

**UNIVERZITA KARLOVA**

**2. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**Komplexní molekulární diagnostika gastrointestinálních  
stromálních nádorů**

**Complex molecular diagnostics of gastrointestinal stromal tumors**

**Alena Kalfusová**

Praha, 2023



Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Biologie a patologie buňky na Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnici v Motole.

Školitel:                    prof. MUDr. Roman Kodet, CSc.  
                                  Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN v Motole

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Biologie a patologie buňky dne ..... v ..... od .....hod.

Předsedou komise pro  
obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:  
Doc. MUDr. Tomáš Kučera, Ph.D.

Děkan fakulty: prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

## ABSTRAKT

Většina gastrointestinálních stromálních nádorů (GIST) je charakterizována přítomností aktivačních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* (80 – 85 %). Ve skupině *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST (10 – 15 %) byly detekovány mutace v genech *BRAF*, *KRAS*, defekty v komplexu SDH, nebo fúze *FGFR1::TACCI*, *ETV6::NTRK3*. Cílená terapie Imatinib mesylátem (IM) znamenala významný průlom v terapii GIST. Výrazným problémem cílené terapie je vznik primární nebo sekundární rezistence. Biologické chování GIST je nepředvídatelné. Stanovení proliferační aktivity vybraných markerů proliferace a senescence umožní objektivizovat riziko agresivního chování nádoru. Cílem první části naší práce byla mutační analýza genů *KIT* a *PDGFRA* a detekce sekundárních mutací u pacientů s progresí onemocnění. V 83.5 % vzorků jsme detekovali primární mutace v genech *KIT* a *PDGFRA*. U 16 pacientů jsme prokázali přítomnost sekundárních mutací (v 29 progresivních ložiscích – 69 %). Potvrdili jsme výraznou intranádorovou a rovněž internádorovou heterogenitu sekundárních mutací. Cílem druhé části práce byla analýza alterací ve skupině *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST. V této skupině GIST jsme prokázali defekty v podjednotkách SDH komplexu, mutace v genech *BRAF* a *NF1* a alterace v genech *AKT1*, a *ATR*. Předmětem zbývajících částí práce bylo stanovení exprese mRNA hladin vybraných markerů proliferace a senescence. Zjistili jsme, že expresní hladiny vybraných markerů (Ki-67, TPX2, TOP2A a hTERT) jsou vhodnými markery pro stanovení proliferace nádoru a určení maligního potenciálu GIST. Navíc jsme zjistili korelaci mezi vyššími hladinami mRNA proliferačních markerů Ki-67, TPX2 a hTERT a kratším přežitím u pacientů s GIST (EFS a OS).

## KLÍČOVÁ SLOVA

GIST, mutace genů, rezistence k terapii, nádorová heterogenita, proliferační markery

## **ABSTRACT**

Most gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are characterized by activating mutations in the *KIT* and *PDGFRA* genes (80 – 85 %). Mutations in the *BRAF*, *KRAS*, defects in the SDH complex, or *FGFR1::TACC1*, *ETV6::NTRK3* fusions were detected in the group of *KIT/PDGFRA* non-mutated GISTs (10 – 15 %). Targeted therapy with Imatinib mesylate (IM) marked a significant breakthrough in treating GISTs. A substantial problem with targeted therapy is the emergence of primary or secondary resistance. The biological behavior of the GIST is unpredictable. Determining the activity of selected cell proliferation markers and senescence will enable the objectification risk of tumor behavior's aggressiveness. The aim of the first part of our work was the mutational analysis of the *KIT/PDGFRA* genes and the detection of secondary mutations in patients with disease progression. We detected primary mutations in *KIT/PDGFRA* genes in 83.5 % of samples. In addition, we demonstrated the presence of secondary mutations in 16 patients (in 29 progressive lesions – 69 %). We confirmed significant intra-tumor and also inter-tumor heterogeneity of secondary mutations. The aim of the second part of the thesis was the analysis of alterations in the *KIT/PDGFRA* non-mutated GISTs. In this group of GISTs, we demonstrated defects in the SDH complex subunits, mutations in the *BRAF* and *NF1* genes, and alterations in the *AKT1* and *ATR* genes. The subject of the remaining part of the work was the determination of mRNA expression levels of selected markers of proliferation and senescence. We found that expression levels of selected markers (Ki-67, TPX2, TOP2, and hTERT) are suitable markers for determining tumor proliferation and malignant potential of GIST. Moreover, we found a correlation between higher mRNA levels of proliferation markers Ki-67, TPX2 and hTERT and shorter survival in GIST patients (EFS and OS).

## **KEYWORDS**

GIST, genes mutations, therapy resistance, tumor heterogeneity, proliferation markers

## OBSAH

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY .....	7
1.1. Gastrointestinální stromální nádory (GIST) .....	7
1.2. <i>KIT/PDGFR</i> A mutované GIST .....	7
1.3. <i>KIT/PDGFR</i> A nemutované GIST .....	9
1.4. Význam markerů proliferace a senescence .....	10
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE .....	11
2.1. Primární a sekundární mutace v genech <i>KIT</i> a <i>PDGFR</i> A .....	11
2.2. Molekulární analýza <i>KIT/PDGFR</i> A nemutovaných GIST .....	11
2.3. Expresní analýza mRNA markerů proliferace a senescence .....	12
3. MATERIÁL A METODY .....	13
3.1. Materiál .....	13
3.2. Metody .....	13
4. VÝSLEDKY .....	15
4.1. Mutační analýza <i>KIT/PDGFR</i> A mutovaných GIST .....	15
4.2. Mutační analýza <i>KIT/PDGFR</i> A nemutovaných GIST .....	16
4.3. Analýza exprese markerů proliferace a senescence .....	17
5. DISKUZE .....	18
6. ZÁVĚR .....	29
7. SOUHRN .....	30
7. SUMMARY .....	31
8. PŘEHLED LITERATURY .....	32
9. PUBLIKAČNÍ ČINNOST .....	46

# 1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

## 1.1. Gastrointestinální stromální nádory (GIST)

Gastrointestinální stromální nádory (GIST) tvoří skupinu mezenchymálních nádorů vznikajících v gastrointestinálním traktu (GIT) (Miettinen et al., 1999). Po stránce exprese proteinů jsou GIST nejlépe charakterizované expresí transmembránového proteinu KIT (CD117) (Heinrich et al., 2003a), která je u nich detekována až v 95 % GIST (Miettinen, Lasota, 2006). Více než 80 % GIST je primárně lokalizovaných v GIT a vyskytují se v celém jeho rozsahu.

## 1.2. *KIT/PDGFR*A mutované GIST

Většina GIST vzniká na podkladě aktivačních mutací v genech *KIT* (80 – 85 %) nebo *PDGFR*A (10 – 15 %) (Hirota et al., 1998; Heinrich et al., 2003b). Typy mutací v genech *KIT* a *PDGFR*A jsou u GIST značně variabilní. Zahrnují delece, substituce, duplikace, inserce a složitější delece-inserce, duplikace-inserce a delece s insercí invertovaných komplementárních sekvencí, tzv. delece-inverze (Lasota, Miettinen, 2008). Mutace v genech *KIT* a *PDGFR*A můžeme rozdělit z několika hledisek. Podle lokalizace mutací v uvedených genech rozlišujeme mutace regulačních domén receptorů (extracelulární a juxtamembránová doména) a mutace enzymatických domén (TK1 a TK2) (Lasota, Miettinen, 2008). Z hlediska předpovědi chování se nádoru na cílenou terapii inhibitory TK, se nádory s mutacemi v regulačních doménách receptorů považují za senzitivní na terapii. Nádory s mutacemi v enzymatických doménách jsou méně citlivé, případně rezistentní. Podle času a způsobu vzniku dále rozdělujeme mutace v genech *KIT* a *PDGFR*A do dvou kategorií. Do první kategorie patří mutace diagnostikované u primárních nádorů před zahájením terapie Imatinib mesylátem (IM). Tyto mutace označujeme jako primární mutace, a souvisí s patogenezí vzniku a rozvoje GIST. Druhou kategorií tvoří mutace detekované v průběhu léčby pacienta s GIST a podílejí se na vzniku získané rezistence na terapii IM (sekundární *KIT* nebo *PDGFR*A mutace). IM je

selektivním inhibítorem tyrozin kináz ABL, BCR-ABL, KIT a PDGFR (Demetri et al., 2002). Na základě úspěšné klinické odpovědi se IM stal terapeutikem první volby u léčby neoperabilních, recidivujících a metastatických GIST (Blanke et al., 2001; Demetri et al., 2002; van Oosterom et al., 2001; Wang et al., 2009). Terapeutická odpověď pacientů na IM závisí na mutačním stavu genů *KIT* a *PDGFRA* (Antonescu et al., 2005; Debiec-Rychter et al., 2005; Saponara et al., 2015). Molekulární klasifikace GIST s ohledem na predikci terapeutické odpovědi IM je tedy nevyhnutná pro identifikaci pacientů, kteří mohou profitovat z cílené léčby (Saponara et al., 2015). Primární a sekundární rezistence na terapii IM se staly hlavním klinickým problémem v onkologické léčbě GIST (Gupta et al., 2008). Z hlediska klasifikace rezistence rozeznáváme dvě formy. Časnou rezistenci, nazývanou také primární, a pozdní, nebo-li, získanou (sekundární) rezistenci (Wang et al., 2009). Primární rezistence je definována jako progresí onemocnění v průběhu prvních 3 – 6 měsíců od začátku terapie IM. Vyskytuje se přibližně u 15 – 20 % pacientů (Heinrich et al., 2006). Hlavním důvodem vzniku této formy rezistence je mutační stav genů *KIT* nebo *PDGFRA* (typ mutace a/nebo lokalizace primární mutace) (Gounder, Maki, 2011). Sekundární rezistence vzniká v průběhu terapie u pacientů, kteří prvotně na terapii odpovídali. V průběhu několika měsíců na terapii u nich následně dochází ke vzniku rezistence a progresi onemocnění. Časové rozmezí vzniku sekundární rezistence se pohybuje v rozpětí 6 až 24 měsíců od začátku terapie IM. Hlavním mechanismem vzniku získané rezistence je přítomnost sekundárních mutací (Guo et al., 2009). Sekundární mutace se vyskytují u 50 – 70 % pacientů s progresí onemocnění (Antonescu et al., 2005; Liegl et al., 2008). SM vznikají v průběhu léčby pacienta s GIST a prezentují se ve formě jednoduchých substitucí. U jedné třetiny pacientů rezistentních na terapii se sekundární mutace neprokáží. Na mechanismu vzniku sekundární rezistence se tedy podílí i jiné molekulární principy (Antonescu, 2008; Antonescu, 2011; Bickenbach et al., 2007).



Nepříznivým znakem sekundární rezistence je také velká heterogenita sekundárních mutací. Sekundární mutace se mohou u jednoho pacienta lišit co do počtu, nebo typu jednak v rámci jednoho nádorového ložiska, či metastázy, ale mohou se lišit i mezi jednotlivými metastázami i ve stejném orgánu (Ordog et al., 2015). Rozdílné sekundární mutace v rozdílných metastázách u stejného pacienta poukazují na rozdílnou klonální evoluci sekundárních mutací (Wardelmann et al., 2005). Heterogenita rezistentních mutací nádorové populace v jedné jednotlivé metastáze a v rámci mnohočetných metastáz, tedy „mezi“ metastázami (tj. každá nádorová léze může podstoupit individuální klonální evoluci) může být u jednotlivých pacientů značná. Heterogenita může kolísat od dvou do pěti sekundárních mutací v rozdílných metastázách, nebo i vznikem dvou rozdílných mutací v jedné metastáze (Liegl et al., 2008; Wardelmann et al., 2006). Molekulárně-genetická analýza provedená z jednoho metastatického ložiska tak nemusí představovat skutečný mutační stav nádoru (Gramza et al., 2009).

