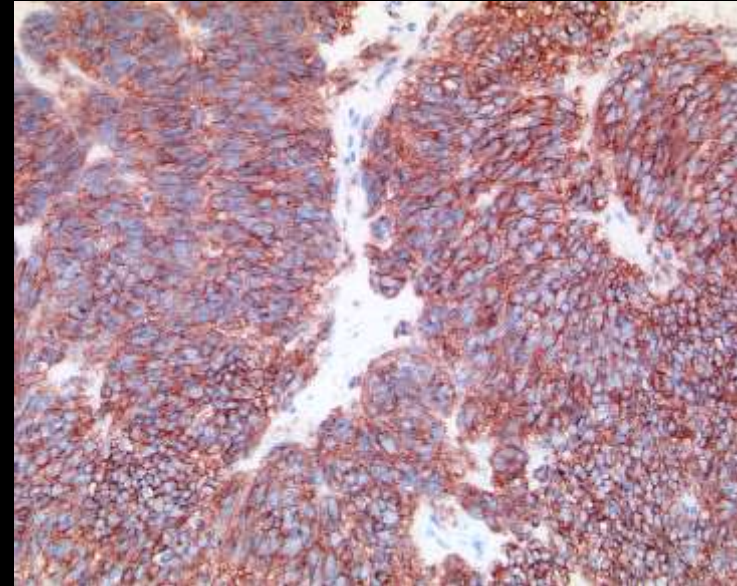


Mutationsanalyse und andere genetische Untersuchungen bei GIST – Was ist sinnvoll?

Was macht der KIT-Rezeptor im GIST?



H1497/20 Magen



CD117-Immunhistochemie

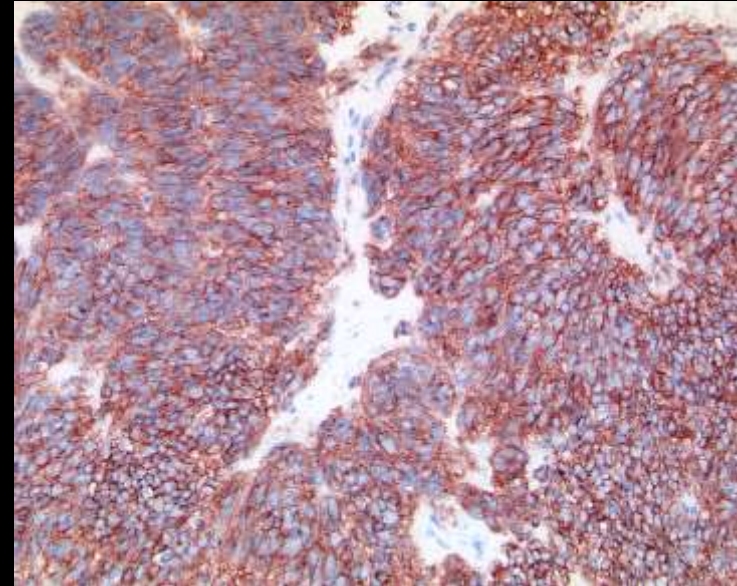
CD117 = KIT-Rezeptor

Der KIT-Rezeptor dreidimensional



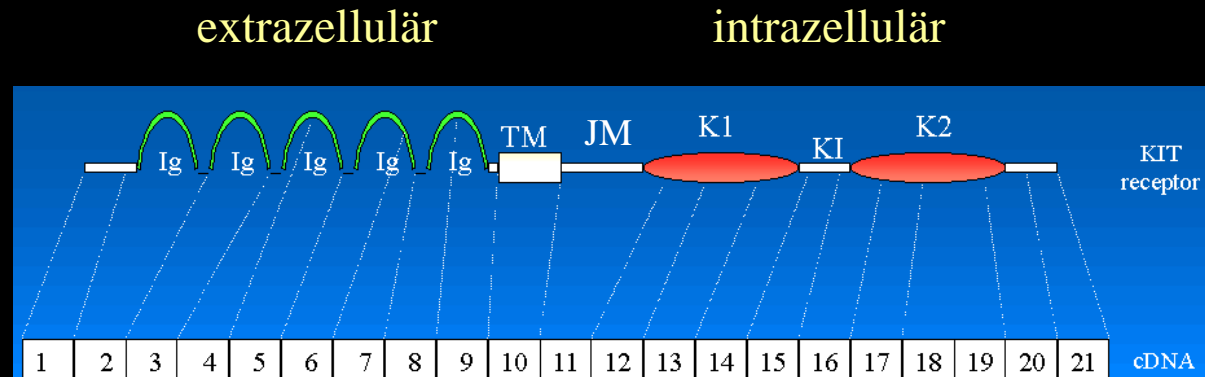
in grün: Imatinib
(Glivec®)

