunohistochemiczna obserwowana jest tylko u 3% guzów z mutacjami genu *KIT*. Wyniki wcześniej przeprowadzonych badań wskazują, że mutacje genu *PDGFRA* są korzystnym czynnikiem prognostycznym dla pacjentów z GIST [88]. W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono zależności pomiędzy obecnością mutacji genu *PDGFRA* a średnim czasem przeżycia.

W badanej grupie GIST, guzy w których nie stwierdzono obecności mutacji genów *KIT* i *PDGFRA* stanowiły 14,6% wszystkich przypadków. Wartość ta jest wyższa od wartości obserwowanych przez inne zespoły, które badały pacjentów leczonych inhibitorami kinaz tyrozynowych [55, 104]. Oznacza to, że populacyjna częstość występowania GIST bez mutacji genów *KIT* i *PDGFRA* może być wyższa niż to pierwotnie zakładano.

Podsumowanie: w niniejszym badaniu określono częstość występowania mutacji genów *KIT* i *PDGFRA* w guzach GIST pochodzących od chorych z północnej Norwegii. Obecność mutacji stwierdzono w 75% przypadków badanych guzów, podczas gdy mutacje *PDGFRA* zostały zidentyfikowane w 10% guzów. Informacja ta jest istotna, gdyż wskazuje, że częstość mutacji *KIT* i *PDGFRA* w guzach GIST jest wysoka. Ponadto wykazano, że typ mutacji *KIT*, oprócz wielkości i aktywności mitotycznej guza jest dodatkowym czynnikiem rokowniczym.

4.3. Identyfikacja mutacji p.D816V genu *KIT* u pacjentów z mastocytozą

Nieopublikowane wyniki

Do nieopublikowanych badań mających na celu określenie czułości czterech wybranych technik biologii molekularnej zakwalifikowano 47 pacjentów z mastocytozą. U 26 chorych stwierdzono mastocytozę układową o powolnym przebiegu (ISM), u 20 mastocytozę skórą (CM), a u jednego pacjenta agresywną mastocytozę układową (ASM). W przeprowadzonych badaniach przy użyciu allelospecyficznego *semi-nested* PCR mutację p.D816V zidentyfikowano u 66% zakwalifikowanych do badań molekularnych pacjentów. Podobną częstość występowania mutacji obserwowano w innych badaniach pacjentów z mastocytozą [68, 76]. U jednego chorego wykryto konstytutywną mutację p.N822I w eksonie 17 genu *KIT*. Było to możliwe dzięki zastosowaniu techniki DHPLC i sekwencjonowania bezpośredniego. Identyfikacja tej mutacji, ocena aktywności receptora oraz wrażliwości transdukowanych wektorem KIT-N822I komórek Ba/F3 na inhibitory kinazy tyrozynowej, była przedmiotem pracy II.

Przeprowadzone badania, oprócz określenia czułości metod biologii molekularnej, miały również na celu określenie częstości występowania mutacji p.D816V genu *KIT* u pacjentów z dwoma postaciami mastocytozy: ISM i CM. W grupie pacjentów z ISM mutację p.D816V zidentyfikowano aż u 23/26 chorych (88%). Uzyskane wyniki są bardzo zbliżone do wyników poprzednio opublikowanych badań, w której mutacje wykryto u 87% badanych pacjentów z ISM [68]. Co więcej, uzyskana w niniejszym badaniu częstość występowania p.D816V jest nieznacznie wyższa od wartości opublikowanych przez dwie niezależne grupy badawcze stosujące wysoce czułe metody *PNA-mediated* PCR i qPCR [65, 109]. W niektórych pracach częstość występowania mutacji p.D816V u pacjentów z ISM jest zdecydowanie niższa (78%), a w przypadku badań krwi obwodowej przeprowadzonych przy użyciu sekwencjonowania bezpośredniego nie przekracza 16% analizowanych przypadków [76, 130].

W niniejszym badaniu mutację p.D816V zidentyfikowano u 40% pacjentów z CM. Taką samą lub podobną częstość występowania mutacji u chorych z CM zaobserwowano w dwóch

innych badaniach [68, 109]. Istnieją prace, w których nie stwierdzono obecności p.D816V u żadnego z badanych pacjentów z CM [130]. Brak mutacji p.D816V u chorych z CM oraz niska częstość występowania tej substytucji u pacjentów z ISM w wyżej wymienionej pracy może być spowodowana wykorzystaniem do badań nieodpowiedniego materiału, tzn. krwi obwodowej [130]. Do badań molekularnych mających na celu wykrycie mutacji genu *KIT* stosuje się zarówno RNA jak i DNA wyizolowany z nieselekcjonowanych lub monoklonalnych komórek szpiku [118]. Wykorzystanie komórek krwi obwodowej prowadzi jednak do znacznego obniżenia czułości analizy, a tym samym zwiększenia liczby fałszywie negatywnych wyników [118]. W przedstawionej pracy własnej wykonano również badania mające na celu porównanie czułości allelospecyficznego *semi-nested* PCR w zależności od materiału wykorzystanego do analizy. Tylko w 18/23 (78%) próbkach wyizolowanych z krwi obwodowej pacjentów potwierdzono obecność mutacji p.D816V, pierwotnie wykrytej w komórkach szpiku kostnego. Podobne wyniki uzyskali inni badacze, którzy w analizach przeprowadzonych przy użyciu techniki qPCR potwierdzili obecność p.D816V w krwi obwodowej u 81% próbek pierwotnie zakwalifikowanych jako *KIT* pozytywne [65]. Wyniki te potwierdzają słuszność obecnie stosowanych zaleceń, zgodnie z którymi, materiałem wykorzystywanym do identyfikacji mutacji p.D816V u pacjentów z mastocytozą powinny być komórki szpiku kostnego [118]. Niniejsze badanie pokazuje, że u pacjentów u których ze względu na stan zdrowia nie można wykonać biopsji szpiku kostnego, możliwie jest przeprowadzenie diagnostyki molekularnej z wykorzystaniem komórek krwi obwodowej. W takich przypadkach należy jednak brać pod uwagę większe prawdopodobieństwo uzyskania wyników fałszywie negatywnych.

Podsumowanie: przeprowadzone badania potwierdziły wysoką skuteczność techniki allelospecyficznego *semi-nested* PCR jako narzędzia pozwalającego na szybką i wiarygodną diagnostykę molekularną pacjentów z mastocytozą. Czułość metody została potwierdzona wysoką częstością zidentyfikowanych mutacji p.D816V w licznej grupie polskich pacjentów. Uzyskane wyniki są zbliżone do wyników opublikowanych przez inne zespoły badawcze stosujące zaawansowany sprzęt diagnostyczny i/lub selekcjonowane komórki szpiku kostnego. Powyższe badanie wykazało, że allelospecyficzny *semi-nested* PCR, ze względu na swą prostotę oraz niskie koszty wykonywanych badań może skutecznie zastąpić bardziej skomplikowane metody molekularne i może być powszechnie stosowany w laboratoriach diagnostycznych.

4.4. Analiza aktywności wybranych izoform receptora KIT

Badania *in vitro* pozwalają między innymi określić czy zmiany na poziomie DNA mają wpływ na aktywność kodowanego białka. Tego typu badania są szczególnie istotne w przypadku identyfikacji nowych mutacji, których funkcje nie są znane. Wyniki badań mających na celu określenie aktywności form receptora KIT-N822I, KIT-T437dup oraz KIT-T619A przedstawiono w pracach I i II.

4.4.1. Inaktywacja receptorów KIT-T437dup oraz KIT-T619A w piebaldyzmie

Praca I

Dane kliniczne dwóch pacjentów zakwalifikowanych do badań zostały przedstawione w pracy I. Do badań molekularnych wykorzystano DNA wyizolowany z komórek krwi obwodowej. Sekwencje kodujące genu *KIT* wraz z flankującymi sekwencjami intronowymi zamplifikowano przy użyciu PCR, a następnie zsekwencjonowano.

U pacjenta #1 zidentyfikowano zamianę nukleotydu c.1855A>G (p.T619A) w obrębie eksonu 12 genu *KIT* kodującego domenę cytoplazmatyczną o aktywności kinazy tyrozynowej. Domena ta jest silnie konserwowana i nawet substytucja jednego aminokwasu prowadzi do zmiany aktywności receptora KIT. Mutacje w bliskim sąsiedztwie kodonu 620 zostały uprzednio opisane u pacjentów z piebaldyzmem [38, 77, 101].

Sekwencjonowanie bezpośrednie genu *KIT* przeprowadzone u pacjenta #2 pozwoliło na wykrycie duplikacji kodonu 437 (c.1406-1408dupACA, p.T437dup) zlokalizowanej w ekso-

nie 8. Dotychczas w tym eksonie genu *KIT* zidentyfikowano wyłącznie mutacje aktywujące u pacjentów z AML oraz u kilku członków rodziny z GIST [44, 52].

Aby stwierdzić czy obydwie zmiany nie są wariantami polimorficznymi przeprowadzono sekwencjonowanie bezpośrednie eksonu 8 oraz 12 genu *KIT* w grupie 50 zdrowych osób. U żadnej osoby z grupy kontrolnej nie stwierdzono obecności p.T437dup lub p.T619A. Ponadto, wyżej wymienionych wariantów genetycznych nie znaleziono w żadnej z ogólnodostępnych baz danych, co potwierdza ich patogenny charakter.

Oprócz duplikacji p.T437dup, u pacjenta #2 zidentyfikowano opisany wcześniej u osób z piebaldyzmem, wariant genetyczny (c.67+4G>A) [38]. Na podstawie wyników badań własnych oraz poprzednio opublikowanej pracy można jednoznacznie stwierdzić, że c.67+4G>A jest wariantem polimorficznym, który nie jest związany z piebaldyzmem. W przeciwieństwie do mutacji p.T437dup, wspomniany wariant genetyczny nie został zidentyfikowany u chorych dzieci pacjenta #2. Uprzednio, substytucję c.67+4G>A wykryto u dwóch pacjentów z GIST, u których nie stwierdzono żadnych objawów klinicznych piebaldyzmu oraz u trzech zdrowych osób z grupy kontrolnej [103].