### **1.3. *KIT/PDGFR*A nemutované GIST**

Z terapeuticko-indikačního hlediska byl donedávna nejvýznamnější a nejčastěji sledován mutační stav genů *KIT* a *PDGFR*A. V posledních letech se velice zajímavou a z terapeutického hlediska otevřenou kapitolou stávají GIST, u kterých nebyly zjištěny mutace v genech *KIT/PDGFR*A. GIST bez přítomnosti mutací v genech *KIT/PDGFR*A tvoří u dospělých přibližně 10 – 15 % případů (Antonescu, 2011; Astolfi et al., 2020; Nannini et al., 2014; Pitsava et al., 2021). U mnohem vzácnějších pediatrických GIST je převážná většina nádorů *KIT/PDGFR*A nemutovaných (85 %) (Boikos et al., 2016). 20 – 40 % pacientů s nemutovanými geny *KIT/PDGFR*A vykazuje ztrátu funkce některé z podjednotek SDH komplexu (Miettinen et al., 2011). Označované jsou následně jako GIST s defektem SDH komplexu (Astolfi et al., 2020). 15 % GIST ze skupiny *KIT/PDGFR*A nemutovaných vykazuje přítomnost mutací v genech *BRAF/RAS* nebo v genu *NF1* (Li, Raut, 2019). Přehled alterací ve skupině *KIT*, *PDGFR*A, *SDH*, *RAS*, *BRAF* a *NF1* nemutovaných GIST je značně rozsáhlý a zahrnuje mimo jiné geny *FGFR1*,

*ARID1A*, *ARID1B*, *SUFU*, *ATR*, *LTK*, *PARK2* a *ZNF217* (Boikos et al., 2016; Tang et al., 2016; Brčić et al., 2021). Celkově s fúzními transkripty *NTRK3::ETV6*, *FGFR1::HOOK3*, *FGFR1::TACCI* (Brenca et al., 2016), somatickými mutacemi v genech *TP53*, *CHD4*, *CTDNN2*, *CBL*, *BCOR*, *NTRK2*, *COL22A1*, *APC* (Pantaleo et al., 2017; Shi et al., 2016), eventuálně v genech *MEN1* a *MAX* (Pantaleo et al., 2017) můžeme definovat více než 20 molekulárně-genetických podtypů GIST (Mou et al., 2018).

#### **1.4. Význam markerů proliferace a senescence**

GIST vykazuje širokou škálu rozdílného biologického chování v rozsahu od benigního po maligní. Předpovědět maligní potenciál onemocnění pouze na základě klinického projevu nádoru a patologických nálezů kromě metastáz je obtížné. Mezi dva nejdůležitější prognostické faktory patří velikost nádoru a mikroskopickým vyšetřením stanovená mitotická aktivita (Miettinen, Lasota, 2001). V průběhu let byly několikrát navrženy a revidované kritéria pro kategorizaci a hodnocení biologického rizika GIST (Fletcher et al., 2002; Joensuu et al., 2015; Miettinen, Lasota, 2006; WHO klasifikace nádorů měkkých tkání a kostí, 5. vydání – WHO 2020). Navzdory propracovanému systému prediktivního hodnocení GIST se setkáváme s případy, které svým chováním neposkytují možnost predikce biologického chování. Nevyhnutnou se tedy stává cesta ke standardizaci jednotlivých faktorů proliferace nádoru, případně procesů maligní progresy. Jednou z cest je objektivizace biologického rizika GIST s využitím molekulárně-genetických metod. S ohledem na objektivní určení rizika agresivního chování se nádoru jsme zjišťovali mRNA expresní hladiny proliferčních markerů Ki-67, TPX2, TOP2A a telomerázové podjednotky hTERT ve skupině GIST v porovnání s onemocněními s předpokládanou nízkou, respektive vysokou proliferční aktivitou (leiomyosarkom vs. Burkittův lymfom) a ve skupinách benigních a maligních GIST. Rovněž jsme statisticky vyhodnocovali souvislost délky přežívání (EFS a OS) v souvislosti s hladinami exprese mRNA proliferčních markerů a hTERT u pacientů s GIST.

## 2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Naše práce chce primárně poukázat na důležitost molekulární analýzy mutačního stavu *KIT/PDGFR*A mutovaných a nemutovaných GIST pro predikci terapeutické odpovědi cílené léčby, pro prokázání sekundární rezistence a heterogenity sekundárních mutací a volbu vhodného TK inhibitoru v rámci precizní terapie. Navíc je naším cílem identifikace molekulárně neklasifikovaných podskupin GIST, návrh jejich cílené terapie, případně umožnění genetického poradenství. Druhou oblastí, kterou se naši práce zabývá, je molekulární zpřesnění prognózy onemocnění a predikce biologických vlastností GIST.

### 2.1. Primární a sekundární mutace v genech *KIT* a *PDGFRA*

- A) zavedení a optimalizování molekulárního vyšetření mutačního stavu genů *KIT* a *PDGFRA* u pacientů s GIST
- B) analyzování spektra a lokalizací primárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA*
- C) zavedení a optimalizace metody pro skrínig mutací – analýza křivek tání (HRM)
- D) potvrzení mechanismu získané rezistence a detekce sekundárních mutací
- E) ověření platnosti teorie o významné intranádorové a internádorové heterogenitě sekundárních mutací

### 2.2. Molekulární analýza *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST

- A) zavedení a optimalizace alelově specifické PCR (AS PCR) pro efektivní detekci mutace V600E v genu *BRAF*
- B) detekce mutací a defektů v genech *SDH* komplexu, popřípadě změn v genu *NF1*
- C) analýza mutací v genech ze skupiny *RAS* (*KRAS* a *NRAS*), v genech *AKT1*, *PIK3CA*, a *ATR*
- D) zavedení a optimalizace kvalitativní RT PCR pro detekci fúzních genů *ETV6::NTRK3* a *TACC1::FGFR1*

### **2.3. Expresní analýza mRNA markerů proliferace a senescence**

A) příprava plazmidů, ředění a definice standardní řady pro následní změřeni a sestrojení kalibračních křivek proliferačních markerů Ki-67, TPX2, TOP2A a telomerázové podjednotky hTERT

B) změřeni a sestrojení kalibrační křivky provozního (tzv. „housekeeping“) genu *ABL*

C) analýza expresních hladin vybraných proliferačních markerů a hTERT v skupině GIST, a ve skupinách nádorů s nízkou a vysokou proliferační aktivitou

D) analýza expresních hladin mRNA proliferačních markerů a hTERT v definovaných skupinách maligních vs. benigních GIST

E) analýza křivek přežití

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. Materiál

Pro komplexní molekulární vyšetření jsme použili vzorky od pacientů s morfologicky a IHC verifikovanou diagnózou GIST na Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF a FN Motol. Molekulární analýzu vzorků jsme ve velké většině provedli z primárních nádorů lokalizovaných v rámci trávicího traktu, případně extragastrointestinálně. Kromě primárních nádorů jsme molekulárně vyšetřili odebraný materiál po recidivě onemocnění a vzorky z metastáz.

#### 3.2. Metody

Zavedli a optimalizovali jsme mutační analýzu genů *KIT* a *PDGFRA* v tzv. „hot spots“ místech, tj. v exonech 9, 11, 13 a 17 genu *KIT* a exonů 12, 14 a 18 genu *PDGFRA* (dle publikace Daum et al., 2007). Navíc jsme zavedli a optimalizovali detekci přítomnosti mutací v exonech 8, 14 a 18 genu *KIT*. Mimoto, u *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST jsme zavedli vyšetřování přítomnosti mutací v exonech 11 a 15 genu *BRAF*, exonech 2, 3 a 4 genů *KRAS* a *NRAS*, exonech 9 a 20 genu *PIK3CA*, v exonu 2 genu *AKT1*, exonu 43 genu *ATR*, a fúzních transkriptů *FGFR1::TACCI* a *ETV6::NTRK*.

Navrhli, zavedli a optimalizovali jsme alelově specifickou PCR pro cílenou detekci mutace p.V600E u pacientů s GIST. Metodu alelově specifické PCR využíváme rovněž pro zjištění mutace p.V600E u melanomů, LHC, mozkových nádorů, případně CRC. Zavedli a optimalizovali jsme rovněž metodu HRM pro skrínig primárních, eventuálně sekundárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA*. Metoda HRM je vhodná pro skrínig jednobodových záměn nebo krátkých delecí i u dalších genu ve skupině *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST. U vybraných pacientů jsme analyzovali a vyhodnocovali DNA a RNA varianty pomocí metody NGS (Next Generation Sequencing – Sekvenování nové generace). V současnosti metodu NGS

využíváme u všech indikovaných pacientů s generalizací onemocnění pro určení potenciálního terapeutického cíle v rámci personalizované medicíny.

Získali jsme plazmidy genů Ki-67, TOP2A, TPX2, a telomerázové podjednotky hTERT klonováním cDNA jednotlivých transkriptů uvedených genů pomocí TOPO<sup>®</sup>TA klonovacího kitu. Plazmid pro kontrolní gen *ABL* byl připraven podle postupu autorů Willasch et al. (2009). Pro účely absolutní kvantifikace jsme následně vykonali logaritmické ředění plazmidů za účelem sestrojení standardních kalibračních křivek. Sestrojili jsme standardní křivky mRNA transkriptů proliferčních markerů Ki67, TPX2, TOP2A, hTERT a kontrolního genu *ABL* z desetinásobného ředění příslušných plazmidů. Koncentrační rozpětí plazmidů kontrolního genu *ABL* představovalo koncentrace od 2.5E+07 kopií/μl do 2.5E+01 kopií/μl. Rozpětí koncentrace naředěných plazmidů proliferčního markeru Ki67 bylo od 1.45E+10 kopií/μl do 1.45E+01 kopií/μl, u TPX2 hodnoty 2.49E+09 kopií/μl až 2.49E+01 kopií/μl, u TOP2A hodnoty 7.83E+09 kopií/μl až 7.83E+04 kopií/μl a u hTERT hodnoty 1.8E+10 kopií/μl až 1.8E+01 kopií/μl. Normalizované expresní hladiny Ki-67, TPX2, TOP2A, telomerázové podjednotky hTERT byly stanoveny jako poměr expresních hladin Ki-67, TPX2, TOP2A a telomerázové podjednotky hTERT k expresním hladinám kontrolního genu *ABL* (Kalfusova et al., 2016). V rámci RQ RT PCR jsme všechny ředění plazmidů Ki-67, TPX2, TOP2A, hTERT a kontrolního genu *ABL*, negativní kontroly, stejně tak kvantifikaci expresí Ki-67, TPX2, TOP2A, hTERT a *ABL* příslušných vzorků vždy prováděli v duplikátech (Kalfusova et al., 2016). Statistickou analýzu jsme provedli pomocí softwaru JMP IN 5.1.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Mutační analýza *KIT/PDGFR*A mutovaných GIST

V rámci molekulární diagnostiky jsme vyšetřili 334 vzorků nádorů od 289 pacientů s GIST. V převážné většině se nádory vyskytovaly v rámci gastrointestinálního traktu (žaludek – 40.4 %, tenké střevo – 19.5 %, tlusté střevo – 2.3 %, jícn – 1.5 %). V menší míře byly nádory distribuovány mimo gastrointestinální trakt, tj. na místech tzv. extragastrointestinální lokalizace – 6.3 % (mesenterium, omentum, retroperitoneum). Významný podíl vyšetřovaných vzorků tvořily vzorky metastáz (nejčastěji se jednalo o metastázy z jater nebo z oblasti břišní dutiny) – 24.0 %. Přítomnost primárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* jsme zjistili v 279 vzorcích nádorů od 239 pacientů. Nejčastěji jsme zjistili přítomnost primárních mutací v exonu 11 genu *KIT* - v 210 vzorcích (75.2 %) od 182 pacientů (76.2 %). Primární mutace v exonu 11 genu *KIT* jsou charakterizovány největší variabilitou. V případě exonu 9 (11 pacientů – 4.6 %, 16 vzorků – 5.7 %) genu *KIT* jsme ve všech analyzovaných vzorcích shodně detekovali duplikaci kodonů 502-503. Mutační analýza mutací v exonu 13 genu *KIT* odhalila ve všech vzorcích (8 vzorků – 2.9 % od 4 pacientů – 1.6 %) substituční záměnu v kodonu 642 (p.K642E). U exonu 17 se jednalo o substituci v kodonu 822 (p.N822K) (1 vzorek – 0.4 % od 1 pacienta – 0.4 %). V rámci genu *PDGFRA* jsme nejčastěji stanovili mutace v exonu 18 (34 pacientů – 14.3 %, 37 vzorků – 13.3 %). V 75 % jsme v uvedeném exonu detekovali substituční záměnu v kodonu 842 (p.D842V) vedoucí k primární rezistenci nádoru na cílenou terapii inhibitory RTK. Mutace v exonech 12 a 14 genu *PDGFRA* jsme detekovali v menší míře (5 vzorků – 2.1 % od 5 pacientů – 1.8 %, respektive 2 vzorky – 0.7 % od 2 pacientů – 0.8 %).

