

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Dottorato di Ricerca in

Oncologia e Patologia Sperimentale

XXIX Ciclo

Settore Concorsuale: SC 06/D3

Settore Scientifico Disciplinare: SSD MED/06

***Next Generation Sequencing* di tumori stromali
gastrointestinali (GIST) resistenti al trattamento con gli
inibitori dei recettori tirosin-chinasici**

Presentata da **Dott.ssa Milena Urbini**

Coordinatore

Prof. Pier-Luigi Lollini

Relatore

Prof. Guido Biasco

Esame Finale anno 2017

INTRODUZIONE

1. I TUMORI STROMALI GASTROINTESTINALI (GIST)

- 1.1 Epidemiologia ed eziologia
- 1.2 Presentazione clinica
- 1.3 Diagnosi anatomo-patologica
- 1.4 Classificazione molecolare
- 1.5 Origine
- 1.6 Classificazione del rischio di recidiva
- 1.7 Trattamento della malattia localizzata
- 1.8 Trattamento della malattia avanzata
- 1.9 Livelli di risposta ai TKI e fenomeni di resistenza

2. NEXT GENERATION SEQUENCING

- 2.1 Tecniche di sequenziamento di nuova generazione
- 2.2 Il cancro e il genoma

3. SCOPO

4. MATERIALI E METODI

- 4.1 Casi
- 4.2 Sequenziamento massivo dell'esoma e del trascrittoma
- 4.3 Analisi Bionformatica
- 4.4 Analisi espressione genica con microarray
- 4.5 Analisi di copy number con i microarray
- 4.6 Profilo di espressione dei miRNA
- 4.7 Genotipizzazione polimorfismi
- 4.8 Analisi statistica dei genotipi di rischio
- 4.9 Immunoistochimica (IHC)
- 4.10 Estrazione proteica ed analisi mediante Western Blot
- 4.11 Conversione con bisolfito e studio della metilazione
- 4.12 PCR quantitativa (qPCR)

4.13 Sequenziamento Sanger

4.14 Colture cellulari e trattamento con GANT61

5. RISULTATI

5.1 Profilo di espressione genica dei diversi sottogruppi molecolari

5.2 Caratterizzazione dei GIST secondariamente resistenti ai TKI

5.2.1 Alterazioni molecolari dei GIST KIT esone 11 metastatici

5.2.2 Ricorrenza dell'inattivazione di DMD nei GIST metastatici

5.2.3 Correlazione tra genotipo e risposta a Imatinib nei GIST KIT esone 11

5.3 Caratterizzazione dei GIST primariamente resistenti ai TKI

5.3.1 Ruolo della metilazione nei GIST KIT/PDGFRA WT

5.3.2 Analisi mutazionale dei GIST quadrupli WT

6. DISCUSSIONE

6.1 Studio meccanismi di resistenza secondaria

6.2 Studio meccanismi di resistenza primaria

7. CONCLUSIONE

8. TABELLE

9. FIGURE

10. BIBLIOGRAFIA

11. PUBBLICAZIONI INERENTI IL PROGETTO DI DOTTORATO

12. PUBBLICAZIONI DURANTE IL PERIODO DI DOTTORATO NON INERENTI AL PROGETTO

1. INTRODUZIONE

I tumori stromali gastrointestinali (GIST), pur essendo la forma maligna mesenchimale più comune del tubo digerente, appartengono ai tumori rari, con un'incidenza pari a 1,5 nuovi casi/100.000 abitanti/anno. Sotto il profilo biologico, circa l'85% dei GIST sporadici dell'adulto si caratterizza per la presenza di mutazioni a carico dei geni codificanti i recettori tirosin-chinasici KIT o PDGFRA, con conseguente attivazione costitutiva della cascata di segnalazione a valle. Ad oggi questi due recettori rappresentano i principali target terapeutici degli inibitori tirosin-chinasici (TKI). Nonostante che l'introduzione dei TKI nel trattamento dei GIST abbia enormemente modificato la storia naturale di questi tumori, circa il 10-15% dei pazienti risultano primariamente resistenti, ovvero sviluppano una resistenza entro 6 mesi dall'inizio del trattamento (resistenza primaria). Inoltre, circa la metà dei pazienti inizialmente responsivi alla terapia, sviluppano una resistenza mediamente entro 24 mesi (resistenza secondaria). La resistenza è strettamente correlata allo stato mutazionale di KIT e PDGFRA. I GIST con mutazione D842V in PDGFRA e generalmente i casi WT tendono ad avere resistenza primaria ai TKI, mentre i KIT^{mut} e tutti gli altri casi PDGFRA^{mut} tendono a rispondere inizialmente ai TKI e poi eventualmente sviluppare resistenza secondaria. E' quindi importante caratterizzare nei diversi sottogruppi GIST i meccanismi molecolari legati all'acquisizione dei fenomeni di resistenza ed eventualmente individuare nuovi target terapeutici per la gestione e la cura dei pazienti.

Con lo sviluppo delle tecniche di *Next Generation Sequencing* (NGS) si è arrivati ad oggi a poter sequenziare l'intero genoma umano, l'esoma (*Exome-seq*) o il trascrittoma (*RNA-seq*) con tempi e costi relativamente contenuti. Insieme queste tecnologie hanno le potenzialità di identificare, in modo sensibile ed efficiente, tutte le anomalie genetiche (mutazioni, fusioni tra geni, inserzioni, delezioni, riarrangiamenti) delle cellule tumorali.

L'identificazione e la caratterizzazione tramite NGS delle alterazioni geniche nei tumori GIST resistenti ai TKI rappresenta il rationale della presente tesi, che in questi anni si è sviluppata in due fasi analitiche. Come prima fase si è proceduto con lo studio delle alterazioni acquisite nei GIST KIT^{mut} secondariamente resistenti e con la valutazione dell'influenza del genotipo del paziente nella risposta al trattamento. Poi si è proceduto secondariamente a studiare i GIST WT, in quanto gruppo eterogeneo di estrema complessità biologica e primariamente resistente al trattamento con TKI.

2. I TUMORI STROMALI GASTROINTESTINALI

2.1 Epidemiologia ed eziologia

I GIST rappresentano solo lo 0,2% di tutte le neoplasie del tratto gastrointestinale, pur essendo la forma maligna mesenchimale più comune del tubo digerente, rientrano nell'ambito delle neoplasie rare. La loro incidenza è pari a 1,5 nuovi casi/100.000 abitanti/anno [Miettinen et al, 2003]. L'età di insorgenza è piuttosto ampia e può interessare ogni decade di età, con un'età media di insorgenza per le forme sporadiche che si aggira tra i 55 e i 65 anni ed un'incidenza lievemente maggiore nel sesso maschile. Tuttavia esistono casi sporadici anche in età infantile e giovanile, definiti come GIST infantili. Infine esistono forme di GIST familiare, nell'ambito della Neurofibromatosi di tipo 1, della Sindrome di Carney e della Sindrome di Carney-Stratakis, la cui età di insorgenza è più precoce, infantile o giovanile, entro i 30 anni [Stratakis et al, 2009; Janeway et al, 2009; Miettinen et al, 2003].

2.2 Presentazione clinica

Nella maggior parte dei casi GIST insorgono all'interno della parete del tubo gastroenterico, in particolare il 50-60% origina dallo stomaco, il 20-30% dal piccolo intestino, il 5-10% dal retto, colon o esofago. Più raramente di manifestano GIST extragastrointestinali, originanti dal mesentere o dall'omento [Corless et al, 2008; Miettinen et al, 2003]. Il diametro delle lesioni può variare da pochi mm fino a 30-50cm. Circa il 30% dei casi si presenta alla diagnosi con una localmente avanzata o metastatica all'esordio. Tipicamente la malattia avanzata è caratterizzata da diffusione epatica e/o peritoneale. Circa il 65% dei pazienti metastatici presenta coinvolgimento di fegato, circa il 20% del peritoneo, mentre sono più rare le localizzazione a livello linfonodale, scheletrico o polmonare [De Matteo et al, 2000]. Prima dell'avvento di Imatinib, il trattamento dei casi avanzati prevedeva l'utilizzo di schemi chemioterapici con un tasso di risposta inferiore al 10% e nessun vantaggio in termini di sopravvivenza [Edmonson et al, 2002, De Matteo et al, 2002].

2.3 Diagnosi anatomo-patologica

La diagnosi anatomo-patologica di GIST si basa sulla combinazione della valutazione morfologica, dell'immunoistochimica (IHC) e, in casi selezionati, dell'analisi molecolare.

Dal punto di vista morfologico, i GIST si suddividono in GIST a cellule fusate, a cellule epitelioidee e misti. Tale sub classificazione non ha però rilevanza clinica. Il pattern predominante, indipendentemente dalla sede, è quello a cellule fusate, osservato nel 70-80% dei GIST e caratterizzato da cellule a forma allungata con nuclei ovali e possibili vacuoli perinucleari. Il restante 20-30% dei GIST, invece, è formato prevalentemente da grandi cellule rotonde o poligonali, di aspetto epitelioide, con bordi cellulari ben definiti e con abbondante e chiaro citoplasma. Una minoranza dei tumori presenta invece un considerevole pleomorfismo cellulare. L'indice mitotico è generalmente basso, tuttavia circa il 25% dei GIST presenta valori superiori ai 10/50 campi a forte ingrandimento (HPF).

In IHC, più del 90% dei GIST mostra una diffusa positività citoplasmatica per KIT (CD117) [Debiec-Rychter et al, 2004a]. Inoltre un terzo dei casi mostra positività a DOG1, che ad oggi viene considerato un nuovo marcatore sensibile e specifico per i GIST [Miettinen et al, 2009]. Altri marcatori immunofenotipici, variabilmente espressi ma non specifici per i GIST sono CD34, actina muscolo liscio, h-caldesmon e, raramente, desmina.

Infine l'analisi molecolare dello stato mutazionale di KIT e di PDGFRA è di aiuto per la conferma diagnostica.

2.4 Classificazione molecolare

A livello molecolare, circa l'85% dei GIST sporadici dell'adulto si caratterizza per la presenza di mutazioni a carico dei geni codificanti i recettori tirosin-chinasici KIT o PDGFRA, con conseguente attivazione costitutiva della cascata di segnalazione a valle (Figura I). Mentre il rimanente 10-15% dei casi sono definiti GIST WT in quanto non portano mutazioni a carico di KIT o PDGFRA [Rubin et al, 2007].

GIST KIT^{mut}: il 70-80% dei GIST è caratterizzato dalla presenza di mutazioni a carico del KIT, proto-oncogene che appartiene alla famiglia di recettori tirosin-chinasici di tipo III, costituiti da una porzione extracellulare con 5 domini Ig-like, da una porzione transmembrana

ed da una porzione intracellulare contenente due domini tirosin-chinasici: il primo dotato di una tasca di legame per l'ATP ed il secondo dotato di una regione fosfotransferasica (*loop* di attivazione) [Huang et al, 1990]. A seguito del legame con il suo ligando, SCF, si ha la dimerizzazione e l'autofosforilazione del recettore con conseguente attivazione delle molecole effettrici a valle, quali le vie RAS/MAPK, JAK/STAT, PI3K/AKTcoinvolte nella trasmissione di stimoli proliferativi ed anti-apoptotici [Duensing et al, 2004] (Figura I).

Tutte le mutazioni riscontrate in KIT nei GIST portano all'attivazione costitutiva del recettore. La maggior parte delle mutazioni interessa la porzione trans-membrana del recettore, codificata dall'esone 11. Tali mutazioni includono delezioni *in-frame*, inserzioni, sostituzioni, o combinazioni di queste [Ernst et al, 1998]. Le delezioni sembrano essere associate a una sopravvivenza libera da progressione e globale più breve rispetto alle altre mutazioni a carico dell'esone 11 [Singer et al, 2002; Taniguchi et al, 1999; Andersson et al, 2006]. In particolare le delezioni che interessano il codone 557 e/o 558 sembrano conferire un comportamento biologico più aggressivo [Martin et al, 2005].

Circa l'11% dei GIST presenta una mutazione a carico del dominio extracellulare di KIT, in genere a livello dell'esone 9. Mutazioni a carico del *loop* di attivazione codificate a livello dell'esone 17 e a carico della tasca dell'ATP codificate a livello dell'esone 13 sono state riscontrate in circa il 1% dei casi [Lasota et al, 2008]. Meno frequentemente sono state riportate mutazioni nell'esone 8.

GIST PDGFRA^{mut}: PDGFRA appartiene, come KIT, alla famiglia dei recettori tirosin-chinasici di tipo III, il cui ligando fisiologico è rappresentato dal Fattore di Crescita derivato dalle Piastrine (PDGF). Circa un terzo dei GIST privi di mutazioni a carico di KIT presenta mutazioni attivanti di PDGFRA. Queste mutazioni possono interessare il dominio trans-membrana codificato a livello dell'esone 12, la tasca di legame dell'ATP codificata a livello dell'esone 14 o, più frequentemente, il *loop* di attivazione codificato a livello dell'esone 18 [Heinrich et al, 2003a; Hirota et al, 2003]. A supporto della loro analogia funzionale, le mutazioni di KIT e PDGFRA sono mutualmente esclusive.

La maggior parte dei GIST mutati per PDGFRA presenta caratteristiche clinico-patologiche e molecolari che li contraddistinguono dai GIST KIT^{mut}. In particolare, sono GIST prevalentemente a localizzazione gastrica e generalmente presentano un basso potenziale di malignità [Wasag et al, 2004; Lasota et al, 2004].

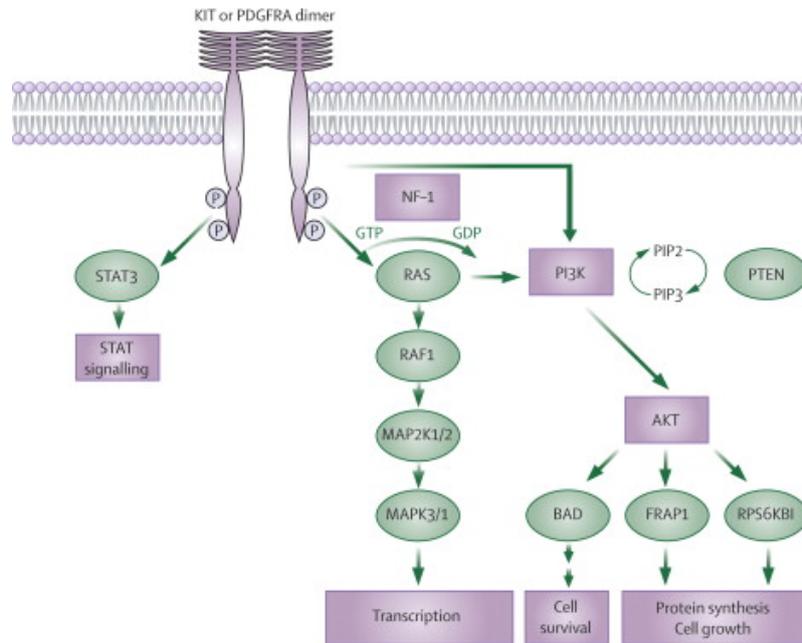


Figura I. KIT and PDGFRA signaling pathway [Rubin et al, 2007]

GIST KIT/PDGFR A WILD-TYPE: circa l'85% dei GIST pediatrici e il 10-15% dei GIST dell'adulto non presenta mutazioni né a carico di KIT né di PDGFRA e per tale motivo sono definiti WT. Possono essere sporadici o legati a forme ereditarie sindromiche [Bajor et al, 2009, Stratakis et al, 2009].

Sotto il profilo clinico GIST KIT/PDGFR A WT si localizzano più frequentemente nello stomaco, con una predilezione per il sesso femminile, sono generalmente multifocali, mostrano un pattern anatomico-patologico prevalentemente epitelioide ed hanno un decorso di malattia indolente pur esordendo spesso come metastatici [Stratakis et al, 2009; Janeway et al, 2009; Miettinen et al, 2005].

Recenti studi di biologia molecolare hanno dimostrato che i GIST KIT/PDGFR A WT rappresentano un gruppo estremamente eterogeneo sotto il profilo biologico (Figura II).

Circa il 50% dei casi presenta una marcata riduzione o perdita dell'espressione di SDHB in IHC che si correla a un'inattivazione della via enzimatica del complesso II mitocondriale (succinato deidrogenasi), e per questo vengono definiti *SDH-deficient* o *SDH^{mut}*. Nella maggior parte dei casi è stata documentata la presenza di mutazioni inattivanti uno dei 4 geni componenti il complesso della succinato deidrogenasi (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD) [Pantaleo et al, 2011b; Janeway et al, 2011; Gill et al, 2010; Miettinen et al, 2011; Pantaleo et al; 2014].

Le mutazioni nella subunità A del complesso SDH sono caratteristiche dei casi GIST pediatrici o giovani adulti ed in genere si tratta di casi con doppio evento mutazionale, uno presente a livello costitutivo e il secondo a livello somatico [Pantaleo et al; 2014]. Le mutazioni a carico di SDHB, SDHC o SDHD sono state invece riscontrate sia in casi sporadici di GIST, sia in associazione con la sindrome di Carney-Stratakis [Pasini et al; 2008].

Tra i GIST SDH deficient ci sono tuttavia casi, in genere associati alla sindrome di Carney, in cui non sono stati identificati eventi mutazionali a carico dei geni SDH [Gaal et al, 2011] e in cui l'evento scatenante l'inattivazione del complesso della succinato deidrogenasi rimane ignoto.

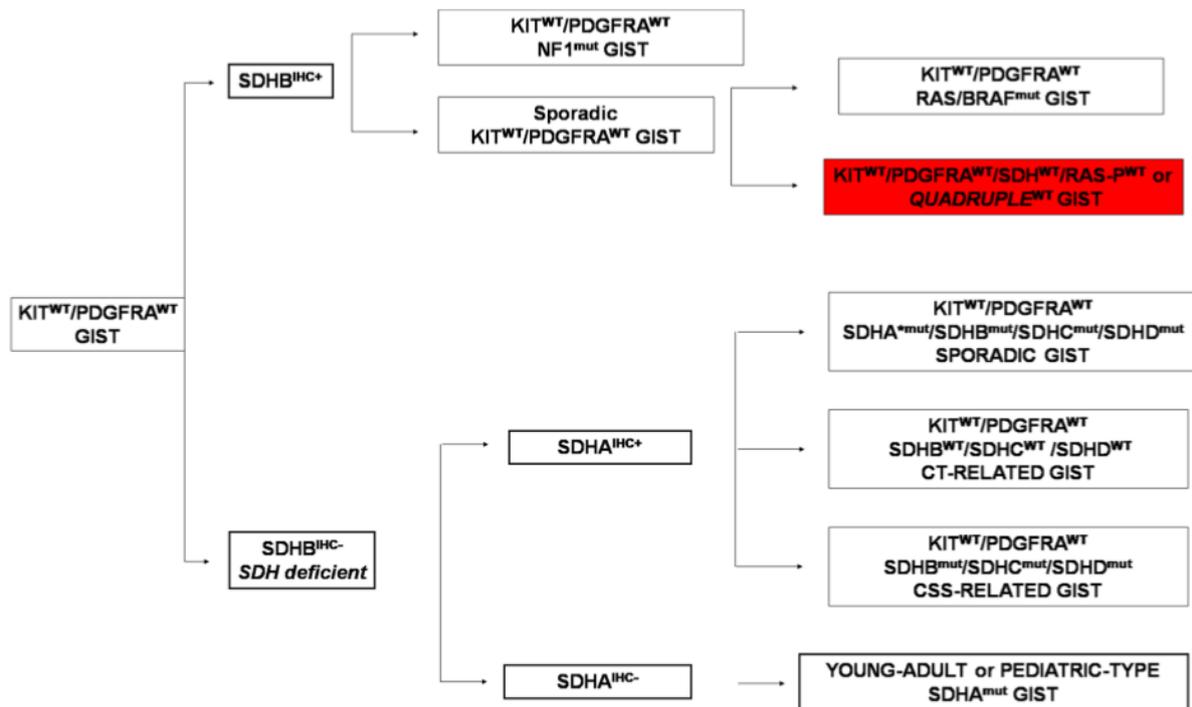


Figura II. Suddivisione molecolare dei GIST KIT/PDGFR WT [Nannini et al, 2014]

L'inattivazione di questo complesso è importante per la tumorigenesi in quanto, tramite la stabilizzazione delle proteine HIF (Hypoxia Inducing Factors), può portare all'espressione dei geni coinvolti nell'angiogenesi e nella glicolisi, supportando quindi la crescita cellulare in condizioni ipossiche. E' stato dimostrato inoltre che i GIST SDH-deficient abbiano una forte attivazione di IGF1R, non presente invece nelle altre categorie di GIST, che potrebbe fungere da target terapeutico [Nannini et al, 2013].