W celu określenia poziomu aktywności receptorów KIT-T437dup oraz KIT-T619A przeprowadzono badania funkcjonalne. Sekwencje kodujące KIT-WT, KIT-T437dup oraz KIT-T619A wklonowano do wektora pcDNA3.1. Pustym wektorem oraz wektorami zawierającymi poszczególne warianty genetyczne genu *KIT* transfekowano komórki HEK-293T. Niektóre komórki stymulowano czynnikiem SCF. Ocenę aktywności receptorów przeprowadzono przy użyciu techniki *western blotting*.

Wyniki badania wykazały, że poziom autofosforylacji receptorów KIT-T437dup oraz KIT-T619A był niski i porównywalny do poziomu obserwowanego w receptorze KIT-WT. Stymulacja komórek KIT-T619A czynnikiem SCF prowadziła do fosforylacji receptora. Jednak obserwowany poziom aktywacji był zdecydowanie niższy w porównaniu do poziomu fosforylacji receptora KIT-WT. W komórkach wykazujących ekspresję KIT-T437dup nie stwierdzono żadnej odpowiedzi na SCF. Poziom fosforylacji receptora był porównywalny do tego obserwowanego w komórkach niepoddanych stymulacji.

Podsumowanie: przeprowadzone badania *in vitro* potwierdziły patogenny charakter mutacji p.T437dup oraz p.T619A u pacjentów z typowymi objawami klinicznymi piebaldyzmu oraz pozwoliły na zidentyfikowanie molekularnego mechanizmu ich działania. Mutacja p.T619A powoduje obniżenie stopnia fosforylacji receptora KIT-T619A po stymulacji ligandem SCF, podczas gdy mutacja p.T437dup prowadzi do konstytutywnej inaktywacji receptora.

4.4.2. Konstytutywna aktywacja receptora KIT-N822I w mastocytozie

Praca II

Dotychczas tylko u czterech rodzin z mastocytozą opisano występowanie mutacji germinacyjnej genu *KIT*. W pracy II przedstawiono kolejną rodzinę z mastocytozą skórą. Jedynym objawem klinicznym zaobserwowanym u członków tej rodziny była pokrzywka barwnikowa, wcześniej określana jako *Urticaria Pigmentosa* (UP). U wszystkich członków rodziny z kliniczną manifestacją UP, zidentyfikowano mutację germinacyjną p.N822I genu *KIT* w DNA wyizolowanym z komórek krwi obwodowej, wymazu z jamy ustnej oraz z komórek osadu moczku.

Dotychczas w literaturze opisano członków dwóch rodzin z GIST oraz zespołem wtórnej achalazji będącej wynikiem rozsianej mięśniakowatości (*diffuse leiomyomatosis - associated achalasia*), u których stwierdzono kliniczne objawy UP oraz obecność mutacji germinacyjnej genu *KIT* [8, 13]. Mutacje genu *KIT* zlokalizowane w kodonie p.N822 wykryto zarówno u dzieci jak i dorosłych pacjentów z CML, w sporadycznych i rodzinnych guzach GIST oraz nasieniakach [61, 81, 108, 115]. Zdecydowana większość wykrytych mutacji powodowała substytucję tyminy na adeninę w pozycji nukleotydowej c.2563T>A, co prowadzi do zamiany

asparaginy na lizynę (p.N822K). Mutację punktową p.N822H zidentyfikowano w nasieniach i w guzach GIST, podczas gdy obecność substytucji p.N822T stwierdzono u dziecka z AML [61, 81, 108]. Natomiast mutację prowadzącą do zamiany asparaginy na tyrozyne (p.N822Y) opisano u członków rodziny z GIST [115]. Współwystępowanie mutacji p.N822I i p.V559A (ekson 11) zostało niedawno opisane u pacjenta z czerniakiem złośliwym [86].

Aby potwierdzić patogenny charakter mutacji p.N822I genu *KIT* przeprowadzono badania funkcjonalne. Komórki HEK293T transfekowano wektorem pcDNA3.1 zawierającym sekwencję kodującą KIT-N822I. Aktywność biochemiczną zmutowanego receptora określono za pomocą techniki *western blotting*. Jako badanie kontrolne zastosowano komórki transfekowane pustym wektorem oraz wektorem zawierającym sekwencję *wild-type* genu *KIT*. Zgodnie z oczekiwaniami, poziom autofosforylacji receptora KIT-WT w komórkach niestymulowanych czynnikiem SCF był niski. Dodanie ligandu do hodowli powodowało natychmiastową aktywację receptora KIT-WT. Natomiast w komórkach KIT-N822I obserwowano silną konstytutywną fosforylację receptora. Wysoki poziom fosforylacji zaobserwowano już w komórkach, które nie były stymulowane czynnikiem SCF. Stymulacja komórek czynnikiem SCF prowadziła do dalszej aktywacji receptora KIT-N822I. Podobne zjawisko zaobserwowali inni badacze w komórkach wykazujących ekspresję receptorów KIT-A502_Y503dup oraz KIT-K509I [131]. Inną charakterystyczną cechą izoform tego receptora, kodowanych przez zmutowane warianty genu *KIT*, jest większa lub równa ekspresja niedojrzałej formy receptora (145 kDa) w porównaniu do formy dojrzałej (160 kDa). W komórkach wykazujących ekspresję KIT-WT dominuje glikolizowana, dojrzała forma receptora [131]. W niniejszym badaniu, w komórkach KIT-N822I zaobserwowano porównywalny poziom ekspresji zarówno formy niedojrzałej jak i dojrzałej, co potwierdza patogenny charakter tego receptora.

Aby stwierdzić, czy mutacja p.N822I genu *KIT* jest czynnikiem onkogennym wykonano badania *in vitro* z zastosowaniem wektorów retrowirusowych i mysich komórek Ba/F3. Po transdukcji wektorem KIT-N822I wzrost komórek stał się niezależny od obecności IL-3. Potwierdza to onkogeną aktywność receptora kodowanego przez gen *KIT* zawierający mutację p.N822I.

Podsumowanie: wyniki badań potwierdziły, że mutacja p.N822I genu *KIT* zidentyfikowana u członków rodziny z mastocytozą skórą jest mutacją aktywującą. Kodowany receptor KIT-N822I wykazywał konstytutywną fosforylację, a doświadczenia przeprowadzone z użyciem wektorów retrowirusowych oraz mysich komórek Ba/F3 potwierdziły, że ta forma receptora ma właściwości onkogenne. Jednocześnie ograniczone objawy kliniczne członków rodziny z mutacją p.N822I sugerują, że na fenotyp pacjentów z mastocytozą mogą wpływać jak dotąd niezidentyfikowane czynniki genetyczne i epigenetyczne.

4.5. Ocena *in vitro* i *ex vivo* wrażliwości transdukowanych komórek Ba/F3 oraz pierwotnych komórek GIST na działanie inhibitorów kinaz tyrozynowych oraz inhibitora HSP90

Zjawisko oporności pierwotnej i powstawania oporności wtórnej u pacjentów z GIST poddanych terapii celowanej stanowi poważny problem kliniczny. W związku z tym opracowanie modeli doświadczalnych, które pozwolą na efektywne testowanie kolejnych związków mogących mieć zastosowanie w leczeniu pacjentów z GIST jest jednym z kluczowych problemów onkologii doświadczalnej. W pracach II, III i VII przedstawiono wyniki badań *in vitro* i *ex vivo* określających oporność lub wrażliwość mysich komórek Ba/F3 oraz komórek pierwotnych GIST wykazujących ekspresję wybranych wariantów genetycznych genów *KIT* i *PDGFRA* na różne inhibitory kinaz tyrozynowych oraz inhibitor HSP90.

4.5.1. Ocena wrażliwości transdukowanych komórek Ba/F3: KIT-V559D, -D816V, -N822I na imatynib i dazatynib

Praca II

Mutacje w kodonie 822 genu *KIT* stwierdzono w mastocytozie, GIST i w innych typach nowotworów [61, 81, 86, 108, 115]. Dlatego w pracy II przeprowadzono szereg doświadczeń mających na celu określenie wrażliwości lub oporności komórek wykazujących ekspresję KIT-N822I na działanie dwóch inhibitorów kinaz tyrozynowych, imatynibu i dazatynibu. Do badania obok komórek KIT-N822I wykorzystano komórki wrażliwe na działanie imatynibu (KIT-V559D) oraz komórki wykazujące oporność na działanie tego inhibitora (KIT-D816V).

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły wysoką aktywność imatynibu względem komórek wykazujących ekspresję receptora KIT-V559D. Uzyskana za pomocą testu proliferacyjnego wartość wskaźnika IC₅₀ wynosiła 82 nM. Ponadto, przy stężeniu imatynibu wynoszącym 100 nM zaobserwowano znaczącą apoptozę tych komórek. W przeciwieństwie do komórek KIT-V559D, zarówno komórki KIT-N822I jak i KIT-D816V, wykazały pierwotną oporność na działanie imatynibu.

Dazatynib, inhibitor kinazy tyrozynowej II generacji, efektywnie hamował wzrost wszystkich badanych komórek. Uzyskane wartości IC₅₀ wynosiły 6 nM, 68 nM i 77 nM, odpowiednio dla komórek KIT-V559D, -N822I oraz -D816V. Znaczącą apoptozę komórek KIT-N822I oraz KIT-D816V zaobserwowano po 48 godzinnej inkubacji komórek z dazatynibem o stężeniu 100 nM. W przypadku komórek KIT-V559D apoptozę obserwowano już przy stężeniu 50 nM dazatynibu. Seria eksperymentów polegająca na jednoczesnym dodaniu dazatynibu i IL-3 do komórek transdukowanych poszczególnymi wariantami genetycznymi genu *KIT* wykazała, że zahamowanie proliferacji oraz indukcja apoptozy to efekt specyficznej aktywności inhibitora względem receptorów KIT-V559D, -N822I oraz -D816V, a nie cytotozycznej siły preparatu.

