

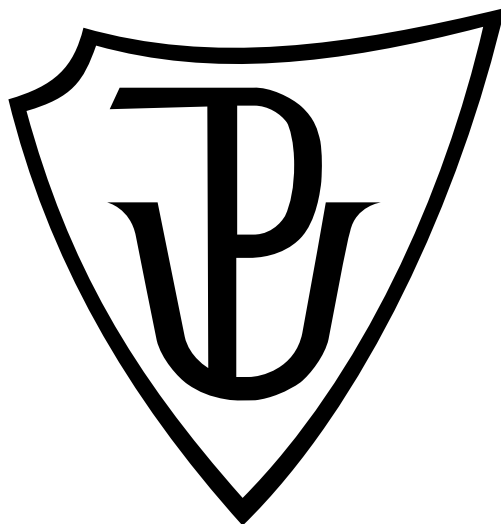
Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Agáta Kubíčková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Exprese proteinu RBPMS2, proteinová reparace
DNA a diferenciacie u GIST**

Bakalářská práce

Agáta Kubíčková

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: MUDr. et MVDr. Jozef Škarda, Ph.D., Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením MUDr. *et* MVDr. Jozefa Škardy, Ph.D., Ph.D. a uvedla jsem všechny použité prameny a literaturu.

V Olomouci dne 7. 5. 2014

Souhrn

Gastrointestinální stromální tumory jsou nejčastějšími mesenchymálními nádory trávicího traktu, s patrnou diferenciací podél linie intersticiálních Cajalových buněk. Tyto nádory nyní vzbuzují zvláštní zájem vzhledem k jejich dobré reakci na cílenou terapii tyrozinkinázovými inhibitory.

V rámci této bakalářské práce byla studována exprese proteinů RBPMS2, hMLH1, hMSH2, p53 a p21 pomocí nepřímé dvoustepňové imunohistochemie ve vzorcích gastrointestinálních stromálních tumorů. Experimentálně získané hodnoty exprese těchto proteinů byly korelovány se stupněm rizika rekurence, progresí tumoru, aplikovanou terapií a velikostí tumoru za použití neparametrického statistického testu Mann-Whitney.

Výsledky této práce potvrdily souvislost mezi overexpresí proteinů p53, p21 a zvýšeným rizikem progresu gastrointestinálních stromálních tumorů (p53: $p = 0,022$; p21: $p = 0,044$). Čímž se podpořila možnost využití p21 jako nového nezávislého prognostického markeru umožňujícího stanovit malignitu gastrointestinálních stromálních tumorů.

Dále byla analyzována exprese proteinů hMLH1 a hMSH2, podílejících se na reparaci DNA. A byla zjištěna signifikantní korelace mezi expresí hMLH1, rizikem rekurence ($p = 0,027$) a velikostí tumoru ($p = 0,013$) související s vysokou mitotickou aktivitou maligních gastrointestinálních stromálních tumorů.

V rámci souboru testovaných vzorků nebyl prokázán signifikantní vztah mezi expresí RBPMS2 a rizikem rekurence ($p = 0,520$). Předpokládané využití RBPMS2 ke stanovení prognózy pacientů s gastrointestinálními stromálními tumory tedy nebylo potvrzeno. Výsledky ale podpořily použití RBPMS2 jako nového diagnostického markeru gastrointestinálních stromálních tumorů.

Summary

Gastrointestinal stromal tumours are the most common mesenchymal neoplasms of the gastrointestinal tract with a noticeable differentiation along the line of the interstitial cells of Cajal. These tumours now arouse particular interest, because of their good response to the targeted therapy by tyrosine kinase inhibitors.

As a part of this bachelor`s thesis expression of proteins RBPMS2, hMLH1, hMSH2, p53 and p21 was studied by indirect two-step immunohistochemistry which was done in histological tissue sections of gastrointestinal stromal tumours. The experimentally obtained values of the expression of these proteins were correlated with the degree of risk of recurrence, tumour progression, applied therapy and tumour size by using Mann-Whitney non-parametric statistical test.

The results of this study confirmed the correlation between overexpression of p53, p21 and an increased risk of progression of gastrointestinal stromal tumours (p53: $p = 0.022$; p21: $p = 0.044$). Thus support the possibility of using p21 as a new independent prognostic marker for determining malignancy of gastrointestinal stromal tumours.

Furthermore, the expression of proteins hMLH1 and hMSH2, which are involved in DNA repair, was analysed. A significant correlation was found between expression of hMLH1 and the risk of recurrence ($p = 0.027$) and tumour size ($p = 0.013$), which is related with a high mitotic activity of malignant gastrointestinal stromal tumours.

In the set of analysed tissue sections the significant correlation between the expression of RBPMS2 and the risk of recurrence was not proved ($p = 0.520$). The intended use of the RBPMS2 for determining the prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumours had not been confirmed. However, the results supported the use of RBPMS2 as a new diagnostic marker of gastrointestinal stromal tumours.

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu MUDr. *et* MVDr. Jozefu Škardovi, Ph.D., Ph.D. za čas, vstřícnost a cenné rady, které mi poskytl během tvorby této bakalářské práce. Zároveň bych chtěla velmi poděkovat lékařům Ústavu klinické a molekulární patologie Fakultní nemocnice Olomouc za stanovení histopatologických charakteristik zpracovávaných vzorků a laborantkám téhož pracoviště za provedení imunohistochemického barvení většiny vzorků. Děkuji také Giorgi Mgbreshvilimu za statistické zpracování výsledků.

Obsah

1.	Úvod	7
2.	Současný stav řešené problematiky	9
2.1.	Diagnostika GIST	9
2.2.	Histologická klasifikace GIST	9
2.3.	Syndromy spojované s GIST	10
2.4.	Molekulární klasifikace GIST	11
2.5.	KIT a PDGFRA	11
2.6.	RBPM2	13
2.6.1.	Vliv RBPM2 na vznik GIST	15
2.7.	Oprava chybného párování bází řízená metylací	17
2.8.	p53	21
2.9.	p21	22
2.10.	Prognostické faktory	23
2.11.	Léčba GIST	24
3.	Cíle práce	28
4.	Materiál a metodika	29
4.1.	Materiál	29
4.2.	Metodika	30
4.2.1.	Imunohistochemická detekce antigenů ve tkáních	30
4.2.2.	Statistické metody	33
5.	Výsledky	34
6.	Diskuze	39
7.	Závěr	41
8.	Literatura	42
9.	Seznam použitých zkratk a symbolů	50

1. Úvod

Gastrointestinální stromální tumor (GIST, gastrointestinal stromal tumours) je nádor trávicího traktu tvořený buňkami vřetenitými nebo epiteloidními. Původ tohoto nádoru není jasný. Předpokládá se, že vzniká z progenitorové buňky diferencující se směrem k intersticiálním Cajalovým buňkám (ICC, interstitial cells of Cajal), nebo z prekursorů buněk hladkého svalstva gastrointestinálního traktu (Miettinen a Lasota, 2001).

GIST je jedním z nejčastěji se vyskytujících mesenchymálních nádorů trávicího traktu a ze všech maligních tumorů gastrointestinálního traktu je zastoupen 0,1 % - 3,0 %, přičemž ročně je tento typ nádoru diagnostikován 11 - 14 osobám na milion obyvatel. GIST se vyskytuje zejména u osob kolem 60. roku věku a mírnou většinu případů tvoří muži. Mezi časté symptomy tohoto onemocnění patří krvácení do trávicího traktu typu: okultního krvácení, enterorrhagie, melény, hematemézy, jejichž následkem je anemie. Dále bývají přítomny nespecifické bolesti břicha, nevolnost, zvracení následované úbytkem hmotnosti. GIST se snadno šíří v těle pacienta a metastazuje formou diseminace do peritonea, omenta, mesenteria a v některých případech krevním řečištěm do jater (Rammohan *et al.*, 2013). GIST se vyskytuje nejvíce v žaludku 39 % - 60 %, dále v tenkém střevě 30 % - 42 %, tlustém střevě včetně konečníku 5 % - 11 %, a vzácněji v jícnu < 5 %, druhotně se vyskytuje v omentu, mesenteriu, peritoneu, retroperitoneu 5 % - 7 % (Hersh *et al.*, 2005; Horton *et al.*, 2004). GIST vychází většinou z *muscularis propria* a poté se vyklenuje častěji do lumen trávicí trubice či na její serózní povrch. GIST je od okolní tkáně zřetelně ohraničen, někdy jej obklopuje pseudokapsula, která může tumor členit septy na pseudolobuly. Menší tumory jsou na řezu bílé, homogenní konzistence a vláknité struktury. U větších tumorů bývá pozorována jejich degradace jako je kalcifikace, nekróza a prokrvácení spojené s pseudocystickou přeměnou (Miettinen *et al.*, 2005).

K potvrzení diagnózy GIST se používá imunohistochemická detekce receptorové tyrozinkinázy KIT. Gen kódující KIT je často u tohoto onemocnění mutován, což se později projevuje v deregulaci její funkce způsobené autofosforylací. Neregulovaná aktivita receptorové tyrozinkinázy KIT vede k nekontrolované proliferaci intersticiálních Cajalových buněk, jelikož jsou aktivovány podřízené

signální dráhy (Rammohan *et al.*, 2013). K imunohistochemické detekci KIT je využívána protilátka proti CD117, negativita ovšem diagnózu GIST zcela nevylučuje, jelikož reakce je pozitivní jen u 95 % případů GIST. U KIT-negativních tumorů se ke confirmaci diagnózy GIST používá DOG1 (Discovered on GIST 1), což je receptorem aktivovaný kalcium dependentní chloridový kanál, jehož exprese je zvýšena v GIST. Negativita DOG1 ale opět diagnózu nemůže s určitostí vyloučit, protože tato reakce je pozitivní jen u 98 % případů GIST (Ricci *et al.*, 2013). V současnosti se proto mnoho odborníků snaží najít marker, který by diagnostiku GIST zcela zpřesnil a potencionálně by mohl sloužit i jako prognostický marker. Jedním z kandidátů je RBPMS2 (RNA-binding protein with multiple splicing 2), jenž byl nedávno označen jakožto marker nediferencovaných viscerálních buněk hladkého svalstva gastrointestinálního traktu, který se významně podílí na vývoji hladkého svalstva trávicího traktu (Notarnicola *et al.*, 2012).

U nádorových onemocnění bývají často pozměněny dráhy a mechanismy regulující buněčné dělení a zajišťující reparaci DNA. Z tohoto důvodu se v práci zaměřuji také na imunohistochemickou detekci p53, p21, hMSH2 a hMLH1 ve vzorcích GIST.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1. Diagnostika GIST

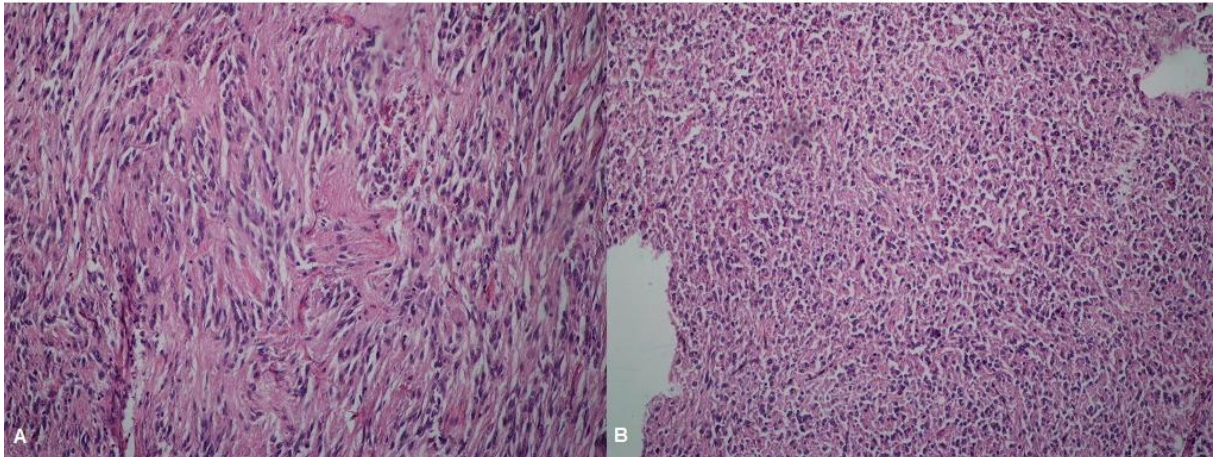
K potvrzení histologického nálezu a konečnému stanovení diagnózy se u GIST využívají imunohistochemické metody. Konkrétně se používají tyto protilátky: CD117 k detekci receptorové tyrozin kinázy KIT, DOG1, desmin a S100. Pozitivní výsledek CD117 spolu s DOG1, nebo alespoň jedné z nich, a zároveň negativní výsledek detekce desminu a S100 potvrzuje diagnózu GIST a vylučuje jiné gastrointestinální mesenchymální tumory. Některé GIST ale mohou být imunohistochemicky negativní na KIT i DOG1 a poté je nutné molekulárně genetické vyšetření genů *KIT* (*v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*) a *PDGFRA* (*platelet-derived growth factor receptor-alpha*) (Novelli *et al.*, 2010). Nyní se z důvodu usnadnění a urychlení diagnostiky pátrá po novém markeru GIST, který by v ideálním případě mohl sloužit také jako prognostický marker. Jedním z nadějných kandidátů je RBPMS2.

2.2. Histologická klasifikace GIST

Dle histologie se GIST dělí do tří základních skupin (Fletcher *et al.*, 2002):

Vřetenobuněčný GIST je nejčastěji se vyskytující histologický typ tvořící 70 % všech případů GIST (Obr. 1A). Nalézá se převážně v žaludku a tenkém střevu. Struktura tohoto typu tumoru je heterogenní a na CT (computed tomography) je patrná jeho snížená hustota ve středu tumoru s výrazným periferním nárůstem měkké tkáně. Vřetenobuněčný GIST se vyskytuje u pacientů mezi 50. až 60. rokem a jsou u něj zaznamenány mutace v genech *KIT* či *PDGFRA* a nebo mutace v obou genech zároveň. Tento typ GIST reaguje dobře na léčbu imatinib mesylátem (Gleevec®, ST1571, Novartis Pharmaceuticals, Basilej, Švýcarsko) a zlepšení prognózy je patrné již na CT snížením hustoty tumoru (Burkill *et al.*, 2003; Liegl-Atzwanger *et al.*, 2010; Miettinen *et al.*, 2005).