Il restante 50% dei GIST WT è invece positivo per SDHB in IHC, ma forma un gruppo molto eterogeneo a livello molecolare e necessita di ulteriori suddivisioni. Infatti, in questo gruppo sono compresi sia i GIST con mutazioni di NF1 [Wang et al, 2011a], stimati intorno al 50% dei casi [Gasparotto et al, 2017], GIST con mutazione di BRAF (circa il 13%) [Agaimy et al, 2009] e infine i GIST definiti “quadrupli WT”, cioè non aventi mutazioni in nessuno dei geni sopracitati (KIT/PDGFR α /RAS-P/SDH WT) [Pantaleo et al, 2015b; Nannini et al, 2014].

2.5 Origine

Sulla base di alcune somiglianze fenotipiche, è stata suggerita una correlazione tra le cellule di GIST e le cellule interstiziali di Cajal (ICC), responsabili della peristalsi intestinale. Fisiologicamente, il sistema delle cellule interstiziali di Cajal è coinvolto nella regolazione della motilità gastrointestinale, interfacciandosi tra l'innervazione autonoma della parete e l'attività ad onde lente della muscolatura del tubo digerente. Le cellule interstiziali di Cajal esprimono l'oncogene KIT, che contribuisce alla loro funzione all'interno della parete intestinale. Inoltre è stato dimostrato in un modello murino che l'espressione di KIT è indispensabile per lo sviluppo delle ICC, dalle cellule precursori alle cellule mature. Tutte queste similitudini portarono ad ipotizzare che esistesse un nesso tra le ICC e i GIST [Sicar et al, 1999]. A supporto di questa tesi, alcuni studi pre-clinici evidenziarono come modelli murini portatori delle mutazioni di KIT riscontrate nei GIST umani sviluppavano una iperplasia delle cellule ICC e tumori simili ai GIST [Sommer et al, 2003; Rubin et al, 2005].

Più recentemente è stata isolata una popolazione cellulare caratterizzata da un'intensa positività per IGF1R, CD34 e CD44 ed una bassa espressione di KIT, da considerare come precursore delle ICC, la cui sopravvivenza e differenziazione in cellule ICC mature dipende strettamente da un *loop* autocrino mediato da IGF1 [Lorincz et al 2008]. Tali cellule rappresenterebbero la linea differenziativa di origine dei GIST (Figura III). Di grande interesse è l'evidenza che il profilo di espressione genica delle ICC mature è molto più simile al profilo dei GIST KIT/PDGFR α mutati rispetto a quello dei GIST KIT/PDGFR α WT, avvallando la duplice ipotesi che i casi WT possano derivare o dalle cellule ICC a una fase differenziativa più precoce oppure da una linea cellulare differente a differenziazione neurale [Pantaleo et al, 2011a].

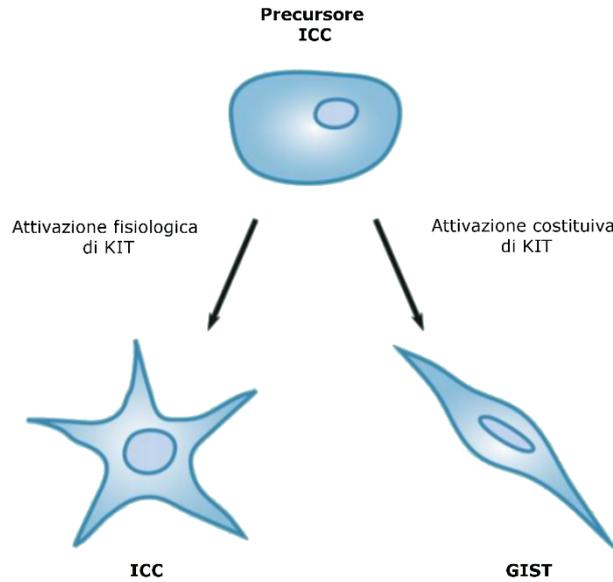


Figura III. Ipotesi di origine del GIST a partire dalle cellule precursori delle ICC

2.6 Classificazione del rischio di recidiva

Il primo modello di classificazione del rischio di recidiva prendeva in considerazione due parametri principali per predire il comportamento biologico dei GIST: il diametro del tumore e l'indice mitotico espresso in numero di mitosi per 50/campi a forte ingrandimento [Fletcher et al, 2002]. Successivamente, è stato proposto un nuovo sistema di valutazione del rischio, il quale oltre all'indice mitotico e alle dimensioni tumorali, incorpora anche la sede del tumore primitivo [Miettinen et al, 2006] (Tavola I). Tale sistema di classificazione si basa sull'evidenza che, a parità di indice mitotico e di dimensioni, i GIST gastrici tendano ad avere una prognosi più favorevole di quelli del piccolo intestino o rettali.

Un altro fattore particolarmente importante per predire il rischio di recidiva è la rottura tumorale, sia spontanea che provocata in corso di intervento chirurgico, che rappresenta un fattore di rischio indipendente rispetto agli altri parametri [Joensuu et al, 2012b]. L'indice mitotico è un fattore prognostico indipendente di rischio [Corless et al, 2014]. Inoltre recentemente si è dimostrato come anche la tipologia di mutazione di KIT o PDGFRA presente ha un effetto sulla prognosi, anche se con un effetto minore rispetto all'indice mitotico [Joensuu et al, 2015]. Più controverso invece è il ruolo dei margini chirurgici nella valutazione del rischio di recidiva, sul quale le evidenze scientifiche sono discordanti [De Matteo 2000; Di Battista et al, 2009; McCarter et al, 2012].

Dimensioni	Indice mitotico	Stomaco	Duodeno	Digiuno/Ileo	Retto
≤ 2	≤ 5/50HPF	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno
2-5		Molto basso	Basso	Basso	Basso
5-10		Basso	Intermedio	Nessun dato	Nessun dato
> 10		Intermedio	Alto	Alto	Alto
≤ 2	> 5/50HPF	Nessuno	Alto	Nessun dato	Alto
2-5		Intermedio	Alto	Alto	Alto
5-10		Alto	Alto	Alto	Alto
> 10		Alto	Alto	Alto	Alto

Tavola I. Classificazione di rischio dei GIST, in base all'indice mitotico, alle dimensioni tumorali e alla sede del tumore primitivo [Miettinen et al, 2006]

2.7 Trattamento della malattia localizzata

Il trattamento standard per i GIST localizzati è rappresentato dalla chirurgia, che si è dimostrata avere un importante impatto sulla sopravvivenza a lungo termine [De Matteo et al, 2000]. Dopo la sola chirurgia, il tempo mediano di recidiva è compreso tra 7 mesi e 2 anni e solamente il 10% dei pazienti rimane libero da malattia dopo un prolungato follow-up. La sede più frequente di metastasi è il fegato (65% dei casi), seguito dal peritoneo (20%), mentre molto più rare sono le localizzazioni a livello linfonodale (6%), scheletrico (6%) o polmonare (2%) [De Matteo et al, 2000]. Alla luce dell'elevato tasso di recidiva di malattia, e degli ottimi risultati dimostrati in diversi trial clinici, è stato studiato introdotto Imatinib ad intento adiuvante, portando a un significativo miglioramento sia in termini di sopravvivenza libera da recidiva che di sopravvivenza globale [De Matteo et al, 2007; Joensuu et al, 2012a]. In caso di malattia localizzata non operabile, la chirurgia rimane sempre la prima scelta, però solo dopo un periodo di pre-trattamento citoreduttivo con Imatinib.

2.8 Trattamento della malattia avanzata

La scoperta e l'introduzione nella pratica clinica di nuovi farmaci TKI, inibitori dei recettori tirosin-chinasici, hanno rappresentato un progresso notevole nel trattamento dei GIST,

consentendo di ottenere buoni tassi di risposta alla terapia e di sopravvivenza, modificando radicalmente la storia naturale e la prognosi dei pazienti affetti da questa malattia.

Nel dettaglio, i farmaci TKI utilizzati nel trattamento dei GIST avanzati sono:

- **Imatinib:** inibitore selettivo dei recettori tirosin-chinasici KIT, PDGFRA e Bcr/Abl, approvato dalla FDA in Febbraio 2001 come prima linea standard di trattamento dei GIST localizzati inoperabili o metastatici. Il suo meccanismo di azione si esplica attraverso il legame a livello della tasca dell'ATP, impedendo quindi l'idrolisi del dominio tirosin-chinasico e bloccando tutte le vie di trasduzione del segnale a valle [Manley et al, 2002]. Joensuu e colleghi furono i primi a pubblicare caso di una paziente affetta da GIST metastatico trattata con sorprendente successo con Imatinib [Joensuu et al, 2001]. Questo eccezionale risultato portò allo sviluppo di due studi di fase I/II che, su 148 e 36 pazienti rispettivamente, riportarono un tasso di risposte obiettive maggiore del 50% [van Oosterom et al, 2001; Demetri et al, 2002, Heinrich et al, 2002]. Il dosaggio raccomandato di Imatinib è di 400 mg/die fino a progressione di malattia [Verweij et al, 2004]. Nel sottogruppo di pazienti portatori della mutazione a carico dell'esone 9 di KIT, il dosaggio raccomandato è di 800 mg/die, alla luce degli studi di correlazione tra il genotipo e l'*outcome* clinico [Debiec-Rychter et al, 2006; Heinrich et al, 2008a]. Il trattamento dovrebbe essere continuato indefinitamente poiché l'interruzione del trattamento è generalmente seguita da una rapida progressione del tumore, anche in caso di risposta completa o asportazione chirurgica delle lesioni secondarie [Le Cesne et al, 2010].
- **Sunitinib:** inibitore multitirosin-chinasico dei recettori KIT, PDGFRA, PDGFR β , VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3, FLT3, CSF-1R, RET, approvato nel 2006 per il trattamento dei pazienti affetti da GIST avanzato/metastatico resistenti o intolleranti ad Imatinib. Il suo meccanismo di azione si esplica attraverso l'inattivazione di KIT e di PDGFRA e l'inibizione di bersagli coinvolti nell'angiogenesi tumorale [Mendel et al, 2003]. Nello studio di fase III che ha portato alla sua approvazione, Sunitinib si è dimostrato vantaggioso sia in termini di controllo di malattia, con un guadagno statisticamente significativo del tempo alla progressione (27.3 vs 6.4 settimane, $p < 0.0001$) che di sopravvivenza globale rispetto al braccio di non trattamento [Demetri et al, 2006]. Il dosaggio consigliato è di 37.5 mg/die ad assunzione continuativa, al fine di raggiungere la massima efficacia e un buon profilo di tollerabilità [George et al, 2009].

- **Regorafenib:** inibitore multitirosin-chinasico dei recettori KIT, PDGFR, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, RET, FGF1R, B-RAF e MAPK, che si è dimostrato attivo nei confronti di numerose linee cellulari, incluse quelle di GIST [Wilhelm et al, 2011]. Un successivo studio di fase II condotto su 34 pazienti affetti da GIST resistenti sia ad Imatinib che a Sunitinib ha riportato una sopravvivenza libera da progressione mediana di 10 mesi [George et al, 2012]. Sulla base di queste promettenti evidenze, è stato condotto uno studio multicentrico di fase III (GRID Trial) su 199 pazienti metastatici in progressione nonostante il pre-trattamento con Imatinib e Sunitinib. E' stato dimostrato in questa casistica un vantaggio significativo del braccio di trattamento con Regorafenib in termini di sopravvivenza libera da malattia (4.8 vs 0.9 mesi, $p < 0.0001$) rispetto a quello con placebo [Demetri et al, 2013]. Sulla base di questi dati, è stato introdotto Regorafenib come trattamento di terza linea, in caso di progressione dopo trattamento con Imatinib e Sunitinib.
- Altri TKI sono stati sviluppati e la loro efficacia è stata valutata nei casi resistenti a Imatinib e Sunitinib. Ponatinib, è un inibitore di KIT che agisce a livello del loop di attivazione, e quindi è efficace anche nei casi con acquisizione di mutazioni secondarie nell'esone 13 e 17 [ref]. Il trattamento con Dasatinib, Nilotinib e Sorafenib ha dimostrato di essere vantaggioso nei casi GIST PDGFRA (D842V) e i casi WT (Kim et al, 2011a). Inoltre Pazopanib, un TKI usato nel trattamento dei sarcomi dei tessuti molli, anche nei GIST sembra migliorare la sopravvivenza dei pazienti resistenti a Imatinib e Sunitinib e in progressione [Mir et al, 2016]

2.9 Livelli di risposta ai TKI e fenomeni di resistenza

Approssimativamente l'80% dei GIST mostra una risposta primaria a Imatinib, però i livelli di risposta sono strettamente influenzati dallo stato mutazionale di KIT e PDGFRA. I tumori con mutazione nell'esone 11 di KIT sono i più responsivi a Imatinib (70-85% di risposte) in quanto il recettore subisce un cambiamento conformazionale che favorisce il legame del farmaco [Corless et al, 2011]. Invece, i tumori con mutazione nell'esone 9 hanno un livello di risposta intermedio (25-48%), mentre quelli con mutazione nell'esone 13 o 17 sono poco responsivi (Heinrich et al, 2003b; Corless et al, 2011).

Inoltre, circa il 10-15% dei pazienti risultano primariamente resistenti al trattamento con Imatinib, ovvero sviluppano una resistenza entro 6 mesi dall'inizio del trattamento. Si tratta

principalmente dei casi con mutazione D842V nell'esone 18 di PDGFRA e diversi casi di GIST WT [Corless et al, 2005, Heinrich et al, 2006]

Infine, circa il 40-50% casi inizialmente responsivi possono sviluppare fenomeni di resistenza [Gramza et al, 2009], definiti come secondari. In genere si manifestano entro 24 mesi dall'inizio del trattamento con Imatinib e possono svilupparsi a seguito di diversi meccanismi: variabili farmacocinetiche, acquisizione di anomalie strutturali e funzionali nei recettori KIT e PDGFRA, e acquisizione di alterazioni cromosomiche. Le più frequenti sono le alterazioni a carico di KIT e PDGFRA, comprendenti: amplificazione genomica di KIT; perdita dell'espressione in superficie di KIT e attivazione alternativa di un altro recettore tirosin-chinasico; attivazione di una via di segnalazione intracellulare alternativa; acquisizione di nuove mutazioni a carico di KIT e PDGFRA che interferiscono con il legame ad Imatinib [Fletcher et al, 2003].

Il Sunitinib, avendo uno spettro di azione più ampio, è stato introdotto come trattamento di seconda linea per i casi non responsivi a Imatinib. Purtroppo, in questi casi, la durata di risposta al trattamento con Sunitinib è comunque limitata (in genere un anno) [Wang et al, 2011b].

Alla luce della enorme variabilità nella risposta al trattamento e dell'alta frequenza di insorgenza della resistenza, sia primaria che secondaria, nasce la necessità di approfondire gli studi concernenti le cause molecolari di questi fenomeni e quindi sviluppare nuovi approcci terapeutici.

3. NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

3.2 Tecniche di sequenziamento di nuova generazione

Negli ultimi anni, sono stati ottenuti notevoli progressi sulla comprensione delle alterazioni genetiche tumorali, specialmente grazie all'avvento di tecnologie di sequenziamento genomico di nuova generazione (*next generation sequencing* – NGS), che hanno enormemente accelerato il ritmo delle scoperte e aumentato la produzione dei dati.

L'innovazione principale è consistita proprio nel passare da tecniche di sequenziamento mirate di pochi geni in pochi campioni, alla possibilità di studiare migliaia di geni alla volta per poi arrivare al sequenziamento massivo di interi esomi e volendo anche dell'intero genoma.

La prima rivoluzione è avvenuta quando, alle indagini classiche di biologia molecolare e

citogenetica, quali la PCR e l'ibridazione fluorescente in situ (FISH), in grado di analizzare un solo gene per volta, sono state affiancate le tecnologie *microarray* di *gene expression* e *SNP-array*, capaci di quantificare il profilo di espressione di tutti i geni conosciuti espressi da una cellula e di identificare tutte le regioni di amplificazione o delezione del genoma [Golub et al, 1999; Bignell et al, 2004]. Con i *microarray* è stato possibile per la prima volta mappare tutte le alterazioni genetiche del cancro ad alta risoluzione, senza una conoscenza a priori del gene candidato.

Queste tecnologie non permettono però di vedere alterazioni quali le mutazioni, le inversioni, e i trascritti di fusione. Il sequenziamento NGS è in grado invece di vedere ogni tipo di alterazione presente dalle mutazioni alle variazioni di copy number (tramite sequenziamento del DNA) e di rilevare trascritti di fusione e quantificare il livello di espressione genica (tramite sequenziamento del RNA).

Inizialmente le mutazioni venivano rilevate tramite Sanger Sequencing [Sanger et al, 1977], che prevedeva l'amplificazione di una regione di interesse e quindi, tramite l'incorporazione di dideossinucleotidi terminatori marcati, di leggere la sequenza delle basi nucleotidiche su un sequenziatore a capillare. Questa tecnica rappresenta il metodo, definito ora, di "prima generazione" per il sequenziamento.

In seguito sono state sviluppate le tecniche di "seconda generazione" o "next-generation" che hanno permesso di sequenziare in parallelo migliaia di regioni diverse, aumentando enormemente la quantità di dati prodotti e analizzabili in breve tempo, fino ad arrivare alla possibilità di sequenziare ad una profondità di 30X l'intero genoma umano in una singola corsa [Mardis et al, 2011].

In linea generale, il campione viene frammentato e amplificato, ottenendo una *library* di DNA che sarà poi immobilizzata su un supporto solido o delle biglie al fine di sequenziare tutti i frammenti in parallelo [Metzker et al, 2010]. Nel processo di sequenziamento, i segnali di incorporazione delle diversi nucleotidi vengono convertiti in *read*, ovvero delle sequenze di poche centinaia di basi che si appaiano in una determinata regione cromosomica. Questa procedura, che prende il nome di *base-calling*, mediante specifici algoritmi rileva anche una serie di parametri, quali l'intensità del segnale, rumore di fondo e presenza di segnali aspecifici, per generare le sequenze nucleotidiche ed assegnare a ciascuna base dei punteggi di qualità (*quality scores*). Quest'ultimi sono correlati alla probabilità di errore e sono uno strumento utile per eliminare basi o escludere *read* che mostrano una bassa qualità. In tal

modo viene migliorata l'accuratezza dell'allineamento [Ledergerber et al, 2011]. Le *reads* vengono quindi allineate sul genoma di riferimento e quindi, tramite apposite pipeline bioinformatiche, i dati vengono analizzati e tutte le alterazioni di interesse vengono identificate.