Mol, C. D. et al.
J. Biol. Chem. 2004;
279:31655-31663



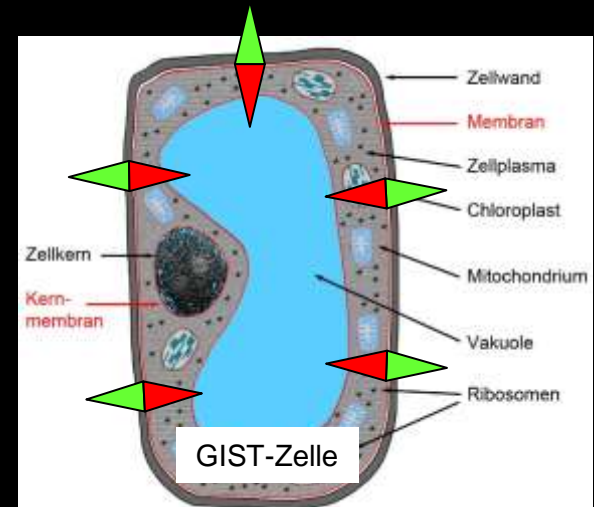
CD117-Immunhistochemie

Der KIT-Rezeptor zweidimensional und seine Position in der GIST-Zelle

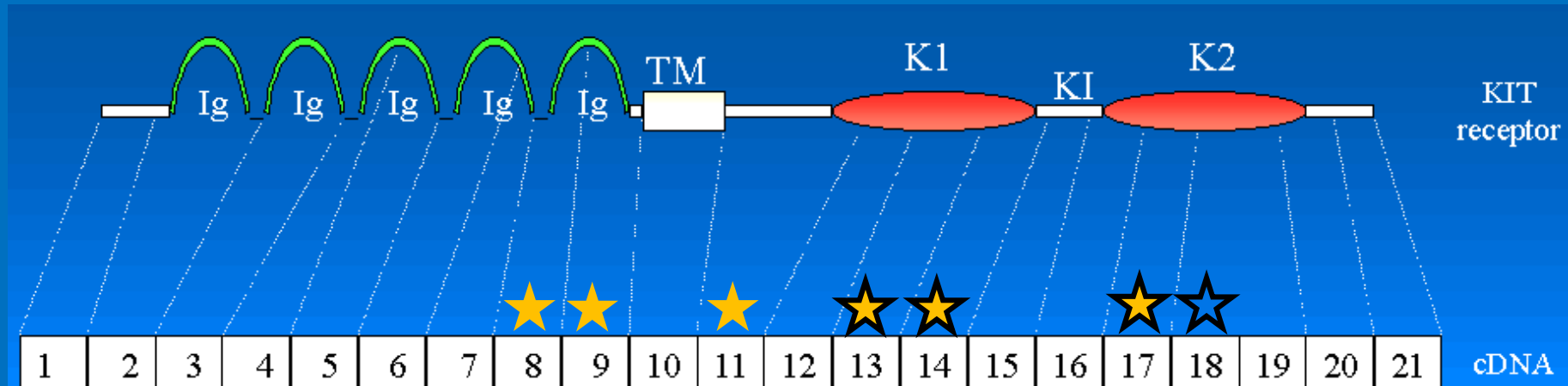


21 Exone auf Chromosom 4q12

- Ig Immunglobulinähnliche Schleife
- TM Transmembrandomäne
- JM Juxtamembrandomäne
- K1 Tyrosinkinasedomäne 1
- KI Kinaseinsert
- K2 Tyrosinkinasedomäne 2

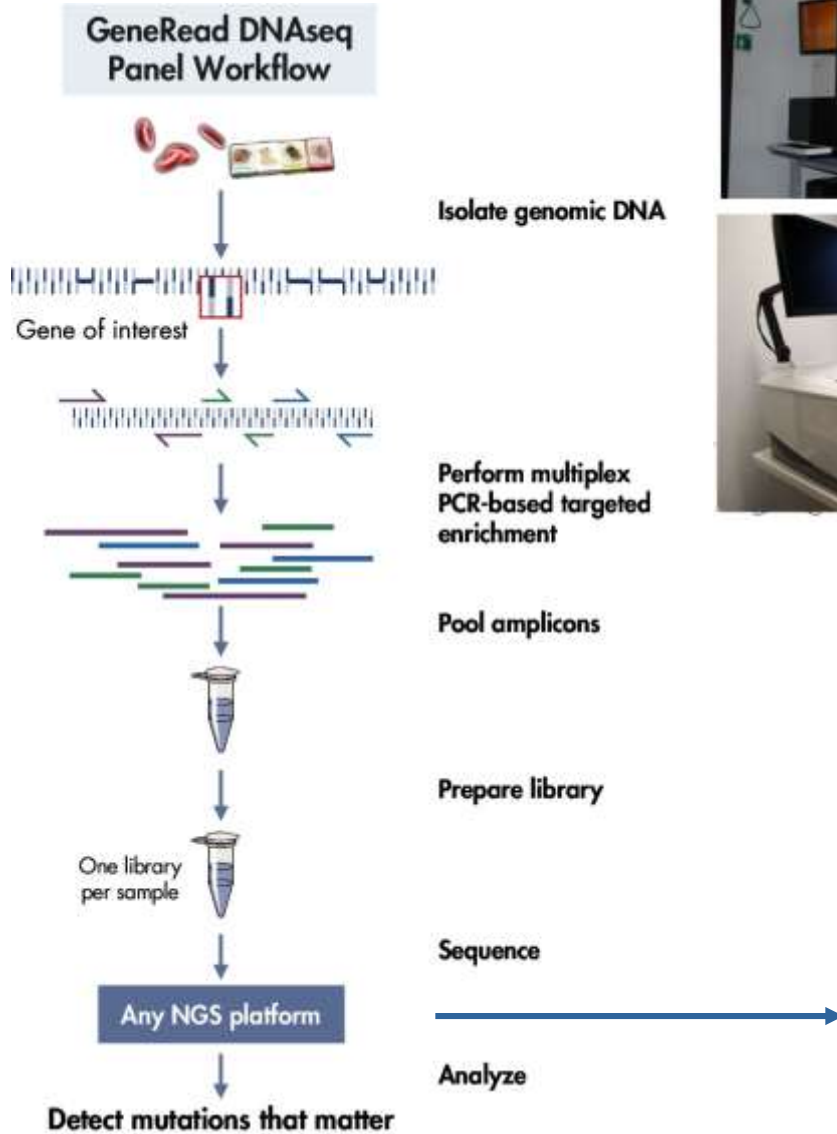


Wo liegen die Mutationen im KIT- bzw. PDGFRA-Rezeptor?



KIT-Gen: 21 Exons

Next Generation Sequencing (NGS) - Workflow



Illumina
HiSeq +
MiSeq



Ion Torrent
PGM



Roche
GS FLX



Roche
454 Junior

MiSeq - Illumina



Vorteile des Next Generation Sequencing (NGS)

- eine geringe DNA Menge reicht aus
- gleichzeitige Analyse zahlreicher Gene
- Mengenbestimmung der mutierten DNA ist möglich
- Nachweis auch nur gering vorhandener (resistenter) Subklone ist möglich

Next Generation Sequencing bei GIST Technologievergleich



**Next-Generation
sequencing**

PDGFRA

Exon 18

**RESULTAT:
p.D842V**



VS

**SANGER
sequencing**

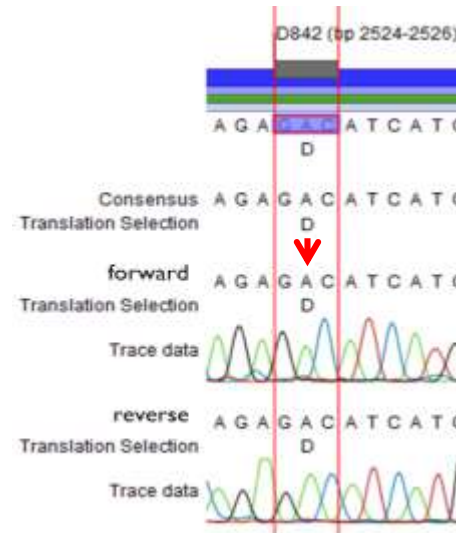


> Nachweisgrenze
(+/- 15-20%)