Epiteloidní GIST se vyskytuje v 10 % případů a je nejčastěji lokalizován v žaludku mladých žen (Obr. 1B). Metastazuje pro GIST zcela netypicky do lymfatických uzlin a navíc často postrádá mutace v genech *KIT* a *PDGFRA* (Burkill *et al.*, 2003; Liegl-Atzwanger *et al.*, 2010).



Obr. 1: Histologické typy GIST - A, vřetenobuněčný GIST; B, epiteloidní GIST (vzorky jsou nabarveny hematoxylinem a eosinem, Z: 100x)

Smíšený GIST vykazuje buďto náhlé přechody mezi oblastmi tvořenými epiteloidními nebo vřetenitými buňkami, případně je jeho vzhled myxoidní (Fletcher *et al.*, 2002).

2.3. Syndromy spojené s GIST

Vzácně se objevujícím syndromem je Carneyho trias zahrnující pomalu rostoucí GIST, lokalizovaný v žaludku a metastazující až do lymfatických uzlin, dále plicní enchodromu a extraadrenální paragangliom. Tento syndrom bývá nejčastěji diagnostikován ženám mladším 30 let (Liegl-Atzwanger *et al.*, 2010; Pappo a Janeway, 2009).

Pro syndrom Carney-Stratakisové je rovněž charakteristický GIST lokalizovaný v žaludku a paragangliom. Od ostatních typů GIST se ovšem odlišuje germinální mutací způsobující ztrátu exprese proteinu SDHB (sukcinát dehydrogenáza B) a ztrátou mutace v genech *KIT* nebo *PDGFRA* (Gill *et al.*, 2010).

Neurofibromatóza typu 1 se vyznačuje benigními vřetenobuněčnými GIST malých rozměrů lokalizovanými převážně v tenkém střevě a postrádajícími mutace v genech *KIT* a *PDGFRA* (Liegl-Atzwanger *et al.*, 2010).

Raritně se vyskytuje familiární GIST pro nějž je příznačná germinální mutace v genu kódujícím *KIT* nebo *PDGFRA* (Haller *et al.*, 2007; O'Riain *et al.*, 2005).

2.4. Molekulární klasifikace GIST

Na základě zjištění, který exon *KIT* je mutován, je možné předpovědět reakci GIST na léčbu. Nejčastěji je v genu kódujícím *KIT* mutován exon 11 a to v 75 % případů (Demetri *et al.*, 2010; Heinrich *et al.*, 2008). Pro mutaci v tomto exonu je charakteristická dobrá odezva na léčbu imatinib mesylátem. Dále bývá mutován *KIT* v exonu 9, což je spojováno se sníženou reakcí na léčbu imatinib mesylátem a s tím související kratší dobou bez progresu onemocnění a nižší pravděpodobností přežití pacienta. V těchto případech se proto zvyšuje dávka imatinib mesylátu nebo se pacientům podává sunitinib malát (Sutent®; Pfizer, New York, NY, USA) (Debiec-Rychter *et al.*, 2006; Heinrich *et al.*, 2008).

Imatinib mesylát je dále účinný u cca 66 % případů GIST s mutací v genu kódujícím *PDGFRA*, zbylá procenta tvoří gen pro *PDGFRA* s mutací v exonu 18 D842V, na jejichž léčbu je tento lék bohužel nevhodný (Agaram *et al.*, 2008; Heinrich *et al.*, 2008).

Další skupinu tvoří wild-type GIST (WT GIST) vyznačující se mutací v genu *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*) exonu 15 (V600E) a současně chybějící mutací v genu *KIT* nebo *PDGFRA*. Typicky se WT GIST vyskytuje v tenkém střevu. WT GIST je rezistentní vůči imatinib mesylátu a tvoří 10 % všech případů GIST (Agaram *et al.*, 2008; Heinrich *et al.*, 2008).

Pediatrický GIST tvoří pouhé 1 % ze všech případů GIST a postihuje zejména děti a mladé dospělé. Tento typ GIST se vyznačuje epiteloidní nebo smíšenou morfologií a lokalizací v žaludku, odkud metastazuje až do jater. U pediatrického GIST nebyly zjištěny mutace v genech *KIT* nebo *PDGFRA*, namísto nich jsou detekovány mutace v genech *SDHB*, *SDHC* a *SDHD* kódujících podjednotky sukcinátdehydrogenázy (Liegl-Atzwanger *et al.*, 2010; Pappo a Janeway, 2009).

2.5. *KIT* a *PDGFRA*

KIT a *PDGFRA* jsou transmembránové glykoproteiny náležející do rodiny tyrozinkinázových receptorů III. Tato rodina receptorů má charakteristickou strukturu - extracelulární doména je složena z pěti smyček, které jsou podobné imunoglobulinovým smyčkám. Dále následuje transmembránová, juxtamembránová a první tyrozinkinázová doména disponující vazebným místem pro ATP. Za ní

je umístěn hydrofilní kinázový úsek následovaný druhou tyrozinkinázovou doménou, která má fosfotransferázovou funkci (Pawson, 2002).

Za normálních podmínek je KIT aktivován svým přirozeným ligandem SCF (stem cell factor), kdežto PDGFRA je aktivován destičkovými růstovými faktory (PDGFs, platelet-derived growth factors). Po navázání specifických ligandů na extracelulární doménu dojde k dimerizaci receptoru a fosforylaci tyrozinových zbytků v tyrozinkinázových doménách. Signál je dále přenášen opět fosforylací tyrozinových zbytků, které jsou součástí podřízených signalizačních molekul, čímž dojde k amplifikaci signálu a spuštění signál transdukujících drah, kterými jsou Ras/MAPK kinázy, Rac/Rho-JNK, PI3K/AKT a SFK/STAT signalizační dráhy (Fletcher, 2004). Aktivita KIT receptoru je regulována juxtamembránovou doménou, jež inhibuje kinázovou aktivitu receptoru v případě, kdy není ligand navázán na extracelulární doménu (Mol *et al.*, 2004).

Signalizační dráhy podřízené KIT receptoru jsou zodpovědné za regulaci velmi významných procesů, kterými jsou např. adheze, proliferace, chemotaxe, apoptóza, dále umožňují diferenciaci a stabilizují diferencované buňky těchto buněčných typů: gametocyty, krvetvorné buňky, melanocyty, žírné buňky a intersticiální Cajalovy buňky řídící motilitu gastrointestinálního traktu (Blume-Jensen *et al.*, 1991; Huizinga, 1999; Chabot *et al.*, 1988; Lev *et al.*, 1993; Maeda *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1990; Yarden *et al.*, 1987; Zsebo *et al.*, 1990, nalezeno v: Lasota a Miettinen, 2008).

Mutace v genech *KIT* a *PDGFRA* jsou rozdělovány do dvou skupin podle příčiny jejich vzniku:

Primární mutace genů *KIT* a *PDGFRA* jsou mutace prokázané v primárních tumorech, u kterých ještě nebyl k léčbě použit inhibitor tyrozinkináz imatinib mesylát.

Sekundární mutace genů *KIT* a *PDGFRA* se od primárních odlišují detekcí mutací až během léčby GIST inhibitorem tyrozinkináz imatinib mesylátem. Tumor je v důsledku vzniklých mutací rezistentní proti tomuto léčivu.

Při výzkumu bylo prokázáno, že primární i sekundární mutace *KIT* postihují stejné alely (Chen *et al.*, 2004; Antonescu *et al.*, 2005).

Mutace v genech *KIT* a *PDGFRA* způsobují u receptorových tyrozinkináz konstitutivní fosforylaci a tím i jejich aktivaci. Mutace v *KIT* a *PDGFRA* jsou rozdělovány podle jejich vlivu na strukturu a funkci domén tyrozinkinázového receptoru na:

- mutace extracelulární a juxtamembránové domény omezující regulaci receptoru.
- mutace první a druhé tyrozinkinázové domény ovlivňující enzymatickou funkci receptoru (Longley *et al.*, 2001).

Nejčastěji se vyskytující mutace genu *KIT* u GIST postihují extracelulární (exon 9) a juxtamembránovou doménu (exon 11). Mutace v extracelulární doméně způsobuje snadnou spontánní homodimerizaci receptoru. Mutace v juxtamembránové doméně je zodpovědná za narušení autoregulační funkce této domény. V konečném důsledku mají obě tyto mutace stejný efekt, kterým je na ligandu nezávislá aktivace tyrozinkinázového receptoru (Heinrich *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 1999, nalezeno v: Lasota a Miettinen, 2008).

Naprostá většina mutací genu *PDGFRA* postihuje druhou tyrozinkinázovou doménu (exon 18), konkrétně aktivační smyčku, která svou konformací reguluje aktivitu ATP vazebného místa. Mutace v exonech *PDGFRA* mají také za následek konstitutivní aktivaci kódovaného receptoru (Rubin *et al.*, 2007).

2.6. *RBPM2*

Protein RBPMS2 je jedním z finálních produktů genu *RBPM2* (*RNA binding protein with multiple splicing*), který je lokalizován buďto na chromosomu 8p12, nebo na chromosomu 15q22.31 a kóduje rodinu proteinů vázajících se na RNA (RBPs, RNA-binding proteins). V promotoru genu *RBPM2* jsou vazebná místa pro transkripční faktory: NF-E1, NFI, AP2 a Sp1. Tento gen je složen z 10 exonů a jeho alternativním sestřihem vzniká mnoho variant transkriptů kódujících odlišné isoformy (Shimamoto *et al.*, 1996; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11030>).

RBPs mají zcela specifickou funkci, kterou je rozpoznávání RNA pomocí motivů umožňujících tvorbu komplexů RNA s proteiny. Tyto komplexy jsou v eukaryotických buňkách nepostradatelné při posttranskripčních úpravách mRNA,

ovlivňují lokalizaci, transport, sestřih, stabilitu, degradaci mRNA a regulují i translaci (St Johnston, 2005).

RBPs mají na svém N-konci umístěn RRM (RNA recognition motif) v podobě β listu, naproti tomu je jejich C-konec složen z mnoha α helixů. Primární struktura RRM obsahuje sekvence homologní s RRM kódovaným *Couch Potato* genem *Drosophily melanogaster*, z čehož lze usuzovat vysokou konzervovanost těchto úseků od hmyzu až po obratlovce a možné zapojení proteinů s těmito doménami do ontogeneze. Primární struktura C-konců RBPs je ale značně variabilní v závislosti na alternativním sestřihu genu *RBPMS* (Shimamoto *et al.*, 1996).

Northern Blot analýza transkriptu genu *RBPMS* zjistila jeho vysokou expresi v tenkém a tlustém střevu, srdci, vaječnicích a prostatě, střední expresi v játrech, ledvinách, pankreatu, plicích, placentě a varlatech a nízkou expresi v kosterním svalstvu, thymu, slezině a periferních leukocytech. V mozku nebyly transkripty daného genu detekovány (Shimamoto *et al.*, 1996).

RBPs se navzájem od sebe liší v primární struktuře svých C-konců, přičemž specifická struktura C-konce je charakteristická pro výskyt v určitém typu tkáně. C-konce RBPs sestávají z α helixů které umožňují těmto proteinům specificky rozeznávat jednotlivé sekvence RNA. Společným znakem všech RBPs je jejich strukturně stejný N-konec kódovaný exony 2 - 5 genu *RBPMS* (Shimamoto *et al.*, 1996).

RRM se u různých proteinů vyskytuje v jejich struktuře v počtu 1 až 4 kopií a jeho velikost se pohybuje v rozmezí 80 - 100 zbytků aminokyselin. RRM se skládá ze dvou krátkých konzervovaných úseků RNP1 a RNP2 a z několika vysoce konzervovaných hydrofobních reziduí lokalizovaných na specifických místech RRM. Vysoce konzervovaná sekundární struktura RRM má následující uspořádání $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$, přičemž β_1 a β_3 jsou součástí RNP1 a RNP2. Funkce RNP1 a RNP2 spočívá ve vazbě na RNA, ale specifické rozpoznávání a vazba na určité sekvence RNA jsou zprostředkovány rezidui, nacházejícími se v oblasti smyčky mezi β_2 , β_3 , a konci domény (Burd a Dreyfuss, 1994, nalezeno v: Gerber *et al.*, 1999).

Mutací pozměněné RBPs mnohdy nedokáží regulovat posttranskripční úpravy RNA, což se může projevit v mnoha aspektech vývoje organismu počínaje tvorbou

struktury embrya až po udržování úrovně diferenciaci specializovaných typů buněk (Bandziulis *et al.* 1989, nalezeno v: Gerber *et al.*, 1999).

Při vývoji hladkého svalstva gastrointestinálního traktu jsou nepostradatelné RBPs, které se RRM doménou váží na specifické sekvence mRNA a ovlivňují tak sestřih, lokalizaci, stabilitu, translaci a degradaci mRNA (St Johnston, 2005). Diferencující se buňky tedy mohou měnit nejen charakter své genové transkripce, ale i zákonitosti bezprostředně ovlivňující metabolismus a zpracování mRNA (Gerber *et al.*, 1999).

2.6.1. Vliv RBPMS2 na vznik GIST

Hladké svalstvo gastrointestinálního traktu má svůj vývojový počátek ve splachnopleurálním mesodermu, jenž se po aktivaci hedgehog/BMP dráhy přeměňuje na viscerální mesenchym, z kterého se postupně diferenciují buňky viscerálního hladkého svalstva SMCs (SMCs, smooth muscle cells; BMP bone morphogenetic protein) (de Santa Barbara *et al.*, 2002). Tyto buňky se nachází v *tunica muscularis* a zajišťují kontraktilitu gastrointestinálního traktu, jsou ovládány enterickým nervovým systémem a ICC. Během diferenciaci SMCs dochází nejprve k prodloužení buněk, poté se buňky začínají shlukovat a také v nich dochází k expresi specifických markerů SMCs. Markery diferencovaných SMCs jsou: α SMA (α -smooth muscle actin), kalponin, SM-MHC (smooth muscle myosin heavy chain), SM22 (smooth muscle protein-22) a smoothelin (Gabella, 2002).