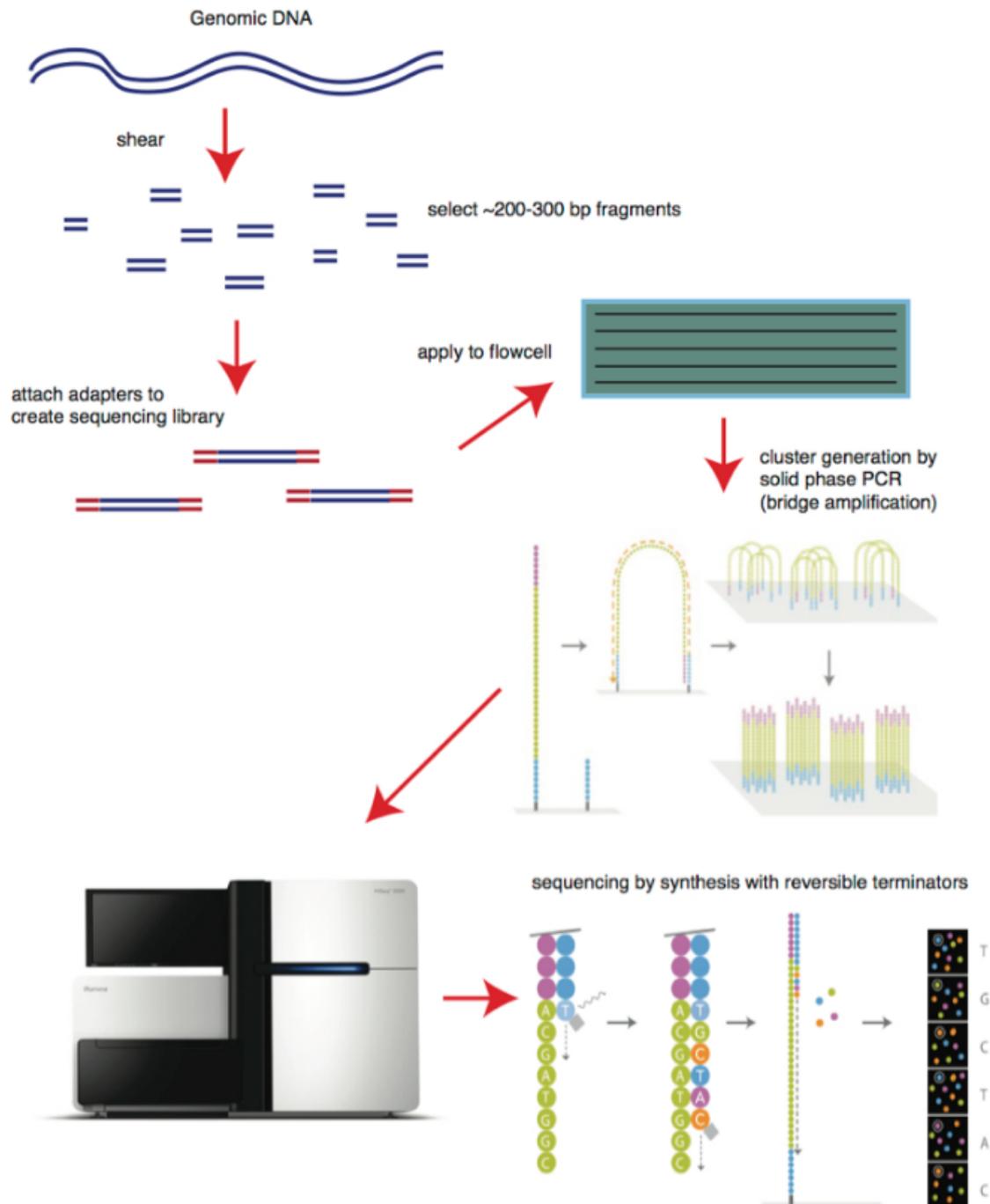


Figura IV. Sintesi library di DNA e sequenziamento massivo tramite tecnologia Illumina

Il *Whole-Genome Sequencing* permette di analizzare il genoma nella sua interezza, identificando varianti strutturali e varianti a singolo nucleotide (SNV), sia nelle regioni codificanti che in quelle intergeniche. Per ottenere le *library* di DNA genomico da sequenziare, il DNA di interesse viene frammentato e amplificato, unendo delle sequenze adattatrici alle estremità di ogni frammento che gli permetteranno l'attacco alla *flowcell* di sequenziamento. Il limite principale di questa tecnica è rappresentato dall'enorme dimensione e complessità dei dati da analizzare e dai notevoli costi richiesti.

Per questi motivi è molto più frequentemente utilizzato il *Whole-Exome Sequencing* (Exome-seq) in grado di analizzare solo le regioni codificanti del genoma, ovvero l'esoma, riducendo così la complessità e la dimensione del dato da analizzare, e quindi i costi. Per fare Exome-seq, le *library* di DNA genomico vengono fatte ibridare a delle sonde specifiche al fine di arricchire le sole regioni codificanti. Dai dati di Exome-seq è quindi possibile identificare tutte le SNV e INDELs nelle regioni codificanti e coinvolte nello splicing; inoltre è possibile stimare il *copy number*, utilizzando i dati di copertura delle reads nelle singole regioni sequenziate.

Il *Whole-Transcriptome Sequencing* (RNA-seq) permette di sequenziare l'intero trascrittoma a partire da *library* di mRNA, anch'esse frammentate e amplificate unendo sequenze adattatrici per il legame alla *flowcell*. Permette di quantificare il profilo di espressione genica, identificare la presenza di riarrangiamenti produttori di geni di fusione e di valutare lo *splicing* alternativo. Inoltre è possibile, con pipeline di analisi specifiche, identificare le SNV e INDELs. I limiti principali dell'analisi del trascrittoma sono rappresentati dall'incapacità di individuare la presenza di varianti nelle regioni non espresse nel campione.

Questi sistemi di sequenziamento sono ad oggi gli strumenti ideali per la caratterizzazione delle alterazioni presenti nelle diverse tipologie tumorali, permettendo analisi omnicomprensive a costi relativamente bassi e in tempi rapidi.

3.1 Il cancro e il genoma

La tumorigenesi è un processo multistep caratterizzato dall'acquisizione di alterazioni geniche che portano alla trasformazione neoplastica. Questo processo sembra seguire un processo simile all'evoluzione Darwiniana, cioè solo le alterazioni vantaggiose per la crescita e proliferazione cellulare vengono mantenute e le cellule che le hanno acquisite potranno

prendere il sopravvento su quelle normali fino alla crescita incontrollata del clone tumorale [Hanahan et al, 2000].

Il numero di mutazioni somatiche acquisite varia tantissimo da un tipo di tumore all'altro (Figura V) e può dipendere da molteplici fattori, tra cui il tasso di proliferazione del tessuto colpito, esposizione a mutageni, la presenza di alterazioni a carico dei meccanismi di riparo del DNA o dei controlli durante la mitosi o l'instabilità dei microsatelliti [Alexandrov et al, 2013].

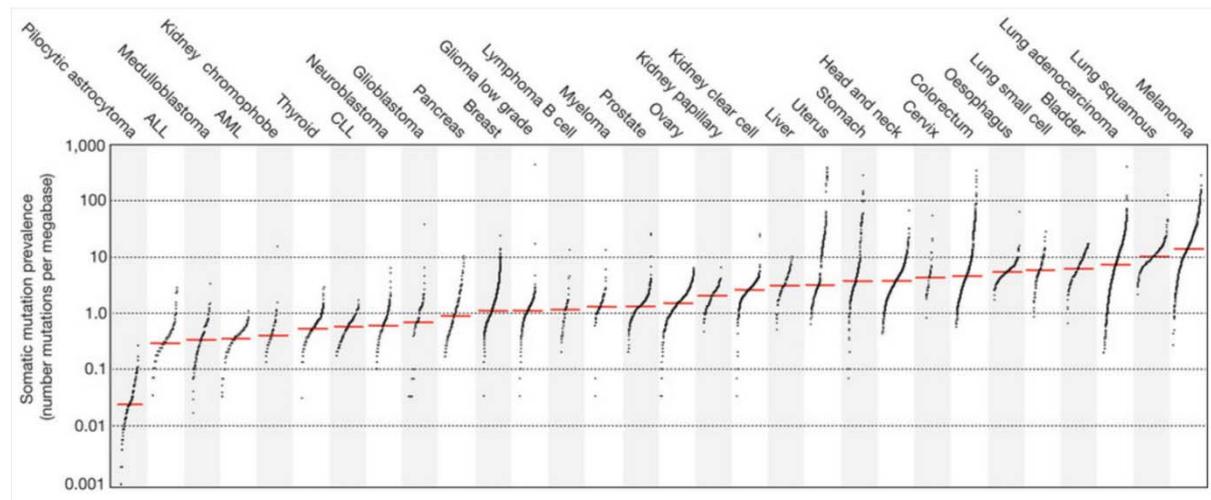


Figura V. Numerosità di mutazioni somatiche rilevate nelle diverse tipologie di tumori umani [Alexandrov et al, 2013]

Delle diverse migliaia di mutazioni presenti nel genoma delle cellule tumorali, solo una piccola parte sono effettivamente mutazioni rilevanti per il tumore (mutazioni *driver*). La maggior parte delle alterazioni sono invece mutazioni neutre o di basso effetto sulla crescita tumorale (mutazioni *passenger*) e in realtà non vengono positivamente selezionate durante l'espansione tumorale. Il numero di geni coinvolti nello sviluppo tumorale è ancora in via di definizione: sulla base del censimento continuamente aggiornato del Sanger Institute, Cancer Gene Census (cancer.sanger.ac.uk/census), sono stati identificati più di 572 geni collegati al cancro, le cui mutazioni, che siano puntiformi, delezioni, amplificazioni, o traslocazioni sono causalmente implicate nella tumorigenesi [Futreal et al, 2004].

Viste la complessità e la numerosità delle alterazioni riscontrabili nei tessuti tumorali, le nuove tecnologie NGS rappresentano lo strumento ideale per la caratterizzazione genetica del cancro al fine di ottenere un quadro onnicomprensivo e funzionale delle alterazioni presenti.

4. SCOPO

Nonostante l'introduzione dei TKI nel trattamento dei GIST abbia enormemente modificato la storia naturale di questi tumori, circa il 10-15% dei pazienti risultano primariamente resistenti, ovvero presentano una resistenza primaria al trattamento (visibile entro 6 mesi) e, circa la metà dei pazienti inizialmente responsivi alla terapia, sviluppano una resistenza secondaria (mediamente entro 24 mesi) [Corless et al, 2005; Heinrich et al, 2006; Gramza et al, 2009].

Lo scopo sperimentale di questo dottorato era l'analisi tramite tecniche NGS delle alterazioni caratterizzanti i GIST resistenti ai TKI, al fine di aumentare la comprensione dei meccanismi molecolari alla base della resistenza e aiutare a migliorare la diagnosi e il trattamento di questi pazienti.

In particolare, dopo aver evidenziato le diversità esistenti tra i diversi sottogruppi GIST, sono state perseguiti due obiettivi:

- 1) Analisi delle alterazioni presenti nei casi GIST secondariamente resistenti ai TKI, tramite caratterizzazione degli eventi mutazionali somatici presenti nei GIST metastatici con mutazione nell'esone 11 di KIT e tramite analisi di associazione tra il genotipo del paziente e la risposta al trattamento.
- 2) Analisi delle alterazioni presenti nei GIST primariamente resistenti ai TKI, in particolare focalizzandosi sui GIST KIT/PDGFR WT, sulla caratterizzazione dei sottogruppi presenti e degli eventi mutazionali che li contraddistinguono.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Casi

Tutti i casi GIST inclusi nello studio sono stati indicati come sporadici, senza storie familiari di patologie legate al cancro. Questi studi sono stati approvati dal comitato etico dell'Azienda Ospedaliera-Universitaria del Policlinico S.Orsola-Malpighi (113/2008/U/Tess). La diagnosi di GIST è stata valutata da patologi esperti basandosi sui parametri istologici e sulla positività per CD117 e DOG1 in IHC.

Il materiale tumorale congelato fresco di XX casi GIST è stato raccolto. Inoltre per aumentare la casistica di quadrupli WT, sono stati raccolti anche XX casi FFPE, di cui solo 5 erano però di sufficiente qualità per le analisi. Di tutti i casi sottoposti a NGS (XX) è stato raccolto anche il sangue periferico, come controllo normale per la definizione delle mutazioni somatiche e germinali. Nella tabella 1 è riportata la lista dei tumori GIST raccolti per lo svolgimento della presente tesi di dottorato. Il sangue periferico di 53 GIST è stato raccolto per la genotipizzazione dei polimorfismi tramite DMET array o sonde taqman.

5.2 Sequenziamento massivo dell'esoma e del trascrittoma

Per il RNA-seq, l'RNA totale di 18 casi GIST (4 quadrupli WT, 2 SDH^{mut} e 7 KIT^{mut} e 5 PDGFRA^{mut}) è stato estratto a partire da tessuto tumorale congelato fresco con il kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Milan, Italy). Le *library* di cDNA sono state sintetizzate a partire da 250 ng di RNA totale, utilizzando il kit TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina, San Diego, CA). In breve, le molecole di mRNA sono state isolate tramite purificazione su biglie magnetiche aventi oligo-dT, quindi il mRNA è stato frammentato e retrotrascritto a partire da *primer random*. Dopo la sintesi del secondo filamento di cDNA, le estremità sono state riparate e ligate alle sequenze adattatrici (Illumina), quindi sono stati amplificati ottenendo le *library* finali di cDNA.

Per l'Exome-seq, il DNA genomico è stato estratto dai tessuti tumorali congelati e dal sangue periferico con il QiAmp DNA mini (Qiagen), mentre dai tessuti paraffinati è stato utilizzato il kit QiAmp DNA micro kit (Qiagen). Le *library* sono state sintetizzate seguendo il protocollo del Nextera Rapid Capture Exome Kit (Illumina). In breve, il DNA genomico (50ng nel caso di tessuto fresco o PB e 100ng nel caso di FFPE) è stato sottoposto a "tagmentazione", cioè è

stato marcato e frammentato, utilizzando la tecnologia a trasposoni Nextera. I frammenti sono stati quindi amplificati aggiungendo le sequenze indice (Illumina) ottenendo *library* di DNA genomico di circa 290bp. Le *library* sono state poi denaturate e fatte ibridare a sonde di 80-mer disegnate per arricchire 214,126 regioni esoniche. Le regioni catturate sono state quindi amplificate ottenendo le *library* di esoma.

La qualità e la dimensione delle *library* di RNA e di esoma sono state valutate sul BioAnalyzer2100 (Agilent Technologies, Taiwan) utilizzando i chip DNA7500 e High Sensitivity. La concentrazione delle *library* è stata valutata con un *assay* fluorimetrico (QuantITPicogreen assay, Life Technologies). 12pM di *library* sono state amplificate e ligate alla *flowcell* utilizzando la bridge PCR e quindi sequenziate in modalità paired-end con *reads* di 80bp per il RNA-seq e di 100bp per l'Exome-seq sullo strumento HiScanSQ (Illumina).

5.3 Analisi Bionformatica

Dopo il demultiplexing e la generazione dei FASTQ (utilizzando la funzione `bcltofastq`, Illumina), dalle *reads* sono state eliminate le basi a bassa qualità (<Q10) e le sequenze degli adattatori Nextera usando AdapterRemoval (<https://github.com/MikkelSchubert/adapterremoval>). Quindi le *reads* sono state allineate sul genoma di riferimento HG19 ([www. http://genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu)) e analizzati con due diverse *pipeline* per il RNA-seq e per l'Exome-seq.

I dati di Exome-seq sono stati mappati sul genoma di riferimento hg19 utilizzando Burrows-Wheeler Aligner (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) e i duplicati ottici e di PCR sono stati rimossi utilizzando la funzione `rmdup` di Samtools (<https://samtools.sourceforge.net/>). GATK (Genome Analysis Toolkit, <https://software.broadinstitute.org/gatk/>) è stato utilizzato per il riallineamento locale delle *reads* e per la chiamata delle INDELS, mentre Mutect (<https://www.broadinstitute.org/cancer/cga/mutect>) è stato utilizzato per la chiamata delle mutazioni puntiformi. Le varianti, con una copertura minima di 15 *reads* e una frequenza dell'allele mutato di almeno 20%, sono state annotate con Annovar (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>) e le mutazioni classificate come non sinonime, nonsense, *frameshift* e non-*frameshift*, o del sito di *splicing* sono state selezionate per ulteriori analisi. Inoltre tutte le varianti sono state ricercate in dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), 1000Genomes (<http://www.1000genomes.org/>), ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>) and EVS (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) e solo le varianti

definibili come rare (frequenza nella popolazione normale minore del 1%) o novel (assenza nei database pubblici) sono state mantenute per le analisi. Per identificare le varianti somatiche, è stata verificata la presenza dell'allele mutate nei dati di exome-seq della controparte normale di ogni paziente. Inoltre l'allineamento delle reads a supporto di ogni variante somatica è stata controllata manualmente con la funzione *tvview* di Samtools. Per prioritizzare le varianti l'effetto predetto di ogni sostituzione aminoacidica è stato calcolato con SNPeff (<http://snpeff.sourceforge.net/>). Inoltre per evidenziare la possibile presenza di variant *driver*, le mutazioni sono state ricercate su COSMIC (Catalog of Somatic Mutations in Cancer, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

Per il RNA-seq, le sequenze sono state allineate usando l'algoritmo TopHat/BowTie (<https://ccb.jhu.edu/software/tophat/>) e i duplicati ottici e di PCR sono stati rimossi utilizzando la funzione *rmdup* di Samtools. La chiamata delle varianti è stata effettuata sui dati di RNA-seq utilizzando SAMtools and SNVMix2. Le varianti sono state filtrate su dbSNP e 1000 Genomi e le somatiche sono state identificate controllando la presenza della variante nei dati di Exome-seq della controparte normale di ogni paziente. L'effetto delle variant è stato predetto con SNPs&GO e PROVEAN.

L'analisi di espressione genica è stata effettuata utilizzando la funzione *htseq-count* (Python package Htseq - <http://www-huber.embl.de/HTSeq/doc/overview.html>) per quantificare il numero di reads che mappano sulle regioni codificanti dei geni riportati nella release 72 di Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Quindi utilizzando il pacchetto *edger* e *limma* di R-Bioconductor (<https://bioconductor.org/>) è stato possibile valutare normalizzare i conteggi e calcolare le differenze di espressione tra i campioni.

Il clustering gerarchico non supervisionato e l'analisi PCA (principal component analysis) dei profile di espressione genica sono stati calcolati con la funzione *heatmap.2* dei pacchetti *qplots* e *prcomp* di R (<https://www.r-project.org>). L'analisi di pathway è stata effettuata utilizzando il software GSEA (Broad Institute) che permette di valutare l'arricchimento dei geni di interesse rispetto a dei gene set di pathway curati disponibili online (MsigDB). Per l'identificazione di nuovi trascritti di fusione sono stati utilizzati tre software: DeFuse (<http://compbio.bccrc.ca/software/defuse/>), ChimeraScan (<https://omictools.com/chimerascan-tool>) and FusionMap (<https://omictools.com/fusionmap-tool>).