Wpływ inhibitorów kinazy tyrozynowej na sygnalizację komórkową KIT-V559D, -N822I oraz -D816V został potwierdzony przy użyciu techniki *western blotting*. Badania wykazały, że imatynib efektywnie blokuje fosforylację receptora KIT-V559D a tym samym hamuje sygnalizację komórkową. Istotne obniżenie poziomu fosforylacji białek AKT, ERK1/2 oraz RPS6K obserwowano już przy 50 nM stężeniu imatynibu. W przeciwieństwie do komórek KIT-V559D, w komórkach wykazujących ekspresję KIT-D816V oraz KIT-N822I tylko dazatynib wykazywał aktywność i powodował zahamowanie fosforylacji receptorów KIT oraz białek zależnych. Zahamowanie fosforylacji białek KIT, AKT, ERK1/2 oraz RPS6K zaobserwowano przy stężeniach 100 nM dazatynibu.

Wyniki badań opublikowanych przez dwa niezależne zespoły badawcze są sprzeczne. W jednym z nich mutacja p.N822K oraz inne mutacje zlokalizowane w pobliżu tego kodonu warunkowały wrażliwość komórek na działanie imatynibu [7]. W drugim natomiast komórki z mutacją w kodonie 822 wykazywały minimalną wrażliwość na działanie imatynibu [51]. Wyniki badań własnych przedstawione w pracy II, wskazują że mutacja KIT-N822I warunkuje oporność komórek na działanie imatynibu. Uzyskane wyniki są zgodne z obserwacjami dotyczącymi chorego z czerniakiem, w którym zidentyfikowano dwie mutacje genu *KIT*, w tym p.N822I. Leczenie imatynibem w tym przypadku było nieskuteczne [86].

Wyniki poprzednio opublikowanych badań wskazują, że komórki wykazujące ekspresję receptorów kodowanych przez gen *KIT*, w którym występuje jedna lub dwie mutacje w obrębie eksonów 13 i/lub 17 są wrażliwe na działanie dazatynibu [51]. Badania *in vitro* przeprowadzone w niniejszej pracy potwierdzają tę zależność. W przedstawionej pracy wykazano, że komórki Ba/F3 wykazujące nadekspresję receptora KIT-N822I są wrażliwe na działanie dazatynibu.

Badania kliniczne II fazy wykazały, że dazatynib nie jest skuteczny w leczeniu pacjentów z mastocytozą układową, u których stwierdzono obecność mutacji p.D816V genu *KIT*

[120]. Jednakże ta obserwacja jest sprzeczna z wynikami badań innych autorów, w których wykazano aktywność dazatynibu *in vitro* jak i *in vivo* u pacjenta z mastocytozą układową i AML, u którego potwierdzono obecność mutacji p.D816V genu *KIT* [117]. Wyniki badań własnych potwierdzają wysoką i specyficzną aktywność *in vitro* dazatynibu względem mysich komórek z ekspresją receptorów KIT-N822I oraz KIT-D816V. Jednakże określenie przydatności dazatynibu w leczeniu pacjentów z różnymi nowotworami, w których stwierdzono obecność mutacji w eksonie 17 genu *KIT*, wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań klinicznych.

4.5.2. Ocena wrażliwości transdukowanych komórek Ba/F3 oraz komórek pierwotnych GIST: KIT-V654A, -T670I oraz PDGFRA-D842V na imatynib i PKC412

Praca VII

Jednym z zagadnień przedstawionych w pracy VII była ocena aktywności *ex vivo* i/lub *in vitro* imatynibu oraz inhibitora PKC412 na komórki Ba/F3 oraz komórki pierwotnych GIST wykazujących ekspresję dwóch form receptora KIT (-V654A, -T670I) oraz jednej formy receptora PDGFRA (-D842V).

Badania *ex vivo* wykonane w ramach niniejszej pracy wykazały, że komórki KIT-V654A oraz KIT-T670I wykazują oporność na działanie nawet wysokich stężeń imatynibu. W przeciwieństwie do imatynibu, PKC412 wykazał aktywność względem obydwu form receptora KIT w stężeniach, które są bezpieczne dla pacjentów leczonych tym inhibitorem [48, 99, 111]. Aby potwierdzić różnice w aktywności imatynibu i PKC412 obserwowane w komórkach pierwotnych GIST, w pracy VII przeprowadzono badania *in vitro* z wykorzystaniem komórek Ba/F3 transdukowanych wektorami KIT-T670I oraz PDGFRA-D842V. Mutacje p.T670I genu *KIT* oraz p.D842V genu *PDGFRA* warunkują oporność komórek na działanie imatynibu. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń potwierdziły wysoką aktywność PKC412 w komórkach wykazujących ekspresję receptorów KIT-T670I oraz PDGFRA-D842V.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że użycie PKC412 może stanowić alternatywę dla pacjentów z GIST, u których stwierdzono obecność dwóch wyżej wymienionych mutacji warunkujących oporność na imatynib.

4.5.3. Ocena wrażliwości transdukowanych komórek Ba/F3 oraz komórek pierwotnych GIST: PDGFRA-D842V oraz -DIM842-844del na inhibitory kinazy tyrozynowej i IPI-504

Praca III

Chociaż większość pacjentów z GIST odpowiada na leczenie przy użyciu imatynibu, u 10-20% osób obserwuje się oporność pierwotną na działanie tego inhibitora. W guzach pierwotnie opornych na działanie imatynibu nie stwierdza się obecności mutacji genów *KIT* i *PDGFRA* albo identyfikuje się mutacje w obrębie eksonów kodujących domenę o aktywności kinazy tyrozynowej. Do takich mutacji należy substytucja p.D842V zlokalizowana w eksonie 18 genu *PDGFRA* [24]. p.D842V jest najczęściej występującą mutacją genu *PDGFRA* u pacjentów z GIST. W rzadkich przypadkach pojawienie się tej mutacji może odpowiadać za zjawisko oporności wtórnej [VII].

Wyniki uprzednio opublikowanych badań wykazały aktywność inhibitorów II generacji nilotynibu i dazatynibu na PDGFRA typu dzikiego [15, 79, 92, 127]. Ze względu na brak dostępnych modeli *in vivo*, w przedstawionej pracy przeprowadzono badania *in vitro* przy użyciu transdukowanych mysich komórek Ba/F3 oraz komórek pierwotnych GIST. Celem niniejszej pracy było między innymi określenie poziomu aktywności nilotynibu, sorafenibu oraz dazatynibu na komórki wykazujące ekspresję receptora PDGFRA-D842V lub PDGFRA-DIM842-844del.

Wyniki badań z pracy III wykazały wrażliwość komórek PDGFRA-DIM842-844del na działanie niskich stężeń wszystkich stosowanych inhibitorów kinaz tyrozynowych. W komór-

kach PDGFRA-D842V aktywność poszczególnych inhibitorów kinaz tyrozynowych była zróżnicowana. Nilotynib wykazywał najniższą aktywność, wartość IC50 wynosiła 1,31 $\mu\text{mol/L}$. Uzyskana wartość jest zbliżona do poprzednio opublikowanych wartości IC50 imatynibu i nilotynibu [126]. Mutacje zmiany sensu w eksonach genów *KIT* i *PDGFRA*, kodujących domenę o aktywności kinazy tyrozynowej receptorów, prowadzą do konstytutywnej aktywacji pętli wiązania ATP [41]. Imatynib wiąże się tylko do nieaktywnych receptorów *KIT* i *PDGFRA*. Dlatego komórki w których ekspresji ulegają receptory o aktywnej pętli wiązania ATP, są odporne na działanie imatynibu [106]. Co prawda, wyniki uprzednio opublikowanych badań wykazały 20-krotnie wyższe, w porównaniu do imatynibu, powinowactwo nilotynibu do różnych form receptora BCR-ABL [126]. Jednakże, nilotynib podobnie jak imatynib wiąże się tylko do nieaktywnych form receptorów BCR-ABL, *KIT* oraz *PDGFR*. Zatem analogiczny do imatynibu mechanizm działania nilotynibu odpowiedzialny jest za niską aktywność tego inhibitora względem komórek *PDGFRA-D842V*. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że nilotynib okazał się skuteczny zarówno w leczeniu samodzielnym jak i skojarzonym pacjentów z *GIST* opornych na imatynib [78, 92].

Dazatynib to inhibitor kinazy BCR-ABL oraz kinaz rodziny SRC o zdecydowanie wyższej aktywności w porównaniu do imatynibu [107]. Jest również inhibitorem *KIT* i *PDGFRA*. Wyniki badań innych autorów wykazały aktywność dazatynibu w guzach *GIST* [31]. Ponadto, stwierdzono znaczący wpływ dazatynibu na komórki wykazujące ekspresję receptora *KIT-D816V* warunkującego oporność na imatynib [106]. Mutacja p.D842V genu *PDGFRA* odpowiada mutacji p.D816V genu *KIT*. Dlatego do badań przedstawionych w pracy III postanowiono wykorzystać dazatynib. Przeprowadzone doświadczenia wykazały zdolność dazatynibu do zahamowania proliferacji oraz inicjacji apoptozy w komórkach wykazujących ekspresję *PDGFRA-D842V*. Aczkolwiek stężenie dazatynibu niezbędne do zahamowania aktywności tej formy receptora było wyższe w porównaniu do stężenia potrzebnego do inaktywacji receptora typu dzikiego [17]. Wykorzystując komórki guzów pierwotnych *GIST* wykazano, że dazatynib prawie całkowicie hamuje fosforylację receptora *PDGFRA-D842V* przy stężeniu 0,5 $\mu\text{mol/L}$. Podobne stężenie dazatynibu było niezbędne do zahamowania fosforylacji receptora *KIT-D816V* w modelu doświadczalnym mastocytozy układowej [106]. Również przy tym stężeniu dazatynibu komórki Ba/F3 ulegały apoptozie. Indukcja apoptozy przez dazatynib została potwierdzona w eksperymentach *ex vivo*. 72-godzinna inkubacja z dazatynibem o stężeniu 1 $\mu\text{mol/L}$ prowadziła do apoptozy 70% pierwotnych komórek *GIST* oraz znacząco hamowała ich proliferację. Badania farmakokinetyczne przeprowadzone podczas prób klinicznych I fazy wykazały, że pacjentom można bezpiecznie podawać wysokie stężenia dazatynibu [106]. Biorąc to pod uwagę oraz wyniki badań własnych wydaje się, że zastosowanie tego inhibitora kinazy tyrozynowej może stanowić alternatywę w leczeniu pacjentów z *GIST*, w których guzach stwierdzono obecność mutacji p.D842V genu *PDGFRA*.