Sekundární mutace v genech *KIT* a *PDGFRA* jsme identifikovali u 16 pacientů z celkového počtu 156 analyzovaných pacientů (10.2 %) na cílené terapii inhibitory RTK v I., II., nebo III. linii. Souhrnně jsme od uvedených 16 pacientů vyšetřili 42

vzorků v průběhu progresu onemocnění. Přítomnost sekundárních mutací jsme zjistili v 29 ložiscích (69 %). Sekundární mutace jsme detekovali v exonech 13 a 17 genu *KIT* a v exonu 18 genu *PDGFRA*. Zjistili jsme výraznou intranádorovou nebo internádorovou heterogenitu sekundárních mutací. U pacienta č. 7 jsme v jednom vzorku z jednoho ložiska detekovali 2 sekundární mutace v exonu 17 genu *KIT* (intranádorová heterogenita). Významnou internádorovou heterogenitu jsme identifikovali u pacienta č. 9. Ve třech vzorcích z let 2008 a 2009 jsme u něj detekovali přítomnost tří rozdílných sekundárních mutací v exonu 17 genu *KIT*.

#### **4.2. Mutační analýza *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST**

U 55 vzorků od 50 pacientů jsme nedetekovali přítomnost mutací v genech *KIT* a *PDGFRA*. Z uvedeného souboru *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST jsme ve 2 vzorcích (3.6 %) od 2 pacientů (4 %) identifikovali mutaci p.V600E v genu *BRAF*. Na průkaz získané rezistence jsme mutaci v genu *BRAF* vyšetřovali rovněž v souboru 76 pacientů s mutacemi v genech *KIT* nebo *PDGFRA*. Uvedených 76 pacientů bylo léčeno IM bez detekovaných sekundárních mutací. Mutaci p.V600E v exonu 15 genu *BRAF* jsme ve zmiňovaném souboru nedetekovali. Ve skupině *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST jsme přítomnost mutací, nebo defektů v genech SDH komplexu (geny *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, a *SDHD*) analyzovali v 12 vzorcích DNA od 9 pacientů. Delece v genech SDH komplexu, ve smyslu rozsáhlejších delecí byly analyzovány prostřednictvím metody MLPA. Menší delece nebo bodové záměny byly detekovány pomocí NGS. V 10 vzorcích (18.2 %) od 8 pacientů (16 %) jsme zjistili přítomnost delecí několika exonů v genech *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2* a *SDHAF1*. U pacienta č. 9 byla navíc současně s alteracemi v genech SDH komplexu zjištěna přítomnost mutace v genu *NF1*. Mutaci v genu *NF1* jsme detekovali u jednoho pacienta (2.0 % z *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST pacientů). Konkrétně byla detekována sestřihová varianta c.5206-2A>G. Alterace v genech *AKT1* a *ATR* jsme detekovali rovněž po jednom případě. Přítomnost mutací v genech *KRAS*, *NRAS* nebo *PIK3CA*, případně fúzních transkriptů *ETV6::NTRK* a *FGFR1::TACC1* nebyla v našem souboru pacientů detekována.



### 4.3. Analýza exprese markerů proliferace a senescence

V naší studii jsme zjistili statisticky významné rozdíly expresních hladin mRNA v kontrolní skupině pacientů s BL (Ki-67  $p < 0.0001$ , TPX2 ( $p < 0.0001$ ), TOP2A ( $p < 0.0001$ ), a hTERT ( $p < 0.0001$ ). Proliferační aktivita Ki-67, TPX2, TOP2A a hTERT byla u GIST a LMS, tj. proliferačně méně aktivních diagnóz, významně nižší, než u BL. Rovněž jsme zjistili statisticky významně vyšší hladiny mRNA proliferačních markerů Ki-67 ( $p < 0.0001$ ), TPX2 ( $p < 0.0001$ ) a hTERT ( $p < 0.0001$ ) ve skupině GIST s maligním chováním vůči skupině benigní. U normalizovaných hladin TOP2A jsme statistickou významnost nezjistili ( $p < 0.1910$ ). Mimoto jsme zjistili korelaci vyšších průměrných hladin mRNA Ki-67 a TPX2 s kratším EFS a rovněž s kratším OS ( $p < 0.0121$  a  $p < 0.0304$  pro Ki-67, a  $p < 0.0003$  a  $p < 0.0030$  pro TPX2). V případě, že jsme expresní hladiny mRNA rozdělili podle hodnot mediánů, korelovali s kratším EFS vyšší hladiny proliferačního markeru TPX2 ( $p < 0.0311$ ) a telomerázové podjednotky hTERT ( $p < 0.0106$ ).

## 5. DISKUZE

Mutační analýza vzorků solitárních nádorů skýtá několik úskalí, která mohou komplikovat správnou interpretaci výsledku identifikovaných molekulárních změn. Kontaminace vzorku nádoru nenádorovými buňkami, například lymfocyty, buňkami hladkého svalstva, nebo jinými zánětlivými buňkami může vést k relativnímu snížení nádorové DNA v analyzovaném vzorku (Sihto et al., 2005). Nezbytná je tedy histopatologická revize nádorové populace vzorku určeného pro mutační analýzu (Lasota, Miettinen, 2008). Při diagnostickém vyšetření byly všechny námi analyzované vzorky podrobeny histologické revizi patologem. V rámci mutační analýzy se s nižší citlivostí detekce změn v DNA setkáváme u vzorků nádorů fixovaných ve formolu a zalitých do parafínu (FFPE). Vysvětlením uvedeného stavu je probíhající degradace nádorové DNA v archivních parafinových blocích při jejich bioptickém zpracování (Lasota, Miettinen, 2008). Nejnižší limit pro detekci mutací pomocí přímého sekvenování je stanoven na 20 % nádorových buněk ve vzorku a souvisí s nízkou citlivostí metodiky přímého sekvenování (de Leng et al., 2016; Smits et al., 2014). V průběhu amplifikace specifických PCR produktů u mutační analýzy se setkáváme rovněž se zvýšeným počtem artefaktů. Doporučením pro předcházení detekce těchto amplifikačních artefaktů je provedení vždy dvou nezávislých amplifikací. Z toho důvodu byly všechny námi detekované primární a sekundární mutace v genech *KIT* a *PDGFRA*, mutace v genu *BRAF*, změny v genech *AKT1* a *ATR* vždy ověřeny druhou nezávislou amplifikací. Pro účely cílené terapie je nezbytné také dosáhnout vysoké citlivosti detekce přítomnosti mutací. Proto jsou v molekulární diagnostice nádorů požadované specifické a senzitivní skrínigové metody, které umožňují rychlou analýzu vzorků. Pro skrínig mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* jsme tedy zavedli a optimalizovali analýzu křivek tání s vysokým rozlišením (HRM – High Resolution Melting). Pro detekci mutací v genu *BRAF* jsme z uvedeného důvodu zavedli metodu alelově specifické PCR (AS PCR). Citlivost metody AS PCR jsme stanovili

na detekci 2.5 % nádorové mutované DNA. Nové možnosti v diagnostice a analýze mutací tvoří metoda NGS, která výrazně ovlivnila schopnost analyzovat aberace genů v nádorových tkáních. Technologie NGS může detekovat mutace, které jsou ve vzorku přítomny ve velmi malých frakcích buněk. Mimoto se metoda NGS v narůstající míře využívá pro detekci změn a variant u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním, konkrétně u onkologických onemocnění s aplikací cílené terapie.

Primární mutace v genech *KIT* a *PDGFRA* jsme v souboru 289 pacientů (334 vzorků) detekovali v 83.5 % vyšetřovaných vzorků, což je v souladu s dosavadními literárními studiemi (Bombac et al., 2020). U primárních mutací v exonu 11 jsme prokázali charakteristickou širokou variabilitu identifikovaných mutací. Jednoduché delece jsme zjistili u 81 (38.6 %) vzorků. Jednoduché substituce jsme v našem souboru pacientů zjistili v 57 (27.1%) vzorcích. Interní tandemové duplikace (ITD) jsme detekovali v 13 (6.2 %) vzorcích. Složitější mutace, zahrnující substituce společně s delecí a inzercí nukleotidů, jsme v našem souboru detekovali v 31 (14.8 %) vzorcích. Typicky se substituce vyskytovaly v oblasti kodonů 557, 558, nebo 560. Mutace v exonu 9 genu *KIT* jsme v našem souboru vyšetřili v 16 vzorcích (5.7 %). Pacienti s mutacemi v exonu 9 genu *KIT* mají prokazatelně prodlouženou dobu přežívání při podávání akcelerované dávky IM již v počátku terapie (Demetri et al., 2002). Mutace v exonu 13 genu *KIT* jsme v našem souboru zjistili u 8 vzorků (2.9 %). Shodně jsme u všech 8 vyšetřených vzorků (4 pacientů) stanovili substituci p.K642E. Nádory s mutacemi v exonu 13 jsou charakterizovány sníženou citlivostí na podávaný IM. Primární mutace v exonu 17 genu *KIT*, který kóduje aktivační místo receptoru (TK2), stabilizují aktivní konformaci proteinu. Bodovou záměnu v exonu 17 genu *KIT* jsme detekovali u 1 pacienta (0.4 %) v 1 vzorku (0.4 %). Konkrétně se jednalo o substituci v kodonu 822 (p.N822K). U převážné většiny GIST se primární mutace vyskytují v genu *KIT* (více než 80 %). U pacientů, u kterých se nezjistí přítomnost mutací v genu *KIT*, se v 5 – 8 % případů vyskytují mutace v genu *PDGFRA*. Mutace v genu *PDGFRA* jsme v našem souboru

detekovali ve 44 vzorcích (13.2 %) od 41 pacientů (17.2 %). Ačkoliv je nejběžnější mutace v genu *PDGFRA* (p.D842V) primárně rezistentní na terapii IM, přibližně 30 % nádorů s jinými mutacemi než p.D842V jsou na terapii IM potenciálně senzitivní (Tajima et al., 2015). Mutace v exonu 12 genu *PDGFRA* jsme detekovali v 2.1 % z *KIT/PDGFRA* mutovaných (5 vzorků od 5 pacientů) vzorků. Nádory s mutacemi v exonu 12 genu *PDGFRA* jsou na terapii IM senzitivní rovněž jako je tomu u exonu 11 genu *KIT* (Tornillo, Terracciano, 2006). Mutace v exonu 14 genu *PDGFRA* jsme v našem souboru identifikovali ve 2 vzorcích (u 2 pacientů), tj. 0.7 % z *KIT/PDGFRA* mutovaných. U prvního pacienta jsme detekovali najednou dvě substituční mutace v exonu 14 genu *PDGFRA* (p.M642T a p.H659N). Mutace v kodonu 659 jsou v rámci exonu 14 genu *PDGFRA* nejčastější (Lasota et al., 2006). V rámci mutační analýzy jsme se u druhého pacienta setkali s přítomností mutace p.P653L v exonu 14 genu *PDGFRA* a zároveň s přítomností druhé mutace p.D846H v exonu 18 genu *PDGFRA*. Zmiňovaný pacient byl na terapii inhibítorem RTK. Předpokládáme, že mutace v exonu 14 genu *PDGFRA* je primární mutací, a mutace v exonu 18 by mohla být mutací sekundární.