Členem RBPs rodiny je RBPMS2, jehož funkce byla po dlouhou dobu neznámá a vědělo se pouze to, že je přítomen v srdci a gastrointestinálním traktu (Gerber *et al.*, 1999). Při vývoji hladkého svalstva gastrointestinálního traktu je RBPMS2 nejvíce exprimován v prekurzorech SMCs tedy ve viscerálním mesenchymu a v průběhu diferenciaci na SMCs jeho exprese rapidně klesá, z tohoto důvodu byl označen jakožto marker nediferencovaných viscerálních SMCs (Notarnicola *et al.*, 2012).

Funkce RBPMS2 spočívá v regulaci diferenciaci SMCs, jelikož indukuje expresi *Nogginu* a udržuje jeho mRNA ve stabilní formě (Notarnicola *et al.*, 2012). *Noggin* přímo inhibuje BMP dráhu, která by vedla buňku k diferenciaci na SMCs tím, že zabraňuje dimerizaci jejího ligandu (Faure *et al.*, 2002). Indukovaná exprese

BPMS2 v diferencovaných SMCs navozuje zvýšení proliferace SMCs, což v důsledku vede k jejich dediferenciaci a ztrátě schopnosti kontrakce (Notarnicola *et al.*, 2012).

Kontraktilitu SMCs řídí myocardin/SRF dráha (SRF, serum response factor). Aby byl myocardin v aktivní formě musí dojít k jeho částečné proteosomální degradaci. BPMS2 inhibuje myocardin/SRF dráhu tím, že zvyšuje expresi myocardinu, který se poté v buňce nachází v nadměrném množství v inaktivní formě. Důsledkem tohoto procesu je, že buňka poté vykazuje nižší kontraktilitu a sníženou expresi kalponinu. Kontraktilitu SMCs BPMS2 dále snižuje významným poklesem exprese mRNA cholinergního muscarinového receptoru 3. Je nutné zdůraznit, že BPMS2 a Noggin mají shodný vliv na dediferenciaci SMCs, ale zvýšení proliferace způsobuje pouze BPMS2 (Notarnicola *et al.*, 2012).

Výše uvedená fakta spolu s vývojem GIST z prekursorů buněk hladkého svalstva gastrointestinálního traktu nebo z progenitorové buňky diferencující se směrem k ICC vedli Hapkovou *et al.* (2013) ke studiu exprese BPMS2 v GIST. Výsledky studie přinesly jedinečný závěr, kterým je zjištění, že exprese mRNA i proteinu BPMS2 je velmi vysoká v GIST při porovnání se zdravou tkání z gastrointestinálního traktu. Dále bylo také zdokumentováno, že v GIST hodnocených jako vysoce rizikové byla exprese BPMS2 6,2krát vyšší než u méně rizikových. U WT GIST a u GIST s mutací genu *PDGFRA* byla exprese BPMS2 nižší, než u GIST s mutací genu *KIT*. Nebyl zpozorován žádný vztah mezi mírou exprese BPMS2 a kterýmkoliv histologickým typem GIST. Také byl studován vliv overexprese BPMS2 na množství mRNA *KIT* v buňkách z primární kultury embryonálních buněk hladké svaloviny trávicího traktu a bylo detekováno dvojnásobné množství mRNA *KIT*. Z těchto výsledků lze vyvodit, že BPMS2 a *KIT* mohou být součástí identické signální dráhy, nebo že jsou pod kontrolou stejných regulačních mechanismů, případně mohou být oba exprimovány v týchž mesenchymálních buňkách během raného vývoje gastrointestinálních buněk vzniklých právě z mesenchymu. Dalším faktorem spojujícím GIST s BPMS2 je možná lokalizace genu *BPMS* na chromosomu 15q22.31 a popsané chromosomální změny u GIST nalezené na témže chromosomu mezi 15q22.1 a 15q25.3, jež jsou spojovány se špatnou prognózou. Ta může být zapříčiněna vyřazením sekvence negativně regulující expresi genu *BPMS* z funkce, čímž

by byla umožněna vyšší exprese RBPMS2 vyúsťující ve zvýšenou proliferaci mesenchymálních buněk a vznik GIST. Dále bylo prokázáno, že exprese RBPMS2 je nezávislá na aktivaci KIT. Tento poznatek byl zjištěn při inhibici KIT dráhy imatinibem v GIST 882, což je buněčná linie odvozená z GIST homozygotní v onkogenní mutaci *KIT* K641E se silnou expresí a aktivitou KIT. Exkluzivním závěrem celé studie Hapkové *et al.* (2013) je, že RBPMS2 může být novým diagnostickým markerem GIST a případně i cílem pro terapii nádorových onemocnění.

2.7. Oprava chybného párování bází řízená metylací

Desetinu všech případů GIST tvoří WT GIST, jenž je charakterizován chybějící mutací v genech *KIT* nebo *PDGFRA* a pro GIST atypickou mutací v *BRAF* exonu 15 (V600E). WT GIST je rezistentní vůči imatinib mesylátu a typicky se vyskytuje v tenkém střevu. Daný typ GIST se tak výrazně odlišuje od ostatních typů GIST, ale podstata jeho odlišnosti nebyla prozatím vysvětlena. Jednou z mnoha příčin by mohla být inaktivace některého z genů podílejícího se na opravě chybného párování bází řízeného metylací.

Oprava chybného párování bází řízená metylací (MMR, mismatch repair) je jedním z mechanismů postreplikační opravy DNA. MMR umožňuje odstranit z DNA báze, které byly indukovaně nebo spontánně oxidovány, deaminovány, metylovány a nebo byly do řetězce chybně zařazeny při replikaci převážně repetitivních sekvencí (Modrich a Lahue, 1996; Umar a Kunkel, 1996, nalezeno v: Christmann *et al.*, 2003). Nejčastějšími chybami, které MMR opravuje, jsou chybně spárované báze jako např.: G/G, G/T (T vzniká deaminací 5-metylcytosinu), C/C a A/C (Fang a Modrich, 1993, nalezeno v: Christmann *et al.*, 2003). MMR vyhledává rovněž chemicky indukované chyby v DNA, jako je např. alkylace, způsobená O⁶-metylguaninem, jenž se páruje s T a C, dále chyby vyvolané UV zářením, interakcí mezi cisplatinou a DNA, addukty purinů vzniklé působením benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxidu, 2-aminofluorenu nebo N-acetyl-2-aminofluorenu a 8-oxoguaninu (Colussi *et al.*, 2002; Duckett *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996; Mello *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 1997, nalezeno v: Christmann *et al.*, 2003).

Schéma průběhu opravy chybného párování bází řízeného metylací v lidských buňkách:

Rozpoznání chemicky modifikovaných bází, chybně spárovaných bází nebo krátkých sekvencí DNA zejména repetitivních, v nichž došlo během replikace k inserci či delecii umožňuje komplex MutS α . Tento komplex se váže na místa, kde jsou tyto báze nebo sekvence začleněny do DNA. Komplex MutS α se skládá z proteinů hMSH2 a hMSH6 (Fishel *et al.*, 1993; Leach *et al.*, 1993; Palombo *et al.*, 1995, nalezeno v: Christmann *et al.*, 2003). Aby se MutS α navázal na chybnou bázi nebo sekvenci v DNA, musí být aktivován fosforylací (Christmann *et al.*, 2002, nalezeno v: Christmann *et al.*, 2003). Kromě tohoto komplexu existuje ještě komplex MutS β , složený z proteinů hMSH2 a hMSH3, vázající se pouze na delší úseky DNA, v nichž došlo k inserci nebo delecii (Acharya *et al.*, 1996; Genschel *et al.*, 1998; Palombo *et al.*, 1996; Umar *et al.*, 1994, nalezeno v: Christmann *et al.*, 2003). Na komplex MutS α nebo MutS β navázaný pomocí PCNA na chybnou bázi nebo sekvenci v nascentním DNA řetězci se specificky připojí komplex MutL α skládající se z proteinů hMLH1 a hPMS2 (Li a Modrich, 1995; Nicolaides *et al.*, 1994; Papadopoulos *et al.*, 1994, nalezeno v: Christmann *et al.*, 2003). K oběma komplexům se posléze připojuje exonukleáza I, která vystřihne chybný úsek DNA (Genschel *et al.*, 2002, nalezeno v: Christmann *et al.*, 2003). Syntéza nového úseku DNA je katalyzována polymerázou δ za účasti proteinů: PCNA, RPA, RFC a oprava je zakončena ligací DNA řetězce DNA ligázou I (Li, 2013).

Nedávno byl objeven mechanismus jakým MMR rozpozná matricový řetězec DNA od nově syntetizovaného řetězce. Proces rozpoznávání DNA řetězců probíhá již během G₁-fáze nebo rané S-fáze epigenetickou modifikací histonů enzymem H3K36 trimetyltransferázou SETD2. Histony jsou před replikací značeny trimetylací lysinu-36, který je součástí histonu H3. Na takto modifikované histony se pak váže komplex MutS α . Komplex MutS α interaguje s chromatinem ještě před vznikem mutací během replikace DNA. Objasněním tohoto mechanismu se podařilo vysvětlit existenci buněk, jenž mají funkční MMR systém a zároveň vykazují nestabilitu mikrosatelitů (MSI, microsatellite instability) tyto buňky totiž postrádají H3K36 trimetyltransferázu SETD2 (Li *et al.*, 2013).

Mutace způsobené sklouznutím DNA polymerázy při replikaci repetitivních sekvencí se mohou zdát zprvu nevýznamné, ale insercemi nebo delecemi v repetitivních sekvencích včleněných do kódujících oblastí DNA může dojít k posunu

čtecího rámce a případně až ke vzniku nefunkčních proteinů disponujících pozměněnými peptidovými sekvencemi na C-koncích (Kloor *et al.*, 2014).

Mnoho vědeckých týmů již dlouhou dobu zkoumá vliv abnormalit ve funkci MMR na vznik a vývoj nádorových onemocnění. Byla prokázána spojitost mezi výskytem Lynchova syndromu (HNPCC, hereditary non-polyposis colorectal cancer) familiárního onemocnění, jehož důsledkem je zvýšená pravděpodobnost výskytu nádorového onemocnění střev, žaludku, dělohy a vaječnicků, a geny *MLH1* (*mutL homolog 1*) a *MSH2* (*mutS homolog 2*), kódujícími proteiny hMLH1 a hMSH2 zodpovědné za MMR (Charames a Bapat, 2003; Lynch *et al.*, 1998; Muller a Fishel 2002; Quinn *et al.*, 1995, nalezeno v: Seifert a Reichrath, 2006). Dále bylo zjištěno, že pacienti s germinální mutací v některém z MMR genů (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2*) mají zvýšené riziko výskytu karcinomu endometria, kolorektálního karcinomu, rakoviny žaludku, tenkého střeva, ledvin, močového ústrojí, vaječnicků, mozku, jater a žlučových cest, případně rakoviny prsu, slinivky břišní a prostaty (Grindedal *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2010; Kastrinos *et al.*, 2009; Lynch *et al.*, 1988; Soravia *et al.*, 2003; Umar *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2010; Win *et al.*, 2012, nalezeno v: Dowty *et al.*, 2013).

Nestabilita mikrosatelitů (MSI) je příznačná právě pro tumory s abnormalitami v MMR. MSI zapříčiňuje vznik mnoha typů nádorových onemocnění, pro něž jsou charakteristické změny v délce repetitivních sekvencí v celém genomu (Loeb, 1994; Fishel *et al.*, 1993, nalezeno v: Seifert a Reichrath, 2006). Kvůli úzké provázanosti mezi mutacemi v genu *MSH2*, nestabilitou mikrosatelitů a vznikem nádorového onemocnění vznikla snaha detekovat mutantní gen *MSH2* v tumorech a zpřesnit tak prognózu nádorových onemocnění. Detekce inaktivačních mutací v genu *MSH2* technikami molekulární biologie je časově náročná a proto se ke slovu dostala imunohistochemická detekce proteinu hMSH2. Tento protein je ve vzorku detekován pouze v případě, když gen *MSH2* není mutován, čímž se průkaz inaktivační mutace v genu *MSH2* značně usnadnil a urychlil (Leach *et al.*, 1996; Shia *et al.*, 2004; Thibodeau *et al.*, 1996, nalezeno v: Seifert a Reichrath, 2006).

Nádorová onemocnění deficientní v MMR jsou často chromosomálně stabilní. Mutace se v těchto případech hromadí nejvíce v oblastech obsahujících krátké repetitivní sekvence, tento typ lokalizace mutací je souhrnně nazýván vysoká

nestabilita mikrosatelitů (MSI-H, high-level microsatellite instability). Příčinou vzniku sporadických nádorových onemocnění vykazujících MSI-H není pouze samotná deficience MMR, ale i epigenetické vlivy, kterými jsou např. metylace promotorů MMR genů s následkem snížení nebo úplného útlumu exprese těchto genů (Boland a Goel, 2010; Jaspersen *et al.*, 2010, nalezeno v: Kloor *et al.*, 2014).

Jsou rozlišovány dva typy inaktivace MMR genů, a to na embryonální úrovni, nebo na somatické. Při embryonální inaktivaci MMR genů jsou často zaznamenány tyto typy mutací: inserce nebo delece několika málo nukleotidů vyúsťující v posun čtecího rámce a inaktivaci daného MMR genu, jednonukleotidové záměny, po kterých může dojít k zařazení odlišné aminokyseliny do syntetizovaného proteinu nebo k předčasnému vzniku stop kodonu. Sporadická MSI-H nádorová onemocnění mají svůj původ v inaktivaci MMR genů zapříčiněné embryonální mutací jedné alely daného genu a současně somatickou inaktivací zbývajících funkčních alely. Charakteristickými známkami sporadických MSI-H nádorových onemocnění jsou metylace promotoru genu *MLH1* a aktivační mutace onkogenu *BRAF* (V600E mutace) (Parsons *et al.*, 2012, nalezeno v: Kloor *et al.*, 2014).