Sorafenib to kolejny inhibitor, który wykazuje szerokie spektrum działania - hamuje wzrost komórek nowotworowych oraz angiogenezę głównie poprzez oddziaływanie na kinazy należące do rodziny RAF, a także receptory VEGFR-2 (KDR) oraz VEGFR-3 (FLT-4). Ponadto, wykazano że sorafenib wiąże się do receptorów *PDGFRB*, *KIT*, *FLT-3* oraz *RET* [14, 128]. Sorafenib jest stosowany w leczeniu pacjentów z gruczolakorakiem nerki oraz z rakiem wątrobowokomórkowym [78]. W badaniach przedstawionych w pracy III sorafenib wykazywał tylko nieznacznie mniejszą aktywność niż dazatynib względem komórek *PDGFRA-DIM842-844del*. Natomiast aktywność sorafenibu względem komórek *PDGFRA-D842V* była prawie 10-krotnie mniejsza od aktywności dazatynibu. Zatrzymanie proliferacji komórek obserwowano dopiero przy stężeniu 425 nmol/L , natomiast niepełne zahamowanie fosforylacji receptora *PDGFRA* dopiero przy 1 $\mu\text{mol/L}$ stężeniu sorafenibu.

Badania przeprowadzone przez inne zespoły badawcze wykazały podobną niską aktywność sorafenibu względem analogicznych mutacji genu *PDGFRB* (p.D850V) oraz *KIT*

(p.D816V) [49, 75]. Niska aktywność sorafenibu może być spowodowana tym, że inhibitor ten prawdopodobnie preferencyjnie wiąże się do nieaktywnej formy receptorów PDGFR. Wyższe powinowactwo sorafenibu do nieaktywnej formy białek wykazano w badaniach określających aktywność sorafenibu względem kinaz RAF [122].

Druga część przeprowadzonych badań miała na celu określenie aktywności inhibitora IPI-504 na komórki wykazujące ekspresję form receptora PDGFRA. Białka HSP90 stanowią cel nowych terapii ukierunkowanych w leczeniu nowotworów. HSP90 jest białkiem opiekuńczym, które stabilizuje strukturę i aktywność wielu białek istotnych w sygnalizacji komórkowej. 17-allylamino-18-demethoxy-geldanamycyna (17-AAG), pochodna geldanamycyny wiąże się do silnie konserwatywnej domeny na N-końcu co prowadzi do inaktywacji białka HSP90 [91]. Wykazano, że 17-AAG powoduje szybką degradację receptora KIT-D816V opornego na działanie imatynibu [42]. Ponadto, wyniki uprzednio opublikowanych badań wykazały, że 17-AAG może przyspieszać degradację PDGFRA-WT [85].

IPI-504 jest łatwo rozpuszczalnym homologiem 17-AAG o wyższej aktywności i preferencyjnie akumuluje się w komórkach nowotworowych [112]. Był testowany na modelach doświadczalnych CML i wkrótce może zostać wykorzystany w leczeniu pacjentów, u których stwierdzono mutacje wtórne receptora BCR-ABL powodujące oporność na leczenie imatynibem [97]. W pracy III wykazano, że IPI-504 jest aktywny względem mysich komórek Ba/F3 i komórek pierwotnych GIST wykazujących ekspresję receptorów PDGFRA-D842V oraz -DIM842-844del. Związek ten hamował proliferację oraz indukował apoptozę komórek. Badania przy użyciu *immunoblottingu* wykazały, że IPI-504 powoduje zarówno inaktywację jak i degradację receptorów PDGFRA-D842V i -DIM842-844del. Biorąc pod uwagę szerokie spektrum mutacji wtórnych genu *KIT* i *PDGFRA* warunkujących oporność wtórną na imatynib, inhibitor HSP90 może okazać się bardziej efektywny w leczeniu pacjentów z GIST niż stosowane obecnie inhibitory kinaz tyrozynowych.

Podsumowanie: wyniki powyższych badań wykazały, że dazatynib – inhibitor kinazy tyrozynowej II generacji oraz IPI-504 – inhibitor HSP90 mogą zostać wykorzystane w leczeniu pacjentów z GIST, w których guzach stwierdzono obecność mutacji p.D842V genu *PDGFRA* powodującą pierwotną oporność na imatynib.

4.6. Określenie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za oporność wtórną u pacjentów z GIST

Praca VII

Oporność guzów na działanie inhibitorów kinaz tyrozynowych stanowi poważny problem terapeutyczny w leczeniu pacjentów z GIST. Do badań wykorzystano guzy ulegające progresji od 26 pacjentów, którzy nie odpowiadali na leczenie imatynibem. U 22 pacjentów guz pierwotny został usunięty podczas zabiegu chirurgicznego, u czterech pacjentów guz pierwotny był nieoperacyjny. U 13 osób leczenie przy użyciu imatynibu było poprzedzone chemio- i/lub radioterapią.

Oporność na działanie inhibitorów kinaz tyrozynowych może być uwarunkowana zarówno przez procesy zależne jak i niezależne od aktywności receptora KIT. W badanej grupie, wtórna aktywacja receptora KIT była najczęściej odpowiedzialna za obserwowaną oporność na działanie imatynibu. W 8/10 progresywnych guzów opornych na działanie imatynibu, stwierdzono fosforylację receptora KIT. W połowie przypadków, za ponowną aktywację receptora odpowiadały wtórne mutacje genu *KIT*. Nie można wykluczyć, że w pozostałych guzach istniały niezidentyfikowane mutacje genu *KIT*. Niestety zsekwencjonowanie całej sekwencji kodującej *KIT* nie było możliwe ze względu na ograniczenia związane z ilością badanego materiału. Inne mechanizmy potencjalnie prowadzące do zwiększenia stopnia aktywacji receptora KIT to między innymi utrudnione wnikanie leku do wnętrza komórki lub przyspieszone usuwanie cząsteczki z komórki. W niniejszej pracy nie było możliwości przeprowadzenia analizy mającej na celu identyfikację tego typu mechanizmów.

W badanej grupie w połowie przypadków stwierdzono obecność mutacji wtórnych. Wszystkie zidentyfikowane warianty genetyczne prowadziły do zamiany aminokwasów i współwystępowały z mutacjami aktywującymi obecnymi również w guzach pierwotnych. Mutacje p.V654A, p.T670I, p.D716N, p.D820E i p.D816G nie zostały dotychczas wykryte w guzach pierwotnych wrażliwych na imatynib. Powyższa obserwacja potwierdza istnienie związku pomiędzy pojawieniem się mutacji wtórnej genu *KIT* a zjawiskiem oporności na imatynib. Zidentyfikowano również mutacje p.D820Y oraz p.N822K, uprzednio wykryte w guzach pochodzących od pacjentów nieleczonych imatynibem [55, 58, 104]. Niniejsza praca potwierdza uprzednio opublikowane wyniki badań innych autorów, które wykazały że mutacje zlokalizowane w obrębie eksonów kodujących domenę o aktywności kinazy tyrozynowej są mutacjami aktywującymi i odpowiadają za istnienie oporności wtórnej [15, 54]. Również mutacja p.D816V genu *KIT* identyfikowana u pacjentów z mastocytozą oraz w grupie pacjentów z nasieniakami indukuje oporność na działanie imatynibu [61, 82].

W jednym przypadku stwierdzono współwystępowanie mutacji p.G565R genu *KIT* oraz mutacji p.D842V genu *PDGFRA*. Mutacja p.D842V to najczęściej identyfikowana pierwotna mutacja genu *PDGFRA* warunkująca oporność GIST na imatynib [54]. Powyższy guz to pierwszy opisany przypadek GIST, w którym mutację pierwotną stwierdzono w genie *KIT* natomiast mutację wtórną, warunkującą oporność na działanie inhibitora, w genie *PDGFRA*. Przypadek ten wskazuje, że w guzach których wzrost jest uzależniony od aktywności kinazy tyrozynowej wrażliwej na dany inhibitor, może dochodzić do mutacji genów kodujących inną kinazę oporną na działanie określonego inhibitora.

W dwóch przypadkach guzów GIST opornych na imatynib stwierdzono amplifikację genu *KIT* lub genów *KIT* i *PDGFRA*. U pacjenta, u którego stwierdzono GIST z amplifikacją *KIT* i *PDGFRA*, zaobserwowano oporność pierwotną na imatynib i znaczącą progresję. Pacjent zmarł w przeciągu pięciu tygodni od rozpoczęcia terapii przy użyciu inhibitora kinazy tyrozynowej. Jednakże przed włączeniem imatynibu przez rok był leczony za pomocą chemioterapii jak i radioterapii. Prawdopodobnie komórki, w których stwierdzono amplifikację genu *KIT* i *PDGFRA*, były obecne w tkance nowotworowej przed podaniem imatynibu i uległy tylko dalszej selekcji w trakcie leczenia z zastosowaniem inhibitora kinazy tyrozynowej. Na podstawie powyższych danych można przypuszczać, że amplifikacja genu *KIT* może być przyczyną oporności pierwotnej.

W dwóch guzach ulegających progresji nie stwierdzono ekspresji genu *KIT*, co potwierdza istnienie niezależnych od aktywności receptora KIT mechanizmów prowadzących do oporności guzów na działanie inhibitorów kinazy tyrozynowej. W jednym przypadku, analiza cytogenetyczna przy użyciu interfazowego FISH wykazała utratę obu genów *KIT* i *PDGFRA* w komórkach nowotworowych. Hemizygotyczność tych genów stwierdzono w dwóch guzach opornych na imatynib, w których wykryto również mutacje wtórne. Dlatego nie można jednoznacznie stwierdzić, że czy hemi- lub homozygotyczność wpływa na oporność komórek nowotworowych na imatynib.