5.4 Analisi espressione genica con microarray

Il RNA totale estratto dal tessuto tumorale di 30 casi è stato marcato seguendo le indicazioni del protocollo Affymetrix per la gene expression. I campioni sono stati quindi ibridati sui chip U133Plus 2.0 (Affymetrix). I dati di gene expression sono stati quantificati usando l'algoritmo RMA, filtrati e analizzati con il t-test modificato di Limma per la rilevazione dei geni differenziali. Il clustering gerarchico e la PCA sono stati graficati tramite with Multiple Array Viewer (MEV <http://www.tm4.org/mev.html>).

5.5 Analisi di copy number con i microarray

Il DNA tumorale di 35 GIST è stato marcato e ibridato nei chip SNP array Genome Wide SNP 6.0 (Affymetrix) secondo protocollo. I valori di Contrast QC e MAPD sono stati usati per controllare la qualità del dato. Le analisi di *copy number* sono state effettuate con la Genotyping Console (Affymetrix) e visualizzate tramite il software Chromosome Analysis Suite (ChAS) (Affymetrix). I segmenti sono stati rilevati tramite l'algoritmo Hidden Markov Model. Per limitare l'iperframmentazione, sono stati considerati solo i segmenti di amplificazione e delezione maggiori di 50probe e segmenti adiacenti separati da meno di 50 probe sono stati uniti in unico segmento.

5.6 Profilo di espressione dei miRNA

Il profilo dei miRNA è stato valutato tramite i TaqMan® Low Density Arrays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) che permette di analizzare 754 miRNA. L'RNA totale di 12 casi (4 quadrupli WT, 4 SDH^{mut} e 2 KIT^{mut} e 2 PDGFRA^{mut}) è stato isolato dal tessuto tumorale tramite estrazione in TRizol ed è stato retrotrascritto usando il TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Dopo uno *step* di preamplificazione, il cDNA è stato caricato sulle card e corso sullo strumento 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). Le analisi dei dati sono state effettuate con SDS Relative Quantification Software version 2.4. (Applied Biosystems). miRNA con Ct \geq 35 sono stati considerati come non espressi e esclusi dalle analisi. Per la normalizzazione dei dati, il valore medio di Ct di Mammu6 è stato sottratto a ogni valore di Ct. I miRNA differenziali sono stati evidenziati con il pacchetto limma di R-Bioconductor. Per identificare i geni target dei miRNA differenziali sono stati interrogati diversi *database*, tra cui

miRTarBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) contenente target validati sperimentalmente; e TargetScan (<http://www.targetscan.org>), DianaLab (<http://diana.imis.athena-innovation.gr>), miRanda (<http://www.microrna.org>) e mirDB (<http://mirdb.org>) contenenti i target predetti in silico. I profili di espressione dei miRNA sono stati poi incrociati con quelli di mRNA derivante dai dati di RNA-seq, al fine di identificare la rete di connessioni esistenti tra miRNA e mRNA.

5.7 Genotipizzazione polimorfismi

Il DNA di 53 pazienti affetti da GIST è stato estratto dal sangue periferico usando il kit QiAmp DNA mini (Qiagen). Il kit DMET Plus Premier Pack (Affymetrix, CA, USA) è stato utilizzato per genotipizzare il DNA di 38 pazienti seguendo il protocollo. I genotipi sono stati chiamati utilizzando la Genotyping Console (Affymetrix). Tutti i genotipi sono stati chiamati con una *call rate* maggiore di 98%.

11 SNP sono stati selezionati per essere sottoposti a validazione tramite sonde TaqMan (Life Technologies) in 50 pazienti, comprendenti 35 della casistica genotipizzata con gli array DMET e 15 nuovi casi di validazione. Sono state utilizzate sonde commerciali proprietarie di Life Technologies per gli SNP: rs1541290 ABCG1, rs960440 SLCO3A1, rs1202283 ABCB4, rs8133052 CBR3, rs3822172 SULT1E1, rs10517 NQO1; rs4715354 GSTA5; rs7003319 CYP11B1 e rs6987861 CYP7B1. Per lo SNP rs4926802 CYP4Z1 è stata disegnata una sonda custom utilizzando i software di disegno della Life Technologies.

5.8 Analisi statistica dei genotipi di rischio

Per ogni paziente è stata calcolata la *Progression Free Survival* (PFS) intesa come tempo intercorso dall'inizio del trattamento con Imatinib 400mg al passaggio a Imatinib 800mg o Sunitinib. 3 casi sono stati esclusi dalle analisi perché risultati intolleranti al trattamento con Imatinib. A partire dai 1936 SNP genotipizzati con il DMET array, sono stati esclusi gli SNP localizzati nel cromosoma X, quelli con $MAF < 10\%$ e invariati nei pazienti analizzati. Inoltre sono stati esclusi gli SNP che non rispettavano l'equilibrio di Hardy-Weinberg. 482 SNP hanno superato i criteri di filtraggio e sono stati sottoposti ad analisi di associazione con la PFS. Per ogni SNP, è stata testata l'associazione con la PFS ipotizzando un modello recessivo o dominante. L'analisi univariata e multivariata è stata effettuata con il modello di

rischio di Cox, con calcolo del hazard ratio (HR) e dell'intervallo di confidenza (95% CI). Quindi, l'analisi multivariata è stata effettuata selezionando gli SNP più significativi in univariata. Un modello predittivo è stato creato considerando tutte le possibili combinazioni degli alleli di rischio e di protezione di 3 SNP (rs1202283, rs2273697 e rs10517). Le curve di sopravvivenza del modello predittivo sono state calcolate e rappresentate col metodo di Kaplan-Meier e comparate tramite il modello di Cox.

5.9 Immunoistochimica (IHC)

L'IHC è stata effettuata su sezioni di tessuto tumorale paraffinato dello spessore di 4µm, utilizzando un anticorpo monoclonale murino anti-SDHA (ab14715 Abcam; Cambridge, UK, 1:2500), tre anticorpi policlonali di coniglio: anti-SDHB (HPA002868 Sigma-Aldrich; St Louis, USA, 1:800), anti-COL22A1 (HPA024830 Sigma-Aldrich) e anti-CALCRL (ab84467 Abcam). In breve, le sezioni sono state deparaffinate, reidratate e sottoposte a trattamento di recupero antigenico appropriato (per SDHA: soluzione di TRIS-EDTA, a pH 9.0 riscaltata al micro-onde a 100°C per 20 minuti; per SDHB: soluzione in citrato, a pH 6.0 riscaltata al micro-onde a 100°C per 40 minuti). Dopo raffreddamento, l'attività delle perossidasi endogene è stata inibita con metanolo/H₂O₂ (0.5% v/v) per 20 minuti. Le sezioni sono state poi risciacquate in una soluzione tampone a pH 7.2–7.4 (PBS) e incubate per una notte con gli anticorpi primari specifici. Successivamente le sezioni sono state di nuovo risciacquate con PBS e trattate con Novolink Polymer detection system (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK).

5.10 Estrazione proteica ed analisi mediante Western Blot

Le proteine sono state estratte da tessuto congelato fresco tramite buffer di lisi RIPA (Sigma-Aldrich) arricchito di inibitori delle proteasi (1 mM PMSF, 10µg/ml aprotinina, 10µg/ml leupeptina, 1 mM ortovanadato di sodio). La concentrazione proteica è stata determinata mediante analisi BCA (Pierce, Rockford, IL). 30 µg di proteina sono stati separati in un gel SDS-PAGE al 15% e trasferiti in membrane di polivinilidene difluoride (PVDF). I siti di legame non specifici sono stati bloccati mediante incubazione in una soluzione contenente PBS 0.1% Tween-20 con 5% w/v BSA per un'ora a temperatura ambiente. Le membrane sono state incubate per una notte a 4°C con i seguenti anticorpi primari: anticorpo

monoclonale murino anti SDHA (ab14715 Abcam 1:10.000), anticorpo monoclonale di coniglio anti SDHB (HPA002868 Sigma-Aldrich, 1:500) e anticorpo policlonale di coniglio anti β -Actina (sc-8432 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 1:500). Infine le membrane sono state lavate, incubate per un'ora con anticorpi secondari coniugati a perossidasi. Gli antigeni sono stati rilevati mediante chemiluminescenza (ECL Advance, Amersham Pharmacia Biotech, France).

5.11 Conversione con bisolfito e studio della metilazione

Il DNA genomico è stato trattato con bisolfito seguendo il protocollo del kit Methylamp DNA modification (Epigentek, Farmingdale, NY). Utilizzando il software MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>), sono stati disegnati *primers* specifici per 2 regioni CpG della regione promotrice di SDHC (CpG17 chr1:161283776-161284007 and CpG27 chr1:161284119-161284451). Gli ampliconi sono stati poi sequenziati in Sanger da entrambi i lati usando il Big Dye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Life Technologies). Le sequenze dei *primers* usati sono: 5'-GAAAATAATTAGTAAATTAGTTAGGTAG-3' and 5'-ACTAAAATCACCTCAACAACAAC-3' for CpG27 [Haller et al, 2015], 5'-AGGTTATAATTTATGTATTTGTTTGGTTAA-3', and 5'-TCTTTAAAAA ACTCTAAA ACTTCTCC-3' for CpG17.

5.12 PCR quantitativa (qPCR)

l'RNA totale è stato retrotrascritto mediante Superscript (Invitrogen Life Technologies) utilizzando primers oligo(dT). Primers specifici per i geni di interesse sono stati disegnati con il Primer Express 3.0 Software (Life Technologies) e la qPCR è stata effettuata utilizzando la FastStart Sybr Green (Roche) sullo strumento LightCycler 480 (Roche). Per quantificare i livelli del prodotto genico, i Ct sono stati normalizzati sul livello di espressione dei geni housekeeping GAPDH, GUSB e ATP5B utilizzando il metodo del DDCT. Come test statistico per definire i livelli significativi è stato adottato lo Student *t* test.

5.13 Sequenziamento Sanger

Per la validazione delle mutazioni e dei trascritti di fusione identificati tramite NGS, primers

specifici per i geni di interesse sono stati disegnati con il Primer Express 3.0 Software (Life Technologies). 10ng di DNA o cDNA sono sottoposti a 35 cicli di amplificazione in PCR utilizzando la polimerasi FASTSTART Taq (Roche). I prodotti della PCR sono stati purificati con il kit di purificazione Qiaquick (Qiagen) e sequenziati su entrambi i filamenti utilizzando il Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies). Le sequenze sono state purificate con sodio acetato e quindi corse sul sequenziatore capillare ABI 3730 Genetic Analyzer (Life Technologies).

5.14 Colture cellulari e trattamento con GANT61

Le GIST882 (gentilmente donate da Dr. Jonathan A. Fletcher, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA) sono state coltivate in RPMI1640 + 15%FBS. Questa linea cellulare è caratterizzata dalla monosomia del cromosoma 22 [51] e quindi è stata utilizzata come modello della perdita monoallelica di SMARCB1. GANT61 (Calbiochem, San Diego, CA), farmaco inibitore di GLI, è stato utilizzato per valutare l'effetto sul mRNA e sulla vitalità dell'inibizione del pathway di Hedgehog. Le cellule sono state coltivate per 72h in terreno contenente GANT61 (range di concentrazione testate: 6.25 - 100 μ M). Per controllare la specificità, in ogni esperimento è stato aggiunto un controllo trattato con solo DMSO (concentrazione = 1.6%).

6. RISULTATI

6.1 Profilo di espressione genica dei diversi sottogruppi molecolari

E' stato effettuato il RNA-seq di 16 casi GIST (5 PDGFRA^{mut}, 7 KIT^{mut}, 2 SDHA^{mut} e 4 casi quadrupli WT), ed è stato valutato il profilo di espressione genica. L'analisi in PCA non supervisionata ha mostrato come ogni gruppo molecolare formi cluster distinti dagli altri (Fig. 1A). In particolare, è evidente la separazione tra i GIST WT e i KIT/PDGFRA mutati, e all'interno dei GIST WT, tra i quadrupli WT e i SDHA^{mut}.

Al fine di confermare e ampliare la casistica analizzata, sono stati utilizzati i dati gene expression prodotti con i chip U133Plus 2.0 di Affymetrix su 29 casi GIST, di cui 9 già presenti nella casistica precedente (Tabella 2). L'analisi non supervisionata, conferma la separazione dei GIST SDHA^{mut} e dei quadrupli WT rispetto ai KIT/PDGFRA mutati, che invece tendono ad avere un profilo simile tra di loro (dati non mostrati). Dall'analisi supervisionata, invece, è stato possibile identificare specifiche *gene signatures* caratterizzanti i quattro diversi sottogruppi molecolari GIST (Fig. 1B).

In particolare, è stato confermato che l'overespressione di PDGFRA è la principale differenza tra GIST PDGFRA e i KIT mutati, mentre i tumori GIST SDHA mutati sono risultati essere caratterizzati dall'over-espressione di IGF1R (p value 2.7×10^{-11}) e di marcatori neuronali (LHX2, KIRREL3). Invece nei quadrupli WT è stato possibile individuare alcuni marcatori specifici, come CALCRL e COL22A1, i cui livelli di espressione sono stati confermati in IHC su tessuto tumorale paraffinato (Fig. 1C).

6.2 Caratterizzazione dei GIST secondariamente resistenti

6.2.1 Alterazioni molecolari dei GIST KIT esone 11 metastatici

I dati di RNA-seq di 7 casi GIST metastatici, tutti portatori di mutazione nell'esone 11 di KIT (Tabella 3), sono stati utilizzati per identificare le ulteriori mutazioni somatiche presenti. Sono state ricercate mutazioni puntiformi o INDELS somatiche e trascritti di fusione. In tre pazienti sono stati identificati e validati con PCR sei trascritti di fusione (Tabella 4). Particolare è uno dei trascritti, MEAF6-SEPSECS, in quanto riarrangiamenti a carico di MEAF6 (anche se con un altro partner, PHF1) sono stati riscontrati nei sarcomi endometriali stromali e nei tumori fibromixoidi ossificanti. I dati mutazionali sono stati integrati con le analisi di *copy number*, effettuate con i chip SNP6.0 di Affymetrix, al fine di identificare tutte

le delezioni e amplificazioni presenti coinvolgenti noti oncosoppressori o oncogeni (ricercati sul database Cancer Gene Census). La ricorrenza di queste alterazioni è stata ricercata anche in 8 casi di GIST KIT ex11 localizzati, di cui era disponibile il dato di CNV. L'unione dei dati di *copy number* e dello stato mutazionale nei GIST KIT esone 11 metastatici e localizzati è schematizzato nella Figura 2A.

La mutazione di KIT è l'unica alterazione ricorrente in tutti i casi. In aggiunta al primo evento mutazionale, in 3 su 7 casi metastatici sono stati riscontrati ulteriori eventi mutazionali su KIT: una mutazione puntiforme è stata rilevata nell'esone 17 di KIT nel GIST188, mentre in altri 2 casi (GIST150 e 174) due alterazioni di *copy number* portavano all'espressione del solo allele mutato: una perdita della copia *wild-type* in un caso e una LOH seguita da un'amplificazione dell'allele mutato nell'altro. Al contrario, in nessuno dei GIST localizzati è stato riscontrato alcun secondo evento mutazionale su KIT.

Tramite RNA-seq non sono state identificate SNV deleterie in oncogeni ma 3 pazienti su 7 presentavano amplificazioni coinvolgenti noti oncogeni, quali CCND2 e KRAS (in GIST11), BRAF, ETV1 e EGFR (in GIST174) e MYCN e TERT (in GIST178). In nessun GIST localizzato sono state identificate amplificazioni coinvolgenti oncogeni (Figura 2A).

Per quel che riguarda gli oncosoppressori, in 4 pazienti (GIST150, 174, 124 e 188) sono state rilevate mutazioni somatiche in LATS2, KEAP1, CDKN1B, CDKN2A e PTEN, predette come funzionalmente deleterie per la proteina (Tabella 5). Inoltre molte delezioni, soprattutto omozigoti o focali, sono state riscontrate principalmente nei GIST metastatici e raramente nei casi localizzati (Figura 2A). In particolare la delezione focale del locus di CDKN2A/CDKN2B, cromosoma 9, è stata riscontrata esclusivamente nei GIST metastatici, in 6 casi su 7 (omozigote in GIST11, 150, 174, 188 e eterozigote in GIST124 e 131). GIST_124 oltre a questa delezione di CDKN2A presentava anche una SNV deleteria, risultando nella completa perdita della funzione della proteina. In 5 pazienti è stata rilevata la presenza di una sola copia di CDKN2C nel cromosoma 1. Sempre su questo cromosoma, in 6 tumori metastatici e in un localizzato è stata riscontrata la perdita di una copia di ARID1A, un membro della famiglia degli geni SWI/SNF coinvolti nel rimodellamento della cromatina. PTEN è stato trovato deleto in 2 pazienti (GIST131 e GIST174), uno dei quali presentava anche uno Stop codon prematuro. SMARCB1, localizzato nel braccio 22q, è risultato deleto in 4 GIST metastatici e 2 localizzati. SMAD4 è stato trovato deleto in GIST131 e 188. Due delezioni focali con *copy number* pari a zero del gene DMD sono state ritrovate in due pazienti (GIST174 e 131), mentre altri due pazienti presentano delezione dell'intero

cromosoma. Queste alterazioni di copy number sono state associate ai livelli di espressione genica, e in particolare le amplificazioni coinvolgenti CCND2 e EGFR portavano ad una significativa sovraespressione di questi geni, mentre le delezioni di CDKN2A/B, CDKN2C, PTEN, SMARCB1 e SMAD4 a una significativa diminuzione dell'espressione genica (Figura 2B).

L'identificazione di alterazioni a carico di oncosoppressori, specialmente nel gruppo dei GIST che hanno acquisito resistenza secondaria al trattamento con TKI, possono suggerire l'introduzione di strategie terapeutiche mirate alternative.

SMARCB1 è un membro del complesso di rimodellazione SWI/SNF e tramite cui modula l'attività di diversi *pathway*, tra cui Hedgehog (Hh). E' stato quindi valutato in vitro l'effetto del trattamento con GANT61 (inibitore del *pathway* Hh) nella linea cellulare GIST882, in quanto questa linea è caratterizzata dalla perdita di SMARCB1 come nei casi GIST KIT esone 11 metastatici analizzati. Il trattamento con GANT61 ha portato a una riduzione nell'espressione dei geni cardine del *pathway* di Hh (Figura 3A) e ha provocato una rilevante inibizione della vitalità cellulare (Figura 3B). Inoltre, dopo il trattamento le cellule GIST882 presentavano modulazione dell'espressione di alcuni geni importanti per la progressione tumorale: l'espressione di KIT risultava significativamente ridotta, mentre quella di CDKN1A è risultata indotta a seguito del trattamento (Figura 3C).

6.2.2 Ricorrenza dell'inattivazione di DMD nei GIST metastatici

Alterazioni a carico di DMD, il gene codificante la distrofina, sono state recentemente collegate allo sviluppo di tumori miogenici [Wang et al, 2014]. Nello studio soprariportato effettuato sui casi GIST KIT esone 11 metastatici erano stati identificati 4 casi con alterazione del gene DMD. Abbiamo valutato lo stato mutazionale di DMD in un pannello più ampio di GIST (29 KIT/PDGFR^{mut} e 6 GIST WT), rilevando alterazioni a carico di questo gene in 10 casi su 35 (Figura 4A; Tabella 3). Tra questi, 8 casi erano GIST KIT esone 11 e 2 casi PDGFRA mutati. Nessuno dei GIST WT è risultato positivo per alterazioni di DMD. Tutte le alterazioni riscontrate erano delle delezioni e, essendo DMD un gene *X-linked*, erano nullizigoti nei maschi e eterozigoti nelle femmine. In 8 casi si trattava di delezioni focali intrageniche, mentre in 2 casi di due loss coinvolgenti l'intero cromosoma (Figura 4B). Tutte le delezioni focali di DMD riguardavano la porzione 5' del gene, con la regione tra l'esone 2 e l'esone 7 la più frequentemente coinvolta, e di dimensione media di 770Mb.