V nádorech, ve kterých nebyla zjištěna inaktivační mutace v genu *MSH2* bývá často zvýšena exprese tohoto genu (Aubry *et al.*, 2001; Castrilli *et al.*, 2002; Hamid *et al.*, 2002; Hussein *et al.*, 2002, 2006; Leach *et al.*, 2000; Rass *et al.*, 2001; Srivastava *et al.*, 2004, nalezeno v: Seifert a Reichrath, 2006). Příčina zmíněného jevu nebyla prozatím objasněna, ale předpokládá se souvislost s nestabilitou genomu. Zvýšená exprese genu *MSH2* byla detekována jak v benigních, tak v maligních tumorech s vyšší proliferační aktivitou (Aubry *et al.*, 2001; Castrilli *et al.*, 2002; Hamid *et al.*, 2002; Leach *et al.*, 2000; Rass *et al.*, 2001; Srivastava *et al.*, 2004, nalezeno v: Seifert a Reichrath, 2006). Následujícími studiemi bylo zdokumentováno, že během buněčného cyklu hladina hMSH2 kolísá. Přičemž nejméně hMSH2 bylo detekováno v buňkách, jež byly ve fázi-G1 a na počátku fáze-S, a nejvíce v buňkách, ve kterých probíhala replikační a postreplikační fáze buněčného cyklu (Marra *et al.*, 1996, nalezeno v: Seifert a Reichrath, 2006). Při overexpresi transkripčního faktoru E2F byla rovněž zpozorována vyšší exprese genu *MSH2* (Iwanaga *et al.*, 2004, nalezeno v: Seifert a Reichrath, 2006). Z těchto poznatků lze vyvodit, že exprese genu *MSH2* je pod kontrolou mechanismů regulujících buněčný cyklus.

MMR má rovněž nepostradatelnou úlohu v kontrolních bodech buněčného cyklu a také při apoptóze (Goldmacher *et al.*, 1986; Kat *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1999, nalezeno v: Seifert a Reichrath, 2006).

Kontrolní bod mezi G₂- a M-fází buněčného cyklu je významný, jelikož zabraňuje buňce v mitóze, pokud v ní došlo k poškození DNA během G₂-fáze nebo nebyla provedena oprava chyb v DNA vzniklých během G₁- a S-fáze. Za funkci kontrolního bodu G₂/M jsou zodpovědné cyklin-dependentní kinázy CDK1 a CDK2. Fosforylaci CDK1 ovlivňuje hMSH2 spolu s navázanou ATR (ATM- and Rad3-related kinase) (Cejka *et al.*, 2003; Wang a Qin, 2003, nalezeno v: Seifert a Reichrath, 2006).

Před kontrolním bodem G₂/M musí dělicí se buňka projít kontrolním bodem S-fáze buněčného cyklu. V tomto bodě se hMSH2 váže na CDK2, a pokud dojde k asociaci ATM (ataxia-telangiectasia-mutated kinase) s hMLH1 je buněčný cyklus zastaven, jelikož dělicí se buňka obsahuje poškozenou DNA. ATM fosforyluje CDK2, která zablokuje postup buňky do další fáze cyklu (Brown *et al.*, 2003, nalezeno v: Seifert a Reichrath, 2006).

Zvýšená exprese genů *MLH1* a *MSH2* *in vitro* indukuje apoptózu. A naopak při abnormalitách omezujících funkci MMR u buněčných linií byla zjištěna vyšší míra rezistence těchto buněk vůči genotoxickým látkám (alkylačním a metylačním činidlům, cisplatině a UV záření), jež byla zapříčiněná blokací fosforylace p53 a drah vedoucích k apoptóze (Fink *et al.*, 1998; Wang a Lippard, 2005; Young *et al.*, 2004, nalezeno v: Seifert a Reichrath, 2006).

V trávicím traktu je gen *MSH2* nejvíce exprimován v bazální lamině, z níž vzniká sliznice trávicí trubice a spekuluje se o dvou možných důvodech. Pravděpodobnější variantou je, že hMSH2 stabilizuje genom dělicích se buněk. Druhou možností je, že exprese genu *MSH2* je indukována proteinem p53, jelikož gen *MSH2* má ve svém promotoru vazebné místo právě pro protein p53 (Leach *et al.*, 1996; Scherer *et al.*, 1996, nalezeno v: Seifert a Reichrath, 2006).

2.8. p53

Gen kódující tumor supresorový protein p53, označovaný jako *TP53* (*tumor protein p53*) je lokalizován na 17p13.1. Protein p53 obsahuje ve své struktuře

domény s funkcí transkripčně aktivační, oligomerizační a také umožňující vazbu na DNA. Protein p53 reaguje na stresové podmínky regulací exprese cílových genů, čímž indukuje zastavení probíhajícího buněčného cyklu, apoptózu, senescenci, reparaci DNA nebo změny v metabolismu. Mutace v genu pro p53 jsou spojovány s mnoha nádorovými onemocněními včetně dědičných nádorových onemocnění. Alternativní sestřih tohoto genu spolu s použitím alternativních promotorů produkuje velké množství variant transkriptů a izoform. Doplňkové izoformy vznikají použitím alternativních iniciačních kodonů při translaci (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>).

Rozvoj nádorového onemocnění je usnadněn změnou exprese regulátorů buněčného cyklu a apoptózy. Proto se mnoho studií zabývalo expresí p53 v GIST. U GIST s overexpresí p53 byla ve většině případů zjištěna nízká aktivace proteinů podřízených p53 a současně nefunkční dráha p53 (Romeo *et al.*, 2009). Dále byl prokázán vztah mezi overexpresí p53 a rostoucím rizikem malignity a mitotickým indexem u GIST (Jiang *et al.*, 2012).

U GIST, které nenesou mutaci v genu kódujícím p53, se předpokládá využití této skutečnosti ke zlepšení účinku inhibitorů tyrozinkináz. K léčbě GIST se často používá imatinib mesylát, jenž má sice silné antiproliferativní účinky, ale nevyvolává u všech buněk GIST apoptózu, čímž zamezuje kompletní remisi onemocnění ovšem s rizikem sekundární progresse. Z tohoto důvodu se uvažuje o léčbě GIST inhibitory tyrozinkináz spolu s inhibitory MDM2 (murine double-minute 2), které by zvýšily množství p53 schopného se vázat na DNA v nádorových buňkách. Nahromaděný p53 by následně indukoval apoptózu (Henze *et al.*, 2012).

2.9. p21

Gen kódující inhibitor cyklin-dependentní kinázy 1A, známý také jako p21 je lokalizován na 6p21.2. Kódovaný protein p21 se váže na komplexy určitého cyklinu s CDK2, CDK4 nebo CDK6 a inhibuje jejich aktivitu, čímž plní funkci regulátoru progresse buněčného cyklu ve fázi-G₁. Exprese tohoto genu je pod přísnou kontrolou tumor supresorového proteinu p53, pomocí kterého protein p21 zprostředkovává zastavení buněčného cyklu v kontrolním bodě G₁ v reakci na stresové faktory. Protein p21 může interagovat s PCNA a s DNA polymerázou, reguluje tedy také S-fázi buněčného cyklu a proces reparace DNA. Protein p21

je specificky štěpen kaspázou CASP3, což je následováno aktivací CDK2, tento proces napomáhá zahájení apoptózy aktivací kaspáz. Alternativním sestřihem vzniká mnoho variant tohoto genu (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_009364.1).

Liu *et al.* (2006) se ve své studii zabýval souvislostí mezi expresí p21 a různými typy GIST s odlišným stupněm malignity. Souvislost mezi lokalizací, velikostí, histologickým subtypem GIST a mírou exprese p21 nebyla nalezena, zato byla prokázána korelace mezi zvýšenou expresí p21 a rostoucím potenciálem malignity GIST. P21 by proto mohl být používán jako marker k posouzení maligního chování GIST.

2.10. Prognostické faktory

GIST je řazen mezi agresivní nádory, u kterých nelze s určitostí vyloučit jejich malignitu, a z tohoto důvodu byla stanovena morfologická kritéria sloužící k určení rizika agresivního chování GIST (Tab. I, II). V Tab. I je uvedeno členění schválené na konferenci The National Institutes of Health v roce 2001 (Fletcher *et al.*, 2002). V roce 2006 tato kritéria zpřesnil Miettinen *et al.* a ta jsou uvedena v Tab. II.

Tab. I: Morfologické prognostické faktory definující riziko agresivního chování GIST (Fletcher *et al.*, 2002).

Riziko agresivního chování	Rozměr tumoru (cm)	Mitotický index (HPF)
velmi nízké	<2	<5/50
nízké	2-5	<5/50
střední	<5	6-10/50
	5-10	<5/50
vysoké	>5	>5/50
	>10	jakýkoliv
	jakýkoliv	>10/50

Tab. II: Prognostické faktory určující riziko agresivního chování GIST (Miettinen *et al.*, 2006).

Mitotický index (HPF)	Max. rozměr (cm)	Gaster	Duodenum	Jejunum a ileum	Rektum
≤5/50	≤2	žádné	žádné	žádné	žádné
	2-5	velmi nízké	nízké	nízké	nízké
	5-10	nízké	vysoké	střední	vysoké
	>10	střední		vysoké	
>5/50	≤2	žádné	neznámé	vysoké	vysoké
	2-5	střední	vysoké	vysoké	vysoké
	5-10	vysoké	vysoké	vysoké	vysoké
	>10	vysoké		vysoké	

HPF (high-power field) značí plochu zorného pole mikroskopu o rozměru 5 mm² při zvětšení 40krát.

2.11. Léčba GIST

Prvním krokem při léčbě GIST je resekce tumoru do histopatologicky prověřených zdravých okrajů tkáně, tedy R0 resekce dle klasifikace. Při manipulaci s tumorem je nutné postupovat opatrně, jelikož je křehký a narušením jeho integrity při operaci by mohlo dojít k rozsevu GIST do okolní tkáně. Lymfatické uzliny se neodstraňují, protože GIST do nich zpravidla nemetastazuje (Demetri *et al.*, 2010; Pidhorecky *et al.*, 2000; Stamatakos *et al.*, 2009, nalezeno v: Rammohan *et al.*, 2013). U 50 % pacientů dochází i po kompletní resekcí tumoru k rozvoji metastáz a recidivě. Polovina pacientů po resekcí tumoru přežívá po dobu 5 let, u vysoce rizikových GIST se doba přežití zkracuje na 2 roky. K léčbě GIST se kromě chirurgického odstranění tumoru používá inhibitor tyrozinkináz imatinib mesylát, který je svou strukturou podobný ATP a váže se místo něj do ATP-vazebného místa tyrozinkinázových receptorů, čímž zabraňuje substrátové fosforylaci a aktivaci podřízených molekul. Imatinib mesylát inhibuje tyto tyrozinkinázy KIT, PDGFRA, PDGFRB, ABL, BCR-ABL a CSF1R, ale velmi záleží i na tom, který exon je u dané kinázy mutován (Beham *et al.*, 2012; Pidhorecky *et al.*, 2000; Sepe a Brugge, 2009; Stamatakos *et al.*, 2009, nalezeno v: Rammohan *et al.*, 2013).

Standardní dávkování imatinibu je 400 mg/den, při kterém jsou vyváženy benefity v podobě zvýšeného celkového přežití s odpovídající reakcí na léčbu a vedlejší účinky, jež jsou nepříznivější u vyšších dávek léku. Pacienti, u nichž dochází k progresi tumoru i při nasazení standardní dávky imatinibu a pacienti s mutací genu *KIT* v exonu 9 jsou léčeni dvojnásobnou dávkou imatinib mesylátu, tedy 800 mg/den (Debiec-Rychter *et al.*, 2004; Heinrich *et al.*, 2003; Lasota a Miettinen, 2008; Zalcborg *et al.*, 2005, nalezeno v: Rammohan *et al.*, 2013). Léčba imatinibem začíná mnohdy již před resekci tumoru, jelikož zmenšuje jeho velikost (snadněji tak lze dosáhnout R0 resekce) a zlepšuje celkové přežití pacientů spolu s přežitím bez progresse onemocnění (Demetri *et al.*, 2010; Sepe a Brugge, 2009; Wang *et al.*, 2012, nalezeno v: Rammohan *et al.*, 2013). Pacienti po kompletní resekci tumoru se středně nebo vysoce rizikovým GIST užívají imatinib mesylát po dobu 3 let, ostatní pacienti po kratší dobu, zpravidla 2 roky (Demetri *et al.*, 2010; McAuliffe *et al.*, 2009; Sepe a Brugge, 2009, nalezeno v: Rammohan *et al.*, 2013).

Pacienti s neresektabilním GIST, četnými metastázemi nebo s recidivou po resekci jsou rovněž léčeni imatinib mesylátem. Po 3 měsíční léčbě se vyhodnocuje stav léze, a pokud ji stále není možné odstranit chirurgicky, pokračuje se dále v léčbě imatinib mesylátem dokud dochází k progresi onemocnění. Aby byly projevy choroby co možná nejmírnější, pokračuje se zpravidla v podpůrné léčbě imatinibem po celý život pacienta. Pacientům s agresivním GIST je podávána vyšší dávka imatinibu až 800 mg/den a při nepříznivých vedlejších účincích bývá podáván sunitinib (Andtbacka *et al.*, 2007; Beham *et al.*, 2012; Dematteo *et al.*, 2009; DeMatteo *et al.*, 2007; Demetri *et al.*, 2010; Gronchi *et al.*, 2007; Guilhot, 2004; Mussi *et al.*, 2010; Raut *et al.*, 2006; Rutkowski *et al.*, 2006; Sepe a Brugge, 2009; Stamatakos *et al.*, 2009; Sym *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Yeh *et al.*, 2010; Zalcborg *et al.*, 2005, nalezeno v: Rammohan *et al.*, 2013).

Časté nežádoucí účinky imatinib mesylátu jsou: zadržování tekutin, nevolnost, svalové křeče, průjem, únava, bolesti břicha a vyrážka. Dále byly zpozorovány i závažné nežádoucí účinky: poruchy funkce jater a plic, snížení počtu erytrocytů, krvácení v trávicím traktu, arytmie, městnavé srdeční selhání a akutní koronární syndromy (Demetri *et al.*, 2010; Eisenberg *et al.*, 2009; Trent *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Zalcborg *et al.*, 2005, nalezeno v: Rammohan *et al.*, 2013).

U 10 % až 20 % pacientů je zjištěna primární rezistence na imatinib, definovaná jako nedosažení stabilního stavu a nástup progresu GIST do 6ti měsíců od počáteční klinické odpovědi. Primární rezistence je charakteristická pro WT GIST, GIST s mutací v exonu 9 *KIT* nebo 18 *PDGFRA*. Sekundární rezistence k imatinibu se od primární liší pozdějším nástupem progresu a to až po 6ti a více měsících od počáteční klinické odpovědi, protože je způsobena novou mutací v genech *KIT* nebo *PDGFRA* ovlivňující aktivitu imatinib mesylátu a nebo mutací v exonu 11 *KIT*. Oba typy rezistence je možné překonat zvýšením dávky imatinib mesylátu. Při selhání tohoto postupu je nutné nasadit sunitinib malát (Demetri *et al.*, 2010; Heinrich *et al.*, 2006; Joensuu *et al.*, 2012; Maleddu *et al.*, 2009, nalezeno v: Rammohan *et al.*, 2013).