Podsumowanie: wyniki badań potwierdzają istnienie zależnych jak i niezależnych od aktywności receptora KIT mechanizmów warunkujących oporność guzów GIST na imatynib. Wykazano, że obecność mutacji genu *PDGFRA* może być przyczyną oporności wtórnej w guzach wykazujących ekspresję genu *KIT*. Natomiast amplifikacja genu *KIT* może powodować zarówno oporność pierwotną jak i wtórną na leczenie imatynibem.

5. WNIOSKI

1. Modyfikacja techniki PCR oraz zastosowanie allelospecyficznego *semi-nested* PCR pozwala na wykrywanie z większą czułością odpowiednio duplikacji w eksonie 11 genu *KIT* w guzach GIST oraz mutacji p.D816V u pacjentów z mastocytozą.
2. Ryzyko progresji nowotworu jest wyższe u chorych z homozygotyczną mutacją w eksonie 11 genu *KIT* w guzach GIST w porównaniu do chorych z guzami, w których wykryto postać heterozygotyczną tej mutacji.
3. Częstość występowania mutacji p.D816V w grupie polskich pacjentów z mastocytozą jest porównywalna do częstości obserwowanych w innych populacjach.
4. Analiza *in vitro* genu *KIT* u pacjentów z piebaldyzmem wykazała, że mutacja p.T619A obniża poziom aktywacji receptora po związaniu liganda, podczas gdy p.T437dup prowadzi do konstytutywnej inaktywacji receptora.
5. Mutacja p.N822I genu *KIT* w rodzinnej mastocytozie ma charakter patogeny i prowadzi do konstytutywnej aktywacji receptora. Mutacja ta warunkuje oporność transdukowanych komórek Ba/F3 na działanie imatynibu oraz ich wrażliwość na dazatynib.
6. Zastosowanie dazatynibu i/lub preparatu IPI-504 może stanowić alternatywę w leczeniu pacjentów z GIST, w których guzach stwierdzono obecność mutacji p.D842V genu *PDGFRA*.
7. U pacjentów z GIST, oporność guzów na imatynib warunkowana jest zarówno przez mechanizmy zależne jak i niezależne od aktywności receptora KIT. Przyczyną oporności może być obecność mutacji wtórnych lub amplifikacja genów *KIT* i *PDGFRA*.
8. Obecność i rodzaj mutacji genów *KIT* i *PDGFRA* w GIST stanowi niezależny czynnik prognostyczny oraz decyduje o odpowiedzi pacjentów na leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych. Dlatego też istotne jest stosowanie czułych i wiarygodnych metod diagnostycznych pozwalających na identyfikację mutacji w tych genach.

6. PIŚMIENICTWO

1. (MetaGIST) GSTM-AG. Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis of 1,640 patients. *J Clin Oncol.* 2010;28:1247-1253.
2. Akin C, Brockow K, D'Ambrosio C, Kirshenbaum AS, Ma Y, Longley BJ, Metcalfe DD. Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit. *Exp Hematol.* 2003;31:686-692.
3. Andersson J, Bümbling P, Meis-Kindblom JM, Sihto H, Nupponen N, Joensuu H, Odén A, Gustavsson B, Kindblom LG, Nilsson B. Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 11 deletions are associated with poor prognosis. *Gastroenterology.* 2006;130:1573-1581.
4. Antonescu CR, Besmer P, Guo T, Arkun K, Hom G, Koryotowski B, Leversha MA, Jeffrey PD, Desantis D, Singer S, Brennan MF, Maki RG, DeMatteo RP. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res.* 2005;11:4182-4190.
5. Antonescu CR, Sommer G, Sarran L, Tschernyavsky SJ, Riedel E, Woodruff JM, Robson M, Maki R, Brennan MF, Ladanyi M, DeMatteo RP, Besmer P. Association of KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res.* 2003;9:3329-3337.
6. Baxter EJ, Hochhaus A, Bolufer P, Reiter A, Fernandez JM, Senent L, Cervera J, Moscardo F, Sanz MA, Cross NC. The t(4;22)(q12;q11) in atypical chronic myeloid leukaemia fuses BCR to PDGFRA. *Hum Mol Genet.* 2002;11:1391-1397.
7. Beghini A, Bellini M, Magnani I, Colapietro P, Cairoli R, Morra E, Larizza L. STI 571 inhibition effect on KITAsn822Lys-mediated signal transduction cascade. *Exp Hematol.* 2005;33:682-688.
8. Beghini A, Tibiletti MG, Roversi G, Chiaravalli AM, Serio G, Capella C, Larizza L. Germline mutation in the juxtamembrane domain of the kit gene in a family with gastrointestinal stromal tumors and urticaria pigmentosa. *Cancer.* 2001;92:657-662.
9. Bertucci F, Goncalves A, Monges G, Madroszyk A, Guiramand J, Moutardier V, Noguchi T, Dubreuil P, Sobol H. Acquired resistance to imatinib and secondary KIT exon 13 mutation in gastrointestinal stromal tumour. *Oncol Rep.* 2006;16:97-101.
10. Blume-Jensen P, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Zsebo KM, Westermarck B, Heldin CH. Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *EMBO J.* 1991;10:4121-4128.
11. Bodemer C, Hermine O, Palmérini F, Yang Y, Grandpeix-Guyodo C, Leventhal PS, Hady-Rabia S, Nasca L, Georgin-Lavialle S, Cohen-Akenine A, Launay JM, Barete S, Feger F, Arock M, Catteau B, Sans B, Stalder JF, Skowron F, Thomas L, Lorette G, Plantin P, Bordigoni P, Lortholary O, de Prost Y, Moussy A, Sobol H, Dubreuil P. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations. *J Invest Dermatol.* 2010;130:804-815.
12. Boissy RE, Nordlund JJ. Molecular basis of congenital hypopigmentary disorders in humans: a review. *Pigment Cell Res.* 1997;10:12-24.
13. Carballo M, Roig I, Aguilar F, Pol MA, Gamundi MJ, Hernan I, Martinez-Gimeno M. Novel c-KIT germline mutation in a family with gastrointestinal stromal tumors and cutaneous hyperpigmentation. *Am J Med Genet A.* 2005;132:361-364.

14. Carlomagno F, Anaganti S, Guida T, Salvatore G, Troncione G, Wilhelm SM, Santoro M. BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98:326-334.
15. Chen H, Isozaki K, Kinoshita K, Ohashi A, Shinomura Y, Matsuzawa Y, Kitamura Y, Hirota S. Imatinib inhibits various types of activating mutant kit found in gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer.* 2003;105:130-135.
16. Chen LL, Trent JC, Wu EF, Fuller GN, Ramdas L, Zhang W, Raymond AK, Prieto VG, Oyedeji CO, Hunt KK, Pollock RE, Feig BW, Hayes KJ, Choi H, Macapinlac HA, Hittelman W, Velasco MA, Patel S, Burgess MA, Benjamin RS, Frazier ML. A missense mutation in KIT kinase domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 2004;64:5913-5919.
17. Chen Z, Lee FY, Bhalla KN, Wu J. Potent inhibition of platelet-derived growth factor-induced responses in vascular smooth muscle cells by BMS-354825 (dasatinib). *Mol Pharmacol.* 2006;69:1527-1533.
18. Cho S, Kitadai Y, Yoshida S, Tanaka S, Yoshihara M, Yoshida K, Chayama K. Deletion of the KIT gene is associated with liver metastasis and poor prognosis in patients with gastrointestinal stromal tumor in the stomach. *Int J Oncol.* 2006;28:1361-1367.
19. Chompret A, Kannengiesser C, Barrois M, Terrier P, Dahan P, Tursz T, Lenoir GM, Bressac-De Paillerets B. PDGFRA germline mutation in a family with multiple cases of gastrointestinal stromal tumor. *Gastroenterology.* 2004;126:318-321.
20. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J, Kutok J, Clark J, Galinsky I, Griffin JD, Cross NC, Tefferi A, Malone J, Alam R, Schrier SL, Schmid J, Rose M, Vandenberghe P, Verhoef G, Boogaerts M, Wlodarska I, Kantarjian H, Marynen P, Coutre SE, Stone R, Gilliland DG. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348:1201-1214.
21. Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol.* 2004;22:3813-3825.
22. Corless CL, Harrell P, Lacouture M, Bainbridge T, Le C, Gatter K, White C, Granter S, Heinrich MC. Allele-specific polymerase chain reaction for the imatinib-resistant KIT D816V and D816F mutations in mastocytosis and acute myelogenous leukemia. *J Mol Diagn.* 2006;8:604-612.
23. Corless CL, McGreevey L, Haley A, Town A, Heinrich MC. KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *Am J Pathol.* 2002;160:1567-1572.
24. Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A, McGreevey L, Harrell P, Shiraga S, Bainbridge T, Morich J, Heinrich MC. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol.* 2005;23:5357-5364.
25. de Raedt T, Cools J, Debiec-Rychter M, Brems H, Mentens N, Sciot R, Himpens J, de Wever I, Schöffski P, Marynen P, Legius E. Intestinal neurofibromatosis is a subtype of familial GIST and results from a dominant activating mutation in PDGFRA. *Gastroenterology.* 2006;131:1907-1912.
26. Debiec-Rychter M, Dumez H, Judson I, Wasag B, Verweij J, Brown M, Dimitrijevic S, Sciot R, Stul M, Vranck H, Scurr M, Hagemeyer A, van Glabbeke M, van Oosterom AT, Group ESTaBS. 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.* 2004;40:689-695.