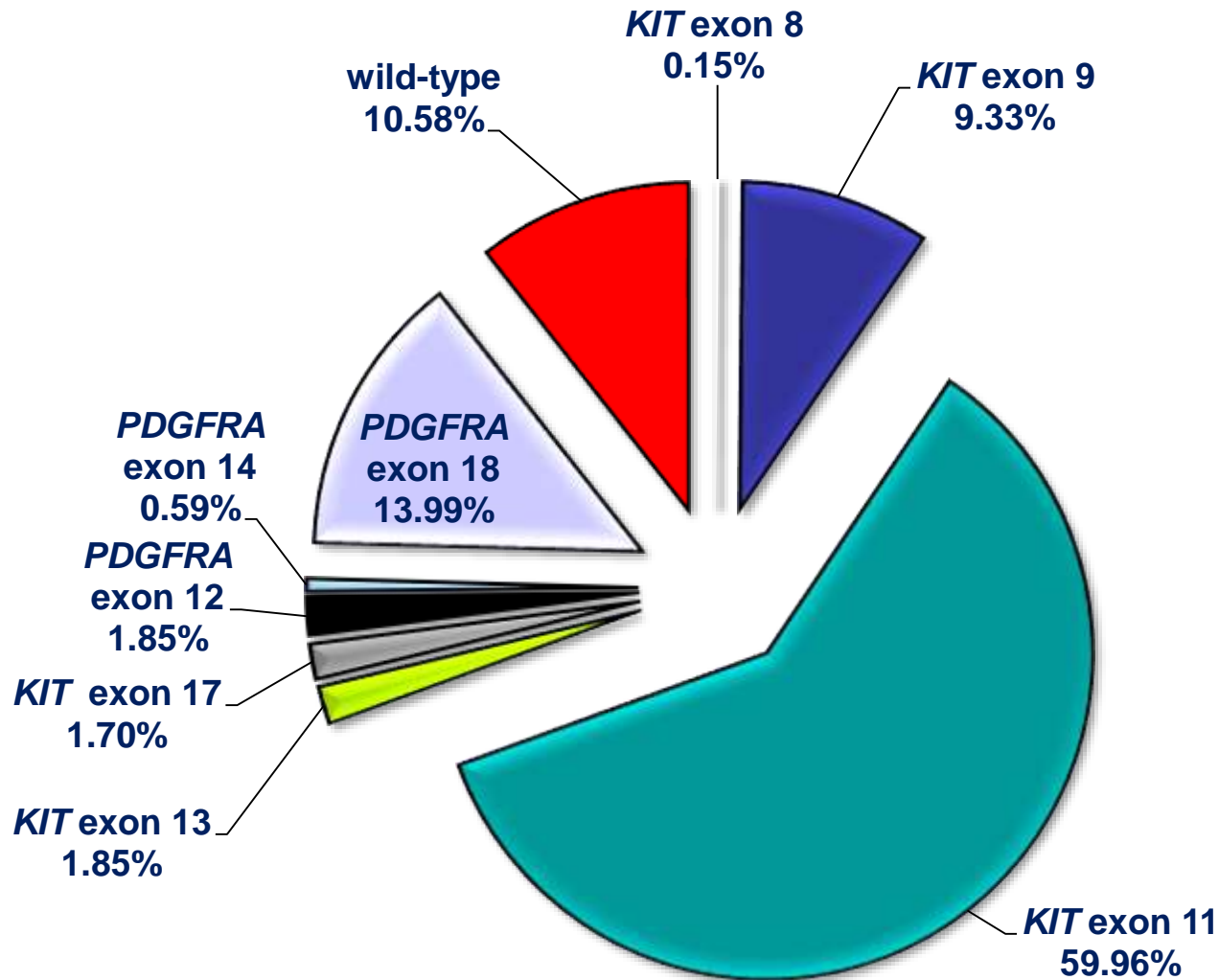
PDGFRA

Exon 18

**RESULTAT:
WILD TYP**



KIT und *PDGFRA* Mutationen treten in 85% bis 90% der GIST auf (n=1351)



Der Mutationstyp ist wichtig für die Prognose und das Ansprechen auf die Therapie mit Imatinib

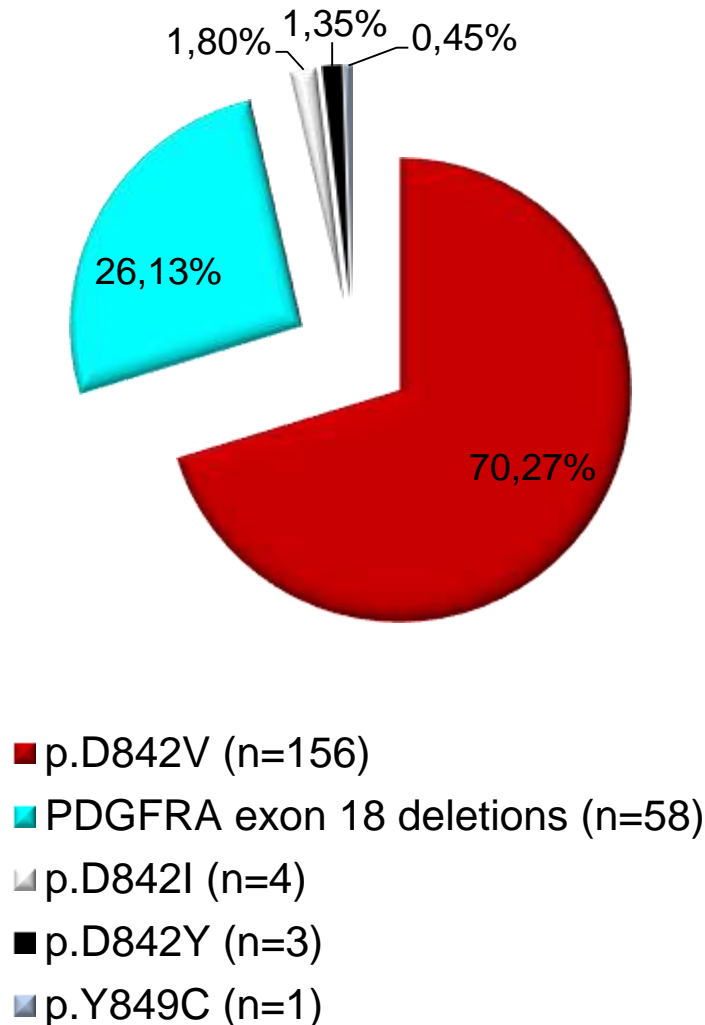
Prognose

- aggressivere Subtypen (z. B. Deletionen in *KIT* Exon 11)
- weniger aggressive Subtypen (*PDGFRA* Mutationen)

Prädiktion

- *KIT* Exon 11 bestes Ansprechen
- *KIT* Exon 9 mittleres Ansprechen
- *PDGFRA* Exon 18 D842V resistent
- sekundäre *KIT* Mutationen als Ursache eines Therapieversagens