Osservando i dati di copertura delle *reads* di RNA-seq è stato possibile notare come la delezione focale di DMD portava alla perdita di espressione del mRNA al 5' del gene, e quindi dell'isoforma lunga del gene, mentre rimaneva l'espressione della isoforma corta di DMD, avente come inizio di trascrizione l'esone 63 (Figura 4C).

Infine si è osservato come nei casi metastatici le delezioni di DMD tendano ad essere più frequenti rispetto ai casi meno aggressivi. Infatti, considerando solo i casi KIT/PDGFRΑ mutati di cui erano disponibile i dati clinici, DMD è stato trovato alterato in 6 casi metastatici mentre 15 su 19 casi con DMD *wild type* erano GIST localizzati (Tabella 6; $P=0.003$, Fisher exact test).

6.2.3 Correlazione tra genotipo e risposta a Imatinib nei GIST KIT esone 11

I meccanismi di resistenza ai TKI, oltre all'acquisizione di nuove mutazioni somatiche nel tumore, possono essere legati al diverso livello di metabolizzazione dei farmaci dell'individuo. Al fine di ricercare altri eventi causali dell'insorgenza della resistenza ad Imatinib, il genotipo di 38 individui affetti GIST è stato analizzato mediante DMET (Affymetrix), un *assay* in grado di rivelare il genotipo di 1936 SNPs in 350 geni noti per il loro coinvolgimento nei meccanismi di metabolismo e detossificazione di farmaci e xenobiotici. In aggiunta a questi 38 casi, altri 15 sono stati utilizzati come casistica di validazione, raggiungendo un totale di 53 casi genotipizzati (Tabella 7). Al fine di uniformare il livello di sensibilità a Imatinib legato al background molecolare, tutti gli individui arruolati per questo studio hanno sviluppato GIST aventi mutazione nell'esone 11 di KIT. Per ogni paziente è stata calcolata il *Progression free Survival* (PFS), considerando il tempo intercorso dall'inizio del trattamento con Imatinib all'inizio dell'evento di progressione, inteso come aumento della dose da 400 a 800mg di Imatinib o il passaggio a Sunitinib. 3 casi su 38 hanno mostrato tossicità a Imatinib e sono stati esclusi, invece dei 1936 SNP iniziali, solo 482 hanno superato i criteri di inclusione (vedi materiali e metodi) e sono stati utilizzati per le analisi. È stata quindi valutata l'associazione tra gli SNP e la PFS tramite analisi uni e multivariata, con calcolo dell'*Hazard Ratio* (HR) e intervallo di confidenza (CI). 26 SNPs sono risultati significativamente associati al PFS e di questi 11 sono stati selezionati (p -value < 0.03) per essere validati in una ulteriore casistica di 15 GIST KIT esone 11 (Tabella 8). Di questi 6 hanno mantenuto la significatività nella casistica espansa di validazione in univariata (Tabella 9) e solo 3 in multivariata: ABCB4 (rs1202283: HR = 0.25, 95% CI 0.12-0.56, $P = 0.0001$), ABCC2 (rs2273697: HR = 2.16, 95% CI 1.09-4.27, $P = 0.027$) e NQO1 (rs10517: HR = 2.56, 95% CI 1.14-5.26, $P = 0.022$). Questi 3 SNP sono stati inseriti in un modello di

predizione in associazione alla risposta. Nel dettaglio, i pazienti sono stati raggruppati in quattro gruppi in base al numero di alleli protettivi o di rischio presenti, ed è quindi stato calcolato il rischio di ogni gruppo. Il gruppo 1 (ABCB4 TT o TC unito a zero o al massimo un allele di rischio in ABCC2 e NQO1) ha un minor rischio di progredire rispetto a tutti gli altri 3 gruppi (gruppo 2: HR = 2.36, 95% CI 1.05-5.30, $P = 0.037$; gruppo 3: HR = 3.19, 95% CI 1.1-9.17, $P = 0.031$; gruppo 4: HR = 25.78, 95% CI 6.86-96.77, $P < 0.0001$) (Figura 5). In questo modo è stato possibile stratificare la casistica in accordo con il rischio di sviluppo di resistenza a Imatinib, confermando l'importanza di questi tre polimorfismi.

6.3 Caratterizzazione dei GIST primariamente resistenti

6.3.1 Ruolo della metilazione nei GIST KIT/PDGFR WT

I casi GIST WT negativi in immunohistochimica per SDHB vengono definiti GIST WT SDH-deficient o SDH^{mut}, anche quando non sono state identificate mutazioni nelle singole subunità del complesso SDH. Un caso appartenente a questa categoria è stato identificato anche nella nostra casistica di GIST KIT/PDGFR WT. Nel particolare, il profilo di espressione di questo caso, GIST_21, era stato analizzato tramite *gene expression array* ed era risultato essere paragonabile a quello di altri 3 casi SDHA mutati [Pantaleo et al, 2011], inoltre a livello proteico era negativo per SDHB come gli altri 3 casi SDHA^{mut} (Figura 6A). Eppure né in sequenziamento Sanger né in Exome-seq né dai dati di *copy number* (SNP6.0 array) era stato possibile identificare alterazioni a carico del complesso SDH, né di geni a lui collegati (dati non mostrati). L'analisi di Exome-seq ha escluso la presenza di alterazioni a carico di BRAF e NF1. A livello dell'mRNA, è stato possibile identificare un calo di espressione di SDHC rispetto a altri casi SDH^{mut} e KIT/PDGFR^{mut} (Figura 6B). È stato quindi valutato lo stato epigenetico del promotore di SDHC, tramite conversione al bisolfito, rilevando una ipermetilazione delle isole CpG (Figura 6C). Ciò indica il caso GIST_21 era effettivamente un caso SDH^{mut} e che anche le alterazioni epigenetiche hanno un ruolo nella classificazione molecolare dei GIST.

6.3.2 Analisi mutazionale GIST KIT/PDGFR/SDH WT

All'interno di una collaborazione a livello Nazionale con diversi centri di ricerca (INT di Milano, IRCC di Candiolo, Campus Bio-Medico di Roma, IOV di Padova) è stato raccolto il materiale tumorale di 30 casi di GIST WT. Al fine di identificare i casi quadrupli WT, è stata ricercata la presenza di mutazioni in SDH (tramite IHC di SDHB), BRAF (sequenziamento

Sanger) e NF1 (sequenziamento NGS). 14 casi su 30 sono risultati essere quadrupli WT. Su 4 casi, disponendo del tessuto tumorale congelato fresco, è stato effettuato sia RNA- che Exome-seq, mentre tra i restanti 10 casi, derivanti da tessuto FFPE, solo su 5 è stato fatto Exome-seq, in quanto ritenuti di sufficiente qualità e/o quantità (Tabella 10).

A livello del profilo di espressione genica, come già visto nella PCA (Figura 1A), i quadrupli WT formano un gruppo assestante rispetto gli altri GIST. Oltre alla over-espressione di *marker* molecolari COL22A1 e NTRK2, tramite l'analisi supervisionata dei geni differenzialmente espressi tra i quadrupli WT e gli altri 3 gruppi GIST (Figura 7A) è stato possibile individuare la over-espressione di EPHA4 e ASCL1, due geni coinvolti nel *commitment* neuronale, e un arricchimento di *pathway* neurali, tra cui *Neuroactive ligand-receptor interaction*, contenente geni legati al lineage neuroendocrino come i recettori accoppiati alle proteine G di classe B (CALCRL, CRHR2, GLP2R e PTH2R). L'elevato livello di espressione di ASCL1 è stato confermato anche in *realtime* PCR su una casistica più ampia di controlli KIT/PDGFR/SDH mutati (Figura 7B). L'arricchimento del pathway neurale è supportato anche dal profilo di espressione dei miRNA, in quanto è stato possibile identificare 17 miRNA, tra i differenzialmente espressi nei quadrupli WT, aventi come target ASCL1 e gli geni coinvolti nel *Neuroactive ligand-receptor interaction pathway* (Figura 7C).

Tra i 4 pazienti analizzati, solo il GIST127 ha mostrato la presenza di trascritti di fusione, probabilmente come eventi secondari (Tabella 11). In particolare, questo tumore ha subito diversi riarrangiamenti a livello del cromosoma 10 e 11, che hanno originato almeno 4 trascritti di fusione, tra cui interessanti sono la fusione *inframe* MARK2-PPF1A1, che porta PPF1A1 sotto il controllo del promotore di MARK2 e la fusione *non-inframe* TET1-RTKN2, che porta all'inattivazione di TET1 a causa della sua troncatura precoce. Inoltre, un'altra rilevante fusione *inframe* è SPRED2-NELFCD, derivante da un riarrangiamento tra il chr2 e chr20, che probabilmente porta all'inattivazione di entrambi i geni. L'effettiva espressione di questi 5 trascritti di fusioni è stata validata con sequenziamento Sanger (dato non mostrato).

L'exome-seq è stato effettuato su 9 casi (4 freschi e 5 FFPE) e di ognuno è stato sequenziato anche il corrispettivo tessuto normale per il filtraggio delle varianti costitutive. Mediamente sono state identificate 18 mutazioni somatiche per tumore. Sono state rilevate due varianti germinali in NF1, annotate in ExAc come "di significato incerto" (p.R2594L in GIST268, Frequenza in ExAC=2/121378 e p.H1374Y in GIST279, frequenza in ExAC=1/118856). Nessuno dei casi analizzati presentava manifestazioni cliniche legate a sindromi e le variante ritrovate in NF1 non sono riportate in HGMD, database in cui sono riportate tutte le varianti e

mutazioni germinali associate a patologie ereditarie.

Non sono state riscontrate alterazioni somatiche ricorrenti eccetto TP53, trovato mutato in 2 pazienti su 9. I geni più rilevanti mutati a livello somatico, anche se non ricorrenti, sono MEN1, MAX, CHD4, FGFR1, CTNND2 (Tabella 12). Queste mutazioni sono state validate in Sanger sequencing (Figura 8). Nell'insieme, questi dati mostrano come i quadrupli WT, per quanto caratterizzati da un comune profilo di espressione, siano un gruppo eterogeneo a livello mutazionale. Tra le mutazioni identificate, è stata riscontrata la mutazione p.N546K in FGFR1, un'alterazione patologica frequentemente presente nei tumori dei tessuti molli. Inoltre per la prima volta è stato riscontrato un caso di GIST con mutazione di MEN1. Questo gene insieme a CHD4 e MAX è un fattore coinvolto nel rimodellamento della cromatina, suggerendo come i meccanismi epigenetici possano avere un ruolo importante nella biologia di questi tumori. Inoltre si è notato come MEN1, insieme a MAX, NF1 e SDH, aumenti la lista di geni caratteristici dei tumori neuroendocrini riscontrati nei GIST WT.

7. DISCUSSIONE

In questa tesi di dottorato, i tumori GIST resistenti al trattamento con TKI sono stati sottoposti ad analisi molecolari approfondite tramite NGS, in quanto nonostante l'introduzione dei TKI nel trattamento dei GIST abbia enormemente modificato la storia naturale di questi tumori [DeMatteo et al, 2007; Joensuu et al, 2012a], numerosi casi presentano o sviluppano fenomeni di resistenza al trattamento [Debiec-Rychter et al, 2004; Heinrich et al 2006, Gramza et al, 2009].

In particolare, per questo studio, sono stati presi in considerazione 4 gruppi molecolari GIST: KIT^{mut}, PDGFRA^{mut}, SDH^{mut} e quadrupli WT. Non sono stati inclusi i casi RAS^{mut} in quanto a causa della loro rarità non ne avevamo a disposizione, inoltre abbiamo selezionato solo casi sporadici, escludendo quasi totalmente la possibilità di trovare casi mutati in NF1.

La resistenza ai TKI si può manifestare in due forme, strettamente correlate allo stato mutazionale di KIT e PDGFRA [Debiec-Rychter et al, 2004; Heinrich et al 2006]: la resistenza primaria riguarda generalmente i casi GIST WT e PDGFRA con mutazione D842V in quanto tendono a non essere responsivi a Imatinib; e la resistenza secondaria invece che riguarda i GIST inizialmente responsivi che poi sviluppano fenomeni di resistenza e vanno incontro a progressione.

Dal profilo di espressione genica, è stato possibile evidenziare specifiche *gene signatures* caratterizzanti ognuno dei 4 gruppi GIST presi in analisi. I KIT e i PDGFRA sono risultati essere simili nel profilo di espressione globale, pur mostrando l'espressione specifica di alcuni marcatori, tra cui PDGFRA che è risultato essere over-espresso principalmente nei GIST portatori di mutazioni in questo gene, confermando dati riportati in lavori precedenti [Subramanian et al, 2004; Hyun JK et al, 2005]. Dall'altro lato, i GIST SDH e quadrupli WT mostravano un profilo nettamente diverso sia tra di loro che dai KIT/PDFRA mutati. I tumori GIST SDHA^{mut} sono risultati essere caratterizzati dall'over-espressione di IGF1R e di marcatori neuronali, quali LHX2 e KIRREL3, come già evidenziato in un lavoro precedente [Pantaleo et al, 2011a]. L'over-espressione di IGF1R conferma ulteriormente le potenzialità di questo recettore come target terapeutico o comunque come marker diagnostico [Chou et al, 2012; Nannini et al, 2013; Lasota et al, 2013]. Invece l'espressione di marker neurali supporta la teoria che questo sottogruppo abbia un'origine diversa o che derivi dalle cellule ICC bloccate a un diverso step differenziativo rispetto ai GIST KIT/PDFRA mutati [Pantaleo et al, 2011a]. Il profilo di espressione dei quadrupli WT, a causa della difficoltà nel reperimento di questi casi a causa della loro rarità, sono stati profilati per la prima volta ed è

stata identificata l'espressione di alcuni marcatori specifici, tra cui CALCRL e COL22A1, confermati in IHC, che possono aiutare come *marker* diagnostici nella identificazione di questa tipologia di GIST.

Queste differenze del profilo di espressione evidenziano la diversità interna presente tra i GIST e possono aiutare nella diagnosi di questa patologia, ma non sono sufficienti né a comprendere tutti i meccanismi legati alla insorgenza di resistenza al trattamento né a trovare nuove strategie terapeutiche. Per questo è stato necessario approfondire gli studi e caratterizzare le alterazioni presenti nelle diverse tipologie di GIST.

7.1 Studio meccanismi di resistenza secondaria

I GIST portatori di mutazioni nell'esone 11 di KIT sono considerati i GIST più sensibili a Imatinib [Heinrich et al 2006], eppure circa il 40-50% dei casi sviluppano fenomeni di resistenza secondaria [Gramza et al, 2009]. In questa tesi abbiamo analizzato le alterazioni geniche presenti in 7 casi metastatici (non più responsivi a Imatinib), combinando i dati di RNA-seq con quelli di SNParray, e confrontate con quelle rilevate nei GIST localizzati (responsivi a Imatinib). In particolare abbiamo visto che secondi eventi mutazionali coinvolgenti KIT, come SNV o amplificazioni o delezioni del cromosoma 4, sono presenti solo nei GIST KIT^{mut} metastatici (3 casi su 7 analizzati) e non nei localizzati. Inoltre sono state rilevate diverse alterazioni a carico oncosoppressori (CDKN2A/B, CDKN1B, CDKN2C, ARID1A, KIF1B, SMARCB1, PTEN, DMD, LATS2 e SMAD4) e in alcuni oncogeni (CCND2, KRAS, BRAF, ETV1, EGFR, MYCN, SMO and TERT) soprattutto nei GIST metastatici e solo raramente nei casi localizzati. Inoltre sono stati identificati alcuni trascritti di fusione in 3 casi, ma senza riscontrare alcuna ricorrenza nella nostra casistica o in letteratura. Interessante potrebbe essere il trascritto di fusione MEAF6-SEPSECS in quanto riarrangiamenti coinvolgenti MEAF6 sono stati documentati sarcomi endometriali stromali e nei tumori fibromixoidi ossificanti [Micci et al, 2014; Antonescu et al, 2014]

Tra gli oncogeni alterati, CCND2 e EGFR sono risultati over-espressi a seguito dell'amplificazione e potenzialmente potrebbero svolgere un ruolo nella acquisizione di resistenza. CCND2 è una ciclina necessaria per la transizione G1/S del ciclo cellulare frequentemente alterata in alcune tipologie di cancro tra cui la leucemia mieloide acuta [Eisfeld et al, 2016]. Anche l'attivazione costitutiva di EGFR è stata associata con diversi tipi di cancro, e diversi approcci terapeutici sono stati sviluppati [Zhou et al, 2011; Heinemann et al, 2014]. Nel nostro studio 2 casi metastatici su 7 presentavano over-espressione di EGFR a

seguito di amplificazione genica, ma sono necessari ulteriori studi in casistiche più ampie per valutare se può essere un gene interessante per una terapia mirata nei GIST.

Tra gli oncosoppressori, CDKN2A/B, PTEN e DMD sono risultati essere alterati solo nei casi metastatici. CDKN2A/B è posizionato nel braccio corto del cromosoma 9, nella banda 21.3, ed è stato trovato alterato in 6 su 7 casi metastatici. E' un oncosoppressore frequentemente alterato nel cancro, soprattutto nelle forme più aggressive. Anche nei GIST la sua alterazione è considerata un fattore prognostico sfavorevole [Zhang et al, 2010; Schneider-Stock et al, 2003]. In accordo con questa affermazione, nel nostro studio nessun caso localizzato presentava alterazioni in CDKN2A/B. Diversi inibitori dei geni CDK sono attualmente sotto investigazione in trial clinici, tra cui il Palbociclib (PD0332991) è attualmente utilizzato in un studio clinico di fase II sui GIST resistenti ai TKI (clinicaltrials.gov, NCT01907607).

PTEN regola negativamente il *pathway* di segnalazione di PI3K/AKT/mTOR ed tra gli oncosoppressori il secondo più frequentemente mutato dopo p53. La delezione monoallelica di PTEN era già stata descritta nei GIST resistenti a Imatinib [Quattrone et al, 2014; Bauer et al, 2007] causando l'attivazione dell'asse di segnalazione di PI3K/AKT/mTOR [Li et al, 2015]. A conferma di questi dati, nella nostra casistica 3 casi metastatici mostravano una delezione di PTEN, associata a un calo di espressione genica. Inoltre per la prima volta è stato riscontrato un caso con mutazione nonsense di PTEN. Alcuni inibitori di mTOR, tra cui Everolimus and Temsirolimus sono stati valutati in diversi studi preclinici e clinici ma ad oggi i risultati ottenuti sono limitati [Schöffski et al, 2010]. Attualmente si stanno testando alcuni inibitori di PI3K, tra cui BYL719, ed è in corso di valutazione come terza linea di trattamento, in associazione con Imatinib (clinicaltrials.gov, NCT01735968).