Rozhodujícím mechanismem sekundární neboli získané rezistence na terapii IM je vznik sekundárních mutací (Guo et al., 2009). Problematika sekundárních mutací a následné sekundární rezistence je tedy významnou komplikací biologické terapie (precizní onkologie). Mezi nejčastěji identifikované sekundární mutace patří mutace p.V654A v exonu 13 a mutace p.N822K v exonu 17 genu *KIT* (Nishida et al., 2008; Zhu et al., 2020). V našem souboru jsme vyšetřili 42 vzorků od 16 pacientů, u kterých byla diagnostikována progresse onemocnění. Přítomnost sekundárních mutací jsme zjistili v 29 ložiscích (69 %). V uvedeném souboru 16 pacientů jsme v rámci exonu 13 detekovali výhradně sekundární mutaci p.V654A. Společně jsme mutaci p.V654A identifikovali ve 12 primárních nádorech s progresí nebo v metastázách. Mutace v exonu 17 tvoří 30 – 40 % sekundárních mutací vedoucích ke vzniku rezistence (Yeh et al., 2017). Sekundární mutace v exonu 17 jsme v našem souboru zjistili u 9 pacientů v 16 ložiscích. Mutace v exonu 17 se, na rozdíl od

mutací v exonu 13 (výhradně mutace p.V654A), vyznačují velkou variabilitou. Sekundární mutace v exonu 17 jsme identifikovali v kodonech 809, 820, 822 a 823. Největší variabilitu identifikovaných sekundárních mutací jsme zaznamenali v kodonu 820 (exon 17). Konkrétně jsme v kodonu 820 zaznamenali substituční záměny p.D820Y, p.D820A, p.D820E a p.D820G. U jednoho pacienta (pacient č. 10) jsme detekovali přítomnost sekundární mutace v exonu 18 genu *PDGFRA*. Za podstatný nález kromě samotné identifikace přítomnosti sekundárních mutací považujeme průkaz heterogenity nádorových populací po terapii. Mutační analýza rezistentních mutací v souboru zmiňovaných 16 pacientů odhalila jejich vysokou heterogenitu a to jednak co do počtu i typu mutací v rámci jednoho ložiska nádoru či jeho metastázy, jednak mezi jednotlivými metastázami. Nejvýrazněji byla zmiňovaná internádorová heterogenita zjištěná u pacienta č. 11. Ve třech odběrech – roky 2017, 2018 a 2022 – jsme u daného pacienta analyzovali 11 ložisek v části se sekundární mutací v exonu 13 a v části se sekundární mutací v exonu 17. Na druhé straně, u pacienta č. 9 jsme ve 3 odběrech z let 2007 a 2008 detekovali tři rozdílné sekundární mutace v exonu 17. Všechny tři mutace se vzájemně lišily (p.N822K, p.D820A, p.D820G). O důležitosti vyšetřování všech dostupných ložisek nádoru a o nerovnoměrné distribuci a přítomnosti sekundárních mutací v jednotlivých ložiscích jsme se přesvědčili při mutační analýze u pacienta č. 1. Molekulárním vyšetřením 3 ložisek jsme zjistili přítomnost sekundární mutace p.D820Y ve dvou analyzovaných vzorcích. Ve třetím vzorku jsme žádnou sekundární mutaci nedetekovali. V případě analýzy pouze tohoto vzorku bychom při neúplném vyšetření uváděli nepřítomnost sekundárních mutací a nejasný mechanismus získané rezistence. Kromě výrazné heterogenity sekundárních mutací mezi jednotlivými ložisky, tzv. internádorovou heterogenitu jsme u pacienta č. 7 detekovali tzv. intranádorovou heterogenitu, tj. heterogenitu sekundárních mutací v rámci jednoho ložiska. Ve vyšetřovaném vzorku jsme zjistili současně přítomnost dvou sekundárních mutací p.D820E a p.N822K v exonu 17 genu *KIT* (Kalfusova et al., 2019). Intranádorová heterogenita sekundárních mutací byla v tomto případě

ověřena pomocí techniky NGS. Přítomnost, počet a výrazná heterogenita (intra či internádorová) sekundárních mutací významně ovlivňuje cílenou léčbu. Problémem současné doby je zvládnutí léčby pacienta s několika rozdílnými sekundárními mutacemi. Důvodem je rozdílná citlivost jednotlivých sekundárních mutací k daným inhibitorům (I., II., nebo III. generace). Stanovení typu a lokalizace sekundárních mutací tedy významně ovlivňuje řízení terapeutické intervence u pacientů s pokročilým GIST.

U terapeuticky ovlivněných nádorů často dochází ke změně morfolgie nádorových buněk (Pauwels et al., 2005). Většina GIST po selhání terapie nemění základní morfologický obraz ani IHC ověřovaný fenotyp, ale setkáváme se například se změnou vřetenobuněčné morfolgie buněk na morfolgii epiteloidní, se změnami exprese proteinů detekovaných pomocí IHC vyšetření, ale také i bez nich. V této souvislosti vykazuje mnoho nádorů variabilní expresi proteinu KIT, nebo dochází k úplné ztrátě jeho exprese (Bickenbach et al., 2007; Liegl et al., 2008; Pauwels et al., 2005). U nádorů rezistentních na terapii IM často vznikají sekundární mutace jako hlavní mechanismus rezistence (Antonescu 2008). Méně často vznikají v primárním nádoru nebo v jeho metastázách metaplastické změny, trans-diferenciace nebo heterologní diferenciace (dediferenciace) (Liegl et al., 2009; Zheng et al., 2013). V našem souboru pacientů s detekovanými sekundárními mutacemi jsme změnu morfolgie nádorových buněk po terapii (tj. v čase vzniku rezistence) zjistili u jednoho pacienta (pacient č. 1).

Nemutovaný stav genů *KIT* nebo *PDGFRA* jsme v naší studii zjistili u 55 vzorků (16.4 %) od 50 pacientů (17.3 %). V minulosti byla skupina *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST považována za terapeuticky nepostihnutelnou. Případně při použití cílené terapie s velmi nízkou léčebnou odpovědí nebo se jednalo o skupinu GIST primárně rezistentních. Recentně se ovšem pohled na molekulární diagnostiku a terapii *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST výrazně změnil. Molekulární analýza této skupiny GIST i pomocí metod NGS prokázala genetické alterace v genech

kódujících důležité signální molekuly v jednotlivých aktivačních drahách, nebo vznik fúzních transkriptů ovlivňujících aktivitu transformovaných buněk. Zjištěné molekulární změny umožňují rozšíření nejen diagnostických, ale zejména terapeutických možností skupiny *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST pacientů. Ve skupině *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST byla detekována přítomnost mutací v genu *BRAF* v rozpětí 3 – 13 % (Agaimy et al., 2009; Agaram et al., 2008; Daniels et al., 2011; Hostein et al., 2010; Rossi et al., 2015). V námi analyzovaném souboru *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST jsme substituci p.V600E identifikovali ve 2 vzorcích (3.6 %) od 2 pacientů (4.0 %). Mutace v genech *KIT* a *BRAF* se při současných znalostech jeví vzájemně exkluzivní. To potvrzují i naše zkušenosti, kdy jsme substituci v kodonu 600 genu *BRAF* detekovali pouze u pacientů bez přítomnosti mutací v genech jak *KIT*, tak *PDGFR*A. Na druhou stranu, autoři Jašek et al. (2020) detekovali koexistenci mutace p.V600E současně s mutacemi v genu *KIT*, nebo v genu *PDGFR*A (v 23 %). V naší studii jsme přítomnost mutace p.V600E ve skupině *KIT/PDGFR*A mutovaných GIST vyšetřovali u 76 pacientů. Mutaci p.V600E jsme v tomto souboru pacientů nedetekovali ani v jednom případě. Přibližně 20 – 40 % *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST je charakterizováno defektem genů *SDH* komplexu. Výskyt mutací v genech *KIT* a *PDGFR*A a současně v genech *SDH* komplexu byl považován za vzájemně exkluzivní. Na druhou stranu, autoři Daum et al. (2012) detekovali koexistenci mutace v genu *KIT* (exon 11 – delece kodonů 557 – 558) společně s mutací v genu *SDHD* (exon 1 - p.G12S). Podle jejich zjištění se přítomnost mutací v genech *KIT/PDGFR*A a *SDH* komplexu nemusí vzájemně vylučovat. V naší studii jsme zjišťovali přítomnost alterací v genech *SDH* komplexu pouze u pacientů bez přítomnosti mutací v genech *KIT*, *PDGFR*A a *BRAF*. V souboru *KIT/PDGFR*A/*BRAF* nemutovaných GIST jsme detekovali přítomnost mutací nebo defektů genů *SDH* komplexu u 8 pacientů (16 %) v 10 vzorcích (18.2 %). V převážné většině se jednalo o delece buď jednoho, nebo několika exonů genů *SDHB*, *SDHC*, nebo *SDHD*. Zjistili jsme také přítomnost delecí v genech pro kofaktory *SDHAF1* a *SDHAF2*. Podle několika studií se u

pacientů s *KIT/PDGFRA* nemutovaným GIST, zejména mladých jedinců, doporučuje testování přítomnosti zárodečných mutací i somatických mutací v genech *SDH* komplexu, jak jsme sami také stanovili (Janeway et al., 2011; Pantaleo et al., 2014; von Mehren et al., 2018). Další definovanou skupinou u *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST je skupina bez defektu genů *SDH* komplexu ale s alteracemi v RAS signální dráze (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *NFI*). Mutace v genu *KRAS* (eventuálně v genech *NRAS*, *HRAS*) se u pacientů s GIST vyskytují ve výrazně nižší míře – v rozpětí přibližně 1 – 11 % *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST. Několik studií, naproti tomu, přítomnost mutací v genu *KRAS* v žádném z vyšetřovaných vzorků GIST nezjistily (Belinsky et al., 2009; Bombac et al., 2020; Lasota et al., 2013). Stejného výsledku bylo dosaženo i v našem souboru *KIT/PDGFRA/BRAF/SDH* nemutovaných pacientů. Ani u jednoho pacienta jsme neidentifikovali mutace v genech *KRAS* ani *NRAS*. Ohledně mutací v genu *NFI* se udává, že jedinci s alteracemi v tomto genu mají vůči běžné populaci 34-násobné riziko vzniku GIST (Wu et al., 2021). V naší studii jsme zjistili přítomnost mutace v genu *NFI* u jednoho pacienta (2.0 % z *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST pacientů). Molekulární analýza zahrnující i gen *NFI* prokázala přítomnost sestřihové varianty c.5206-2A>G v uvedeném genu současně se ztrátou genů *SDHB*, *SDHAF1* a exonu 4 genu *SDHD*. Neobvykle vysoké procento (59 %) detekovaných patogenních mutací v genu *NFI* u „quadruple“ nemutovaných GIST (*KIT/PDGFRA/BRAF/SDH*) identifikovali ve své studii autoři Gasparotto et al. (2017). Na základě jejich analýzy hrají mutace v genu *NFI* významnou roli v patogeneze *KIT/PDGFRA/BRAF/SDH* nemutovaných GIST. Navíc uvedené výsledky poukazují na skutečnost, že významný podíl sporadických a „quadruple“ nemutovaných GIST jsou ve skutečnosti nediodagnostikovaní pacienti s mutací *NFI*. Mutace v genech *AKT1*, *PIK3CA* a *ATR* jsme analyzovali u *KIT/PDGFRA/BRAF/SDH* nemutovaných pacientů. V jednom případě (muž, 83 let) jsme detekovali mutaci v kodonu 16 genu *AKT1* (2.0 % z *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST pacientů). Konkrétně se jednalo o substituci v kodonu 16 genu



*AKT1* (p.G16E). V rámci naší studie jsme se zaměřili rovněž na zjištění přítomnosti mutací v genu *PIK3CA*. Detekce mutací v genu *PIK3CA* má kromě vysvětlení mechanismu vzniku těchto nádorů rovněž významný terapeuticko-indikační význam. Analýza mutací *PIK3CA* je totiž v současnosti jednou z nejčastějších onkologických indikací pro terapeutické ovlivnění několika onemocnění. U mutací v genu *PIK3CA* můžeme využít terapeutického zásahu inhibitory PI3K. U GIST byly mutace v genu *PIK3CA* detekovány ve skupině primárních GIST velkých rozměrů a metastatických GIST. Autoři Lasota et al. (2016) identifikovali přítomnost mutací v genu *PIK3CA* u přibližně 2 % pacientů (10 z 529 pacientů). Naše studie neprokázala přítomnost mutací v genu *PIK3CA* u pacientů s nemutovanými geny *KIT/PDGFR*A. Udržování stability genomu částečně závisí na náležité regulaci odpovědi buňky na poškození DNA a na integritě DNA reparačního systému. Klíčovou roli v rozpoznávání poškozené DNA sehrávají 2 kinázy - ATM (ataxia-telangiectasia mutated) a ATR (ATM and Rad3-related). Přítomnost mutací v genu *ATR* u GIST je asociována se skupinou *KIT/PDGFR*A nemutovaných (Shi et al., 2016). Alteraci v genu *ATR* jsme v našem souboru detekovali u jednoho pacienta (2.0 % z *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST pacientů). Konkrétně jsme identifikovali substituční záměnu v exonu 43. Uvedená substituce nukleotidů vedla ke vzniku STOP kodonu TGA z původního STOP kodonu TAA. Nedošlo tedy k záměně STOP kodonu za jinou aminokyselinu. Brenca et al. (2016) jako první detekovali přítomnost chimérického transkriptu *ETV6::NTRK3* u GIST. Profilování alterací nových genů (např. ze skupiny *NTRK* nebo *FGFR*) u *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST pomáhá objasnit změny vedoucí k transformaci buněk podobně jako je tomu u *KIT/PDGFR*A mutovaných GIST (Cao et al., 2022). Navíc, identifikace těchto alterací má významný dopad v rámci personalizované léčby (terapeutické ovlivnění v rámci precizní onkologie) (Zito Marino et al., 2020). V rámci naší studie jsme přítomnost fúzního transkriptu *ETV6::NTRK3* nedetekovali. Rovněž jsme v našem souboru *KIT/PDGFR*A nemutovaných GIST nedetekovali přítomnost fúzního transkriptu *FGFR1::TACC1*.