Imatinib-Resistenz: *PDGFRA*-Mutation p.D842V

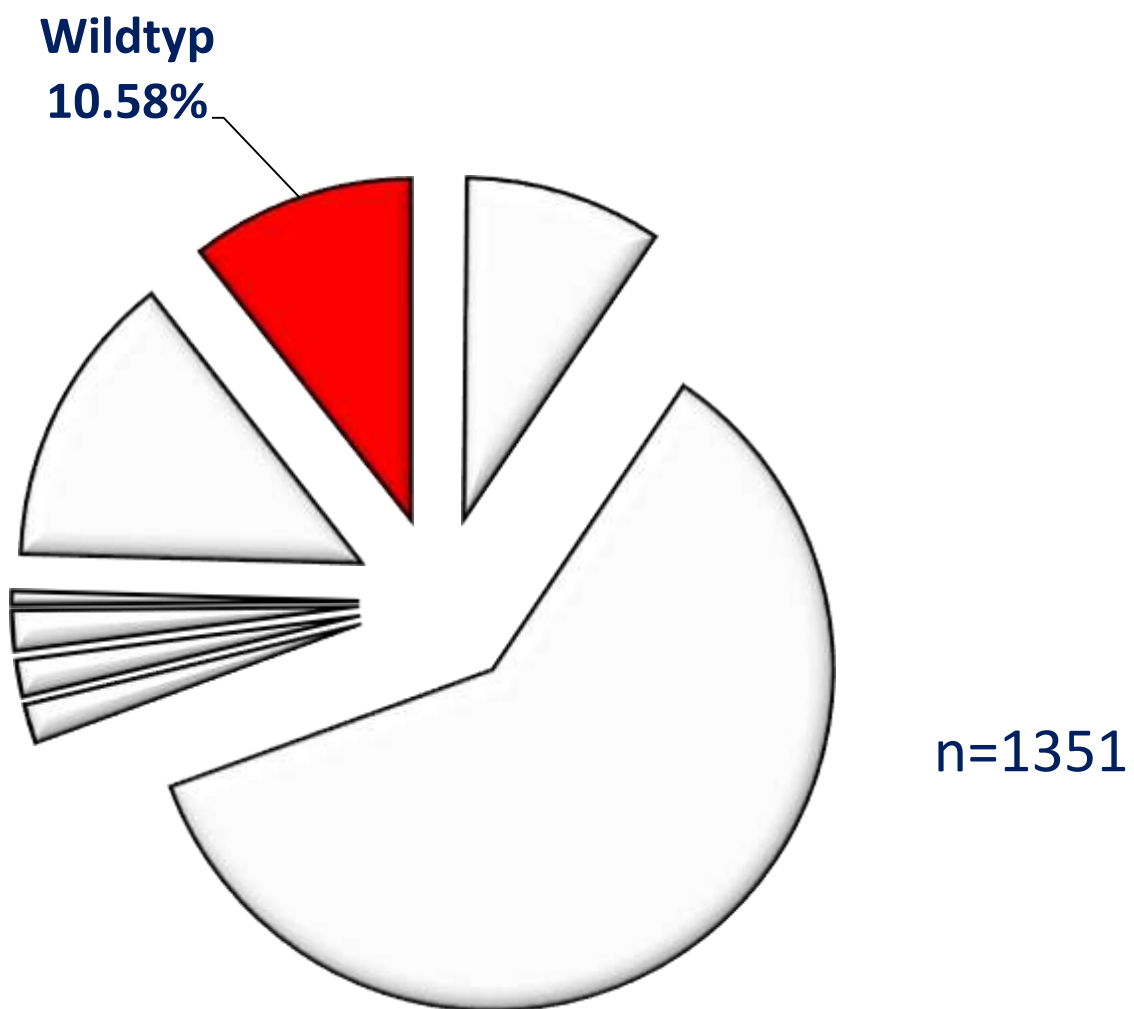


- 15% aller GIST tragen eine *PDGFRA* Exon 18 Mutation
- nahezu alle sind im Magen lokalisiert

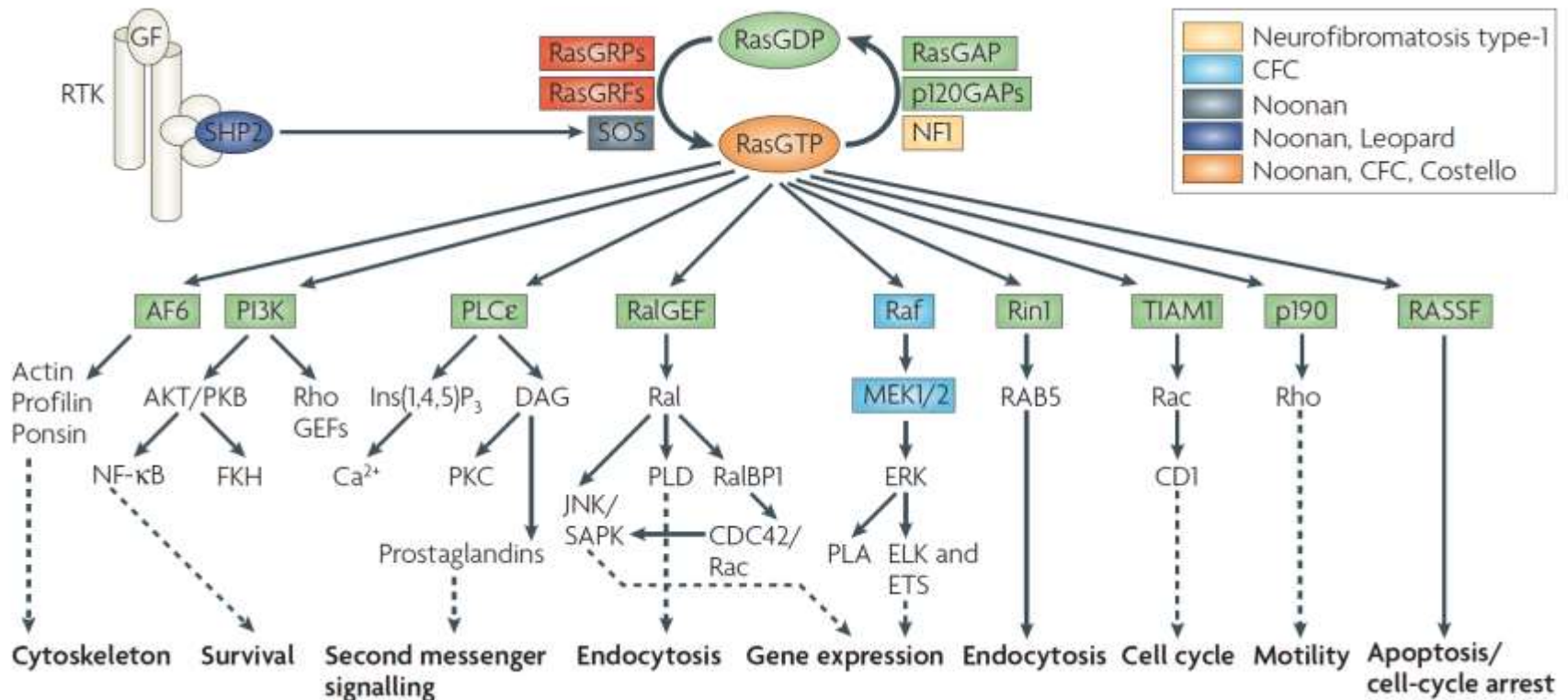
~70% aller in Magen-GIST lokalisierten *PDGFRA* Exon 18 Mutationen sind p.D842V!