Sunitinib malát je podobně jako imatinib inhibitor tyrozinkináz cílený na více typů těchto receptorů, ale je účinný i u GIST rezistentních vůči imatinibu a u komplikovaných případů. U sunitinibu byla prokázána ještě delší doba bez progresu onemocnění i delší celkové přežití než u imatinibu. Primární a sekundární mutace *KIT* v GIST rezistentních vůči imatinibu významně ovlivňují účinnost sunitinibu, který je méně účinný při léčbě tumorů s mutací v exonu 11 *KIT*. Sunitinib malát se podává vždy po dobu 4 týdnů nepřetržitě každý den, přičemž dávkování je 50 mg/den. Po 4 týdnech léčby následuje 14 dní bez podávání léku. Běžnými nežádoucími účinky sunitinib malátu jsou nevolnost, únava a hypertenze. Dále byla pozorována hematologická toxicita (anémie, neutropenie), kardiotoxicita, bolesti břicha, průjemy, zánět sliznice, nechutenství, zbarvení kůže a hypothyreóza (Demetri *et al.*, 2006, 2010; George *et al.*, 2009; Heinrich *et al.*, 2008; Chu *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2007; Raut *et al.*, 2010; Sepe a Brugge, 2009; Zhu *et al.*, 2009, nalezeno v: Rammohan *et al.*, 2013).

Nedávno byly vyvinuty a otestovány inhibitory tyrozinkináz II. generace, které přinášejí novou naději pro pacienty s GIST rezistentními vůči imatinibu i sunitinibu: sorafenib, dasatinib, nilotinib a regorafenib. Regorafenib inhibuje *KIT*, *PDGFR*, *VEGFR* a zároveň je dobře snášen pacienty. Mezi jeho vedlejší účinky patří hypertenze, vyrážka a průjem (Demetri *et al.*, 2009a,b, 2010, 2012, 2013; Fumagalli *et al.*, 2009; George *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2007; Huynh *et al.*, 2009; Kindler *et al.*, 2011; Montemurro *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2012; Reichardt *et al.*, 2009; Sawaki *et al.*, 2011; Trent *et al.*, 2011, nalezeno v: Rammohan *et al.*, 2013).

Pro GIST je typické jeho nepředvídatelné chování a z tohoto důvodu je striktně doporučováno dlouhodobé sledování všech pacientů, u nichž se tento typ tumoru vyskytl. GIST má tendenci se vracet hlavně během prvních 3 až 5 roků. Standardně pacienti chodí na kontrolu po každých 3 až 6 měsících (Demetri *et al.*, 2010; Sepe a Brugge, 2009; Stamatakos *et al.*, 2009, nalezeno v: Rammohan *et al.*, 2013).

3. Cíle práce

- 1) Detekce proteinů RBPMS2, hMLH1, hMSH2, p21 a p53 pomocí nepřímé dvoustupňové imunohistochemické metody.
- 2) Korelace exprese daných proteinů s těmito prognostickými faktory: velikostí tumoru, počtem mitóz, lokalizací tumoru, výskytem nekróz a přežíváním pacientů.

4. Materiál a metodika

4.1. Materiál

Biologický materiál:

Do parafínu zalité bloky se vzorky 47 pacientů s diagnostikovaným GIST shromážděné z celého území České republiky. Průměrný věk pacientů činí 60 let, mužů je 23 (49 %), žen 24 (51 %). GIST byly nejčastěji lokalizovány v žaludku 16 (34 %), tenkém střevu 15 (32 %), jícnu 6 (14 %), rektu 3 (6 %), peritoneu 3 (6 %), retroperitoneu 2 (4 %), omentu 1 (2 %) a v játrech 1 (2 %). 17 (36 %) pacientů mělo mutaci v genu kódujícím KIT, 8 (16 %) pacientů mělo mutovaný gen *PDGFRA* a u 6 (14 %) případů se vyskytly mutace v obou těchto genech. Zbýlých 16 (34 %) pacientů mělo WT GIST.

Chemikálie:

Xylen, etanol (70%, 80%, 96%), aceton, kyselina citronová, dihydrát citronanu sodného, Tris® (2-amino-2-hydroxymetylpropan-1,3-diol), Tween®, SUBRS BUFFER, DAB chromogen, hematoxylin, bezvodé médium Entellan, 30% roztok peroxidu vodíku, chlorid sodný, amoniak, destilovaná voda.

Primární protilátky: RBPMS2 králičí polyklonální (kat. č. ab170777), hMLH1 (kat. č. 33-7800, Invitrogen), hMSH2 králičí polyklonální (kat. č. 2019, Cell signaling), p21 (kat. č. 7H181), p53 (Masarykův onkologický ústav Brno, B. Vojtěšek). Sekundární protilátka Dako EnVision + Dual Link System – HRP (kat. č. K4061).

Příprava použitých roztoků:

Citrátový pufr: 9 ml roztoku 10mmol/l kyseliny citronové smíchat s 41 ml roztoku 10mmol/l citronanu sodného a to doplnit do objemu 500 ml destilovanou vodou, případně upravit pH na 6,0 - 6,2.

Zásobní roztok 10x Tris pufru: 61 g Tris rozpustit v 1 l destilované vody, případně upravit pH na hodnotu 7,6. Ředění zásobního roztoku 10x Tris pufru: 900 ml fyziologického roztoku smíchat se 100 ml 10x Tris pufru.

Roztok 0,05 mol/l Tris pufru s 0,05% Tween: k 1 l Tris přidat 500 µl Tween.

3,3'-diaminobenzidin (DAB): smíchat 1 ml SUBRS BUFFER s 20 μ l DAB chromogenu.

Čpavková voda: 5 ml amoniaku smíchat se 100 ml destilované vody.

Přístroje a vybavení laboratoře:

Mikrovlnná trouba (HISTOS PRO RAPID MICROWAVE HISTOPROCESSOR), digestoř (Merci), chladnička (ARDO GL34), mikroskop Olympus CH 40RF200 (označení okuláru WHK 10x/20 L), pH metr (Orion 3-star pH Benchtop), digitální časovač (Roth TR118), míchačka (MR Hei-Standard), laboratorní váhy (RADWAG PS 2100/C/2), vlhká komůrka, Elite PAP Pen, pozitivně nabitá podložní skla, krycí skla, automatické pipety (100 - 1000 μ l), špičky, kyvety, mikroskopavky, odměrné válce, nálevky, autoklávovatelné lahve, buničina, ochranné rukavice, odpadní nádoba.

4.2. Metodika

4.2.1. Imunohistochemická detekce antigenů ve tkáních

K detekci proteinů RBPMS2, hMLH1, hMSH2, p53 a p21 byla použita nepřímá dvoustupňová imunohistochemická metoda. Ze zkoumaných tkání, fixovaných formalínem a zalitých v parafínu, laborantky vyhotovily 5 μ m silné řezy. Poté následovalo napínání řezů na teplé vodní hladině. Po tomto kroku laborantky řezy přemístily na pozitivně nabitá podložní skla, a aby došlo k dalšímu rozpínání řezů, byly preparáty umístěny na temperovanou podložku.

Podložní skla s napnutými řezy bylo nutné nechat zaschnout v termostatu při 58 °C do druhého dne. Odstranění parafínu z preparátů bylo provedeno roztokem xylenu, v němž se parafín rozpouští. V xylenu byly preparáty poprány 2krát vždy po dobu 10 min. Poté byla tkáň zavodněna, jelikož další práce s preparáty probíhala v hydrofilním prostředí. Toho bylo dosaženo protažením preparátů sestupnou alkoholovou řadou roztoků o koncentracích 96 %, 80 %, 70 % etanolu a nakonec destilovanou vodou. V každém roztoku byly preparáty ponechány po dobu 4 min. Preparáty se poté umístily do nádoby obsahující citrátový pufr o pH = 6,0 - 6,2 a k revitalizaci antigenu byla využita mikrovlnná stimulace po dobu 15 min. při 120 °C. Poté se preparáty 20 min. chladily tekoucí vodou a následně se opláchly

2krát destilovanou vodou. Následovala blokáce aktivity endogenní peroxidázy ponořením preparátů na 15 min. do kyvety s 5% roztokem peroxidu vodíku. Po této proceduře byly preparáty opláchnuty destilovanou vodou. Následovala promytí 2krát po 5 min. v 0,05 mol/l Tris pufru, 1krát po dobu 5 min. v 0,05 mol/l Tris pufru s 0,05% Tween, tyto roztoky měly pH cca 7,6.

Před aplikací primární protilátky byla tkáň na podložním skle ohraničena pomocí Elite PAP Pen. Na tkáň se poté aplikovalo 200 μ l naředěné primární protilátky (Tab. III), tak, aby pokryla celý povrch tkáně a nakonec byly preparáty položeny do vlhké komůrky s optimální vlhkostí. Inkubace probíhala při laboratorní teplotě.

Tab. III: Primární protilátky použité k detekci zkoumaných proteinů, jejich ředění a doba inkubace

primární protilátka	ředění	doba inkubace
RBPMS2	1:50	1 hod.
hMLH1	1:50	2 hod.
hMSH2	1:50	2 hod.
p53	1:100	1 hod.
p21	1:50	1 hod.

Poté byl preparát promyt 2krát po 3 min. v 0,05 mol/l Tris pufru, 1krát po dobu 3 min. v 0,05 mol/l Tris pufru s 0,05% Tween. Po promytí byla aplikována sekundární protilátka sestávající z kozích anti-myších a anti-králičích imunoglobulinů konjugovaných s polymerem křenové peroxidázy. Inkubace probíhala 1 hod. při laboratorní teplotě. Opětovný oplach 3krát po 3 min. v 0,05 mol/l Tris pufru. K vizualizaci specifické imunohistochemické reakce byl použit roztok 3,3'-diaminobenzidinu (DAB) aplikovaný po dobu 5 min. Preparáty byly opět opláchnuty destilovanou vodou. Výsledkem reakce byl hnědý stabilní produkt v místech, kde byl přítomen antigen.

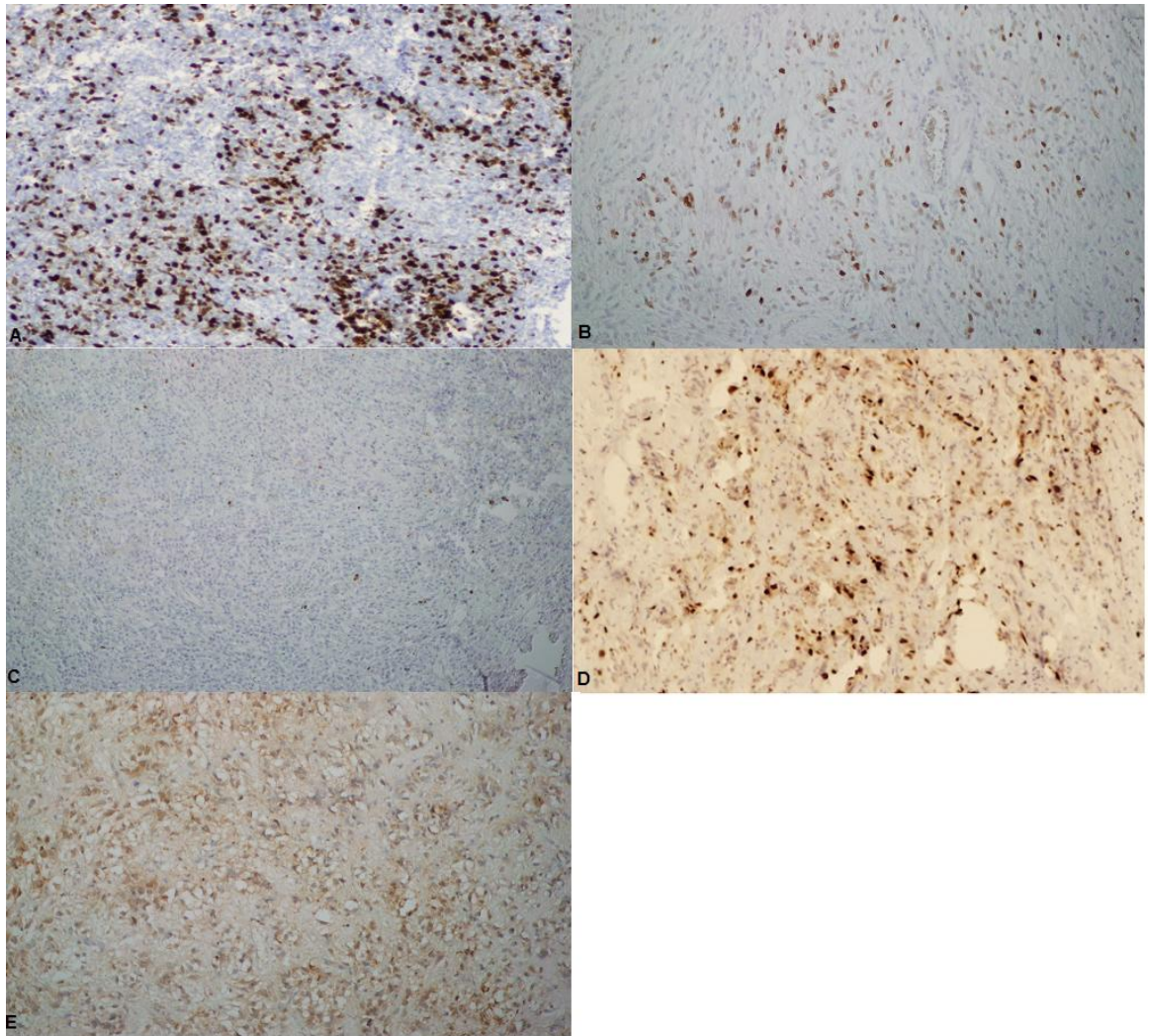
Dále bylo provedeno nespecifické dobarvení jader buněk hematoxylinem. Preparáty byly umístěny do kyvet obsahujících hematoxylin na dobu 1 až 2 min. Poté byly preparáty v kyvetě proplachovány slabým proudem tekoucí vody, pak

se do kyvety nalila čpavková voda a po 1 min. se opět preparáty proplachovaly tekoucí vodou.