Progrese onemocnění má zásadní dopad na klinický stav a kvalitu života pacientů. Stanovení biologického rizika a určení agresivního chování je základním parametrem při diagnostickém vyšetření. Spektrum biologického rizika GIST je široké. Zahrnuje nádory benigní, nádory s nejasným biologickým potenciálem a rovněž nádory zřetelně maligní, s vysokým rizikem progrese (Miettinen et al., 2002). Ovšem i benigní nádory menších rozměrů (méně než 2 cm) mohou metastázovat a vykazovat znaky agresivního chování. Proto i tyto nádory musí být důsledně vyhodnocovány. Největší pozornost se soustřeďuje na stanovení proliferační aktivity, případně stanovení markerů ovlivňujících buněčný cyklus, přežívání nebo apoptózu buněk. V naší studii jsme se konkrétně zaměřili na stanovení expresních hladin mRNA vybraných, nám dostupných molekulárních proliferačních markerů Ki-67, TPX2, TOP2A a telomerázové podjednotky hTERT pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (RQ RT PCR). Proliferační aktivitu GIST jsme stanovovali ve srovnání s jinými nádory. Kontrolní skupinou byl vysoce proliferačně aktivní Burkittův lymfom (BL) a leiomyosarkomy (LMS) různého gradu. Pro určení biologického rizika jsme zjišťovali expresi proliferačních markerů a hTERT ve skupině histopatologicky posouzených benigních a maligních GIST. Rovněž jsme analyzovali expresní hladiny mRNA uvedených molekulárních markerů ve vztahu k přežívání pacientů (EFS a OS) na základě křivek přežití. Stanovení Ki-67 indexu slouží jednak k diagnostickým účelům, k určení prognózy, a jednak byla prokázána jeho prediktivní hodnota. Statistická analýza výsledků naší studie potvrzuje korelaci mezi vyšší expresí mRNA proliferačního markeru Ki-67 a maligním chováním GIST ( $p < 0.0001$ ). Rovněž jsme zjistili vyšší hladiny mRNA Ki-67 u BL, charakterizovaného vysokou proliferační aktivitou (nad 90 %) ( $p > 0.0001$ ). Detekovali jsme také asociaci vyšších hladin mRNA Ki-67 (při průměrných hodnotách mRNA) s kratším EFS i OS ( $p < 0.0121$ , respektive  $p < 0.0304$ ). Stanovení expresních hladin mRNA proliferačního markeru Ki-67 pomocí vysoce citlivé metody absolutní kvantifikace tak může přispět k objektivnímu určení proliferační

aktivity nádoru, maligního potenciálu GIST a rovněž k stanovení délky přežívání do progresu, případně celkového přežívání (Kalfusova et al., 2016).

Nadměrná exprese TPX2 (mRNA nebo proteinu) je markerem horší prognózy u mnoha typů nádorů (Brizova et al., 2010; Pérez de Castro, Malumbres, 2012). V naší studii jsme zjistili, že mRNA hladiny proliferačního markeru TPX2 jsou asociovány s proliferační aktivitou GIST a rovněž s jejich biologickým potenciálem ve vztahu k progresi onemocnění a nepříznivé prognóze. Potvrdili jsme statisticky významnou korelaci vyšších hladin mRNA markeru TPX2 a vysoce proliferačně aktivních nádorů – BL ( $p > 0.0001$ ). Navíc vyšší hladiny exprese mRNA TPX2 markeru byly signifikantně spojeny s maligním biologickým chováním GIST ( $p > 0.0001$ ). Rovněž jsme detekovali souvislost vyšších hladin mRNA TPX2 a kratším celkovým přežíváním i horší prognózou (EFS  $p > 0.0003$ , OS  $p > 0.0030$  při hodnotách průměru a EFS  $p > 0.0311$  při hodnotách mediánu) (Kalfusova et al., 2016).

Topoizomeráza 2A (TOP2A) je enzym, který katalyzuje uvolňování nadobrátek vinutí vláken DNA v procesu její replikace. V naší studii jsme potvrdili souvislost vyšší exprese TOP2A s vysokým proliferačním indexem nádoru (BL vs. GIST a LMS,  $p > 0.001$ ). Na rozdíl od potvrzeného vzájemného vztahu exprese TOP2A a proliferace nádoru jsme nezjistili asociaci vyšších hladin mRNA TOP2A a agresivnějším chováním GIST (maligní versus benigní GIST,  $p > 0.1910$ ). Rovněž jsme nedetekovali souvislost mezi vyššími hladinami TOP2A a dobou přežívání pacientů s GIST (při hodnotách rozdělených podle průměru: EFS  $p > 0.3435$ , OS  $p > 0.4040$  a při hodnotách mediánů: EFS  $p > 0.3065$ , OS  $p > 0.4401$ ). Výsledky naší studie však nejsou překvapivé v souvislosti se studií autorů Stacey et al. (2000). Z výsledků jejich studie vyplývá, že exprese TOP2A je v nádorových buňkách méně závislá na proliferačním stavu nádorových buněk. Buňky, které zůstávají životaschopné, ale jsou dočasně vyřazeny z aktivního buněčného cyklu, jsou totiž schopny stát se dominantními a produkovat vyšší hladiny TOP2A. Vysvětlení může podporovat fakt, že pomalu rostoucí buňky aktivně neproliferují. Z tohoto pohledu, skupiny GIST s nízkým a vysokým rizikem mohou být z velké části tvořeny pomalu

rostoucími buňkami. Následně statistické rozdíly expresních hladin mRNA TOP2A mezi benigními a maligními GIST nejsou podle našeho zjištění tak významné jako je tomu u expresních hladin Ki-67, TPX2 a hTERT. Telomeráza je RNA-dependentní DNA polymeráza, která udržuje délky telomér. Telomeráza a podjednotky hTERT mohou rovněž chránit nádorové buňky před apoptózou. V neposlední řadě je zvýšená exprese podjednotky hTERT spojená s pokročilým stadiem onemocnění a s nepříznivou prognózou u různých typů nádorů (Liu et al., 2016). Přibližně 85 – 90 % nádorů má zvýšenou aktivitu telomerázy a expresi katalytické podjednotky hTERT. Autoři Günther et al. (2000) detekovali zvýšenou aktivitu hTERT u maligních GIST ve srovnání s benigními GIST. V naší studii jsme rovněž detekovali zvýšenou expresi hTERT ve skupině GIST maligního rizika vůči benigní skupině ( $p > 0.001$ ). Při sledování proliferační aktivity jsme stejně tak zjistili vyšší expresi hTERT u vysoce proliferačně aktivních BL ( $p > 0.001$ ) vůči skupinám GIST a LMS. Mimoto jsme prokázali statisticky významné zkrácení doby přežívání pacientů s GIST při hodnotách exprese mRNA hTERT vyšších než medián stanovených počtů kopií ( $p > 0.0106$ ). Stanovení expresních hladin mRNA telomerázové podjednotky hTERT se tak může stát účinným biomarkerem buněčného přežívání a pokročilého stádia onemocnění v rámci komplexní diagnostiky GIST (Kalfusova et al., 2016).

## 6. ZÁVĚR

V posledních dvou desetiletích molekulární patologie významně přispěla ke zlepšení a porozumění mechanismu vzniku a rozvoje GIST. Zjištění mechanismu funkce tyrozin kinázových receptorů a dalších regulačních proteinů a identifikace jejich molekulárních změn jako terapeutických cílů zásadně změnilo léčebné přístupy a přineslo u většiny pacientů s GIST zlepšení v prodloužení kvality a délky života. Mutační analýza u GIST má zásadní prediktivní a terapeutický dopad u každého nemocného. Identifikace příčin vzniku sekundární rezistence na podávané inhibitory RTK, průkaz intra a internádorové heterogenity sekundárních mutací a pochopení jejich mechanismů poskytuje možnost alternativních změn léčby ve smyslu nových terapeutických strategií nebo cílů. Volba inhibitorů II. a III. generace, kombinace s dalšími inhibitory, případně s imunoterapií se stává součástí terapeutické rozvahy v léčbě GIST. Průkaz molekulárních alterací ve skupině GIST s *KIT/PDGFR*A nemutovanými geny v naší studii umožnil pochopení mechanismu vzniku těchto podskupin GIST a volbu personalizované terapie. Recentní publikační výstupy a studie potvrzují prognostický význam námi analyzovaných proliferačních markerů Ki-67, TPX2, TOP2A a hTERT. Výsledky kvantitativní analýzy (RQ RT PCR) vybraných molekulárních markerů měřených prostřednictvím mRNA hladin, poukazují na vhodnost využívání této metodiky pro diagnostické a prognostické účely (zlepšení stanovení prognostického rizika). Potvrdili jsme rovněž korelaci expresních hladin mRNA molekulárních markerů Ki-67, TPX2 a hTERT s morfologicky definovanými skupinami benigních a maligních GIST. Genetická škála GIST se v průběhu let výzkumu ukazuje jako značně heterogenní. Očekáváme, že moderní diagnostické přístupy v molekulární analýze pomohou identifikovat patogenetické cesty rozvoje GIST v dalších letech. Zároveň hlubší a detailnější pochopení molekulárních mechanismů, které navozují vznik GIST a jeho progresi mohou zlepšit stanovení biologického rizika onemocnění a mohou přispět k volbě individualizované terapie

## 7. SOUHRN

Ve studii jsme po molekulární stránce komplexně vyšetřili 334 vzorků od 289 pacientů s GIST. Vzhledem k rozsáhlému souboru pacientů jsme mohli potvrdit a po statistické stránce ověřit variabilitu a lokalizaci primárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA*. Pro rychlý skrínig primárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* jsme zavedli metodu analýzy křivek tání (HRM). Pro detekci aktivační mutace V600E v genu *BRAF* jsme zavedli alelově specifickou PCR. V úzké spolupráci s Onkologickou klinikou 2. LF UK a FN Motol a jejím zaměřením na cílenou terapii pacientů s GIST a s tím souvisejícím operačním provozem jsme u 16 pacientů měli možnost detekovat přítomnost sekundárních mutací (ozřejmit sekundární rezistenci na terapii) a identifikovat jejich intranádorovou i internádorovou heterogenitu. V současné době, po vyčerpání dostupné cílené terapie, na základě indikace od onkologa, vyšetřujeme patientskou DNA a RNA prostřednictvím metody NGS, pomocí které vyhledáváme možné terapeutické varianty. Recentní vyhledávání terapeutických variant, respektive vyšetření exprese prediktivních markerů, je výrazným molekulárně – genetickým přínosem v rámci personalizované medicíny. V uvedeném souboru pacientů jsme navíc měli možnost identifikovat podskupiny *KIT/PDGFRA* nemutovaných GIST s mutacemi v genech *BRAF*, *NF1*, defekty v genech *SDH* komplexu, případně variantami v genech *AKT1* a *ATR*. Potvrdili jsme heterogenitu podskupin *KIT* a *PDGFRA* nemutovaných GIST. Pacienti s alteracemi v jiných genech než *KIT* a *PDGFRA* mohou profitovat z cílené inhibice. Kromě toho, GIST s mutacemi v genu *NF1* případně defekty v *SDH* komplexu jsou často součástí syndromů s návazností na genetické poradenství.

Pro objektivní zhodnocení biologického rizika jsme v naší studii analyzovali expresní hladiny mRNA markerů proliferace a senescence. Rovněž jsme se zaměřili na určení prognózy onemocnění GIST na základě expresních hladin vybraných markerů buněčné proliferace ve vztahu k přežívání do progresu a celkovému přežívání.