27. Debiec-Rychter M, Lasota J, Sarlomo-Rikala M, Kordek R, Miettinen M. Chromosomal aberrations in malignant gastrointestinal stromal tumors: correlation with c-KIT gene mutation. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001;128:24-30.
28. Debiec-Rychter M, Sciot R, Le Cesne A, Schlemmer M, Hohenberger P, van Oosterom AT, Blay JY, Leyvraz S, Stul M, Casali PG, Zalcberg J, Verweij J, Van Glabbeke M, Hagemeyer A, Judson I, Group ESTaBS, Group IS, Group AGT. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Cancer.* 2006;42:1093-1103.
29. Dematteo RP, Gold JS, Saran L, Gönen M, Liao KH, Maki RG, Singer S, Besmer P, Brennan MF, Antonescu CR. Tumor mitotic rate, size, and location independently predict recurrence after resection of primary gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Cancer.* 2008;112:608-615.
30. DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg.* 2000;231:51-58.
31. Demetri GD, Lo Russo P, MacPherson IR, Wang D, Morgan JA, Brunton VG, Paliwal P, Agrawal S, Voi M, Evans TR. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of dasatinib in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2009;15:6232-6240.
32. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med.* 2002;347:472-480.
33. Dessinioti C, Stratigos AJ, Rigopoulos D, Katsambas AD. A review of genetic disorders of hypopigmentation: lessons learned from the biology of melanocytes. *Exp Dermatol.* 2009;18:741-749.
34. Duensing A, Medeiros F, McConarty B, Joseph NE, Panigrahy D, Singer S, Fletcher CD, Demetri GD, Fletcher JA. Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene.* 2004;23:3999-4006.
35. El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Knuutila S, Miettinen M. DNA sequence copy number changes in gastrointestinal stromal tumors: tumor progression and prognostic significance. *Cancer Res.* 2000;60:3899-3903.
36. Emmerson P, Maynard J, Jones S, Butler R, Sampson JR, Cheadle JP. Characterizing mutations in samples with low-level mosaicism by collection and analysis of DHPLC fractionated heteroduplexes. *Hum Mutat.* 2003;21:112-115.
37. Escribano L, Alvarez-Twose I, Sánchez-Muñoz L, Garcia-Montero A, Núñez R, Almeida J, Jara-Acevedo M, Teodósio C, García-Cosío M, Bellas C, Orfao A. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124:514-521.
38. Ezoe K, Holmes SA, Ho L, Bennett CP, Bolognia JL, Brueton L, Burn J, Falabella R, Gatto EM, Ishii N. Novel mutations and deletions of the KIT (steel factor receptor) gene in human piebaldism. *Am J Hum Genet.* 1995;56:58-66.
39. Fleming TP, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Oldfield EH, Aaronson SA, Ali IU. Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res.* 1992;52:4550-4553.
40. Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. Diagnosis of

- gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol.* 2002;33:459-465.
41. Foster R, Griffith R, Ferrao P, Ashman L. Molecular basis of the constitutive activity and STI571 resistance of Asp816Val mutant KIT receptor tyrosine kinase. *J Mol Graph Model.* 2004;23:139-152.
 42. Fumo G, Akin C, Metcalfe DD, Neckers L. 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) is effective in down-regulating mutated, constitutively activated KIT protein in human mast cells. *Blood.* 2004;103:1078-1084.
 43. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, Aldanondo I, Sanchez L, Dominguez M, Botana LM, Sanchez-Jimenez F, Sotlar K, Almeida J, Escribano L, Orfao A. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood.* 2006;108:2366-2372.
 44. Gari M, Goodeve A, Wilson G, Winship P, Langabeer S, Linch D, Vandenberghe E, Peake I, Reilly J. c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 1999;105:894-900.
 45. Giebel LB, Spritz RA. Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:8696-8699.
 46. Gold JS, Gönen M, Gutiérrez A, Broto JM, García-del-Muro X, Smyrk TC, Maki RG, Singer S, Brennan MF, Antonescu CR, Donohue JH, DeMatteo RP. Development and validation of a prognostic nomogram for recurrence-free survival after complete surgical resection of localised primary gastrointestinal stromal tumour: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2009;10:1045-1052.
 47. Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell.* 1994;77:307-316.
 48. Gotlib J, Berubé C, Growney JD, Chen CC, George TI, Williams C, Kajiguchi T, Ruan J, Lilleberg SL, Durocher JA, Lichy JH, Wang Y, Cohen PS, Arber DA, Heinrich MC, Neckers L, Galli SJ, Gilliland DG, Coutré SE. Activity of the tyrosine kinase inhibitor PKC412 in a patient with mast cell leukemia with the D816V KIT mutation. *Blood.* 2005;106:2865-2870.
 49. Guida T, Anaganti S, Provitera L, Gedrich R, Sullivan E, Wilhelm SM, Santoro M, Carlomagno F. Sorafenib inhibits imatinib-resistant KIT and platelet-derived growth factor receptor beta gatekeeper mutants. *Clin Cancer Res.* 2007;13:3363-3369.
 50. Gunawan B, Bergmann F, Höer J, Langer C, Schumpelick V, Becker H, Füzesi L. Biological and clinical significance of cytogenetic abnormalities in low-risk and high-risk gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol.* 2002;33:316-321.
 51. Guo T, Agaram NP, Wong GC, Hom G, D'Adamo D, Maki RG, Schwartz GK, Veach D, Clarkson BD, Singer S, DeMatteo RP, Besmer P, Antonescu CR. Sorafenib inhibits the imatinib-resistant KITT670I gatekeeper mutation in gastrointestinal stromal tumor. *Clin Cancer Res.* 2007;13:4874-4881.
 52. Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, Merkelbach-Bruse S, Preussner LM, Woolery C, Baldus SE, Heinicke T, Thiele J, Buettner R, Longley BJ. Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology.* 2005;129:1042-1046.
 53. Heinrich MC, Corless CL, Blanke CD, Demetri GD, Joensuu H, Roberts PJ, Eisenberg BL, von Mehren M, Fletcher CD, Sandau K, McDougall K, Ou WB, Chen CJ, Fletcher JA. Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol.* 2006;24:4764-4774.

54. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, Kiese B, Eisenberg B, Roberts PJ, Singer S, Fletcher CD, Silberman S, Dimitrijevic S, Fletcher JA. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol*. 2003;21:4342-4349.
55. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 2003;299:708-710.
56. Heldin CH, Westermark B. Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul*. 1990;1:555-566.
57. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 1998;279:577-580.
58. Hirota S, Nishida T, Isozaki K, Taniguchi M, Nishikawa K, Ohashi A, Takabayashi A, Obayashi T, Okuno T, Kinoshita K, Chen H, Shinomura Y, Kitamura Y. Familial gastrointestinal stromal tumors associated with dysphagia and novel type germline mutation of KIT gene. *Gastroenterology*. 2002;122:1493-1499.
59. Kang HJ, Nam SW, Kim H, Rhee H, Kim NG, Hyung WJ, Noh SH, Kim JH, Yun CO, Liu ET. Correlation of KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gene activation and expression profiles in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*. 2005;24:1066-1074.
60. Kawagishi J, Kumabe T, Yoshimoto T, Yamamoto T. Structure, organization, and transcription units of the human alpha-platelet-derived growth factor receptor gene, PDGFRA. *Genomics*. 1995;30:224-232.
61. Kemmer K, Corless CL, Fletcher JA, McGreevey L, Haley A, Griffith D, Cummings OW, Wait C, Town A, Heinrich MC. KIT mutations are common in testicular seminomas. *Am J Pathol*. 2004;164:305-313.
62. Kikuchi H, Yamashita K, Kawabata T, Yamamoto M, Hiramatsu Y, Kondo K, Baba M, Ohta M, Kamiya K, Tanaka T, Suzuki S, Kitagawa K, Kitagawa M, Sugimura H, Konno H. Immunohistochemical and genetic features of gastric and metastatic liver gastrointestinal stromal tumors: sequential analyses. *Cancer Sci*. 2006;97:127-132.
63. Kim TW, Lee H, Kang YK, Choe MS, Ryu MH, Chang HM, Kim JS, Yook JH, Kim BS, Lee JS. Prognostic significance of c-kit mutation in localized gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res*. 2004;10:3076-3081.
64. Kinoshita K, Isozaki K, Hirota S, Nishida T, Chen H, Nakahara M, Nagasawa Y, Ohashi A, Shinomura Y, Kitamura Y, Matsuzawa Y. c-kit gene mutation at exon 17 or 13 is very rare in sporadic gastrointestinal stromal tumors. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003;18:147-151.
65. Kristensen T, Vestergaard H, Møller MB. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn*. 2011;13:180-188.
66. Kumabe T, Sohma Y, Kayama T, Yoshimoto T, Yamamoto T. Amplification of alpha-platelet-derived growth factor receptor gene lacking an exon coding for a portion of the extracellular region in a primary brain tumor of glial origin. *Oncogene*. 1992;7:627-633.
67. Kuroda N, Tanida N, Hirota S, Daum O, Hes O, Michal M, Lee GH. Familial gastrointestinal stromal tumor with germ line mutation of the juxtamembrane domain of the KIT gene observed in relatively young women. *Ann Diagn Pathol*. 2011;15:358-361.

68. Lanternier F, Cohen-Akenine A, Palmerini F, Feger F, Yang Y, Zermati Y, Barète S, Sans B, Baude C, Ghez D, Suarez F, Delarue R, Casassus P, Bodemer C, Catteau A, Soppelsa F, Hanssens K, Arock M, Sobol H, Fraitag S, Canioni D, Moussy A, Launay JM, Dubreuil P, Hermine O, Lortholary O, network A. Phenotypic and genotypic characteristics of mastocytosis according to the age of onset. *PLoS One*. 2008;3:e1906.
69. Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, Miettinen M. A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab Invest*. 2004;84:874-883.
70. Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Stachura T, Schneider-Stock R, Kallajoki M, Steigen SE, Sarlomo-Rikala M, Boltze C, Kordek R, Roessner A, Stachura J, Miettinen M. Gastrointestinal stromal tumors with internal tandem duplications in 3' end of KIT juxtamembrane domain occur predominantly in stomach and generally seem to have a favorable course. *Mod Pathol*. 2003;16:1257-1264.
71. Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M. 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*. 1999;154:53-60.
72. Lasota J, Stachura J, Miettinen M. GISTs with PDGFRA exon 14 mutations represent subset of clinically favorable gastric tumors with epithelioid morphology. *Lab Invest*. 2006;86:94-100.
73. Lasota J, Wozniak A, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Kordek R, Nassar A, Sobin LH, Miettinen M. Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases. *Am J Pathol*. 2000;157:1091-1095.
74. Lev S, Blechman J, Nishikawa S, Givol D, Yarden Y. Interspecies molecular chimeras of kit help define the binding site of the stem cell factor. *Mol Cell Biol*. 1993;13:2224-2234.
75. Lierman E, Lahortiga I, Van Miegroet H, Mentens N, Marynen P, Cools J. The ability of sorafenib to inhibit oncogenic PDGFRbeta and FLT3 mutants and overcome resistance to other small molecule inhibitors. *Haematologica*. 2007;92:27-34.
76. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Patnaik M, Butterfield JH, McClure RF, Li CY, Pardanani A. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*. 2009;113:5727-5736.
77. Lin ZM, Xu Z, Bu DF, Yang Y. New mutations of KIT gene in two Chinese patients with piebaldism. *Br J Dermatol*. 2006;155:1303-1304.
78. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J, Group SIS. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359:378-390.
79. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, Castaneda S, Cornelius LA, Das J, Doweiko AM, Fairchild C, Hunt JT, Inigo I, Johnston K, Kamath A, Kan D, Klei H, Marathe P, Pang S, Peterson R, Pitt S, Schieven GL, Schmidt RJ, Tokarski J, Wen ML, Wityak J, Borzilleri RM. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem*. 2004;47:6658-6661.
80. Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, Ma YS, Langley K, Ding TG, Duffy T, Jacobs P, Tang LH, Modlin I. Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and

- aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet.* 1996;12:312-314.
81. Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G, Xiao S, Singer S, Fletcher CD, Fletcher JA. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol.* 2000;156:791-795.
 82. Ma Y, Zeng S, Metcalfe DD, Akin C, Dimitrijevic S, Butterfield JH, McMahon G, Longley BJ. The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. *Blood.* 2002;99:1741-1744.
 83. Martin-Broto J, Gutierrez A, Garcia-del-Muro X, Lopez-Guerrero JA, Martinez-Trufero J, de Sande LM, Lainez N, Maurel J, De Juan A, Losa F, Andres R, Casado A, Tejido PG, Blanco R, Carles J, Bellmunt J, Gomez-España A, Ramos R, Martinez-Serra J, Llombart-Bosch A, Poveda A. Prognostic time dependence of deletions affecting codons 557 and/or 558 of KIT gene for relapse-free survival (RFS) in localized GIST: a Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS) Study. *Ann Oncol.* 2010;21:1552-1557.
 84. Martín J, Poveda A, Llombart-Bosch A, Ramos R, López-Guerrero JA, García del Muro J, Maurel J, Calabuig S, Gutierrez A, González de Sande JL, Martínez J, De Juan A, Láinez N, Losa F, Alija V, Escudero P, Casado A, García P, Blanco R, Buesa JM, Research SGfS. Deletions affecting codons 557-558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J Clin Oncol.* 2005;23:6190-6198.
 85. Matei D, Satpathy M, Cao L, Lai YC, Nakshatri H, Donner DB. The platelet-derived growth factor receptor alpha is destabilized by geldanamycins in cancer cells. *J Biol Chem.* 2007;282:445-453.
 86. McDonnell K, Betz B, Fullen D, Lao CD. V559A and N822I double KIT mutant melanoma with predictable response to imatinib? *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010.
 87. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130:1466-1478.
 88. Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:52-68.
 89. Mital A, Piskorz A, Lewandowski K, Wasąg B, Limon J, Hellmann A. A case of mast cell leukaemia with exon 9 KIT mutation and good response to imatinib. *Eur J Haematol.* 2011;86:531-535.
 90. Nakata Y, Kimura A, Katoh O, Kawaishi K, Hyodo H, Abe K, Kuramoto A, Satow Y. c-kit point mutation of extracellular domain in patients with myeloproliferative disorders. *Br J Haematol.* 1995;91:661-663.
 91. Neckers L, Lee YS. Cancer: the rules of attraction. *Nature.* 2003;425:357-359.
 92. O'Hare T, Walters DK, Deininger MW, Druker BJ. AMN107: tightening the grip of imatinib. *Cancer Cell.* 2005;7:117-119.
 93. Orfao A, Garcia-Montero AC, Sanchez L, Escribano L, REMA. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol.* 2007;138:12-30.
 94. Pardanani A, Reeder TL, Kimlinger TK, Baek JY, Li CY, Butterfield JH, Tefferi A. Flt-3 and c-kit mutation studies in a spectrum of chronic myeloid disorders including systemic mast cell disease. *Leuk Res.* 2003;27:739-742.

95. Pasini B, Matyakhina L, Bei T, Muchow M, Boikos S, Ferrando B, Carney JA, Stratakis CA. Multiple gastrointestinal stromal and other tumors caused by platelet-derived growth factor receptor alpha gene mutations: a case associated with a germline V561D defect. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:3728-3732.
96. Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer.* 2002;38 Suppl 5:S3-10.
97. Peng C, Brain J, Hu Y, Goodrich A, Kong L, Grayzel D, Pak R, Read M, Li S. Inhibition of heat shock protein 90 prolongs survival of mice with BCR-ABL-T315I-induced leukemia and suppresses leukemic stem cells. *Blood.* 2007;110:678-685.
98. Penzel R, Aulmann S, Moock M, Schwarzbach M, Rieker RJ, Mechtersheimer G. The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. *J Clin Pathol.* 2005;58:634-639.
99. Propper DJ, McDonald AC, Man A, Thavasu P, Balkwill F, Braybrooke JP, Caponigro F, Graf P, Dutreix C, Blackie R, Kaye SB, Ganesan TS, Talbot DC, Harris AL, Twelves C. Phase I and pharmacokinetic study of PKC412, an inhibitor of protein kinase C. *J Clin Oncol.* 2001;19:1485-1492.
100. Przygodzki RM, Hubbs AE, Zhao FQ, O'Leary TJ. Primary mediastinal seminomas: evidence of single and multiple KIT mutations. *Lab Invest.* 2002;82:1369-1375.
101. Richards KA, Fukai K, Oiso N, Paller AS. A novel KIT mutation results in piebaldism with progressive depigmentation. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:288-292.
102. Robinson TL, Sircar K, Hewlett BR, Chorneyko K, Riddell RH, Huizinga JD. Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD34-positive interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol.* 2000;156:1157-1163.
103. Romagnoli S, Graziani D, Bramerio M, Gambacorta M, Colombo P, Roncalli M, Coggi G, Bosari S. Immunohistochemical profile and c-kit mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Res Pract.* 2005;201:71-81.
104. Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen CJ, Xiao S, Tuveson DA, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 2001;61:8118-8121.
105. Sakurai S, Oguni S, Hironaka M, Fukayama M, Morinaga S, Saito K. Mutations in c-kit gene exons 9 and 13 in gastrointestinal stromal tumors among Japanese. *Jpn J Cancer Res.* 2001;92:494-498.
106. Shah NP, Lee FY, Luo R, Jiang Y, Donker M, Akin C. Dasatinib (BMS-354825) inhibits KITD816V, an imatinib-resistant activating mutation that triggers neoplastic growth in most patients with systemic mastocytosis. *Blood.* 2006;108:286-291.
107. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science.* 2004;305:399-401.
108. Shimada A, Taki T, Kubota C, Itou T, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y, group JcAcs. N822 mutation of KIT gene was frequent in pediatric acute myeloid leukemia patients with t(8;21) in Japan: a study of the Japanese childhood AML cooperative study group. *Leukemia.* 2007;21:2218-2219.
109. Sotlar K, Escribano L, Landt O, Möhrle S, Herrero S, Torrelo A, Lass U, Horny HP, Bültmann B. One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *Am J Pathol.* 2003;162:737-746.
110. Spritz RA, Holmes SA, Ramesar R, Greenberg J, Curtis D, Beighton P. Mutations of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene account for a continuous range of phenotypes in human piebaldism. *Am J Hum Genet.* 1992;51:1058-1065.

111. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, Grandin W, Lebwohl D, Wang Y, Cohen P, Fox EA, Neuberg D, Clark J, Gilliland DG, Griffin JD. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*. 2005;105:54-60.
112. Sydor JR, Normant E, Pien CS, Porter JR, Ge J, Grenier L, Pak RH, Ali JA, Dembski MS, Hudak J, Patterson J, Penders C, Pink M, Read MA, Sang J, Woodward C, Zhang Y, Grayzel DS, Wright J, Barrett JA, Palombella VJ, Adams J, Tong JK. Development of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin hydroquinone hydrochloride (IPI-504), an anti-cancer agent directed against Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:17408-17413.
113. Sánchez-Martín M, Pérez-Losada J, Rodríguez-García A, González-Sánchez B, Korf BR, Kuster W, Moss C, Spritz RA, Sánchez-García I. Deletion of the SLUG (SNAI2) gene results in human piebaldism. *Am J Med Genet A*. 2003;122A:125-132.
114. Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, Isozaki K, Ito T, Nomura T, Matsuda H, Kitamura Y. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*. 1999;59:4297-4300.
115. Thalheimer A, Schlemmer M, Bueter M, Merkelbach-Bruse S, Schildhaus HU, Buettner R, Hartung E, Thiede A, Meyer D, Fein M, Maroske J, Wardelmann E. Familial gastrointestinal stromal tumors caused by the novel KIT exon 17 germline mutation N822Y. *Am J Surg Pathol*. 2008;32:1560-1565.
116. Tian Q, Frierson HF, Krystal GW, Moskaluk CA. Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. *Am J Pathol*. 1999;154:1643-1647.
117. Ustun C, Corless CL, Savage N, Fiskus W, Manaloor E, Heinrich MC, Lewis G, Ramalingam P, Kepten I, Jillella A, Bhalla K. Chemotherapy and dasatinib induce long-term hematologic and molecular remission in systemic mastocytosis with acute myeloid leukemia with KIT D816V. *Leuk Res*. 2009;33:735-741.
118. Valent P, Akin C, Escribano L, Födinger M, Hartmann K, Brockow K, Castells M, Sperr WR, Kluin-Nelemans HC, Hamdy NA, Lortholary O, Robyn J, van Doormaal J, Sotlar K, Hauswirth AW, Arock M, Hermine O, Hellmann A, Triggiani M, Niedoszytko M, Schwartz LB, Orfao A, Horny HP, Metcalfe DD. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest*. 2007;37:435-453.
119. Vega-Ruiz A, Cortes JE, Sever M, Manshouri T, Quintás-Cardama A, Luthra R, Kantarjian HM, Verstovsek S. Phase II study of imatinib mesylate as therapy for patients with systemic mastocytosis. *Leuk Res*. 2009;33:1481-1484.
120. Verstovsek S, Tefferi A, Cortes J, O'Brien S, Garcia-Manero G, Pardanani A, Akin C, Faderl S, Manshouri T, Thomas D, Kantarjian H. Phase II study of dasatinib in Philadelphia chromosome-negative acute and chronic myeloid diseases, including systemic mastocytosis. *Clin Cancer Res*. 2008;14:3906-3915.
121. Verweij J, van Oosterom A, Blay JY, Judson I, Rodenhuis S, van der Graaf W, Radford J, Le Cesne A, Hogendoorn PC, di Paola ED, Brown M, Nielsen OS. Imatinib mesylate (STI-571 Glivec, Gleevec) is an active agent for gastrointestinal stromal tumours, but does not yield responses in other soft-tissue sarcomas that are unselected for a molecular target. Results from an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group phase II study. *Eur J Cancer*. 2003;39:2006-2011.
122. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R, Project CG. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116:855-867.