Insgesamt tragen 10% aller GIST die Resistenzmutation p.D842V!

Und wenn keine *KIT*- oder *PDGFRA*-Mutation nachweisbar ist?



Alternative Mutationen bei GIST ohne KIT/PDGFR α Mutation - Neurofibromatose Typ 1 Mutationen -



Karnoub and Weinberg, Nature reviews 2008

Die Häufigkeit von GIST bei NF1 Patienten ist 7%.

Alternative Mutationen bei GIST ohne *KIT*/*PDGFRA* Mutation - *KRAS* Mutationen -

Novel Oncogene and Tumor Suppressor Mutations in *KIT* and *PDGFRA* Wild Type Gastrointestinal Stromal Tumors Revealed by Next Generation Sequencing

Jaclyn Frances Hechtman,^{1,*} Ahmet Zehir,¹ Talia Mitchell,¹ Laetitia Borsu,¹ Samuel Singer,² William Tap,³ Alifya Oultache,¹ Marc Ladanyi,^{1,4} and Khedoudja Nafa¹

TABLE 2. Previously Reported Cases of *KRAS*-Mutant GISTs

Case	<i>KRAS</i> mutation	<i>KIT</i> / <i>PDGFRA</i> mutation	Organ	Risk	<i>KIT</i> IHC	Response to Imatinib
Miranda et al. (2012)	G12D	<i>KIT</i> Δ570-576	Stomach	High	+	Unknown
Miranda et al. (2012)	G12A/ G13D	<i>KIT</i> Δ579	Small bowel	Intermediate	+	Unknown
Miranda et al. (2012)	G13D	<i>PDGFRA</i> D842V	Stomach	Low	+	Unknown
Antonescu et al. (2013)	G12V	<i>KIT</i> Δ557-558	Small bowel	High	-	None
Serrano et al. (2014)	G12R	<i>KIT</i> Δ554-559	Stomach	High	+	Limited to <i>KRAS</i> wild type nodule
Current	G12V	None	Stomach	High	+	None

GCC, 2014

Alternative Mutationen bei GIST ohne *KIT/PDGFR*A Mutation - *BRAF*-Mutationen -

Agaram GCC 2008

BRAF MUTATIONS IN GIST

855

TABLE I. Clinical and Pathologic Findings in BRAF mutated GIST patients

	Age/Sex	Primary Tumor Size (cm)	Primary Tumor Site	MF/50 HPF	Stage at presentation	CD117	PTEN	PI6	LFU/mo
1 ^a	52/F	10	SB	90	Periton Mets	P	P	N	DOD/18
2	55/F	10	SB	5	Primary	P	NA	NA	NED/9
3	49/F	9	SB	50	Primary	P	P	P	NED/13
4 ^b	66/M	20	Stomach	68	Primary	N	N	N	NED/32

F, female; M, male; cm, centimeters; SB, small bowel; periton mets, peritoneal metastases; MF, mitotic figures; HPF, high power fields; P, positive; N, negative; DOD, dead of disease; NED, no evidence of disease; AWD, alive with disease; NA, not available, LFU, last follow-up; mo, months.

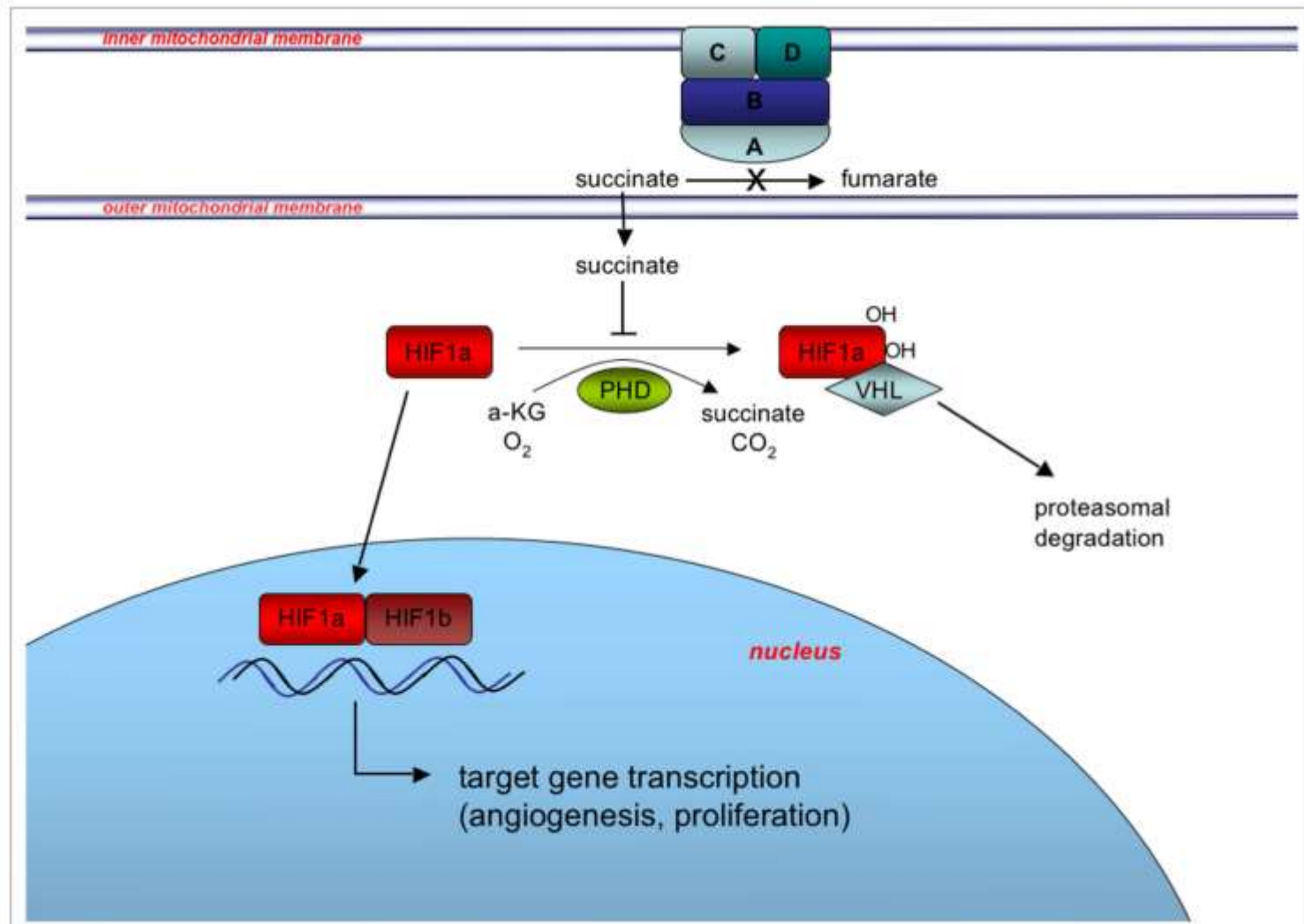
^aGenotyping on normal tissue as well.