Po vyprání přebytečného hematoxylinu tekoucí vodou byly preparáty odvodněny protažením touto řadou roztoků: 96% etanol, aceton, aceton-xylen a 2krát v xylenu. V každém roztoku byly preparáty ponechány po dobu 3 min. Posledním krokem bylo montování do bezvodého média konkrétně Entellanu a překrytí krycím sklíčkem.

K hodnocení míry exprese studovaných proteinů bylo použito semikvantitativního hodnocení exprese pomocí H-indexu = procentuální počet pozitivních buněk v 10 zorných polích při celkovém zvětšení 200krát x síla exprese/ 2. Síla exprese: 1 - slabá, 2 - středně silná, 3 - silná. U proteinů hMLH1, hMSH2, p21 a p53 byla hodnocena exprese v jádrech buněk, zatímco u RBPMS2 byla hodnocena cytoplazmatická exprese viz Obr. 2.

Část parametrů, konkrétně imunohistochemická exprese proteinů DOG1, Ki67, CD34, RBPMS2, p21, p53, hMLH1, hMSH2 jakož i stanovení histologických subtypů GIST, byla zpracována v rámci rutinních diagnostických metod na pracovišti Ústavu klinické a molekulární patologie Fakultní nemocnice Olomouc. V rámci své práce jsem se z části seznámila s diagnostickými postupy při histopatologické diagnostice GIST.



Obr. 2: Fotografie preparátů GIST, které jsou imunohistochemicky pozitivní na výskyt proteinů - A, p53; B, p21; C, hMLH1; D, hMSH2; E, RBPMS2 (Z: 100x)

4.2.2. Statistické metody

K analýze dat byl použit počítačový program Statistica verze 2. Ke srovnání imunohistochemické exprese proteinů hMLH1, hMSH2, p21, p53, RBPMS2 se stupněm rizika rekurence, progresí tumoru, použitou terapií a velikostí nádoru byl aplikován Mann-Whitney neparametrický test. Hodnoty $p \leq 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

5. Výsledky

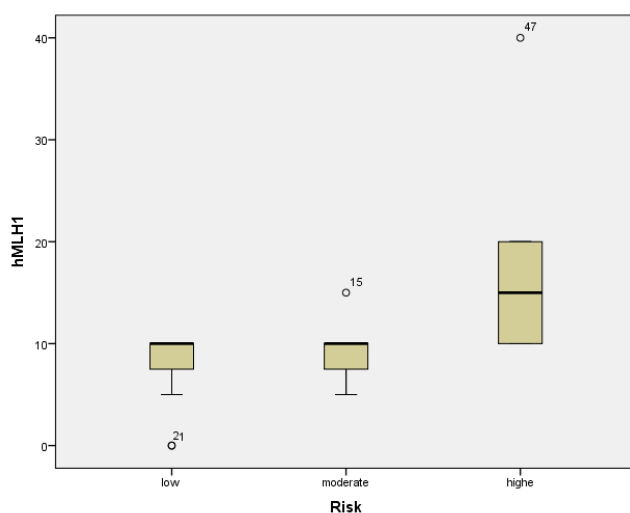
Stupeň rizika rekurence byl stanoven podle prognostických faktorů určujících riziko agresivního chování GIST (Tab. II) a zahrnuje tedy lokalizaci tumoru, mitotický index, velikost tumoru a výskyt nekróz.

Veškeré analyzované vzorky GIST byly rozděleny na tři skupiny: tumory s nízkým stupněm rizika rekurence, středním stupněm rizika rekurence a vysokým stupněm rizika rekurence.

Nebyla nalezena žádná signifikantní korelace při srovnání tumorů s nízkým a středním stupněm rizika rekurence s expresí všech testovaných proteinů a mitotickou aktivitou.

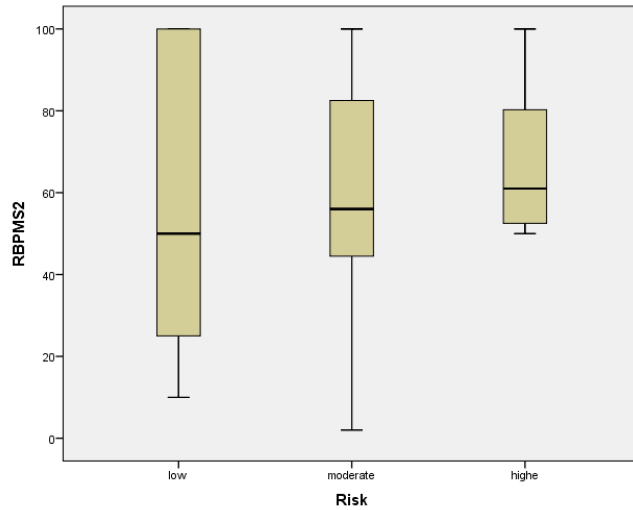
Výsledky Mann-Whitney testu prokázaly korelaci mezi expresí hMLH1 ($p = 0,003$), mitotickou aktivitou ($p = 0,049$) a tumory s nízkým a vysokým stupněm rizika rekurence (Obr. 3).

U souboru tumorů se středním a vysokým stupněm rizika rekurence byla prokázána korelace s expresí hMLH1 ($p = 0,027$). Zároveň byla zaznamenána tendence ke korelaci těchto skupin tumorů s mitotickou aktivitou a expresí hMSH2 a p53 (mitotická aktivita: $p = 0,054$; hMSH2: $p = 0,067$; p53: $p = 0,062$).



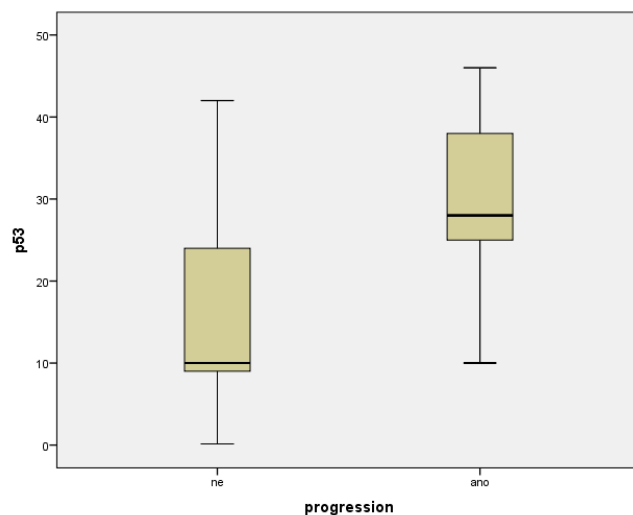
Obr. 3: Korelace exprese hMLH1 se stupněm rizika rekurence

U všech vzorků nezávisle na stupni rizika rekurence byla zaznamenána vysoká exprese RBPMS2 (Obr. 4).



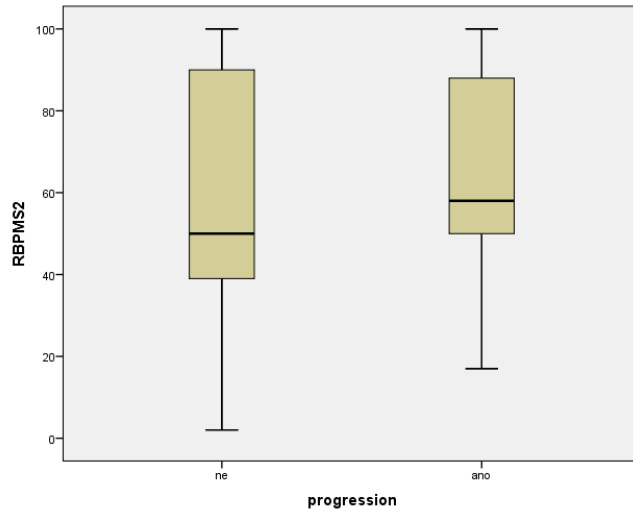
Obr. 4: Korelace exprese RBPMS2 se stupněm rizika rekurence

Progrese je situace, kdy dochází k nárůstu hmoty tumoru u pacientů podstupujících léčbu. Analyzované vzorky GIST tedy byly rozděleny na případy, u nichž došlo k progresi a na případy bez progresi nádorového onemocnění. S rizikem progresi GIST koreluje exprese p21 ($p = 0,044$), p53 ($p = 0,022$) a mitotická aktivita ($p = 0,007$) viz Obr. 5.



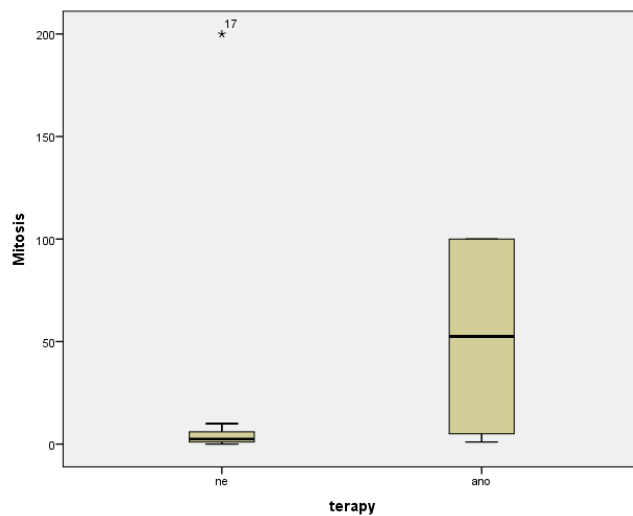
Obr. 5: Korelace exprese p53 s progresí nádorového onemocnění

Nezávisle na progresi GIST byla zaznamenána vysoká exprese RBPMS2 (Obr. 6).

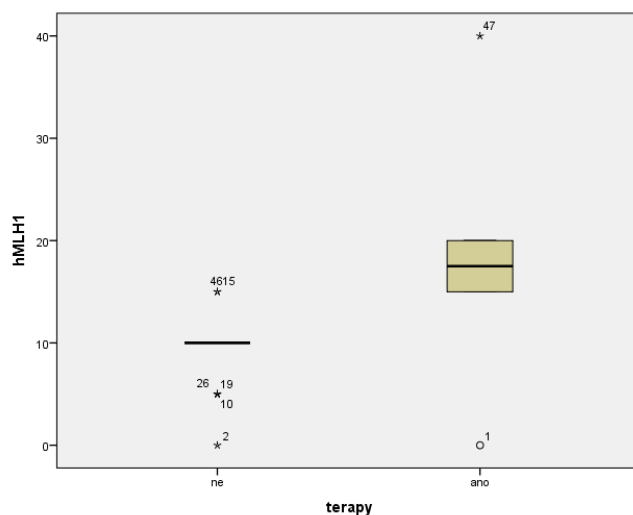


Obr. 6: Korelace exprese RBPMS2 s progresí nádorového onemocnění

U všech vzorků byl zkoumán také možný vliv terapie na expresi daných proteinů. U pacientů podstupujících terapii byla zaznamenána korelace s vyšší expresí hMLH1 ($p = 0,011$) viz Obr. 8. Současně byla zaznamenána i tendence ke korelaci mitotické aktivity tumoru s terapií ($p = 0,065$) viz Obr. 7.

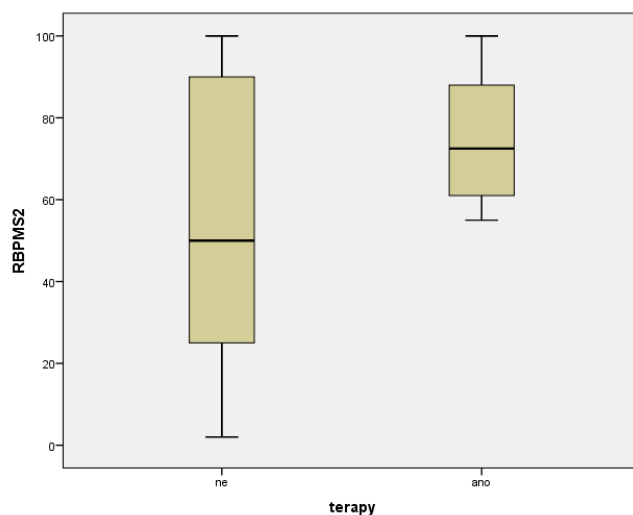


Obr. 7: Korelace mitotické aktivity tumoru s terapií



Obr. 8: Korelace exprese hMLH1 s terapií

Nezávisle na použití terapie byla zaznamenána vysoká exprese RBPMS2 (Obr. 9).



Obr. 9: Korelace exprese RBPMS2 s terapií

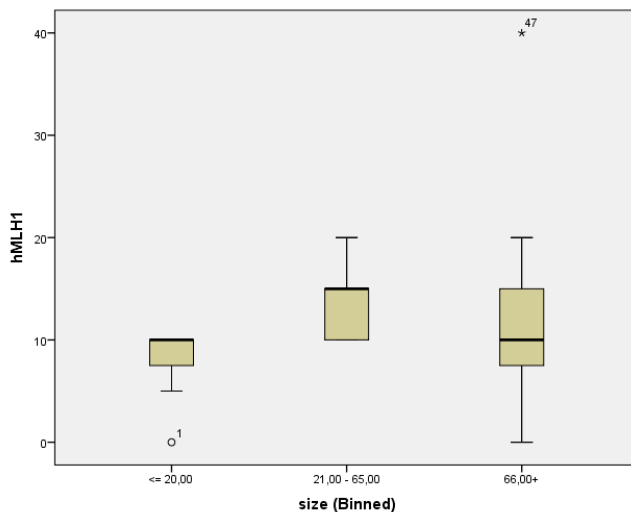
Veškeré studované vzorky GIST byly rozděleny do tří velikostních skupin: ≤ 20 mm; 21 - 65 mm a >66 mm.

U velikostních skupin ≤ 20 mm a 21 - 65 mm koreluje velikost tumoru s expresí hMLH1 ($p = 0,013$) a tendenci ke korelaci vykazuje exprese p21 ($p = 0,065$) viz Obr. 10.