123. Wardelmann E, Hrychuk A, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Goldstein J, Hohenberger P, Losen I, Manegold C, Büttner R, Pietsch T. Association of platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *J Mol Diagn.* 2004;6:197-204.
124. Wardelmann E, Losen I, Hans V, Neidt I, Speidel N, Bierhoff E, Heinicke T, Pietsch T, Büttner R, Merkelbach-Bruse S. Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer.* 2003;106:887-895.
125. Wasag B, Debiec-Rychter M, Pauwels P, Stul M, Vranckx H, Oosterom AV, Hagemeyer A, Sciot R. Differential expression of KIT/PDGFR α mutant isoforms in epithelioid and mixed variants of gastrointestinal stromal tumors depends predominantly on the tumor site. *Mod Pathol.* 2004;17:889-894.
126. Weisberg E, Manley P, Mestan J, Cowan-Jacob S, Ray A, Griffin JD. AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br J Cancer.* 2006;94:1765-1769.
127. Weisberg E, Wright RD, Jiang J, Ray A, Moreno D, Manley PW, Fabbro D, Hall-Meyers E, Catley L, Podar K, Kung AL, Griffin JD. Effects of PKC412, nilotinib, and imatinib against GIST-associated PDGFR α mutants with differential imatinib sensitivity. *Gastroenterology.* 2006;131:1734-1742.
128. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004;64:7099-7109.
129. Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfield LJ. Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol.* 2005;36:486-493.
130. Worobec AS, Semere T, Nagata H, Metcalfe DD. Clinical correlates of the presence of the Asp816Val c-kit mutation in the peripheral blood mononuclear cells of patients with mastocytosis. *Cancer.* 1998;83:2120-2129.
131. Yang Y, Létard S, Borge L, Chaix A, Hanssens K, Lopez S, Vita M, Finetti P, Birnbaum D, Bertucci F, Gomez S, de Sepulveda P, Dubreuil P. Pediatric mastocytosis-associated KIT extracellular domain mutations exhibit different functional and signaling properties compared with KIT-phosphotransferase domain mutations. *Blood.* 2010;116:1114-1123.
132. Yin XY, Ren YQ, Yang S, Xu SX, Zhou FS, Du WH, Lin D, Wang PG, Zhang SM, Zhang XJ. A novel KIT missense mutation in one Chinese family with piebaldism. *Arch Dermatol Res.* 2009;301:387-389.
133. Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, Fitzgibbon J, Lister TA, Melo JV, Cross NC, Cavenagh JD. A novel K509I mutation of KIT identified in familial mastocytosis-in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res.* 2006;30:373-378.

8. ZAŁĄCZNIK NR 1

Materiały i metody wykorzystane do przeprowadzenia dotychczas nieopublikowanych badań mających na celu porównanie czułości czterech metod molekularnych w identyfikacji mutacji p.D816V u pacjentów z mastocytozą.

MATERIAŁ

Do badań molekularnych wykorzystano próbki szpiku kostnego pochodzącego od 47 pacjentów z mastocytozą leczonych w Klinice Alergologii, Katedrze i Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii oraz Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Zgodnie z wytycznymi WHO u 26 pacjentów zdiagnozowano mastocytozę układową o powolnym przebiegu (ISM), u 20 mastocytozę skórną (CM) oraz u jednego pacjenta agresywną mastocytozę układową (ASM). Ponadto, do badań wykorzystano próbki krwi obwodowej pochodzącej od pacjentów, u których w szpiku kostnym stwierdzono obecność mutacji p.D816V.

METODY

Izolacja DNA oraz opracowanie kontroli pozytywnej i negatywnej

Genomowy DNA ze szpiku kostnego oraz z krwi obwodowej wyizolowano przy pomocy metody polegającej na lizie komórek, trawieniu proteinazą K, ekstrakcji fenol/chloroform i precypitacji.

W celu uzyskania niezbędnego do dalszych badań kontrolnego DNA, sekwencję eksonu 17 zawierającą mutację p.D816V oraz sekwencję KIT-WT zamplifikowano przy użyciu techniki PCR. Produkty reakcji PCR poddano ligacji z wektorem plazmidowym *pGEM-T Easy Vector* (Promega, www.promega.com) i wprowadzono do komórek kompetentnych. Po całonocnej inkubacji komórek bakteryjnych w temperaturze 37°C, przeprowadzono selekcję klonów stosując pożywkę agarową zawierającą ampicylinę, X-gal oraz IPTG. Do identyfikacji klonów zawierających sekwencję KIT-D816V oraz KIT-WT wykorzystano technikę PCR oraz sekwencjonowanie bezpośrednie. Wyizolowane plazmidowe DNA KIT-D816V wymieszano z KIT-WT w następujących proporcjach: 1:100, 3:100, 5:100, 8:100, 10:100, 20:100.

Reakcja PCR

Do reakcji PCR przeprowadzanej w objętości 25 µL wykorzystano 50 ng/µL genomowego lub plazmidowego DNA. Mieszanina reakcyjna zawierała 5 µL buforu 10×(NH₄)₂SO₄, 1,5 µmol/L MgCl₂, 200 nmol/L dNTPs, 100 nmol/L starterów *forward* i *reverse* oraz 0,15 jednostki polimerazy *Taq* (Fermentas, www.fermentas.com). Każdy cykl reakcji PCR składał się z denaturacji (94°C, 30 s), przyłączania starterów (50°C, 1 min) oraz wydłużania (72°C, 1 min). Oprócz 35 opisanych cykli, zastosowano denaturację wstępną (94°C, 5 min) i wydłużanie końcowe (72°C, 10 min). Do standardowej reakcji PCR zastosowano starter *forward* o sekwencji 5'-CTC TTT ACA AGT TAA AAT GAA-3' oraz starter *reverse* o sekwencji 5'-AAT CCT TTG CAG GAC TGT CA-3'. Produkty PCR o wielkości 217 bp identyfikowano na 2% żelu agarozowym w promieniowaniu UV.

Allelospecyficzny PCR

1 µL produktu standardowej reakcji PCR wykorzystano do przygotowania drugiej mieszaniny reakcyjnej. Do mieszaniny tej dodawano również starter *forward* używany podczas pierwszej reakcji PCR oraz starter *reverse* specyficzny do mutacji: 5'-GAA TCA TTC TTG

ATG A-3'. Ponadto, w skład mieszaniny wchodziło: 5 μ L buforu 10 \times (NH₄)₂SO₄, 2,5 μ mol/L MgCl₂, 200 nmol/L dNTPs, 400 nmol/L starterów *forward* i *reverse* oraz 0,15 jednostki polimerazy *Taq*. Amplifikację PCR prowadzono z zastosowaniem metody *touch-down* PCR, polegającej na obniżaniu temperatury przyłączania starterów w każdym z 10 pierwszych cykli o 1°C. 35 cykli charakteryzowało się następującym profilem termicznym: denaturacja (94°C, 30 s), przyłączanie starterów (65°C w pierwszym cyklu, 30 s), wydłużanie starterów (72°C, 30 s). Zastosowano również denaturację wstępną (94°C, 30 s) oraz wydłużanie końcowe (72°C, 7 min). Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR o wielkości przeprowadzono z wykorzystaniem 7% żelu poliakrylamidowego.

Reakcja SNaPshot

Oczyszczone produkty standardowej reakcji PCR użyto do przygotowania reakcji SNaPshot z wykorzystaniem zestawu SnaPshot Multiplex System zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta (Life Technologies, www.lifetechnologies.com). W reakcji SNaPshot wykorzystano następujące startery: 5'-TGT GAT TTT GGT CTA GCC AGA G-3' oraz 5'-GAT CGA TCG ATC GAT CAC CAC ATA ATT AGA ATC ATT CTT GAT G-3'. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono przy użyciu urządzenia 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies).

Analiza DHPLC

Oczyszczone produkty standardowej reakcji PCR wykorzystano do analizy heterodupleksów przy użyciu techniki DHPLC przeprowadzonej z wykorzystaniem urządzenia Wave System 3500 (Transgenomic, www.transgenomic.com). Rozdział chromatograficzny prowadzono w temperaturze 58°C. Uzyskane chromatografy analizowano przy użyciu oprogramowania Navigator Software (Transgenomic).

Sekwencjonowanie bezpośrednie

Do reakcji sekwencjonowania bezpośredniego wykorzystano oczyszczone produkty standardowej reakcji PCR oraz odczynnik *Big Dye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies, www.lifetechnologies.com). Produkty reakcji oczyszczano przy użyciu *Exterminator Kit* (A&A Biotechnology, www.aabiot.com). Rozdział elektroforetyczny reakcji sekwencjonowania przeprowadzono przy użyciu urządzenia 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies). Uzyskane sekwencje analizowano z zastosowaniem oprogramowania Sequencher Software (GeneCodes, www.genecodes.com).