^bImatinib resistant GIST.

		wt	<i>KIT</i> -mutant	<i>PDGFR</i> A-mutant
BRAF	wild type	172	228	44
	mutant	7 (3.9%)	0	0
		179	228	44

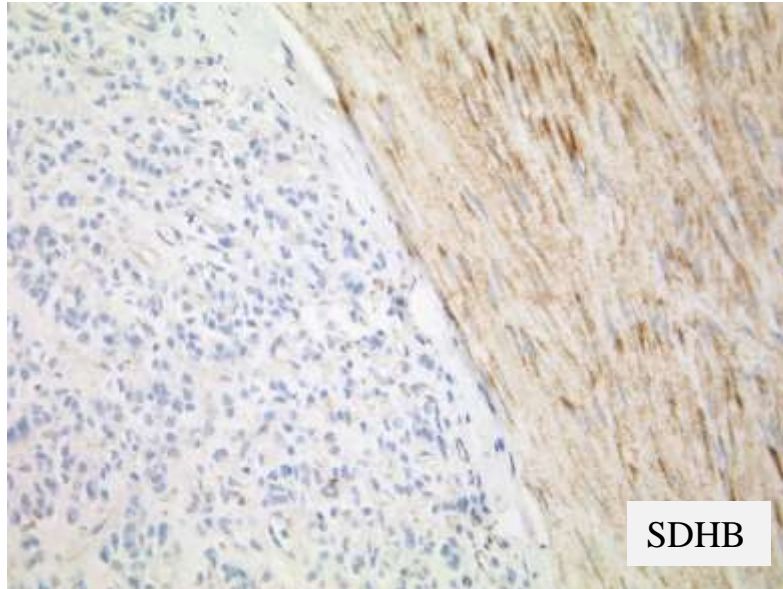
Huss, S et al. Hum Pathol 2017

Alternative Mutationen bei GIST ohne *KIT/PDGFR*A Mutation - Succinatdehydrogenase-Mangel -

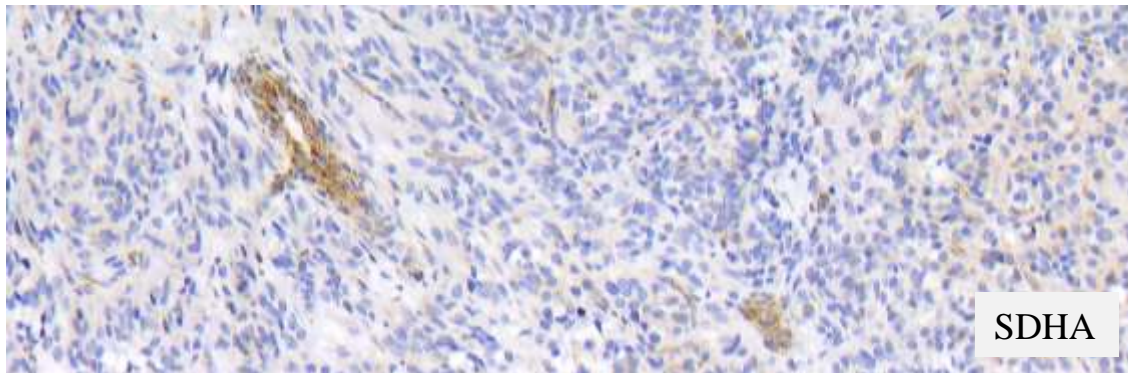


Belinsky et al., Frontiers in Oncology 2013

Der immunhistochemische Ausfall der SDHB- Färbung weist auf einen Defekt im SDH-Komplex hin