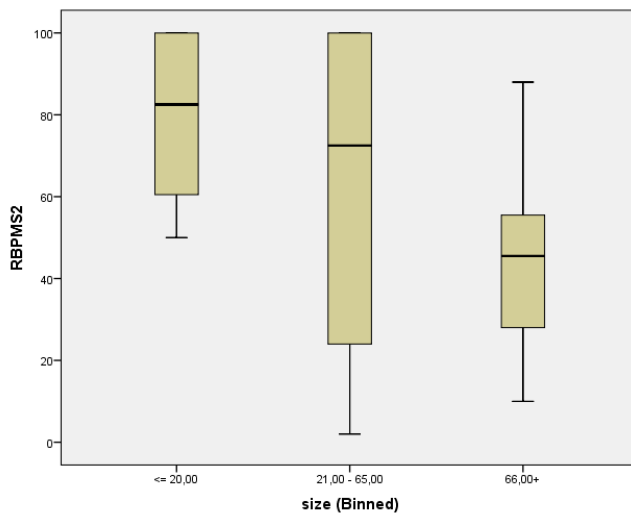
Dále byla statisticky hodnocena korelace mezi expresí daných proteinů a vzorky GIST náležejícími do velikostních skupin ≤ 20 mm a >66 mm. Zde byla

zjištěna signifikantní korelace s expresí RBPMS2 ($p = 0,008$) a tendence ke korelaci s mitotickou aktivitou ($p = 0,073$) viz Obr. 11.

Jako poslední zbylá možnost byla hledána korelace mezi expresí daných proteinů a vzorky GIST patřícími do velikostních skupin 21 - 65 mm a >66 mm. V tomto případě byla signifikantní korelace s expresí p21 ($p = 0,006$) a mitotickou aktivitou tumoru ($p = 0,030$).



Obr. 10: Korelace exprese hMLH1 s velikostí tumoru



Obr. 11: Korelace exprese RBPMS2 s velikostí tumoru

6. Diskuze

V rámci studovaného souboru pacientů byla zjištěna korelace mezi expresí proteinu hMLH1 a stupněm rizika rekurence ($p = 0,027$), velikostí tumoru ($p = 0,013$) a podstoupenou terapií ($p = 0,011$). Zároveň byla zaznamenána tendence ke korelaci exprese hMSH2 se stupněm rizika rekurence GIST ($p = 0,067$). Tyto výsledky podporují teorii zdůvodňující vyšší expresi genů *MLH1* a *MSH2* v tumorech. Podstatou této teorie je, že v nádorech s vyšší proliferační aktivitou dochází často během replikace k poškození DNA, zastavení buněčného cyklu a navození apoptózy. Z těchto důvodů je potřebné větší množství proteinů hMLH1 a hMSH2, které plní svou funkci právě v kontrolních bodech buněčného cyklu. Dle dostupných informací nebyla dosud zkoumána imunohistochemická exprese hMLH1 a hMSH2 ve větším počtu vzorků GIST, a proto se jedná o unikátní výsledky. K dispozici jsou prozatím práce zabývající se mírou metylace promotoru genu *MLH1* v GIST, jejich závěry se ovšem velmi liší (House *et al.*, 2003; Igarashi *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2008).

Na souboru pacientů hodnoceném v této práci, který je relativně velký vzhledem k vzácnému výskytu daného onemocnění, se potvrdilo, že RBPMS2 je možno využít jako diagnostický marker GIST. Exprese tohoto proteinu byla vysoká v naprosté většině vzorků GIST. Ovšem nebyl potvrzen prognostický význam exprese proteinu RBPMS2 ($p = 0,520$). Tento výsledek je v rozporu s původní hypotézou. Nicméně vzhledem k tomu, že neexistují jiné práce, které by se touto problematikou zabývaly, s výjimkou práce Hapkové *et al.* (2013), bude nutné tento výsledek ověřit multicentrickou studií.

V rámci této práce byla také zjištěna korelace mezi expresí p21 a progresí GIST bez ohledu na lokalizaci primárního tumoru ($p = 0,044$). Uvedený fakt je v souladu s obecně známým faktem, že zvýšená exprese p21 u solidních nádorů je spojena s horší prognózou. Toto zjištění podporuje hypotézu kolegů Liu *et al.* (2006), kteří zjistili, že zvýšená exprese p21 může být nezávislým prognostickým faktorem určujícím malignitu GIST. Studie Blair *et al.* (2005) rovněž potvrzuje, že v GIST je zvýšená exprese proteinu p21.

Z výsledků této práce je rovněž zřejmé, že zvýšená exprese aberantního proteinu p53 je spojena s progresí GIST ($p = 0,022$) a je zde i tendence ke korelaci se stupněm rizika rekurence ($p = 0,062$). Jiné práce se rovněž zabývaly danou

problematikou a většina studií svými výsledky potvrzuje výše uvedený fakt. Expresí p53 podle výsledků studií rovněž koreluje u pacientů s GIST s počtem mitóz, rizikem malignity, tvorbou metastáz po kompletní resekci tumoru a se sníženou pravděpodobností přežití pacientů (Fang *et al.*, 2013; Hata *et al.*, 2006; Hillemanns *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2013; Martínez-Consuegra *et al.*, 2006; Menéndez *et al.*, 2011; Romeo *et al.*, 2009; Zong *et al.*, 2012). Ovšem existují také studie, které neprokázaly korelace mezi expresí p53, prognózou a pravděpodobností přežití pacientů s GIST (Artigiani Neto *et al.*, 2012; Cunningham *et al.*, 2001; Wallander *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2003). Možné příčiny rozdílných závěrů studií lze objasnit používáním různých klonů protilátek proti p53 k imunohistochemické detekci tohoto proteinu. Dále bylo zjištěno, že nemutovaný p53 je ve vzorcích hůře detekovatelný, kvůli své nestabilitě, oproti mutovanému p53, který je snadno detekovatelný. Některé studie používají vzorky tkáně o malé velikosti tzv. tissue microarrays, což u GIST není vhodné, jelikož se jedná o tumor s heterogenní strukturou, a tudíž i exprese proteinů nebývá ve tkáni GIST rovnoměrná. Tyto vyjmenované faktory ve výsledku ovlivňují analyzovanou míru exprese p53 a tím i závěry studií.

Výsledky této práce rovněž potvrdily obecně známý fakt, že mitotická aktivita vzorků GIST koreluje se stupněm rizika rekurence ($p = 0,049$), progresí ($p = 0,007$) a velikostí tumoru ($p = 0,030$), což je zohledněno i v prognostických tabulkách hodnotících riziko progresu u pacientů s GIST (Tab. I, II).

7. Závěr

Gastrointestinální stromální tumory jsou nejčastějšími mesenchymálními nádory trávicího traktu. GIST jsou odolné vůči konvenční chemoterapii i ozařování. Jelikož tyto tumory dobře reagují na cílenou terapii, která byla objevena na základě molekulárně genetických studií, slouží GIST jako model pro vývoj cílené terapie vhodné pro léčbu jiných typů solidních tumorů. Tato bakalářská práce shrnuje současné poznatky týkající se diagnostiky, histologie, cílené terapie, molekulární klasifikace a charakterizace tohoto unikátního tumoru.

V experimentální části práce jsem se zabývala imunohistochemickou detekcí proteinů RBPMS2, hMLH1, hMSH2, p53 a p21 ve vzorcích tkání z GIST. Jelikož GIST ve většině případů vykazuje maligní chování, zaměřila jsem se právě na detekci proteinů, které se účastní procesů probíhajících během kontrolních bodů buněčného cyklu, reparace DNA a apoptózy.

Výsledky této práce potvrdily souvislost mezi overexpresí proteinů p53, p21 a zvýšeným rizikem progresu GIST (p53: $p = 0,022$; p21: $p = 0,044$). Toto zjištění lze logicky zdůvodnit, jelikož při poruchách buněčného cyklu je zvýšena exprese p53, který poté aktivuje gen kódující p21, jenž zastaví buněčný cyklus v kontrolním bodě G_1 . Tyto výsledky podporují využití p21 jako nového nezávislého prognostického markeru umožňujícího stanovit malignitu GIST.

Dále byla analyzována exprese proteinů hMLH1 a hMSH2 a v rámci souboru testovaných vzorků byl prokázán signifikantní vztah mezi expresí hMLH1 a rizikem rekurence ($p = 0,027$) a velikostí GIST ($p = 0,013$). Tento výsledek souvisí s vysokou proliferační aktivitou maligních případů GIST, kdy při replikaci DNA dochází k jejímu poškození následovanému aktivací mechanismů reparujících DNA, jejichž součástí jsou právě proteiny hMLH1 a hMSH2.

Výsledky této práce nepotvrdily předpokládané využití RBPMS2 ke stanovení prognózy pacientů s GIST, jelikož nebyla prokázána korelace mezi rizikem rekurence GIST a expresí RBPMS2 ($p = 0,520$). Tento výsledek ovšem bude ještě nutné ověřit multicentrickou studií. Výsledky práce ovšem potvrdily, že RBPMS2 je možné využít jako diagnostický marker GIST.

8. Literatura

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: 853-859.

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 tumors occurs through secondary gene mutation. *Clin. Cancer Res.* 11: 4182-4190.

Artigiani Neto, R., Logullo, A.F., Stávale, J.N., Lourenço, L.G. (2012): Ki-67 expression score correlates to survival rate in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Acta Cir Bras.* 27: 315-321.

Blair, S.L., Al-Refaie, W.B., Wang-Rodriguez, J., Behling, C., Ali, M.W., Moossa, A.R. (2005): Gastrointestinal stromal tumors express ras oncogene: a potential role for diagnosis and treatment. *Arch Surg.* 140: 543-547.

Burkill, G.J., Badran, M., Al-Muderis, O., Meirion Thomas, J., Judson, I.R., Fisher, C., Moskovic, E.C. (2003): Malignant gastrointestinal stromal tumor: distribution, imaging features, and pattern of metastatic spread. *Radiology* 226: 527-532.

Cunningham, R.E., Abbondanzo, S.L., Chu, W.S., Emory, T.S., Sobin, L.H., O'Leary, T.J. (2001): Apoptosis, bcl-2 expression, and p53 expression in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 9: 19-23.

de Santa Barbara, P., van den Brink, G.R., Roberts, D.J. (2002): Molecular etiology of gut malformations and diseases. *Am J Med Genet* 115: 221-230.

Debiec-Rychter, M., Sciot, R., Le Cesne, A., Schlemmer, M., Hohenberger, P., van Oosterom, A.T., Blay, J.Y., Leyvraz, S., Stul, M., Casali, P.G., Zalcborg, J., Verweij, J., Van Glabbeke, M., Hagemeyer, A., Judson, I. (2006): KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Cancer* 42: 1093-1103.

Demetri, G.D., von Mehren, M., Antonescu, C.R., DeMatteo, R.P., Ganjoo, K.N., Maki, R.G., Pisters, P.W., Raut, C.P., Riedel, R.F., Schuetze, S., Sundar, H.M., Trent, J.C., Wayne, J.D. (2010): NCCN Task Force report: update on the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *J Natl Compr Canc Netw. Suppl 2*: S1-41.

Dowty, J.G., Win, A.K., Buchanan, D.D., Lindor, N.M., Macrae, F.A., Clendenning, M., Antill, Y.C., Thibodeau, S.N., Casey, G., Gallinger, S., Marchand, L.L., Newcomb, P.A., Haile, R.W., Young, G.P., James, P.A., Giles, G.G., Gunawardena, S.R., Leggett, B.A., Gattas, M., Boussioutas, A., Ahnen, D.J., Baron, J.A., Parry, S., Goldblatt, J., Young, J.P., Hopper, J.L., Jenkins, M.A. (2013): Cancer risks for MLH1 and MSH2 mutation carriers. *Hum Mutat. 34*: 490-497.

Fang, Y.J., Zhang, R.X., Luo, R.Z., Ou, Q.J., Wan, D.S., Pan, Z.Z., Wu, X.J. (2013): Study on associated biomarkers influencing recurrence, metastasis and prognosis in patients with gastrointestinal stromal tumors after complete resection. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi. 16*: 242-246.

Faure, S., de Santa Barbara, P., Roberts, D.J., Whitman, M. (2002): Endogenous patterns of BMP signaling during early chick development. *Dev Biol. 244*: 44-65.

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. *Hum Pathol. 33*: 459-465.

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

Gabella, G. (2002): Development of visceral smooth muscle. *Results Probl Cell Differ 38*: 1-37.

Gerber, W.V., Yatskievych, T.A., Antin, P.B., Correia, K.M., Conlon, R.A., Krieg, P.A. (1999): The RNA-binding protein gene, hermes, is expressed at high levels in the developing heart. *Mech Dev. 80*: 77-86.

Gill, A.J., Chou, A., Vilain, R., Clarkson, A., Lui, M., Jin, R., Tobias, V., Samra, J., Goldstein, D., Smith, C., Sioson, L., Parker, N., Smith, R.C., Sywak, M., Sidhu, S.B.,

Wyatt, J.M., Robinson, B.G., Eckstein, R.P., Benn, D.E., Clifton-Bligh, R.J. (2010): Immunohistochemistry for SDHB divides gastrointestinal stromal tumors (GISTs) into 2 distinct types. *Am J Surg Pathol* 34: 636.

Haller, F., Schulten, H-J., Armbrust, T., Langer, C., Gunawan, B., Füzesi, L. (2007): Multicentric sporadic gastrointestinal stromal tumors (GISTs) of the stomach with distinct clonal origin: differential diagnosis to familial and syndromal GIST variants and peritoneal metastasis. *Am J Surg Pathol* 31: 933-937.

Hapkova, I., Skarda, J., Rouleau, C., Thys, A., Notarnicola, C., Janikova, M., Bernex, F., Rypka, M., Vanderwinden, J.M., Faure, S., Vesely, J., de Santa Barbara, P. (2013): High expression of the RNA-binding protein RBPMS2 in gastrointestinal stromal tumors. *Exp Mol Pathol*. 94: 314-321.

Hata, Y., Ishigami, S., Natsugoe, S., Nakajo, A., Okumura, H., Miyazono, F., Matsumoto, M., Hokita, S., Aikou, T. (2006): P53 and MIB-1 expression in gastrointestinal stromal tumor (GIST) of the stomach. *Hepatogastroenterology* 53: 613-615.

Heinrich, M.C., Owzar, K., Corless, C.L., Hollis, D., Borden, E.C., Fletcher, C.D., Ryan, C.W., von Mehren, M., Blanke, C.D., Rankin, C., Benjamin, R.S., Bramwell, V.H., Demetri, G.D., Bertagnolli, M.M., Fletcher, J.A. (2008): Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the north american intergroup phase III trial of imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor: CALGB 150105 study by cancer and leukemia group B and southwest oncology group. *J Clin Oncol* 26: 5360-5367.