Interessante è la scoperta di alterazioni a carico di DMD, il gene della distrofina, rilevate in 4 casi metastatici su 7 analizzati. DMD è il gene umano più grande conosciuto, si trova sul cromosoma X e le cui alterazioni sono state associate con lo sviluppo della distrofia di Duchenne [Monaco et al, 1985]. Recentemente, la presenza di delezioni intrageniche di questo gene sono state rilevate nei tumori di origine miogenica [Wang et al, 2014]. In particolare, sono state individuate delezioni intrageniche di DMD in 25 su 40 tumori miogenici tra cui GIST, rabdomiosarcoma e leiomiomasarcoma. Queste delezioni sono state rilevate solo nel tessuto tumorale e in nessun sarcoma non miogenico analizzato (58casi). Lo studio di Wang e colleghi ha portato a ipotizzare un ruolo da oncosoppressore per DMD, la cui inattivazione può promuovere le capacità metastatiche grazie al suo ruolo nella migrazione, invasione e ancoraggio [Wang et al, 2014]. Abbiamo quindi deciso di approfondire la ricerca delle alterazioni di DMD su un totale di 35 casi GIST, di cui avevamo i dati di *copy number*

derivanti da SNParray. Tra questi, 10 casi KIT/PDGFR^A mutati presentavano alterazioni a carico di DMD: 8 delezioni intrageniche e due delezioni dell'intero cromosoma X. Nessuno dei GIST WT analizzati presentavano alterazioni di DMD. Le delezioni intrageniche riscontrate ricadevano tutte nella parte 5' del gene, mantenendo intatta l'espressione della forma corta di DMD avente inizio di trascrizione a partire dall'esone 63. Dal punto di vista clinico, le alterazioni di DMD sono state riscontrate più frequentemente nei casi metastatici, in quanto tutti i casi localizzati analizzati erano DMD WT. Nonostante questi dati siano ancora preliminari, sembrano indicare DMD come un importante oncosoppressore e supportare nuove strategie terapeutiche volte a restaurare la funzionalità di DMD nel trattamento dei GIST metastatici. Saranno quindi necessari studi su casistiche più ampie per confermare questo dato e correlare lo status di DMD con lo status mutazionale di KIT/PDGFR^A, al fine di esplorare nuove terapie nei casi GIST che sono resistenti o che acquisiscono resistenza al trattamento con Imatinib.

Altri importanti oncosoppressori sono stati rilevati deleti nei GIST metastatici KIT esone 11, ma derivavano da delezioni di ampie regioni cromosomiche comunemente alterate nei GIST (braccio p del cromosoma 1 e braccio q del cromosoma 22) e quindi, anche se con minor frequenza, sono stati trovati alterati anche in alcuni casi localizzati. La delezione del braccio corto del cromosoma 1, è stata riscontrata in 6 casi su 7 KIT^{mut} metastatici e si associa in 5 casi al calo di espressione di CDKN2C, un oncosoppressore che regola il ciclo cellulare, e in 6 alla perdita monoallelica di ARID1A. Quest'ultimo gene codifica per un membro del complesso SWI/SNF del rimodellamento della cromatina ed è coinvolto nella proliferazione e differenziamento cellulare, riparo del DNA [Wu et al, 2014]. Mutazioni a carico di ARID1A sono frequenti nel cancro [Wu et al, 2014]. Infine la delezione del braccio q del cromosoma 22 è stata riscontrata in 4 casi metastatici e in 2 localizzati. La presenza della delezione, per quanto monoallelica, si associa a un significativo calo di espressione di SMARCB1, è un noto oncosoppressore e la sua perdita è associata con lo sviluppo di tumori rabdoidi [Versteeg et al 1998; Roberts et al, 2000; Kim et al, 2014;]. Inoltre è un membro del complesso di rimodellazione SWI/SNF che modula l'attività di diversi *pathway*, tra cui quello di Hedgehog (Hh) tramite l'interazione con le molecole GLI [Kim et al, 2014; Jagani et al, 2010]. La descrizione di un modello murino di GIST ottenuto tramite l'inattivazione di PTCH1 suggerisce che il *pathway* di Hh possa avere un ruolo nella biologia dei GIST [Pelczar et al, 2013]. Quando abbiamo pubblicato questi dati, non esistevano dati pubblicati riportanti l'effetto dell'inibizione del *pathway* di Hh nei GIST. Quindi abbiamo testato l'effetto di GANT61, un inibitore di GLI, su una linea cellulare GIST portatrice della delezione di

SMARCB1 e abbiamo dimostrato la presenza di un effetto sulla vitalità cellulare e sul livello di espressione di alcuni geni chiave per la progressione tumorale: KIT e CDKN1A. Questo esperimento rappresenta solo un primo tentativo di valutare l'effetto dell'inibizione di Hh nei GIST. In seguito alla nostra pubblicazione, a conferma dei nostri risultati, un altro gruppo di ricerca ha riscontrato mutazioni in altri componenti del *pathway* di Hh nei GIST, tra cui PTCH1, e ha dimostrato *in vitro* come il trattamento con farmaci inibitori di GLI vada a favorire il legame di GLI3 al promotore di KIT e ne riduca significativamente l'espressione, portando a un calo della vitalità delle cellule tumorali GIST [Tang et al 2015].

Altri fattori che possono influire sull'*outcome* del trattamento possono non dipendere dalle alterazioni somatiche accumulate dal tumore, ma piuttosto dalla variabilità genetica individuale che modula i processi di accumulo, metabolismo ed eliminazione di un farmaco. Per questo motivo, abbiamo effettuato uno studio di farmacogenetica al fine di valutare l'effetto della variabilità genetica del paziente sulla risposta clinica al trattamento con Imatinib. Fino ad ora erano stati analizzati solo pochi SNP alla volta (approccio a gene candidato) [Angelini et al, 2013; Angelini et al, 2015; O'Brien et al, 2013; Ravegnini et al, 2016]. Nello studio portato avanti in questa tesi, invece, è stato utilizzato un approccio omnicomprensivo, utilizzando il DMET array che permette di analizzare migliaia di SNP noti per essere legati al metabolismo dei farmaci [Deeken, 2009]. Il nostro studio è stato effettuato su una casistica di 34 pazienti GIST e il loro genotipo è stato associato con la PFS sotto trattamento con Imatinib. Gli SNP significativi sono stati valutati in una casistica espansa di validazione totale di 53 casi GIST KIT esone 11 mutati. Tre SNP ABCB4 rs1202283, ABCC2 rs2273697, and NQO1 rs10517 hanno mantenuto la significatività. A partire da questi tre SNP è stato costruito un modello predittivo di rischio, riuscendo a stratificare i pazienti in base al rischio di progressione sotto Imatinib e quindi confermando il ruolo di questi SNP come *marker* genetici. Questi 3 SNP sono stati associati al trattamento con Imatinib nei GIST per la prima volta, solo ABCC2 era già stato associato alla resistenza a Imatinib in uno studio effettuato nella leucemia mieloide cronica [Au et al, 2014]. Nonostante la dimensione della casistica analizzata possa sembrare limitata e che da ciò possa derivare un limitato potere statistico, bisogna tenere in considerazione la rarità della malattia che abbiamo analizzato e dello sforzo che è stato fatto per mantenere la popolazione in studio il più possibile omogenea, a scapito della numerosità. Infatti abbiamo selezionato solo casi con mutazione nell'esone 11 di KIT e che non avessero mostrato tossicità/intolleranza a Imatinib. Alla luce di queste considerazioni, si tratta del primo ampio studio di farmacogenetica effettuato sui GIST e ha permesso di individuare una *signature* genetica che potrebbe aiutare

nel controllo e nel follow-up di questi pazienti in quanto sembra essere correlata alla progressione della malattia sotto trattamento con Imatinib. Ulteriori studi saranno necessari per confermare questo dato, come una validazione tramite studio prospettico comprendente tutti i GIST KIT/PDGFR^A mutati.

7.2 Studio meccanismi di resistenza primaria

La resistenza primaria è strettamente legata allo stato mutazionale di KIT e PDGFRA e si manifesta entro 6 mesi dal trattamento [Debiec-Rychter et al, 2004; Heinrich et al 2006]. I GIST PDGFRA con mutazione D842V nell'esone 18, la mutazione più comune nei casi PDGFRA^{mut}, sono primariamente resistenti al trattamento con TKI, sia a Imatinib che a Sunitinib [Heinrich et al, 2003; Heinrich et al, 2008b]. Per questa tipologia di GIST si sta ora delineando una nuova opzione terapeutica, che prevede l'utilizzo di un nuovo promettente TKI, Crenolanib [Heinrich et al, 2012]. Si tratta di un potente inibitore di PDGFRA e PDGFR^B che si è dimostrato essere 100 volte più efficace di Imatinib nei GIST con mutazione D842V e per questo è attualmente in corso l'arruolamento di casi per un trial clinico (clinicaltrials.gov, NCT02847429). I GIST WT sono stati definiti come primariamente resistenti ai TKI ma, a differenza dei PDGFRA D842V, per loro ancora non esiste una vera opzione terapeutica alternativa. La causa di questa mancanza va ricercata nella rarità e nella grande eterogeneità del gruppo GIST WT, di cui solo recentemente si sta cominciando a riconoscere i diversi sottogruppi molecolari che lo compongono [Boikos et al, 2016]. Infatti al suo interno sono riconoscibili casi GIST SDH^{mut}, RAS^{mut}, BRAF^{mut}, NF1^{mut} e i rimanenti sono definiti quadrupli WT [Boikos et al, 2016; Nannini et al, 2014]. Inoltre è stato dimostrato come i diversi sottogruppi di GIST WT abbiano un diverso comportamento clinico [Boikos et al, 2016].

Sono stati riportati casi di regressione sotto trattamento con Dabrafenib, un inibitore di BRAF, nei GIST portatori della mutazione V600E di BRAF [Falchook et al, 2013], inoltre recentissime scoperte nei GIST quadrupli WT suggeriscono l'utilizzo di inibitori dei recettori TRK in alcuni casi aventi specifiche alterazioni somatiche [Shi et al. 2016]. Infine, i casi SDHA^{mut}, nonostante l'inefficacia del trattamento con TKI, hanno mostrato una notevole buona sopravvivenza, sia in confronto ai GIST KIT/PDGFR^A mutati che ai GIST quadrupli WT [Pantaleo et al, 2015a]. E' quindi importante, per la gestione di questi pazienti, saper riconoscere i diversi sottogruppi all'interno dei GIST WT.

La diagnosi di GIST SDH^{mut} avviene tramite analisi immunohistochimica di SDHB [Gill et al,

2010] ma si rende necessario il sequenziamento diretto per identificare la mutazione alla base dell'inattivazione del complesso SDH. Recentemente è stato dimostrato come anche eventi epigenetici possano essere gli eventi mutazionali che portano alla perdita di SDHB. Nello studio effettuato da noi, abbiamo dimostrato come la metilazione del promotore di SDHC sia riconducibile alla perdita del complesso SDH, in accordo con altri due studi pubblicati [Haller et al, 2014, Killian et al, 2013]. Questi dati sottolineano l'importanza delle alterazioni epigenetiche nella biologia dei GIST e aggiungono un ulteriore grado di complessità nel background molecolare dei GIST WT.

Ancora più complesso ed eterogeneo è il profilo dei quadrupli WT. Nello studio che è stato portato avanti in questa tesi, abbiamo studiato tramite RNA-seq e Exome-seq 9 casi di quadrupli WT sporadici, evidenziando una importante eterogenità a livello mutazionale che si riconduce incredibilmente ad un omogeneo e peculiare profilo di espressione.

A livello germinale due casi presentazioni varianti missenso in NF1, ma queste varianti erano riportate in ExAc come "varianti di significato incerto" e non presenti nel database HGMD dove invece sono elencate le mutazioni di NF1 patologiche che, quando germinali, causano la neurofibromatosi. Queste valutazioni, insieme alla constatazione che nessuno dei casi GIST quadrupli WT analizzati erano stati diagnosticati come sindromici, non permettono di sostenere un ruolo patologico per queste varianti identificate.

A livello somatico, in 6 casi su 9, sono state riscontrate mutazioni in geni legati alla tumorigenesi, tra cui 2 casi con mutazioni a carico di TP53 suggerendo un ruolo importante di questo gene nei quadrupli WT (frequenza stimata di mutazione maggiore del 20%). E' già stato descritto come l'over-espressione di TP53 si associ una maggior rischio [Zong et al, 2012], ma la presenza di vere e propri eventi mutazionali non erano ancora state riportate nei GIST.

Una mutazione inattivante MAX è stata rilevata in un caso. MAX è un fattore di trascrizione legato all'arresto del ciclo cellulare e alla differenziazione. Mutazioni a carico di questo gene sono state riscontrate nelle forme ereditarie di feocromocitoma/paraganglioma e raramente nelle forme sporadiche. E' già stato riportato un caso GIST WT portatore di una mutazione somatica di MAX in un caso portatore anche di una mutazione frameshift in NF1 somatica [Belinsky et al, 2015]. Curiosamente, anche nel nostro caso con mutazione di MAX, era stata rilevata una variante in NF1, ma trattandosi di una variante germinale di significato incerto, non è possibile trarre delle conclusioni di un'eventuale associazione tra la presenza di mutazioni in MAX e in NF1.

Una delezione omozigote di MEN1 è stata rilevata in un ulteriore caso di quadruplo WT.

MEN1 è un oncosoppressore implicato nella sindrome ereditaria MEN1 (*Multiple endocrine neoplasia type 1*) che è caratterizzata dal manifestarsi di diverse combinazioni di neoplasie neuroendocrine [Giusti et al, 2015; Minetti et al, 2016]. Questa è la prima volta che viene riportata la presenza di mutazioni a carico di MEN1 nei GIST.

L'identificazione di mutazioni in MEN1 e MAX, insieme a quelle già note in SDH e NF1, porta ad aumentare ulteriormente la lista di geni alterati nei GIST WT che tipicamente sono noti per essere implicati nei tumori neuroendocrini NET. I NET comprendono una vasta famiglia di tumori endocrini, sporadici e a volte associati a sindromi, che derivano da alterazioni somatiche o germinali in diversi geni di suscettibilità. La scoperta di un sottogruppo di GIST WT portatori di mutazioni in SDH e di un sottogruppo avente alterazioni germinali o somatiche in NF1, si somma alla recente identificazione di mutazioni a carico di MEN1 e MAX nei quadrupli WT, suggerendo un'associazione tra i GIST WT e la famiglia di NET. A supporto di questa ipotesi, i quadrupli WT studiati in questa tesi presentavano una marcata over-espressione di ASCL1, un *marker* immunohistochimico precoce di *lineage* neuroendocrino e che svolge un ruolo anche nel *commitment* neurale [Ball, 2004; La Rosa et al, 2013], e l'espressione dei geni appartenenti alla classe B delle secretine, recettori associati a proteine G necessari per la segnalazione dei *pathway* neuroendocrini [Millar et al, 2010]. Già in passato, in un precedente lavoro del nostro gruppo in cui erano stati messi a confronto i profili di espressione genica di 4 casi GIST WT (solo successivamente indentificati come 2 SDH^{mut} e 2 quadrupli WT) e di alcuni casi GIST KIT/PDGFR mutati, era stata riscontrata una over-espressione di *marker* neurali nel gruppo dei WT [Pantaleo et al, 2011a]. Insieme questi dati rinforzano l'ipotesi che la maggioranza dei GIST KIT/PDGFR WT possano derivare da una cellula bloccata a un diverso step differenziativo rispetto ai GIST KIT/PDFRA mutati, come una cellula direzionata al differenziamento neurale o al *commitment* neuroendocrino.

Dall'analisi di exome dei 9 casi di quadruple WT altri geni rilevanti sono risultati mutati. Come CHD4, un componente del complesso Mi2-NuRD coinvolto nel regolamento della trascrizione, riparo del DNA e proliferazione, tramite il rimodellamento della cromatina e deacetilazione degli istoni. Di recente CHD4 è stato trovato mutato in diversi tumori [Gonzalez-Perez et al, 2013; Kim et al, 2011b]. E' interessante notare come anche MEN1 e MAX siano coinvolti nella regolazione epigenetica e rimodellamento della cromatina [Bouchard et al, 2001; Yang et al, 2013], suggerendo che questi fenomeni possano avere un ruolo nella biologia di questi tumori.

Inoltre, una mutazione inattivante la CTNND2 è stata rilevata in un caso. Questo gene è

espresso nel tessuto cerebrale ed è over-espressa in diversi tumori, eppure diverse mutazioni inattivanti sono state registrate in COSMIC e mutazioni non senso sono state identificate nel glioblastoma e nell'adenocarcinoma [Nopparat et al, 2015; Frattini et al, 2013]. Lo stesso caso presentava inoltre diversi riarrangiamenti cromosomici che portavano alla troncatura prematura di alcuni geni, tra cui TET1 e SPRED2, ma se queste alterazioni abbiano o meno una influenza nello sviluppo del tumore non è chiaro.

Infine, una mutazione missenso N546K a carico di FGFR1 è stata rilevata in un caso. Si tratta di una regione *hotspot* di mutazione e la stessa è stata rilevata nel sarcoma di Ewing [Angelopoulos et al, 2015]. FGFR1 è noto per essere coinvolto nello sviluppo di diversi sarcomi e nei tumori del sistema nervoso [Angelopoulos et al, 2015] e recentemente è stato riportato alterato in alcuni casi di GIST quadrupli WT, tra cui due eventi di fusione (FGFR1-TACC1 e FGFR1-HOOK3) [Shi et al, 2016].

L'importanza di geni nei fusioni nei GIST quadrupli WT era già stata evidenziata da un lavoro riportante la presenza della fusione ETV6-NTRK3 in un caso [Brenca et al, 2015]. Successivamente altri due positivi per la fusione sono stati identificati tra i quadrupli WT [Heinrich et al, 2016]. La presenza di alterazioni a carico di NTRK3, indica la possibilità di trattare questi pazienti con gli inibitori di TRK e un primo report sulla efficacia del trattamento con LOXO-101 è stato pubblicato di recente [Shi et al, 2016]. Ciò suggerisce l'importanza di ricercare nei casi quadrupli WT la presenza di questo gene di fusione a fini di migliorare la scelta terapeutica. Nella nostra casistica non sono stati rilevati questi eventi di fusione, né a carico di FGFR1 né a carico di ETV6-NTRK3, probabilmente a causa della grossa eterogeneità intrinseca al gruppo dei GIST quadrupli WT.

Come considerazione generale, i risultati da noi ottenuti sui quadrupli WT non sono sufficienti a completare la comprensione di questo sottogruppo, che rimane eterogeneo e caratterizzato da una ampia gamma di alterazioni. Solo studi su casistiche più grandi potranno chiarire le basi molecolari dei quadrupli WT. E' stato comunque possibile evidenziare come alla base di questa eterogeneità vi sia comunque un profilo di espressione comune che porta ad avvicinare i GIST quadrupli WT ai tumori neuroendocrini, con cui condividono parte della ampia gamma di geni di suscettibilità mutati.

8. CONCLUSIONI

L'insieme degli studi riportati nella presente tesi, porta a miglior comprensione dei meccanismi molecolari alla base della classificazione dei GIST e dei fattori implicati nei fenomeni di resistenza al trattamento con TKI. Inoltre la caratterizzazione delle alterazioni geniche caratterizzanti i diversi gruppi GIST può indicare approcci terapeutici mirati alternativi a quelli standard, portando a un miglioramento nella gestione della patologia.

La resistenza secondaria si associa principalmente a una maggior aggressività del tumore legata all'acquisizione di nuove alterazioni molecolari. L'individuazione dell'evento mutazionale alternativo scatenante la resistenza può indicare il trattamento più efficace, come Palbociclib e BYL719 rispettivamente nei casi CDKN2A/B e PI3K mutati.

I casi GIST WT, primariamente resistenti ai TKI, sono stati sottoposti negli ultimi anni a studi approfonditi che hanno portato a una miglior caratterizzazione molecolare e all'identificazione di diversi sottogruppi con diverse caratteristiche cliniche. Il gruppo dei quadrupli WT rimane ancora non del tutto compreso, molto eterogeneo a livello mutazionale ma con caratteristiche che ricordano i tumori neuroendocrini. La scoperta in alcuni di questi casi di eventi di fusione a carico di RTK, suggerisce la sperimentazione di alcuni nuovi trattamenti mirati, ma ancora si rendono necessari ulteriori studi per arrivare a un vero approccio terapeutico efficace nella totalità di GIST quadrupli WT.