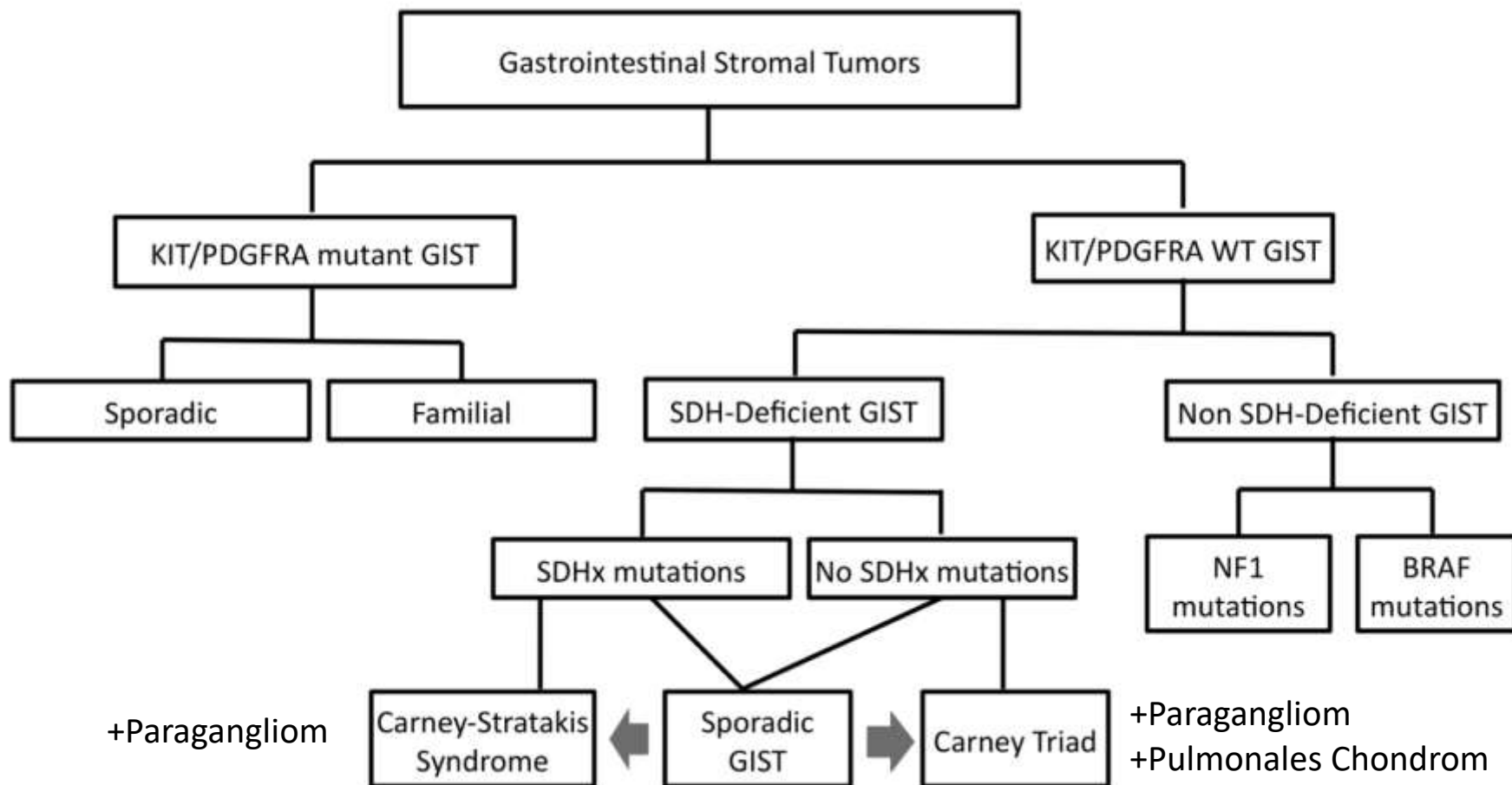


SDHB-Mangel spricht für eine Alteration in egal welchem SDH-Komplexpartner (SDHA/B/C/D)



SDHA-Mangel weist auf eine SDHA Alteration hin

Molekulare Einteilung von GIST



mod. acc. to Boikos and Stratakis, Endocrine 2014

Genomische Entwicklung bei manchen GIST

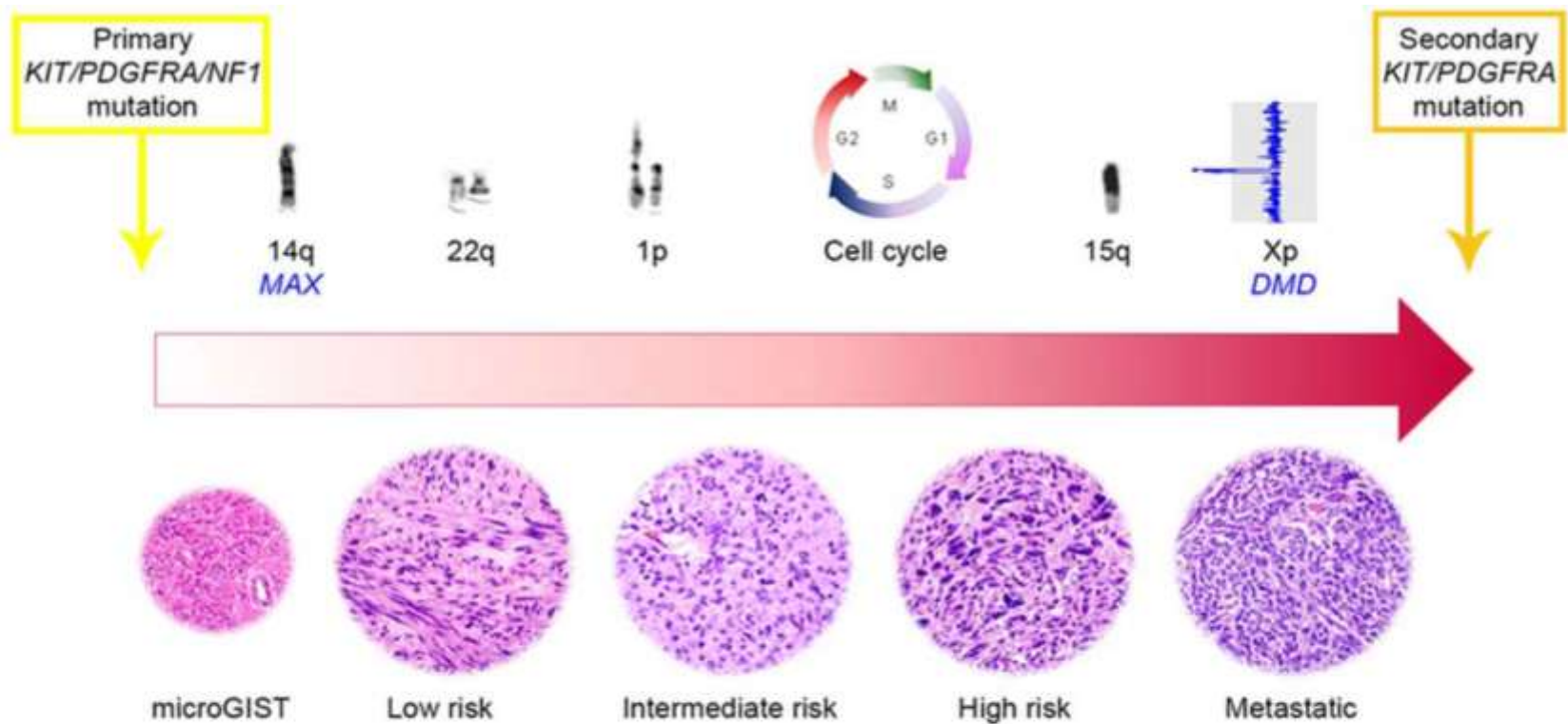
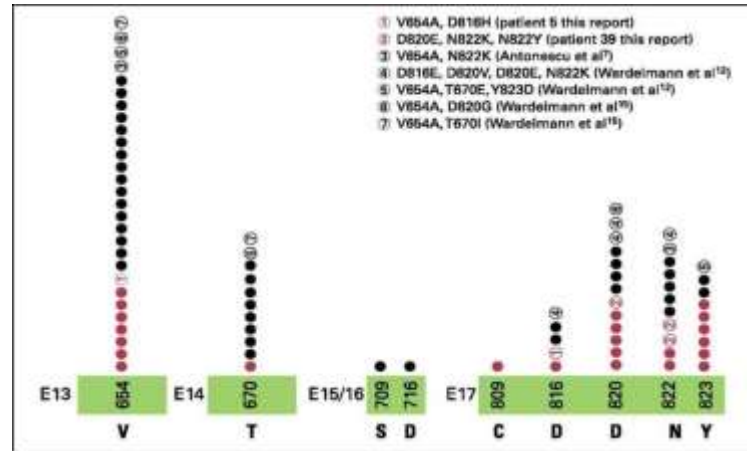
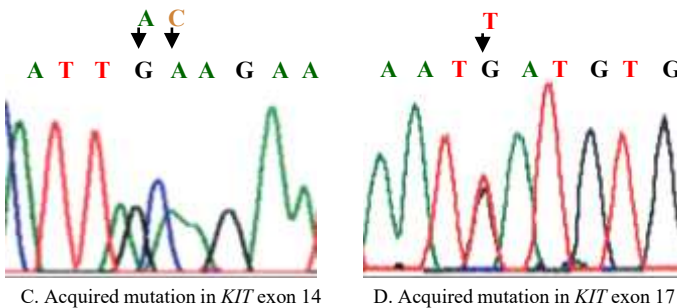
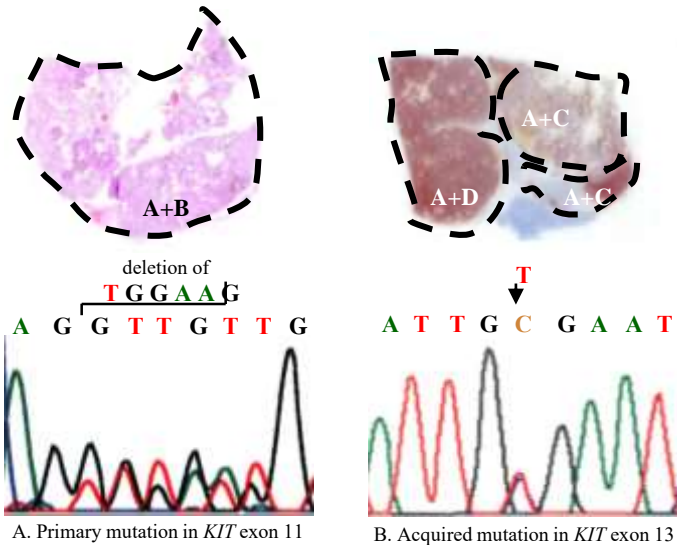