## 7. SUMMARY

In the study, we examined 334 samples from 289 patients with GIST with a comprehensive molecular investigation. Given such an extensive set of patients, we confirmed and statistically verified the variability and localization of primary mutations in the *KIT* and *PDGFRA* genes. We introduced a melting curve analysis method for rapid screening of primary mutations in the *KIT* and *PDGFRA* genes. We introduced allele-specific PCR to detect the V600E activating mutation in the *BRAF* gene. In close cooperation with the Oncology Clinic of the 2nd Faculty of Medicine of Charles University Prague and Faculty Hospital Motol and its focus on the targeted therapy of patients with GIST and related surgery, in 16 patients we had the opportunity to identify secondary mutations (clarify secondary resistance to treatment) and their intratumoral and intertumoral heterogeneity. Currently, after the failure of available targeted therapy, based on the request from the oncologist, we examine the patient's DNA and RNA using the NGS method, with a target to search for possible therapeutic variants. The recent search for therapeutic variants or the examination of the expression of predictive markers is a significant molecular-genetic contribution within the framework of personalized medicine. In investigated group of patients in this study, we also had the opportunity to identify subgroups of *KIT/PDGFRA* non-mutated GISTs with mutations in the *BRAF*, *NF1* genes, defects in the *SDH* complex genes, or variants in the *AKT1* and *ATR* genes. We confirmed the heterogeneity of *KIT* and *PDGFRA* subsets of non-mutated GISTs. Patients with gene alterations other than *KIT* and *PDGFRA* may benefit from targeted inhibition. In addition, GISTs with mutations in the *NF1* gene or defects in the *SDH* complex are often an integral part of syndromes requiring genetic counseling. To assess the biological risk objectively, we analysed the expression levels of mRNA markers of proliferation and senescence in our study. We also focused on determining the prognosis of GIST based on the expression levels of these markers in relation to survival to progression and overall survival.

## 8. PŘEHLED LITERATURY

1. Agaimy, A., Terracciano, L. M., Dirnhofer, S., Tornillo, L., Foerster, A., Hartmann, A., & Bihl, M. P. (2009). V600E BRAF mutations are alternative early molecular events in a subset of KIT/PDGFRα wild-type gastrointestinal stromal tumours. *Journal of clinical pathology*, 62(7), 613–616. <https://doi.org/10.1136/jcp.2009.064550>
2. Agaram, N. P., Wong, G. C., Guo, T., Maki, R. G., Singer, S., Dematteo, R. P., Besmer, P., & Antonescu, C. R. (2008). Novel V600E BRAF mutations in imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Genes, chromosomes & cancer*, 47(10), 853–859. <https://doi.org/10.1002/gcc.20589>
3. Antonescu, C. R., Besmer, P., Guo, T., Arkun, K., Hom, G., Koryotowski, B., Leversha, M. A., Jeffrey, P. D., Desantis, D., Singer, S., Brennan, M. F., Maki, R. G., & DeMatteo, R. P. (2005). Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(11), 4182–4190. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2245>
4. Antonescu C. R. (2008). Targeted therapy of cancer: new roles for pathologists in identifying GISTs and other sarcomas. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 21 Suppl 2, S31–S36. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.9>
5. Antonescu C. R. (2011). The GIST paradigm: lessons for other kinase-driven cancers. *The Journal of pathology*, 223(2), 251–261. <https://doi.org/10.1002/path.2798>
6. Astolfi, A., Pantaleo, M. A., Indio, V., Urbini, M., & Nannini, M. (2020). The Emerging Role of the FGF/FGFR Pathway in Gastrointestinal Stromal Tumor. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3313. <https://doi.org/10.3390/ijms21093313>



7. Belinsky, M. G., Skorobogatko, Y. V., Rink, L., Pei, J., Cai, K. Q., Vanderveer, L. A., Riddell, D., Merkel, E., Tarn, C., Eisenberg, B. L., von Mehren, M., Testa, J. R., & Godwin, A. K. (2009). High density DNA array analysis reveals distinct genomic profiles in a subset of gastrointestinal stromal tumors. *Genes, chromosomes & cancer*, 48(10), 886–896. <https://doi.org/10.1002/gcc.20689>
8. Bickenbach, K., Wilcox, R., Veerapong, J., Kindler, H. L., Posner, M. C., Noffsinger, A., & Roggin, K. K. (2007). A review of resistance patterns and phenotypic changes in gastrointestinal stromal tumors following imatinib mesylate therapy. *Journal of gastrointestinal surgery: official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 11(6), 758–766. <https://doi.org/10.1007/s11605-007-0150-y>
9. Blanke, C. D., Eisenberg, B. L., & Heinrich, M. C. (2001). Gastrointestinal stromal tumors. *Current treatment options in oncology*, 2(6), 485–491. <https://doi.org/10.1007/s11864-001-0070-0>
10. Boikos, S. A., Pappo, A. S., Killian, J. K., LaQuaglia, M. P., Weldon, C. B., George, S., Trent, J. C., von Mehren, M., Wright, J. A., Schiffman, J. D., Raygada, M., Pacak, K., Meltzer, P. S., Miettinen, M. M., Stratakis, C., Janeway, K. A., & Helman, L. J. (2016). Molecular Subtypes of KIT/PDGFR Wild-Type Gastrointestinal Stromal Tumors: A Report From the National Institutes of Health Gastrointestinal Stromal Tumor Clinic. *JAMA oncology*, 2(7), 922–928. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0256>
11. Bombac, A., Zakotnik, B., Bucic, M., Setrajcic Dragos, V., Gazic, B., Stegel, V., Klancar, G., & Novakovic, S. (2020). Mutational spectrum and classification of novel mutations in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumours. *International journal of oncology*, 56(6), 1468–1478. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5028>
12. Brenca, M., Rossi, S., Polano, M., Gasparotto, D., Zanatta, L., Racanelli, D., Valori, L., Lamon, S., Dei Tos, A. P., & Maestro, R. (2016). Transcriptome

sequencing identifies ETV6-NTRK3 as a gene fusion involved in GIST. *The Journal of pathology*, 238(4), 543–549. <https://doi.org/10.1002/path.4677>

13. Brčić, I., Argyropoulos, A., & Liegl-Atzwanger, B. (2021). Update on Molecular Genetics of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(2), 194. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11020194>

14. Brizova, H., Kalinova, M., Krskova, L., Mrhalova, M., & Kodet, R. (2010). A novel quantitative PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase IIalpha, and TPX2): an immunohistochemical correlation, testing, and optimizing for mantle cell lymphoma. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, 456(6), 671–679. <https://doi.org/10.1007/s00428-010-0922-8>

15. Cao, Z., Li, J., Sun, L., Xu, Z., Ke, Y., Shao, B., Guo, Y., & Sun, Y. (2022). GISTs with *NTRK* Gene Fusions: A Clinicopathological, Immunophenotypic, and Molecular Study. *Cancers*, 15(1), 105. <https://doi.org/10.3390/cancers15010105>

16. Daniels, M., Lurkin, I., Pauli, R., Erbstösser, E., Hildebrandt, U., Hellwig, K., Zschille, U., Lüders, P., Krüger, G., Knolle, J., Stengel, B., Prall, F., Hertel, K., Lobeck, H., Popp, B., Theissig, F., Wünsch, P., Zwarthoff, E., Agaimy, A., & Schneider-Stock, R. (2011). Spectrum of KIT/PDGFR $\alpha$ /BRAF mutations and Phosphatidylinositol-3-Kinase pathway gene alterations in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Cancer letters*, 312(1), 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.07.029>

17. Daum, O., Grossmann, P., Vanecek, T., Sima, R., Mukensnabl, P., & Michal, M. (2007). Diagnostic morphological features of PDGFR $\alpha$ -mutated gastrointestinal stromal tumors: molecular genetic and histologic analysis of 60 cases of gastric gastrointestinal stromal tumors. *Annals of diagnostic pathology*, 11(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2006.10.002>

18. Daum, O., Sedivcova, M., Dubova, M., & Michal, M. (2012). KIT mutations and sequence changes in genes encoding SDH complex possibly need not be mutually exclusive in gastrointestinal stromal tumors. *Applied immunohistochemistry &*

*molecular morphology: AIMM*, 20(5), 523–524. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e3182494026>

19. de Leng, W. W., Gadellaa-van Hooijdonk, C. G., Barendregt-Smouter, F. A., Koudijs, M. J., Nijman, I., Hinrichs, J. W., Cuppen, E., van Lieshout, S., Loberg, R. D., de Jonge, M., Voest, E. E., de Weger, R. A., Steeghs, N., Langenberg, M. H., Sleijfer, S., Willems, S. M., & Lolkema, M. P. (2016). Targeted Next Generation Sequencing as a Reliable Diagnostic Assay for the Detection of Somatic Mutations in Tumours Using Minimal DNA Amounts from Formalin Fixed Paraffin Embedded Material. *PloS one*, 11(2), e0149405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149405>

20. 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. (2005). Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants. *Gastroenterology*, 128(2), 270–279. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.11.020>

21. Demetri, G. D., von Mehren, M., Blanke, C. D., Van den Abbeele, A. D., Eisenberg, B., Roberts, P. J., Heinrich, M. C., Tuveson, D. A., Singer, S., Janicek, M., Fletcher, J. A., Silverman, S. G., Silberman, S. L., Capdeville, R., Kiese, B., Peng, B., Dimitrijevic, S., Druker, B. J., Corless, C., Fletcher, C. D., ... Joensuu, H. (2002). Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *The New England Journal of medicine*, 347(7), 472–480. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020461>

22. Fletcher, C. D., Berman, J. J., Corless, C., Gorstein, F., Lasota, J., Longley, B. J., Miettinen, M., O'Leary, T. J., Remotti, H., Rubin, B. P., Shmookler, B., Sobin, L. H., & Weiss, S. W. (2002). Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *International journal of surgical pathology*, 10(2), 81–89. <https://doi.org/10.1177/106689690201000201>

23. Gasparotto, D., Rossi, S., Polano, M., Tamborini, E., Lorenzetto, E., Sbaraglia, M., Mondello, A., Massani, M., Lamon, S., Bracci, R., Mandolesi, A., Frate, E.,

- Stanzial, F., Agaj, J., Mazzoleni, G., Pilotti, S., Gronchi, A., Dei Tos, A. P., & Maestro, R. (2017). Quadruple-Negative GIST Is a Sentinel for Unrecognized Neurofibromatosis Type 1 Syndrome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(1), 273–282. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0152>
24. Gounder, M. M., & Maki, R. G. (2011). Molecular basis for primary and secondary tyrosine kinase inhibitor resistance in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 67 Suppl 1(Suppl 1), S25–S43. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1526-3>
25. Gramza, A. W., Corless, C. L., & Heinrich, M. C. (2009). Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(24), 7510–7518. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0190>
26. Günther, T., Schneider-Stock, R., Häckel, C., Pross, M., Schulz, H. U., Lippert, H., & Roessner, A. (2000). Telomerase activity and expression of hTRT and hTR in gastrointestinal stromal tumors in comparison with extragastrointestinal sarcomas. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 6(5), 1811–1818.
27. Guo, T., Hajdu, M., Agaram, N. P., Shinoda, H., Veach, D., Clarkson, B. D., Maki, R. G., Singer, S., Dematteo, R. P., Besmer, P., & Antonescu, C. R. (2009). Mechanisms of sunitinib resistance in gastrointestinal stromal tumors harboring KITAY502-3ins mutation: an in vitro mutagenesis screen for drug resistance. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(22), 6862–6870. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1315>
28. Gupta, P., Tewari, M., & Shukla, H. S. (2008). Gastrointestinal stromal tumor. *Surgical oncology*, 17(2), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2007.12.002>
29. Heinrich, M. C., Corless, C. L., Demetri, G. D., Blanke, C. D., von Mehren, M., Joensuu, H., McGreevey, L. S., Chen, C. J., Van den Abbeele, A. D., Druker, B. J., Kiese, B., Eisenberg, B., Roberts, P. J., Singer, S., Fletcher, C. D., Silberman, S.,

- Dimitrijevic, S., & Fletcher, J. A. (2003a). Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *21*(23), 4342–4349. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.04.190>
30. Heinrich, M. C., Corless, C. L., Duensing, A., McGreevey, L., Chen, C. J., Joseph, N., Singer, S., Griffith, D. J., Haley, A., Town, A., Demetri, G. D., Fletcher, C. D., & Fletcher, J. A. (2003b). PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science (New York, N.Y.)*, *299*(5607), 708–710. <https://doi.org/10.1126/science.1079666>
31. Heinrich, M. C., Corless, C. L., Blanke, C. D., Demetri, G. D., Joensuu, H., Roberts, P. J., Eisenberg, B. L., von Mehren, M., Fletcher, C. D., Sandau, K., McDougall, K., Ou, W. B., Chen, C. J., & Fletcher, J. A. (2006). Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *24*(29), 4764–4774. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.2265>
32. 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. (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science (New York, N.Y.)*, *279*(5350), 577–580. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.577>
33. Hostein, I., Faur, N., Primois, C., Boury, F., Denard, J., Emile, J. F., Bringuier, P. P., Scoazec, J. Y., & Coindre, J. M. (2010). BRAF mutation status in gastrointestinal stromal tumors. *American journal of clinical pathology*, *133*(1), 141–148. <https://doi.org/10.1309/AJCPPCKGA2QGBJ1R>
34. Janeway, K. A., Kim, S. Y., Lodish, M., Nosé, V., Rustin, P., Gaal, J., Dahia, P. L., Liegl, B., Ball, E. R., Raygada, M., Lai, A. H., Kelly, L., Hornick, J. L., NIH Pediatric and Wild-Type GIST Clinic, O'Sullivan, M., de Krijger, R. R., Dinjens, W. N., Demetri, G. D., Antonescu, C. R., Fletcher, J. A., ... Stratakis, C. A. (2011). Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT

and PDGFRA mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(1), 314–318. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009199108>