In conclusione, gli studi effettuati in questa tesi, insieme ai recenti risultati pubblicati in letteratura, aiutano a migliorare la comprensione molecolare dei diversi sottogruppi GIST e possono portare all'identificazione di nuovi approcci terapeutici.

9. TABELLE

Tabella 1: Lista dei campioni tumorali GIST raccolti e delle analisi effettuate

	ID	tipologia tessuto	Stato mutazionale	GEP array	SNP array	RNA-seq	Exome-seq	miRNA
SDH deficient	GIST_10	fresco	SDHA ^{mut}	X	X	X		X
	GIST_24	fresco	SDHA ^{mut}	X	X			
	GIST_07	fresco	SDHA ^{mut}	X	X	X		X
	GIST_21	fresco	SDHC ^{mut}	X	X		X	
	GIST_151	fresco	SDHA ^{mut}					X
	GIST_193	fresco	SDHA ^{mut}					X
Quadrupli WT	GIST_127	fresco	WT	X	X	X	X	X
	GIST_133	fresco	WT	X	X	X	X	X
	GIST_400	fresco	WT			X	X	X
	GIST_401	fresco	WT			X	X	X
	GIST409	FFPE	WT				X	
	GIST279	FFPE	WT				X	
	GIST257	FFPE	WT				X	
	GIST268	FFPE	WT				X	
GIST320	FFPE	WT				X		
KIT mutati	GIST_130	fresco	KIT ^{mut}	X	X			
	GIST_124	fresco	KIT ^{mut}	X	X	X		
	GIST_27	fresco	KIT ^{mut}		X			
	GIST_20	fresco	KIT ^{mut}	X	X			
	GIST_11	fresco	KIT ^{mut}	X	X	X		X
	GIST_16	fresco	KIT ^{mut}	X	X			
	GIST_174	fresco	KIT ^{mut}		X	X		
	GIST_188	fresco	KIT ^{mut}		X	X		
	GIST_150	fresco	KIT ^{mut}		X	X		
	GIST_08	fresco	KIT ^{mut}	X	X			
	GIST_13	fresco	KIT ^{mut}	X	X			
	GIST_23	fresco	KIT ^{mut}	X				
	GIST_121	fresco	KIT ^{mut}	X	X			
	GIST_02	fresco	KIT ^{mut}	X	X			
	GIST_131	fresco	KIT ^{mut}	X	X	X		
	GIST_135	fresco	KIT ^{mut}	X	X			
	GIST_125	fresco	KIT ^{mut}	X	X			
	GIST_14	fresco	KIT ^{mut}	X	X			X
	GIST_09	fresco	KIT ^{mut}	X	X			
	GIST_18	fresco	KIT ^{mut}		X			
	GIST_04	fresco	KIT ^{mut}	X	X			
	GIST_178	fresco	KIT ^{mut}	X	X	X		
GIST_129	fresco	KIT ^{mut}	X	X				
PDGFRA mutati	GIST_05	fresco	PDGFRA ^{mut}	X	X			
	GIST_26	fresco	PDGFRA ^{mut}	X	X			
	GIST_26	fresco	PDGFRA ^{mut}		X			X
	GIST_12	fresco	PDGFRA ^{mut}	X	X			
	GIST_15	fresco	PDGFRA ^{mut}	X	X			X
	GIST_22	fresco	PDGFRA ^{mut}	X	X			
	GIST_136	fresco	PDGFRA ^{mut}	X	X	X		
	GIST_138	fresco	PDGFRA ^{mut}			X		
	GIST_140	fresco	PDGFRA ^{mut}			X		
	GIST_141	fresco	PDGFRA ^{mut}			X		
	GIST_165	fresco	PDGFRA ^{mut}			X		

Tabella 2. Caratteristiche dei casi arruolati per la caratterizzazione del profilo di espressione dei diversi gruppi molecolari GIST

ID	Sesso	Array	RNAseq	Età	Sito	Stato mutazionale di KIT/PDGFR/SDH
GIST_133	M	X	X	57	Duodeno	WT
GIST_127	F	X	X	63	Ileo	WT
GIST_07	F	X	X	27	Stomaco	SDHA exon 9 p.S384X
GIST_10	M	X	X	29	Stomaco	SDHA exon 2 p.R31X; SDHA exon 13 p.R589W
GIST_188	F		X	57	Duodeno	KIT exon 11 p.N564-L576 del KIT exon 17 p.N822K
GIST_174	M		X	59	Stomaco	KIT exon 11 p.N564 L576 del KIT exon 17 p.N822K
GIST_131	M	X	X	58	Ileo	KIT exon 11 p.V569_Y578 del
GIST_11	M	X	X	65	Stomaco	KIT exon 11 p.557-558 del
GIST_178	F	X	X	65	Stomaco	KIT exon p.V559D
GIST_124	M	X	X	70	Stomaco	KIT exon 11 p.1765-1766 ins
GIST_150	F		X	55	Stomaco	KIT exon 11 p.P551_E554 del
GIST_165	M		X	50	Stomaco	PDGFRA exon 18 p.D842V
GIST_136	M	X	X	76	Stomaco	PDGFRA exon 18 p.D842V
GIST_140	F		X	45	Stomaco	PDGFRA exon 18 p.D842V
GIST_141	M		X	68	Stomaco	PDGFRA exon 18 p.D842V
GIST_138	F		X	75	Stomaco	PDGFRA exon 18 p.D842V
GIST_02	F	X		85	Stomaco	KIT exon 11 p.V560D
GIST_04	M	X		79	Stomaco	KIT exon 9 p.AY502-503 ins
GIST_05	M	X		68	Stomaco	PDGFRA exon 12 p.SPDGHE 566-571RIQ
GIST_08	M	X		62	Stomaco	KIT exon 11 p.V559D
GIST_09	M	X		54	Stomaco	KIT exon 11 TLQPYDHWEEFP 574-585 ins at P585
GIST_12	F	X		66	Stomaco	PDGFRA exon 14 p.K646E
GIST_13	M	X		46	Intestino	KIT exon 11 p.V559D
GIST_14	M	X		56	Stomaco	KIT exon 11 p.WK557-558del
GIST_15	F	X		64	Stomaco	PDGFRA exon 18 DIMH p.842-845 del
GIST_16	F	X		62	Stomaco	KIT exon 11 p.L576P
GIST_20	M	X		38	Intestino	KIT exon 11 del MYEQW552-557 KIT exon 18 A829P
GIST_22	F	X		76	Stomaco	PDGFRA exon 18 p.D842V
GIST_23	F	X		47	Stomaco	KIT exon 11 p.V559D
GIST_24	F	X		18	Stomaco	SDHA exon 8 p.L349R fs*11
GIST_26	M	X		49	Stomaco	PDGFRA exon 12 p.V561D
GIST_121	M	X		71	Stomaco	KIT exon 11 p.V559D
GIST_125	F	X		48	Stomaco	KIT exon 11 p.W557R
GIST_129	M	X		59	Stomaco	KIT exon11 p.Y553-V559 delins L
GIST_130	F	X		79	Stomaco	KIT exon 9 p.A502-Y503 ins
GIST_135	F	X		61	Stomaco	KIT exon 11 p.W557-E561 del

Tabella 3. Caratteristiche cliniche dei casi GIST metastatici KIT esone 11 mutati

Campione	Sesso	Età	Sito tumore primario	Sito Metastasi	Stato	Mutazione KIT
GIST_11	M	77	Stomaco	Peritoneo	NED	KIT exon 11 del (WK557-558)
GIST_124	M	73	Stomaco	Peritoneo Polmone	DOD	KIT exon 11 c.1765-1766 ins (QLPYDHKWEFPRNR 588-589 ins)
GIST_131	M	68	Ileo	Fegato	AWD	KIT exon 11 c.1706_1735del (p.V569_Y578 del)
GIST_178	F	70	Stomaco	Fegato Peritoneo	AWD	KIT exon 11 c1676T>A (p.V559D)
GIST_150	F	58	Stomaco	Fegato	NED	KIT exon 11 c.1651_1663del (p.P551_E554del)
GIST_174	M	61	Stomaco	Fegato	NED	KIT exon 11 c.1727T>C (p.L576P)
GIST_188	F	62	Duodeno	Fegato Ossa	DOD	KIT exon 11 c.1690_1728del39 (p.N564_L576del) + KIT exon 17 c.2466T>G (p.N822K)

NED: nessuna evidenza di malattia; DOD: morto a causa della malattia; AWD: vivo con malattia

Tabella 4. Trascritti di fusione identificati nei GIST metastatici KIT esone 11 mutati

Campione	Gene al 5'	Chr	Esone di rottura nel gene al 5'	Gene al 3'	Chr	Esone di rottura nel gene al 3'	N° splitted reads	N° spanning reads	Frame	Tipo fusione
GIST_150	DOK6	chr18	ex3	MYO5B	chr18	ex34	34	9	sì	Intra-chromosomal Complex
GIST_150	MEAF6	chr1	ex4	SEPSECS	chr4	ex8	21	6	sì	Inter-chromosomal
GIST_178	PACS2	chr14	ex1	IGHD	chr14	ex1	25	8	no	Intra-chromosomal Complex
GIST_178	FAM174A	chr5	ex1	DMGDH	chr5	ex16	26	16	no	Intra-chromosomal Complex
GIST_131	KDM4B	chr19	ex2 (not coding)	ODF3L2	chr19	ex3	17	19	no	Intra-chromosomal Complex
GIST_131	KDM4B	chr19	ex2 (not coding)	SHC2	chr19	ex2	12	5	no	Intra-chromosomal Complex

Tabella 5. Lista delle SNV identificate nei GIST metastatici KIT esone 11 mutati.

Campione	Gene	Esone	cDNA	Proteina	Tipo di alterazione	Posizione cromosomica	Coverage Ratio	Predizione effetto mutazione *
GIST_124	CDKN2A	2	c.C247T	p.H83Y	SNV	9:21971111	1.00	Deleteria
GIST_150	KEAP1	4	c.G1385A	p.G462E	SNV	19:10600470	0.42	Deleteria
GIST_174	LATS2	8	c.C2809T	p.Q937X	Stop gained	13:21549467	0.40	Deleteria
GIST_174	PTEN	7	c.C697T	p.R233X	Stop gained	10:89717672	0.69	Deleteria
GIST_188	CDKN1B	2	c.479delC	p.S160fs	Frameshift deletion	12:12871762	0.85	Deleteria

* Unione di due predittori bioinformatici: Provean e SNPs&GO

Tabella 6. Dati clinici e molecolari dei casi GIST in cui è stato studiato lo stato mutazionale di DMD. I casi con perdita di DMD sono riportati in grassetto.

ID	Sesso	Età	DMD	Esone inizio delezione	Esone fine delezione	Localizzazione	Stato	Stato mutazionale KIT/PDGFR
GIST_18	M	NA	deleto	ex2	ex7	NA	NA	KIT exon 11 V559G
GIST_20	M	38	deleto	ex2	ex2	Intestino	Metastatico	KIT exon 11 del MYEQW552–557 Z;
			deleto	ex8	ex17			KIT exon 18 A829P
GIST_22	F	76	deleto	ex1	ex44	Stomaco	NA	PDGFRA exon 18 D842V
GIST_25	M	84	deleto	ex1	ex17	NA	NA	KIT exon 11 del WKV557–559 F
GIST_26	M	49	deleto	ex1	ex11	Stomaco	Metastatico	PDGFRA exon 12 V561D
GIST_27	M	52	deleto	ex1	ex1	NA	NA	KIT exon 11 del KV558-559 N
GIST_131	M	58	deleto	ex3	ex7	Intestino	Metastatico	KIT exon 11 del V569_Y578
GIST_174	M	59	deleto	ex1	ex7	Stomaco	Metastatico	KIT exon 11 L576P
GIST_188	F	57	deleto	Intero cromosoma		Intestino	Metastatico	KIT exon 11 N564_L576del; KIT exon 17 p.N822K
GIST_178	F	65	deleto	Intero cromosoma		Stomaco	Metastatico	KIT exon 11 V559D
GIST_02	F	85	wt	-	-	Stomaco	Localizzato	KIT exon 11 V560D
GIST_04	M	79	wt	-	-	Stomaco	Localizzato	KIT exon 9 ins AY502–503
GIST_05	M	68	wt	-	-	Stomaco	Localizzato	PDGFRA exon 12 ins/del SPDGHE566–571RIQ
GIST_08	M	62	wt	-	-	Stomaco	Localizzato	KIT exon 11 V559D
GIST_09	M	54	wt	-	-	Stomaco	Localizzato	KIT exon 11 ins TQLPYDHWKWEFP574–585
GIST_11	M	65	wt	-	-	Stomaco	Metastatico	KIT exon 11 del WK557–558
GIST_12	F	66	wt	-	-	Stomaco	Localizzato	PDGFRA exon 14 K646E
GIST_13	M	46	wt	-	-	Intestino	Localizzato	KIT exon 11 V559D
GIST_14	M	56	wt	-	-	Stomaco	Metastatico	KIT exon 11 hom. del WK557–558
GIST_15	F	64	wt	-	-	Stomaco	Localizzato	PDGFRA exon 18 del DIMH842-845
GIST_16	F	62	wt	-	-	Stomaco	Localizzato	KIT exon 11 L576P
GIST_121	M	72	wt	-	-	Stomaco	Localizzato	KIT exon 11 V559D
GIST_124	M	72	wt	-	-	Stomaco	Metastatico	KIT exon 11 ins 1765–1766

continuo Tabella 6

ID	Sesso	Età	DMD	Esone inizio delezione	Esone fine delezione	Localizzazione	Stato	Stato mutazionale KIT/PDGFR
GIST_125	F	49	wt	-	-	Stomaco	Localizzato	KIT exon 11 W557R
GIST_129	M	60	wt	-	-	Stomaco	Localizzato	KIT exon 11 del/ins Y553-V559L
GIST_130	F	79	wt	-	-	Stomaco	Localizzato	KIT exon 9 ins A502_Y503
GIST_135	F	60	wt	-	-	Stomaco	Localizzato	KIT exon 11 del W557_E561
GIST_136	M	76	wt	-	-	Stomaco	Localizzato	PDGFRA exon 18 D842V
GIST_150	F	56	wt	-	-	Stomaco	Metastatico	KIT exon 11 P551_E554del
GIST_07	F	27	wt	-	-	Stomaco	Metastatico	KIT/PDGFR wild-type (SDH deficient)
GIST_10	M	29	wt	-	-	Stomaco	Metastatico	KIT/PDGFR wild-type (SDH deficient)
GIST_21	F	25	wt	-	-	Stomaco	NA	KIT/PDGFR wild-type (SDH deficient)
GIST_24	F	18	wt	-	-	Stomaco	Metastatico	KIT/PDGFR wild-type (SDH deficient)
GIST_127	F	63	wt	-	-	Ileo	Localizzato	quadruple wild-type (KIT/PDGFR/SDH/BRAF-KRAS-NF1 wild-type)
GIST_133	M	57	wt	-	-	Duodeno	Localizzato	quadruple wild-type (KIT/PDGFR/SDH/BRAF-KRAS-NF1 wild-type)

Tabella 7. Dati clinici dei pazienti arruolati per la genotipizzazione dei polimorfismi associati al metabolismo dei farmaci e xenobiotici.

Cases, <i>n</i>	53
Gender, <i>n</i> (%)	
Female	22 (41.5)
Male	31 (58.5)
Age at diagnosis, years	
Median (range)	59 (36-83)
Tumor site, <i>n</i> (%)	
Stomach	26 (49.1)
Small intestine	25 (47.2)
Extra GIST	1 (1.9)
Missing	1 (1.9)
Tumor size, <i>n</i> (%)	
< 2 cm	10 (19.0)
5 – 10 cm	14 (26.4)
≥ 10 cm	24 (45.3)
Missing	5 (9.4)
Status at onset, <i>n</i> (%)	
Localized	28 (52.8)
Metastatic	25 (47.2)
Mitotic index, <i>n</i> (%)	
≤ 5	12 (22.6)
6 – 10	4 (7.5)
≥ 10 cm	26 (49.1)
Missing	11 (20.8)

Tabella 8. Associazione tra PFS e genotipo di 35 casi GIST. 26 SNP sono risultati significativi in analisi univariata. In grassetto sono evidenziati gli SNP selezionati per la validazione sulla casistica espansa di 53 casi tramite sonde taqMan.

Gene, RefSNP	mRNA	Proteina	Modello	Frequenza	PFS	HR (95% CI)	P-value
				n (%)	Mediana (giorni)		
ABC4, rs1202283	c.504T>C	Asn168Asn	TT+Tc cc	30 (88.2)	1164	Ref 4.35 (1.40-13.5)	0.006
				4 (11.8)	484		
ABCC2, rs2273697	c.1249A>G	Val417Ile	AA+Ag gg	18 (52.9)	1368	Ref 3.27 (1.40-7.67)	0.004
				16 (47.1)	761		
ABCG1, rs1541290	c.*1981A>G	3'UTR	AA+Ag gg	26 (76.5)	1164	Ref 2.70 (1.07-6.81)	0.029
				8 (23.5)	606		
ABCG1, rs3788010	c.1809-252A>G	Intron	AA+Ag gg	29 (85.3)	1164	Ref 2.80 (1.01-7.80)	0.040
				5 (14.7)	761		
ALDH3A1, rs887241	c.400G>T	Ala134Ser	GG+Gt tt	24 (70.6)	958	Ref 0.37 (0.14-1.03)	0.045
				10 (29.4)	2647		
CBR3, rs2835286	c.398-12A>G	Intron	AA+Ag gg	10 (29.4)	2647	Ref 3.24 (1.10-9.60)	0.023
				24 (70.6)	958		
CYP11B1, rs1134095	c.*1499C>T	3'UTR	CC+Ct tt	19 (55.9)	1649	Ref 2,70 (1.09-6.73)	0.027
				15 (44.1)	958		
CYP11B1, rs4736312	c.*1852T>G	3'UTR	TT+Tg gg	19 (55.9)	1649	Ref 2.73 (1.08-6.67)	0.027
				15 (44.1)	958		
FMO1, rs12954	c.*111T>C	3'UTR	TT+Tc cc	7 (20.6)	2647	Ref 3.40 (0.97-11.84)	0.040
				27 (79.4)	976		
GSTA2, rs2180314	c.335G>C	Ser112Thr	GG+Gc cc	27 (79.4)	976	Ref 0.24 (0.05-1.02)	0.033
				7 (20.6)	2647		
NQO1, rs1800566	c.559C>T	Pro187Ser	TT+Tc cc	11 (47.8)	535	Ref 0.42 (0.17-1.03)	0.047
				22 (52.2)	1216		
SLCO3A1, rs960440	c.1753+4399G>C	Intron	GG+Gc cc	8 (23.5)	516	Ref 0.32 (0.13-0.80)	0.011
				26 (76.5)	1164		
ABCC3, rs1051640	c.4509A>G	Glu1503Glu	AA Ag+gg	25 (73.5)	878	Ref 0.33 (0.11-0.97)	0.032
				9 (26.5)	2647		
ABCG1, rs1044317	c.*399A>G	3'UTR	AA Ag+gg	5 (14.7)	761	Ref 0.36 (0.13-0.99)	0.040
				29 (85.3)	1164		
CBR3, rs8133052	c.11A>G	Cys4Tyr	AA A+gg	6 (17.6)	730	Ref 0.26 (0.09-0.74)	0.006
				28 (82.4)	1216		
CYP2A7, rs3869579	c.931T>C	Arg311Cys	TT Tc+cc	12 (35.3)	2647	Ref 2.50 (0.98-6.32)	0.045
				22 (64.7)	958		
CYP2C18, rs2860840	c.*31T>C	3'UTR	TT Tc+cc	4 (11.8)	515	Ref 0.34 (0.12-1.03)	0.046
				30 (88.2)	1163		
CYP4B1, rs2297809	c.1123C>T	Arg375Cys	CC Ct+tt	24 (72.7)	1164	Ref 2.35 (0.98-5.61)	0.048
				9 (27.3)	958		
CYP4Z1, rs4926802	c.1170T>C	Ile390Ile	CC Ct+tt	10 (41.7)	2647	Ref 4.94 (1.35-18.1)	0.008
				14 (58.3)	761		
CYP7B1, rs6987861	c.122+1556T>C	Intron	TT Tc+cc	13 (38.2)	606	Ref 0.33 (0.15-0.78)	0.012
				21 (61.8)	1368		
CYP11B1, rs5303	c.*694C>T	3'UTR	CC Ct+tt	16 (47.1)	958	Ref 0.35 (0.14-0.88)	0.020
				18 (52.9)	1649		
CYP11B1, rs7003319	c.*1042G>A	3'UTR	GG Ga+aa	15 (44.1)	958	Ref 0.37 (0.15-0.92)	0.027
				19 (55.9)	1649		
CYP19A1, rs1062033	c.-12829C>G	Intron	CC Cg+gg	8 (23.5)	958	Ref 0.38 (0.15-1.01)	0.043
				26 (76.5)	1368		
GSTA5, rs4715354	c.-31+2057C>T	Intron	CC Ct+tt	10 (29.4)	739	Ref 0.36 (0.14-0.89)	0.017
				24 (70.6)	1368		
NQO1, rs10517	c.*1119C>T	3'UTR	CC Ct+tt	24 (70.6)	958	Ref 0.33 (0.12-0.91)	0.015
				10 (29.4)	2647		
SULT1E1, rs3822172	c.-9-469A>G	Intron	AA Ag+gg	21 (61.8)	976	Ref 0.37 (0.14-0.95)	0.030
				13 (38.2)	1649		

Tabella 9. Analisi univariata tra PFS e genotipo di 53 casi GIST. In grassetto sono evidenziati i 3 SNP risultati significativi anche in multivariata e utilizzati per il modello predittivo.