FIGURE 4. Model of gastrointestinal stromal tumor (GIST) genomic progression. Primary *KIT*, *PDGFRΑ* or *NF1* mutations represent the initiating oncogenic driver events in most GISTs and are followed by stepwise accumulation of chromosomal aberrations, harboring putative tumor suppressor genes, and cell cycle dysregulating events. Metastatic GISTs develop treatment resistance through evolving tyrosine kinase inhibitor-resistant subclones with additional secondary *KIT* or *PDGFRΑ* mutations.

MAX – Myc associated factor X
 DMD – gene encoding dystrophin
 Verlust von p16, p53 und Rb1

IM Schaefer et al. 2017 Adv. Anat. Pathol
 IM Schaefer et al. 2016 Nature Comm

Sekundäre *KIT* Mutationen bei Imatinib-resistenten GIST

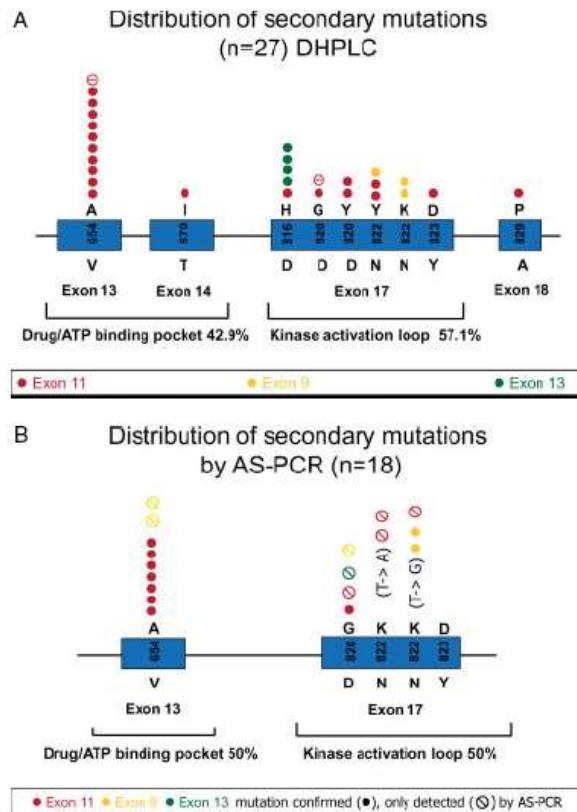


Heinrich MC et al. *J Clin Oncol.* 2006

Es kann sich mehr als eine Resistenzmutation in einem wieder auftretenden GIST entwickeln.

Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST

B Liegl,^{1,2} I Kepten,³ C Le,³ M Zhu,¹ GD Demetri,⁴ MC Heinrich,^{5,6} CDM Fletcher,¹ CL Corless³ and JA Fletcher^{1*}



Journal of Pathology
J Pathol 2008; **216**: 64–74

Figure 2. (A) Summary of secondary *KIT* resistance mutations detected by D-HPLC in 27/57 tumour samples from 14 patients with progressing GISTs. Associated primary *KIT* mutations are indicated in red (exon 11 mutations), yellow (exon 9 mutations) and green (exon 13 mutations). (B) Summary of secondary *KIT* resistance mutations detected by AS-PCR only (⊙) or detected by both AS-PCR and D-HPLC (●) in 18 tumour samples. Associated primary *KIT* mutations are indicated in red (exon 11 mutations), yellow (exon 9 mutations) and green (exon 13 mutations).

Je sensitiver die Nachweismethode, desto mehr Sekundärmutationen können gefunden werden.

Schlussfolgerungen

GIST-relevante Gene bei Erstdiagnose:

KIT Exons 8, 9, 11, 13, 17

PDGFRA Exons 12, 14, 18

SDHA-D (genetische und epigenetische Alterationen)

KRAS, BRAF

NF1

GIST-relevante Gene bei Rückfall:

KIT Exons 13, 14, 17, 18

MAX (Myc associated factor X)

DMD (gene encoding dystrophin)



Offene Fragen bei der Mutationsanalyse

- Bei welchen GIST? Abhängig vom Risikoprofil?
- Welche Methode zur Genanalyse ist am besten?
- Zahlt das die Krankenkasse?
- Welche Rolle spielen Untersuchungen am Blut (“liquid biopsy”)?