35. Jašek, K., Váňová, B., Grendár, M., Štanclová, A., Szépe, P., Hornáková, A., Holubeková, V., Plank, L., & Lasabová, Z. (2020). BRAF mutations in KIT/PDGFRA positive gastrointestinal stromal tumours (GISTs): Is their frequency underestimated? *Pathology, research and practice*, 216(11), 153171. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153171>

36. Joensuu, H., Martin-Broto, J., Nishida, T., Reichardt, P., Schöffski, P., & Maki, R. G. (2015). Follow-up strategies for patients with gastrointestinal stromal tumour treated with or without adjuvant imatinib after surgery. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 51(12), 1611–1617. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.05.009>

37. Kalfusova, A., Hilska, I., Krskova, L., Kalinova, M., Linke, Z., & Kodet, R. (2016). Gastrointestinal stromal tumors - quantitative detection of the Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT telomerase subunit mRNA levels to determine proliferation activity and a potential for aggressive biological behavior. *Neoplasma*, 63(3), 484–492. [https://doi.org/10.4149/320\\_150714N390](https://doi.org/10.4149/320_150714N390)

38. Kalfusova, A., Linke, Z., Kalinova, M., Krskova, L., Hilska, I., Szabova, J., Vicha, A., & Kodet, R. (2019). Gastrointestinal stromal tumors - Summary of mutational status of the primary/secondary KIT/PDGFRA mutations, BRAF mutations and SDH defects. *Pathology, research and practice*, 215(12), 152708. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152708>

39. Lasota, J., Stachura, J., & Miettinen, M. (2006). GISTs with PDGFRA exon 14 mutations represent subset of clinically favorable gastric tumors with epithelioid morphology. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 86(1), 94–100. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700360>

40. Lasota, J., & Miettinen, M. (2008). Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology*, *53*(3), 245–266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2008.02977.x>
41. Lasota, J., Xi, L., Coates, T., Dennis, R., Evbuomwan, M. O., Wang, Z. F., Raffeld, M., & Miettinen, M. (2013). No KRAS mutations found in gastrointestinal stromal tumors (GISTs): molecular genetic study of 514 cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *26*(11), 1488–1491. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.89>
42. Lasota, J., Felisiak-Golabek, A., Wasag, B., Kowalik, A., Zięba, S., Chłopek, M., Wang, Z. F., Coates, T., Kopczyński, J., Gozdz, S., Sarlomo-Rikala, M., & Miettinen, M. (2016). Frequency and clinicopathologic profile of PIK3CA mutant GISTs: molecular genetic study of 529 cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *29*(3), 275–282. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.160>
43. Li, G. Z., & Raut, C. P. (2019). Targeted therapy and personalized medicine in gastrointestinal stromal tumors: drug resistance, mechanisms, and treatment strategies. *OncoTargets and therapy*, *12*, 5123–5133. <https://doi.org/10.2147/OTT.S180763>
44. Liegl, B., Kepten, I., Le, C., Zhu, M., Demetri, G. D., Heinrich, M. C., Fletcher, C. D., Corless, C. L., & Fletcher, J. A. (2008). Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *The Journal of pathology*, *216*(1), 64–74. <https://doi.org/10.1002/path.2382>
45. Liu, T., Yuan, X., & Xu, D. (2016). Cancer-Specific Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Promoter Mutations: Biological and Clinical Implications. *Genes*, *7*(7), 38. <https://doi.org/10.3390/genes7070038>
46. Miettinen, M., Sarlomo-Rikala, M., & Lasota, J. (1999). Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Human pathology*, *30*(10), 1213–1220. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(99\)90040-0](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(99)90040-0)

47. Miettinen, M., & Lasota, J. (2001). Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, 438(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s004280000338>
48. Miettinen, M., El-Rifai, W., H L Sobin, L., & Lasota, J. (2002). Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review. *Human pathology*, 33(5), 478–483. <https://doi.org/10.1053/hupa.2002.124123>
49. Miettinen, M., & Lasota, J. (2006). Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 130(10), 1466–1478. <https://doi.org/10.5858/2006-130-1466-GSTROM>
50. Miettinen, M., Wang, Z. F., Sarlomo-Rikala, M., Osuch, C., Rutkowski, P., & Lasota, J. (2011). Succinate dehydrogenase-deficient GISTs: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 66 gastric GISTs with predilection to young age. *The American journal of surgical pathology*, 35(11), 1712–1721. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182260752>
51. Mou Y, Wang Q, Li B. (2018). “The 'Wild'-Type Gastrointestinal Stromal Tumors: Heterogeneity on Molecule Characteristics and Clinical Features.” *Cancer Transl Med*, 4(3):75–82. doi: 10.4103/ctm.ctm\_17\_18
52. Nannini, M., Astolfi, A., Urbini, M., Indio, V., Santini, D., Heinrich, M. C., Corless, C. L., Ceccarelli, C., Saponara, M., Mandrioli, A., Lolli, C., Ercolani, G., Brandi, G., Biasco, G., & Pantaleo, M. A. (2014). Integrated genomic study of quadruple-WT GIST (KIT/PDGFR/SDH/RAS pathway wild-type GIST). *BMC cancer*, 14, 685. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-685>
53. Nishida, T., Kanda, T., Nishitani, A., Takahashi, T., Nakajima, K., Ishikawa, T., & Hirota, S. (2008). Secondary mutations in the kinase domain of the KIT gene are predominant in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Cancer science*, 99(4), 799–804. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00727.x>



54. Ordog, T., Zörnig, M., & Hayashi, Y. (2015). Targeting Disease Persistence in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Stem cells translational medicine*, 4(7), 702–707. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0298>
55. Pantaleo, M. A., Astolfi, A., Urbini, M., Nannini, M., Paterini, P., Indio, V., Saponara, M., Formica, S., Ceccarelli, C., Casadio, R., Rossi, G., Bertolini, F., Santini, D., Pirini, M. G., Fiorentino, M., Basso, U., Biasco, G., & GIST Study Group (2014). Analysis of all subunits, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, of the succinate dehydrogenase complex in KIT/PDGFRA wild-type GIST. *European journal of human genetics : EJHG*, 22(1), 32–39. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.80>
56. Pantaleo, M. A., Urbini, M., Indio, V., Ravegnini, G., Nannini, M., De Luca, M., Tarantino, G., Angelini, S., Gronchi, A., Vincenzi, B., Grignani, G., Colombo, C., Fumagalli, E., Gatto, L., Saponara, M., Ianni, M., Paterini, P., Santini, D., Pirini, M. G., Ceccarelli, C., ... Biasco, G. (2017). Genome-Wide Analysis Identifies MEN1 and MAX Mutations and a Neuroendocrine-Like Molecular Heterogeneity in Quadruple WT GIST. *Molecular cancer research : MCR*, 15(5), 553–562. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0376>
57. Pauwels, P., Debiec-Rychter, M., Stul, M., De Wever, I., Van Oosterom, A. T., & Sciot, R. (2005). Changing phenotype of gastrointestinal stromal tumours under imatinib mesylate treatment: a potential diagnostic pitfall. *Histopathology*, 47(1), 41–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02179.x>
58. Pérez de Castro, I., & Malumbres, M. (2012). Mitotic Stress and Chromosomal Instability in Cancer: The Case for TPX2. *Genes & cancer*, 3(11-12), 721–730. <https://doi.org/10.1177/1947601912473306>
59. Pitsava, G., Settas, N., Faucz, F. R., & Stratakis, C. A. (2021). Carney Triad, Carney-Stratakis Syndrome, 3PAS and Other Tumors Due to SDH Deficiency. *Frontiers in endocrinology*, 12, 680609. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.680609>

60. Rossi, S., Gasparotto, D., Miceli, R., Toffolatti, L., Gallina, G., Scaramel, E., Marzotto, A., Boscato, E., Messerini, L., Bearzi, I., Mazzoleni, G., Capella, C., Arrigoni, G., Sonzogni, A., Sidoni, A., Mariani, L., Amore, P., Gronchi, A., Casali, P. G., Maestro, R., ... Dei Tos, A. P. (2015). KIT, PDGFRA, and BRAF mutational spectrum impacts on the natural history of imatinib-naive localized GIST: a population-based study. *The American journal of surgical pathology*, *39*(7), 922–930. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000418>
61. Saponara, M., Urbini, M., Astolfi, A., Indio, V., Ercolani, G., Del Gaudio, M., Santini, D., Pirini, M. G., Fiorentino, M., Nannini, M., Lolli, C., Mandrioli, A., Gatto, L., Brandi, G., Biasco, G., Pinna, A. D., & Pantaleo, M. A. (2015). Molecular characterization of metastatic exon 11 mutant gastrointestinal stromal tumors (GIST) beyond KIT/PDGFR $\alpha$  genotype evaluated by next generation sequencing (NGS). *Oncotarget*, *6*(39), 42243–42257. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6278>
62. Sihto, H., Sarlomo-Rikala, M., Tynninen, O., Tanner, M., Andersson, L. C., Franssila, K., Nupponen, N. N., & Joensuu, H. (2005). KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha tyrosine kinase gene mutations and KIT amplifications in human solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *23*(1), 49–57. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.093>
63. Shi, E., Chmielecki, J., Tang, C. M., Wang, K., Heinrich, M. C., Kang, G., Corless, C. L., Hong, D., Fero, K. E., Murphy, J. D., Fanta, P. T., Ali, S. M., De Siena, M., Burgoyne, A. M., Movva, S., Madlensky, L., Heestand, G. M., Trent, J. C., Kurzrock, R., Morosini, D., ... Sicklick, J. K. (2016). FGFR1 and NTRK3 actionable alterations in "Wild-Type" gastrointestinal stromal tumors. *Journal of translational medicine*, *14*(1), 339. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1075-6>
64. Smits, A. J., Kummer, J. A., de Bruin, P. C., Bol, M., van den Tweel, J. G., Seldenrijk, K. A., Willems, S. M., Offerhaus, G. J., de Weger, R. A., van Diest, P. J., & Vink, A. (2014). The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate. *Modern pathology : an official journal of the United*

- States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 27(2), 168–174.  
<https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.134>
65. Stacey, D. W., Hitomi, M., & Chen, G. (2000). Influence of cell cycle and oncogene activity upon topoisomerase IIalpha expression and drug toxicity. *Molecular and cellular biology*, 20(24), 9127–9137.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.20.24.9127-9137.2000>
66. Tajima, S., Ohata, A., Koda, K., & Maruyama, Y. (2015). Myxoid epithelioid gastrointestinal stromal tumor harboring an unreported PDGFRA mutation: report of a case and review of the literature. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(5), 5821–5829.
67. Tang, C. M., Lee, T. E., Syed, S. A., Burgoyne, A. M., Leonard, S. Y., Gao, F., Chan, J. C., Shi, E., Chmielecki, J., Morosini, D., Wang, K., Ross, J. S., Kendrick, M. L., Bardsley, M. R., Siena, M., Mao, J., Harismendy, O., Ordog, T., & Sicklick, J. K. (2016). Hedgehog pathway dysregulation contributes to the pathogenesis of human gastrointestinal stromal tumors via GLI-mediated activation of KIT expression. *Oncotarget*, 7(48), 78226–78241. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12909>
68. Tornillo, L., & Terracciano, L. M. (2006). An update on molecular genetics of gastrointestinal stromal tumours. *Journal of clinical pathology*, 59(6), 557–563.  
<https://doi.org/10.1136/jcp.2005.031112>
69. van Oosterom, A. T., Judson, I., Verweij, J., Stroobants, S., Donato di Paola, E., Dimitrijevic, S., Martens, M., Webb, A., Sciot, R., Van Glabbeke, M., Silberman, S., Nielsen, O. S., & European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (2001). Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet (London, England)*, 358(9291), 1421–1423. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)06535-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)06535-7)