Henze, J., Mühlenberg, T., Simon, S., Grabelius, F., Rubin, B., Taeger, G., Schuler, M., Treckmann, J., Debiec-Rychter, M., Taguchi, T., Fletcher, J.A., Bauer, S. (2012): p53 modulation as a therapeutic strategy in gastrointestinal stromal tumors. *PLoS One*. 7: e37776. doi: 10.1371/journal.pone.0037776.

Hersh, MR., Choi, J., Garrett, C., Clark, R. (2005): Imaging gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Control* 12: 111-115.

Hillemanns, M., Päsold, S., Böttcher, K., Höfler, H. (1998): Prognostic factors of gastrointestinal stromal tumors of the stomach. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 82: 261-266.

Horton, K.M., Juluru, K., Montgomery, E., Fishman, E.K. (2004): Computed tomography imaging of gastrointestinal stromal tumors with pathology correlation. *Comput Assist Tomogr* 28: 811-817.

House, M.G., Guo, M., Efron, D.T., Lillemoe, K.D., Cameron, J.L., Syphard, J.E., Hooker, C.M., Abraham, S.C., Montgomery, E.A., Herman, J.G., Brock, M.V. (2003): Tumor suppressor gene hypermethylation as a predictor of gastric stromal tumor behavior. *J Gastrointest Surg*. 7: 1004-1014.

Chen, L.L., Trent, J.C., Wu, E.F., Fuller, G.N., Ramdas, L., Zhang, W., Raymond, A.K., Prieto, V.G., Oyediji, C.O., Hunt, K.K., Pollock, R.E., Feig, B.W., Hayes, K.J., Choi, H., Macapinlac, H.A., Hittelman, W., Velasco, M.A., Patel, S., Burgess, M.A., Benjamin, R.S., Frazier, M.L. (2004): A missense mutation in KIT domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*. 64: 5913-5919.

Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., Kaina, B. (2003): Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193: 3-34.

Igarashi, S., Suzuki, H., Niinuma, T., Shimizu, H., Nojima, M., Iwaki, H., Nobuoka, T., Nishida, T., Miyazaki, Y., Takamaru, H., Yamamoto, E., Yamamoto, H., Tokino, T., Hasegawa, T., Hirata, K., Imai, K., Toyota, M., Shinomura, Y. (2010): A novel correlation between LINE-1 hypomethylation and the malignancy of gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res*. 16: 5114-5123.

Jiang, J., Jin, M.S., Suo, J., Wang, Y.P., He, L., Cao, X.Y. (2012): Evaluation of malignancy using Ki-67, p53, EGFR and COX-2 expressions in gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol*. 18: 2569-2575.

Kim, M.Y., Park, Y.S., Choi, K.D., Lee, J.H., Choi, K.S., Kim do, H., Song, H.J., Lee, G.H., Jung, H.Y., Kim, J.H., Yun, S.C., Kim, K.C., Yook, J.H., Oh, S.T., Kim, B.S., Ryu, M.H., Kang, Y.K. (2012): Predictors of recurrence after resection of small gastric gastrointestinal stromal tumors of 5 cm or less. *J Clin Gastroenterol*. 46: 130-137.

Kloor, M., Staffa, L., Ahadova, A., von Knebel Doeberitz, M. (2014): Clinical significance of microsatellite instability in colorectal cancer. *Langenbecks Arch Surg*. 399: 23-31.

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

Li, F., Mao, G., Tong, D., Huang, J., Gu, L., Yang, W., Li, G.M. (2013): The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS α . *Cell*. 153: 590-600.

Li, G.M. (2013): Decoding the histone code: Role of H3K36me3 in mismatch repair and implications for cancer susceptibility and therapy. *Cancer Res.* 73: 6379-6383.

Liegl-Atzwanger, B., Fletcher, J.A., Fletcher, C.D. (2010): Gastrointestinal stromal tumors. *Virchows Arch* 456: 111-127.

Liu, F.Y., Qi, J.P., Xu, F.L., Wu, A.P. (2006): Clinicopathological and immunohistochemical analysis of gastrointestinal stromal tumor. *World J Gastroenterol.* 12: 4161-4165.

Longley, B.J., Reguera, M.J., Ma, Y. (2001): Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications in disease classification and therapy. *Leuk. Res.* 25: 571-576.

Lv, A., Li, Z., Tian, X., Guan, X., Zhao, M., Dong, B., Hao, C. (2013): SKP2 high expression, KIT exon 11 deletions, and gastrointestinal bleeding as predictors of poor prognosis in primary gastrointestinal stromal tumors. *PLoS One.*, 8:e62951. doi: 10.1371/journal.pone.0062951.

Martínez-Consuegra, N., Baquera-Heredia, J., de León-Bojorge, B., Padilla-Rodríguez, A., Hidalgo, C.O. (2006): Expression of p53 and BCL-2 as prognostic markers and for anatomical location in gastrointestinal stromal tumors (GIST). Clinico-pathological and immunohistochemistry study of 19 cases. *Rev Gastroenterol Mex.* 71: 269-278.

Menéndez, P., Padilla, D., Cubo, T., Villarejo, P., Gambí, D., Menéndez, J.M., Colina, F., García, M., Lora, D., Martín, J. (2011): Biological behavior due to cell proliferation markers of gastrointestinal stromal tumors. *Hepatogastroenterology* 58: 76-80.

Miettinen, M., Lasota, J. (2001): Gastrointestinal stromal tumors - definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch.* 438: 1-12.

Miettinen, M., Makhlof, H., Sobin, L.H., Lasota, J. (2006): Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term followup. *Am J Surg Pathol* 30: 477-489.

Miettinen, M., Sobin, L.H., Lasota, J. (2005): Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 29: 52-68.

Mol, C.D., Dougan, D.R., Schneider, T.R., Skene, R.J., Kraus, M.L., Scheibe, D.N., Snell, G.P., Zou, H., Sang, B.C., Wilson, K.P. (2004): Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 279: 31655-31663.

Notarnicola, C., Rouleau, C., Le Guen, L., Virsolvy, A., Richard, S., Faure, S., De Santa Barbara, P. (2012): The RNA-binding protein RBPMS2 regulates development of gastrointestinal smooth muscle. *Gastroenterology.* 143: 687-697.

Novelli, M., Rossi, S., Rodriguez-Justo, M., Tanriere, P., Seddon, B., Toffolatti, L., Sartor, C., Hogendoorn, P.C.W., Sciot, R., Van Glabbeke, M., Verweij, J., Blay, J.Y., Hohenberger, P., Flanagan, A., Dei Tos, A.P. (2010): DOG1 and CD117 are the antibodies of choice in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 57: 259-270.

O'Riain, C., Corless, C.L., Heinrich, M.C., Keegan, D., Vioreanu, M., Maguire, D., Sheahan, K. (2005): Gastrointestinal stromal tumors: insights from a new familial GIST kindred with unusual genetic and pathologic features. *Am J Surg Pathol* 29: 1680-1683.

Pappo, A.S., Janeway, K.A. (2009): Pediatric gastrointestinal stromal tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* 23: 15-34.

Pawson, T. (2002): Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur. J. Cancer* 38: S3-S10.

Rammohan, A., Sathyanesan, J., Rajendran, K., Pitchaimuthu, A., Perumal, S., Srinivasan, U., Ramasamy, R., Palaniappan, R., Govindan, M. (2013): A gist of gastrointestinal stromal tumors: A review. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 5: 102-112.

Ricci, R., Dei Tos, A.P., Rindi, G. (2013): GISTogram: a graphic presentation of the growing GIST complexity. *Virchows Arch.* 463: 481-487.

Romeo, S., Debiec-Rychter, M., Van Glabbeke, M., Van Paassen, H., Comite, P., Van Eijk, R., Oosting, J., Verweij, J., Terrier, P., Schneider, U., Sciot, R., Blay, J.Y., Hogendoorn, P.C. (2009): Cell cycle/apoptosis molecule expression correlates with imatinib response in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res.* 15: 4191-4198.

Rubin, B.P., Heinrich, M.C., Corless, C.L. (2007): Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet* 368: 1731-1741.

Saito, K., Sakurai, S., Sano, T., Sakamoto, K., Asao, T., Hosoya, Y., Nakajima, T., Kuwano, H. (2008): Aberrant methylation status of known methylation-sensitive CpG islands in gastrointestinal stromal tumors without any correlation to the state of c-kit and PDGFRA gene mutations and their malignancy. *Cancer Sci.* 99: 253-259.

Seifert, M., Reichrath, J. (2006): The role of the human DNA mismatch repair gene hMSH2 in DNA repair, cell cycle control and apoptosis: implications for pathogenesis, progression and therapy of cancer. *J Mol Histol.* 37: 301-307.

Shimamoto, A., Kitao, S., Ichikawa, K., Suzuki, N., Yamabe, Y., Imamura, O., Tokutake, Y., Satoh, M., Matsumoto, T., Kuromitsu, J., Kataoka, H., Sugawara, K., Sugawara, M., Sugimoto, M., Goto, M., Furuichi, Y. (1996): A unique human gene that spans over 230 kb in the human chromosome 8p11-12 and codes multiple family proteins sharing RNA-binding motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 10913-10917.

St Johnston, D. (2005): Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6: 363-375.

Wallander, M.L., Layfield, L.J., Tripp, S.R., Schmidt, R.L. (2013): Gastrointestinal stromal tumors: clinical significance of p53 expression, MDM2 amplification, and KIT mutation status. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 21: 308-312.

Wong, N.A., Young, R., Malcomson, R.D., Nayar, A.G., Jamieson, L.A., Save, V.E., Carey, F.A., Brewster, D.H., Han, C., Al-Nafussi, A. (2003): Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. *Histopathology* 43: 118-126.

Zong, L., Chen, P., Jiang, J., Wang, L., Li, Q.G. (2012): Predictive value of p53 expression in the risk of malignant gastrointestinal stromal tumors: Evidence from 19 studies. *Exp Ther Med.* 3: 87-92.

Internetové zdroje:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11030>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_009364.1

9. Seznam použitých zkratek a symbolů

A	adenin
ABL	Abelson tyrosine-protein kinase
AP2	transkripční faktor AP2
ATM	ataxia-telangiectasia-mutated kinase
ATP	adenosintrifosfát
ATR	ATM- and Rad3-related kinase
BCR-ABL	fúzní protein BCR-ABL
BMP	bone morphogenetic protein
<i>BRAF</i>	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
C	cytosin
CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
CD117	epitop extracelulární domény KIT receptoru
CD34	antigen CD34
CDK1	cyklin-dependentní kináza 1
CDK2	cyklin-dependentní kináza 2
CDK4	cyklin-dependentní kináza 4
CDK6	cyklin-dependentní kináza 6
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor
CT	počítačová tomografie
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOG1	discovered on GIST 1
E2F	transkripční faktor E2F
G	guanin
GIST	gastrointestinální stromální tumor
hedgehog	sonic hedgehog protein
hMLH1	protein kódovaný genem <i>MLH1</i>
hMSH2	protein kódovaný genem <i>MSH2</i>
hMSH3	protein kódovaný genem <i>MSH3</i>
hMSH6	protein kódovaný genem <i>MSH6</i>
HNPCC	Lynchův syndrom

HPF	plocha zorného pole mikroskopu o rozměru 5 mm ² při zvětšení 40krát
hPMS2	protein kódovaný genem <i>PMS2</i> (<i>postmeiotic segregation increased 2</i>)
ICC	intersticiální Cajalovy buňky
<i>KIT</i>	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
Ki67	proliferační marker
MDM2	murine double-minute 2
<i>MLH1</i>	<i>mutL homolog 1</i>
MMR	oprava chybného párování bází řízená metylací
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
<i>MSH2</i>	<i>mutS homolog 2</i>
<i>MSH6</i>	<i>mutS homolog 6</i>
MSI	nestabilita mikrosatelitů
MSI-H	vyšší nestabilita mikrosatelitů
MutL α	komplex proteinů hMLH1 a hPMS2
MutS α	komplex proteinů hMSH2 a hMSH6
MutS β	komplex proteinů hMSH2 a hMSH3
NF-E1	GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)
NFI	nuclear factor I/C (CCAAT-binding transcription factor)
p	krátké rameno chromosomu nebo statistická veličina
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p53	tumor supresorový protein p53
PCNA	proliferační buněčný jaderný antigen
PDGFR	receptor destičkového růstového faktoru
PDGFRA	receptor destičkového růstového faktoru - alfa
PDGFRB	receptor destičkového růstového faktoru - beta
PDGFs	destičkové růstové faktory
PI3K/AKT	dráha 1-fosfatidylinozitol-3-kinázy a serin-treonin proteinkinázy kódované genem <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
q	dlouhé rameno chromosomu
Rac/Rho-JNK	dráha serin-treonin proteinkinázy kódované genem <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i> / proteinu kódovaného

	genem <i>ras homolog family member D</i> - mitogenem aktivované proteinkinázy 8
Ras/MAPK	kaskáda dějů, kterých se účastní protein p21 ^{ras} a mitogenem aktivované proteinkinázy
<i>RBPMs</i>	<i>RNA binding protein with multiple splicing</i>
RBPMs2	RNA-binding protein with multiple splicing 2
RBP _s	proteiny vázající se na RNA
RFC	replikační faktor C
RNA	ribonukleová kyselina
RNP1	úsek RBPMs2 kódovaný genem <i>RNA binding motif, single stranded interacting protein 2</i>
RNP2	úsek RBPMs2 kódovaný genem <i>RNA binding motif, single stranded interacting protein 2 RPA</i>
RRM	RNA recognition motif
S100	S100 calcium-binding protein A12
SCF	stem cell factor
SDHB	podjednotka B sukcinát dehydrogenázy
SDHC	podjednotka C sukcinát dehydrogenázy
SDHD	podjednotka D sukcinát dehydrogenázy
SFK/STAT	Src family kinase/ signal transducer and activator of transcription
SM22	smooth muscle protein-22
SMCs	buňky viscerálního hladkého svalstva
SM-MHC	smooth muscle myosin heavy chain
Sp1	transkripční faktor Sp1
SRF	serum response factor
T	tymin
<i>TP53</i>	<i>tumor protein p53</i>
Tris	Tris pufr (2-amino-2-hydroxymetylpropan-1,3-diol)
VEGFR	receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru
WT GIST	wild-type GIST
Z	celkové zvětšení mikroskopu
αSMA	α-smooth muscle actin