70. von Mehren, M., & Joensuu, H. (2018). Gastrointestinal Stromal Tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(2), 136–143. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.9705>
251. Wang, C. M., Fu, H., Zhao, G. F., Zhou, X. Y., Du, C. Y., Dong, R. Z., Zhou, Y., & Shi, Y. Q. (2009). Secondary resistance to imatinib in patients with gastrointestinal stromal tumors through an acquired KIT exon 17 mutation. *Molecular medicine reports*, 2(3), 455–460. [https://doi.org/10.3892/mmr\\_00000121](https://doi.org/10.3892/mmr_00000121)
71. Wardelmann, E., Thomas, N., Merkelbach-Bruse, S., Pauls, K., Speidel, N., Büttner, R., Bihl, H., Leutner, C. C., Heinicke, T., & Hohenberger, P. (2005). Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumours caused by multiple KIT mutations. *The Lancet. Oncology*, 6(4), 249–251. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70097-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70097-8)
72. Wardelmann, E., Merkelbach-Bruse, S., Pauls, K., Thomas, N., Schildhaus, H. U., Heinicke, T., Speidel, N., Pietsch, T., Buettner, R., Pink, D., Reichardt, P., & Hohenberger, P. (2006). Polyclonal evolution of multiple secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(6), 1743–1749. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1211>
73. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Soft tissue and bone tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer 2020. (WHO classification of tumours series, 5th ed. Vol. 3). <https://publications.iarc.fr/588>
74. Willasch, A. M., Gruhn, B., Coliva, T., Kalinova, M., Schneider, G., Kreyenberg, H., Steinbach, D., Weber, G., Hollink, I. H., Zwaan, C. M., Biondi, A., van der Velden, V. H., Reinhardt, D., Cazzaniga, G., Bader, P., Trka, J., & European Study Group on WT1 Expression in Childhood AML (2009). Standardization of WT1 mRNA quantitation for minimal residual disease monitoring in childhood AML and implications of WT1 gene mutations: a European multicenter study. *Leukemia*, 23(8), 1472–1479. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.51>

75. Wu, J., Zhou, H., Yi, X., He, Q., Lei, T., Tan, F., Liu, H., & Li, B. (2021). Targeted Deep Sequencing Reveals Unrecognized KIT Mutation Coexistent with NF1 Deficiency in GISTs. *Cancer management and research*, *13*, 297–306. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S280174>
76. Yeh, C. N., Chen, M. H., Chen, Y. Y., Yang, C. Y., Yen, C. C., Tzen, C. Y., Chen, L. T., & Chen, J. S. (2017). A phase II trial of regorafenib in patients with metastatic and/or a unresectable gastrointestinal stromal tumor harboring secondary mutations of exon 17. *Oncotarget*, *8*(27), 44121–44130. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17310>
77. Zheng, S., Huang, K. E., Jia, J., Li, X., & Tao, D. Y. (2013). Rhabdomyosarcomatous differentiation in gastrointestinal stromal tumors after imatinib resistance: a potential diagnostic pitfall. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, *238*(1), 120–124. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.012173>
78. Zhu, G., Shi, J., Zhang, S., Guo, Y., Huang, L., Zhao, H., Jiang, Y., & Sun, J. (2020). Loss of PI3 kinase association improves the sensitivity of secondary mutation of KIT to Imatinib. *Cell & bioscience*, *10*, 16. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-0377-9>
79. Zito Marino, F., Pagliuca, F., Ronchi, A., Cozzolino, I., Montella, M., Berretta, M., Errico, M. E., Donofrio, V., Bianco, R., & Franco, R. (2020). NTRK Fusions, from the Diagnostic Algorithm to Innovative Treatment in the Era of Precision Medicine. *International journal of molecular sciences*, *21*(10), 3718. <https://doi.org/10.3390/ijms21103718>

## 9. PUBLIKAČNÍ ČINNOST

### **Původní vědecké práce bez impakt faktoru, které jsou podkladem disertační práce**

1. **Augustiňáková (Kalfusová) A.** a Kodet R. (2010) Histopatologická a molekulární charakteristika a diagnostika gastrointestinálních stromálních tumorů. Aktuální pohled na léčbu GIST. Farmakoterapie. Speciální příloha, (6), 6 – 13.
2. **Augustiňáková (Kalfusová) A.** a Kodet R. (2011) Molekulární diagnostika gastrointestinálních stromálních tumorů ve vztahu k predikci terapeutické odpovědi na cílenou biologickou léčbu. *Cesk. Patol.* 47(4), 148 – 152.
3. **Kalfusová A.** a Kodet R. (2017) Molekulární mechanizmy primární a sekundární rezistence, molekulárně-genetické znaky a vlastnosti *KIT/PDGFR* nemutovaných GIST. *Cesk. Patol.* 53(4), 167 – 173.

### **Původní vědecké práce bez impakt faktoru, které nejsou podkladem disertační práce**

1. Kalinová M, Mrhalová M, Krsková L, Jungbauerová H, **Kalfusová A**, Mand'áková P, Čandová J, Soukup J, Camp V, Kodet R. (2014) Komplexní přístup v diagnostice lymfomů v praktických příkladech. *Cesk. Patol.* 50(3), 118 – 126.

### **Původní vědecké práce s impakt faktorem, které jsou podkladem disertační práce**

1. **A. Kalfusova**, I. Hilska, L. Krskova, M. Kalinova, Z. Linke, R. Kodet. (2016) Gastrointestinal stromal tumors – quantitative detection of the Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT telomerase subunit mRNA levels to determine proliferation activity and potential for aggressive biological behavior. *Neoplasma* 63(3) p. 484 – 492. (IF<sub>2016</sub> = 2.119)

2. **Kalfusova, A.**, Linke, Z., Kalinova, M., Krskova, L., Hilska, I., Szabova, J., Vicha, A., Kodet, R. (2019). Gastrointestinal stromal tumors - Summary of mutational status of the primary/secondary KIT/PDGFR $\alpha$  mutations, BRAF mutations and SDH defects. *Pathology, research and practice*, 215(12), 152708. Available online <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152708> (IF<sub>2019</sub> = **2.050**)

### **Původní vědecké práce s impakt faktorem, které nejsou podkladem disertační práce**

1. Fabian, O., Hradsky, O, Potuznikova, K, **Kalfusova, A.**, Krskova, L., Hornofova, L., Zamecnik, J., Bronsky, J. (2017) Low predictive value of histopathological scoring system for complications development in children with Crohn's disease. *Pathology-Research and Practice*. 213, 353 – 358. **publikace (IF<sub>2017</sub> = 1.466)**

2. Vasovcak, P., Krepelova, A., Menigatti, M., Puchmajerova, A., Skapa, P., **Augustinakova (Kalfusova), A.**, Amann, G., Wernstedt, A., Jiricny, J., Marra, G., Wimmer, K. (2012) Unique mutational profile associated with a loss of TDG expression in the reptal cancer of a patient with a constitutional *PMS2* deficiency. *DNA Repair* 11, 616-623. **publikace (IF<sub>2012</sub> = 4.274)**

### **Přednášky a plakátová sdělení na odborných setkáních**

*International Scientific Meeting, Association of Clinical Pathologist*, 12.6. – 13.6.2008, Praha, **Posterová prezentace:** Significance of mutational analysis of the receptor tyrosine kinases KIT and PDGFR $\alpha$  in patients with gastrointestinal stromal tumor

Cena za nejlepší posterovou prezentaci (**Best poster presentation**)

**35. Sjezd českých patologů**, 18.6. – 19.6.2008, Brno, **Přednáška:** Význam mutační analýzy genů receptorových tyrosinkináz KIT a PDGFR $\alpha$  u pacientů s gastrointestinálními stromálními nádory

*Clinical Cancer Immunotherapy and Translational Research*, 19.11. – 21.11.2009, Havana, **Vyzvaná přednáška:** Prognostic significance of GIST with regard to the activity of proliferation markers and the telomerase subunit hTERT

*ASCO Annual Meeting*, 4.6. – 8.6.2010, Chicago (USA), **Posterová prezentace:** Prognostic significance of proliferation markers and telomerase activity in gastrointestinal stromal tumors

**2. mezioborové onkologické kolokvium PragueONCO 2011**, 27.1. – 28.1.2011, Praha, **Posterová prezentace:** Prediktivní a prognostický význam molekulární analýzy gastrointestinálních stromálních nádorů

*XVII. pracovní setkání a fórum onkologů a zástupců zdravotních pojišťoven – Molekulární diagnostika v onkologii – vliv na efektivitu a náklady onkologické léčby*, 27.5.2011, Brno, **Vyzvaná přednáška:** Vyšetřování mutací c-kit a PDGFRA u gastrointestinálních stromálních nádorů k doplnění indikace terapie imatinib mesylátem

*Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky CLS JEP a 44. cytogenetické konference* 7.9. – 9.9.2011, Třeboň, **Přednáška:** Molekulární diagnostika gastrointestinálních stromálních nádorů v kontextu komplexní histopatologické diagnostiky GIST

*24th European Congress of Pathology*, 8.9. – 12.9.2012, Kongresové centru v Praze, **Posterová prezentace:** Role sekundárních mutací v mechanismu vývoje lékové rezistence u pacientů s GIST

*9. sympozium a workshop molekulární patologie a histo(cyto)chemie, 99. olomoucký diagnostický seminář české divize IAP a 5. olomoucké dny histologických laborantů*, 26.4. – 27.4.2013, Olomouc, **Posterová prezentace:** Přehled primárních a sekundárních mutací s ohledem na význam detekce primární a sekundární rezistence u pacientů s gastrointestinálním stromálním nádorem



*3<sup>rd</sup> Annual Oncology Biomarkers Congress and 2<sup>nd</sup> Annual Oncology Clinical Development Congress*, 14.10. – 15.10.2013, Manchester, **Posterová prezentace:** The detection of activity of selected proliferative biological markers to determine potential aggressive biological behaviour and prognosis of gastrointestinal stromal tumours

*21. Sjezd českých a slovenských patologů*, 7.11. – 8. 11.2014, Praha, **Posterová prezentace:** Přehled zajímavých případů v molekulární diagnostice mutací genů *KIT*, *PDGFRA* a *BRAF* u pacientů s gastrointestinálním stromálním nádorem.

*Vědecká konference 2. LF UK, 9.4. – 10.4.2014*, Praha, **komentovaný poster:** Přehled vyšetření primárních a sekundárních mutací v genech *KIT* a *PDGFRA* u pacientů v rámci komplexní diagnostiky gastrointestinálních stromálních nádorů a rozšíření molekulární analýzy o stanovování mutací v genu *BRAF*

*Satelitní sympozium u konference DDPEO*, 2.12.2014, Olomouc, **Přednáška:** Prediktivní genetické biomarkery u GIST

*Dni molekulovej patológie, 11. sympóziium molekulovej patológie s medzinárodnou účasťou a Martinské dni nelekárskych pracovníkov v patológii*, 4.6. – 5.6.2015, Martin, **Vyzvaná přednáška:** Prediktivní význam molekulární diagnostiky pacientů s gastrointestinálním stromálním nádorem

*20th World Congress on Advances in Oncology and 18th International Symposium on Molecular Medicine*, 8.10. – 10.10.2015, Atény, **Posterová prezentace:** Secondary mutations in the *KIT* gene and mutation analysis of the *BRAF* gene in the patients with gastrointestinal stromal tumors, implication of their assessment.

*Setkání účastníku ReGISTer*, 2017, Praha, **Vyzvaná přednáška:** Novinky v molekulární diagnostice gastrointestinálních stromálních nádorů

*Institucionální podpora FNM*, hodnocení projektů interních grantů v rámci Institucionální podpory FNM, 2018, Praha, **Přednáška:** Gastrointestinální stromální nádory – část jedné problematiky z blízka

*Vědecká konference 2. LF UK*, 10.4. – 11.4.2019, Praha, **komentovaný poster:** Význam klonální evoluce sekundárních mutací na intra a intertumorální heterogenitu s ohledem na rezistenci na terapii inhibitory RTK u pacientů s GIST.

*47. Sjezd českých patologů a 25. Sjezd České společnosti histopatologických laborantů*, 3.11. – 5.11.2022, Praha, **poster:** Molekulární podtypy *KIT/PDGFR*A nemutovaných gastrointestinálních stromálních nádorů