Gene	RefSNP	Modello	Frequenza <i>n</i> (%)	PFS Mediana (giorni)	HR (95% CI)	<i>P</i> -value
ABCB4	rs1202283	TT+Tc	30 (79.6)	1034	Ref	0.001
		cc	10 (20.4)	506	3.81 (1.76-8.24)	
ABCC2	rs2273697	AA+Ag	25 (51.0)	1163	Ref	0.035
		gg	24 (49.0)	761	2.05 (1.05-3.98)	
ABCG1	rs1541290	AA+Ag	37 (75.5)	1034	Ref	0.019
		gg	12 (24.5)	606	2.38 (1.15-4.93)	
CYP7B1	rs6987861	TT	17 (34.7)	606	Ref	0.047
		Tc+cc	32 (65.3)	1034	0.50 (0.25-1.00)	
CYP11B1	rs7003319	GG	19 (38.8)	878	Ref	0.047
		Ga+aa	30 (61.2)	1034	0.50 (0.25-1.01)	
NQO1	rs10517	CC	35 (71.4)	765	Ref	0.015
		Ct+tt	14 (28.6)	1368	0.37 (0.16-0.80)	

Table 10. Caratteristiche cliniche casi di GIST quadrupli WT studiati in NGS

Caso	Sesso	Età	Sito Tumore	dimensione (cm)	Indice Mitotico	Classif. di rischio	Metastasi	Tipo di tessuto	Analisi NGS
GIST127	F	63	Ileo	5-10	6-10/50HPF	Alto	Sì	Fresco congelato	RNA + Exome
GIST133	M	57	Duodeno	1.6	< 5/50HPF	Molto basso	No	Fresco congelato	RNA + Exome
GIST400	M	69	Duodeno	NA	NA	NA	No	Fresco congelato	RNA + Exome
GIST401	F	45	Duodeno	NA	NA	NA	No	Fresco congelato	RNA + Exome
GIST409	M	45	Digiuno	NA	NA	NA	No	FFPE	Exome
GIST279	F	41	Colon	8	80/50HPF	Alto	Sì	FFPE	Exome
GIST257	F	73	Ileo	12	100/50HPF	Alto	No	FFPE	Exome
GIST268	M	50	Ileo	8,5	2/50HPF	Intermedio	No	FFPE	Exome
GIST320	M	73	Ileo	13	<5/50HPF	Alto	No	FFPE	Exome

Tabella 11. Lista dei geni di fusione identificati nel caso GIST_127

Gene al 5'			Gene al 3'					
Gene	Esoni	Posizione	Gene	Esoni	Posizione	Num Splitted reads	Num. Spanning reads	Frame
SPRED2	1	2:65,659,096	NELFCD	11	20:57,568,053	61	21	yes
MARK2	1	11:63,607,032	PPFIA1	2	11:70,170,508	23	5	yes
TET1	8	10:70,432,802	XR_946000.1.1	2	10:63,979,196	22	22	no
PLA2G16	1	11:63,381,472	ATL3	2	11:63,426,724	18	16	no
ASCC1	1	10:73,972,945	C10orf11	2	10:77,795,766	51	22	no

Tabella 12. Lista delle mutazioni somatiche oncogeniche identificate nei GIST quadrupli WT

ID	Gene	cDNA	Proteina	Posizione	Ratio
GIST127	CTNND2	c.2986_2987delinsAG>T	p.S996delinsW	chr5:11022893	0,31
GIST257	TP53 ^{#§}	c.473G>T	p.R158L	chr17:7578457	0,40
	TP53 [#]	c.680delC	p.S227fs*18	chr17:7577601	0,27
GIST268	MAX [#]	c.100_110delTCCCTACGTTT	p.K34fs*31	chr14:65560487	0,29
GIST320	MEN1 ^{#§}	c.249_252delAGAC	p.L83fs*34	chr11:64577330	0,93
	TP53 ^{#§}	c.646G>A	p.V216M	chr17:7578203	0,65
GIST401	CHD4 [#]	c.2659delC	p.R887fs*14	chr12:6701977	0,47
GIST409	FGFR1 ^{#§}	c.1638C>A	p.N546K	chr8:38274849	0,59

§ la mutazione è presente in COSMIC # il gene fa parte del database Cancer Gene Census

10. FIGURE

Figura 1. Profilo di espressione genica dei sottogruppi molecolari GIST. A) L'analisi PCA non supervisionata mostra la separazione tra i gruppi GIST, in rosso i casi quadrupli WT, in verde i SDHA^{mut}, in blu i PDGFRA^{mut} e in giallo i KIT^{mut}. B) Clustering gerarchico dei geni maggiormente differenziali tra i quattro sottogruppi GIST. C) Validazione in immunohistochimica dell'espressione dei marcatori CALCRL e COL22A1 nei quadrupli WT (sopra) in confronto con i GIST SDH^{mut} (sotto).

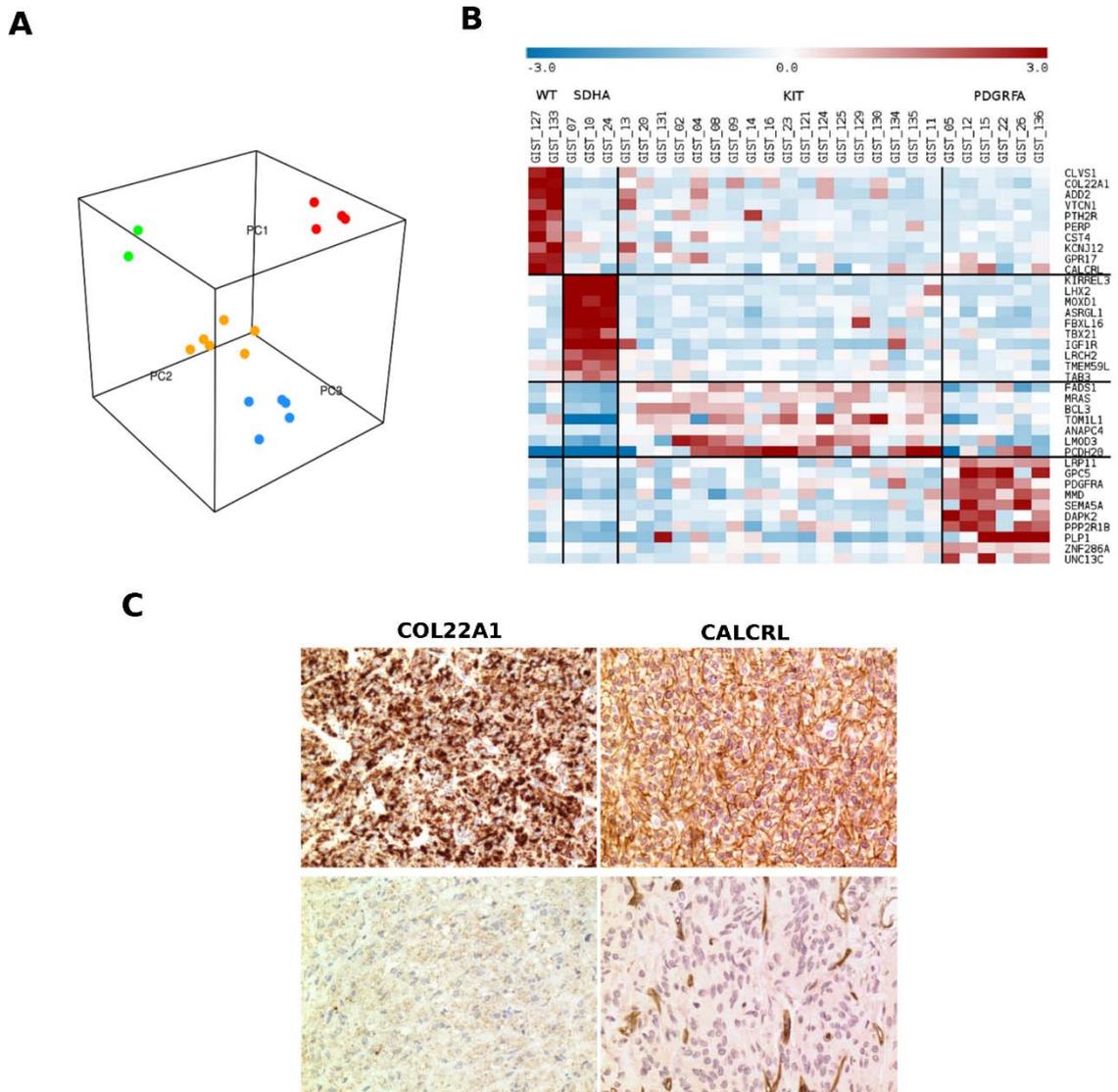
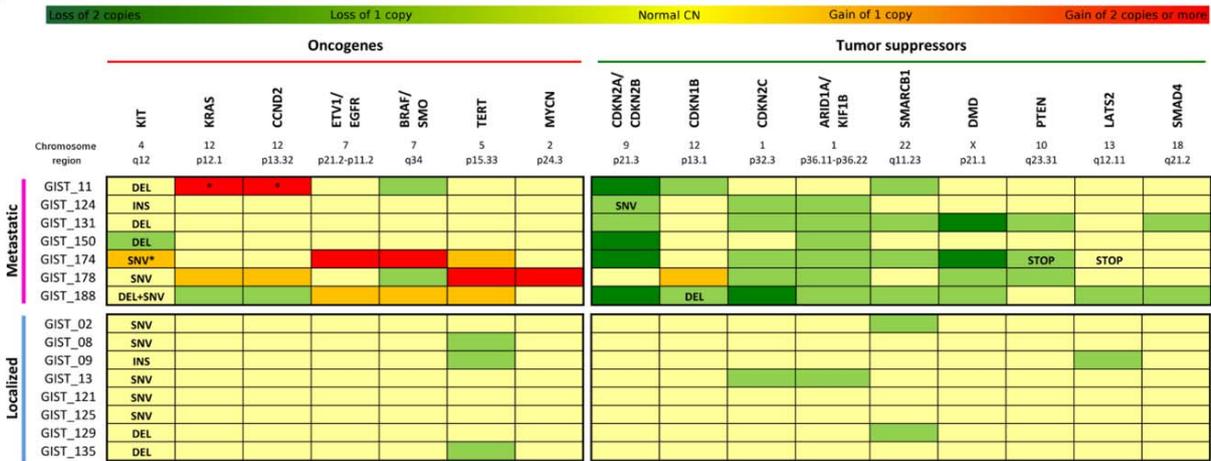


Figura 2. Profilo mutazionale e di espressione dei GIST KIT esone 11. A) Profilo mutazionale dei GIST KIT^{mut}. Nella parte superiore del grafico sono riportati i dati mutazionali derivanti dall'unione del RNA-seq con gli SNP-array di 7 casi di GIST KIT^{mut} metastatici. Nella parte inferiore del grafico sono mostrati a confronto i dati di SNP-array di 8 casi GIST KIT^{mut} localizzati. Per ogni paziente sono riportati gli stati di alterazione dei geni più rilevati come oncogeni (sulla sinistra) e come oncosoppressori (sulla destra). In giallo sono indicati i copy number normali (CN=2), invece nelle tonalità del verde sono rappresentate le delezioni (verde scuro se in omozigosi, verde chiaro se in eterozigosi) mentre nelle tonalità del rosso le amplificazioni (arancioni se si tratta di gain di una sola copia, rosso se si tratta di 2 o più copie). INS=inserzione; DEL = delezione; SNV = mutazione puntiforme missenso; STOP = acquisizione di uno STOP codon prematuro. * Perdita di eterozigosi. § GIST178 presentava un genotipo triploide in tutti i cromosomi. B) Oncogeni e oncosoppressori i cui livelli di espressione correla con il loro stato di *copy number*. Gli oncogeni sono mostrati nella parte sinistra del grafico, gli oncosoppressori sulla parte destra. Per ogni gene, il livello di espressione è stato valutato a partire dal conteggio normalizzato delle read mappanti (cpm) e quindi confrontato rispetto al cpm medio nell'intera casistica. La significatività della differenza di espressione è stata valutata tramite t-test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

A



B

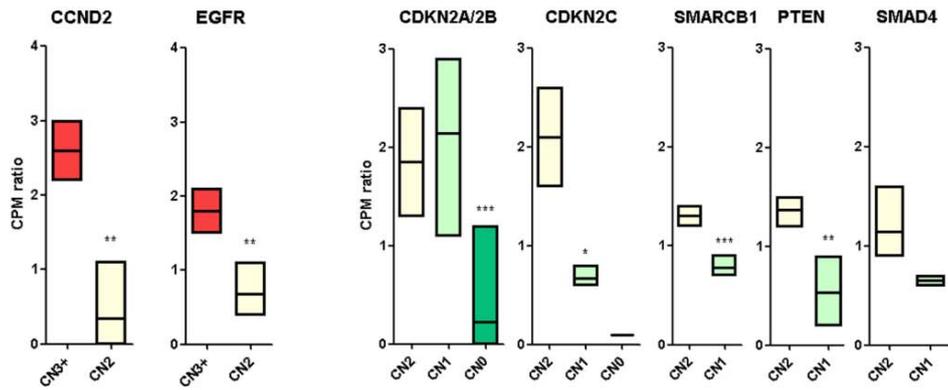
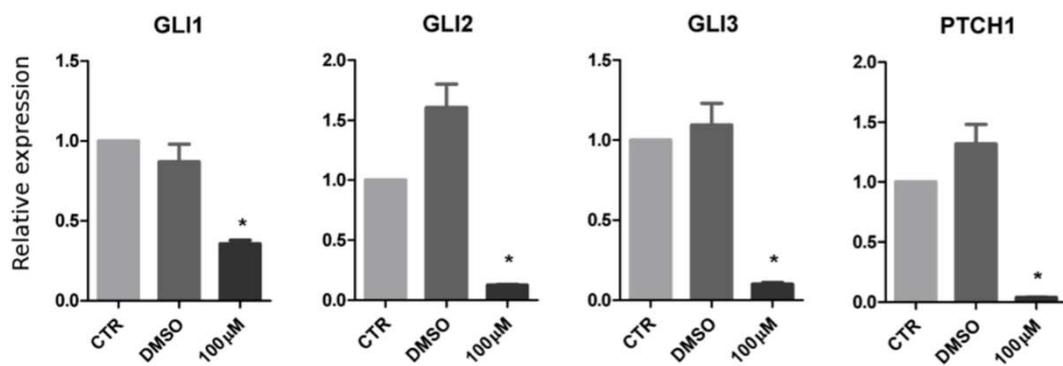
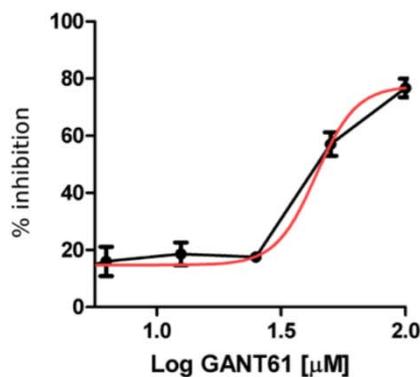


Figura 3. Effetto dell'inibizione del *pathway* di Hedgehog nella linea GIST882. Le GIST882 sono state trattate con GANT61 (concentrazioni da 6.25 a 100 μ M) per 72h. A) Il livello di espressione dei geni del *pathway* di Hh (GLI1, GLI2, GLI3, PTCH1) è risultato essere significativamente downregolato a seguito del trattamento. B) Il trattamento con GANT61 ha portato a una significativa inibizione della vitalità cellulare nelle GIST882. C) Il livello di espressione di KIT è diminuito a seguito del trattamento con GANT61, mentre quello di CDKN1A ha subito un aumento significativo. La significatività dei livelli di espressione è stata valutata rispetto al trattamento con solo DMSO tramite t-test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

A



B



C

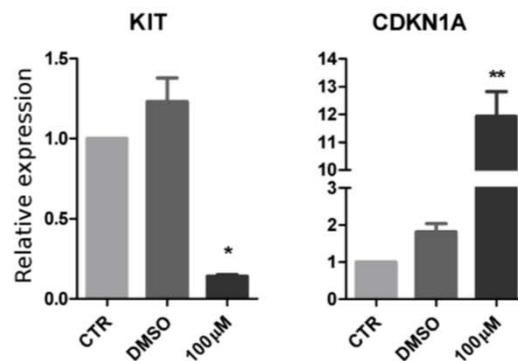


Figura 4. Delezione di *DMD* e espressione genica nei GIST. A) Log^2 Ratio del cromosoma X, derivante dai dati di copy number ottenuti con gli SNParray, mostranti le delezioni focali e i due casi con delezione dell'intero braccio cromosomico. B) **Rappresentazione grafica** delle dimensioni delle delezioni focali di *DMD*, gene localizzato sullo strand negativo del cromosoma X. C) **Espressione di *DMD* graficata come il numero medio di reads di RNA-seq mappanti sulle regioni codificanti del gene.** Sono mostrati i tre casi con delezione focale di *DMD*, di cui erano disponibili i dati di RNA-seq. Tutti i casi mostrano la perdita di dei primi esoni di *DMD* e l'espressione della isoforma corta di *DMD*, a partire dall'esone 63.

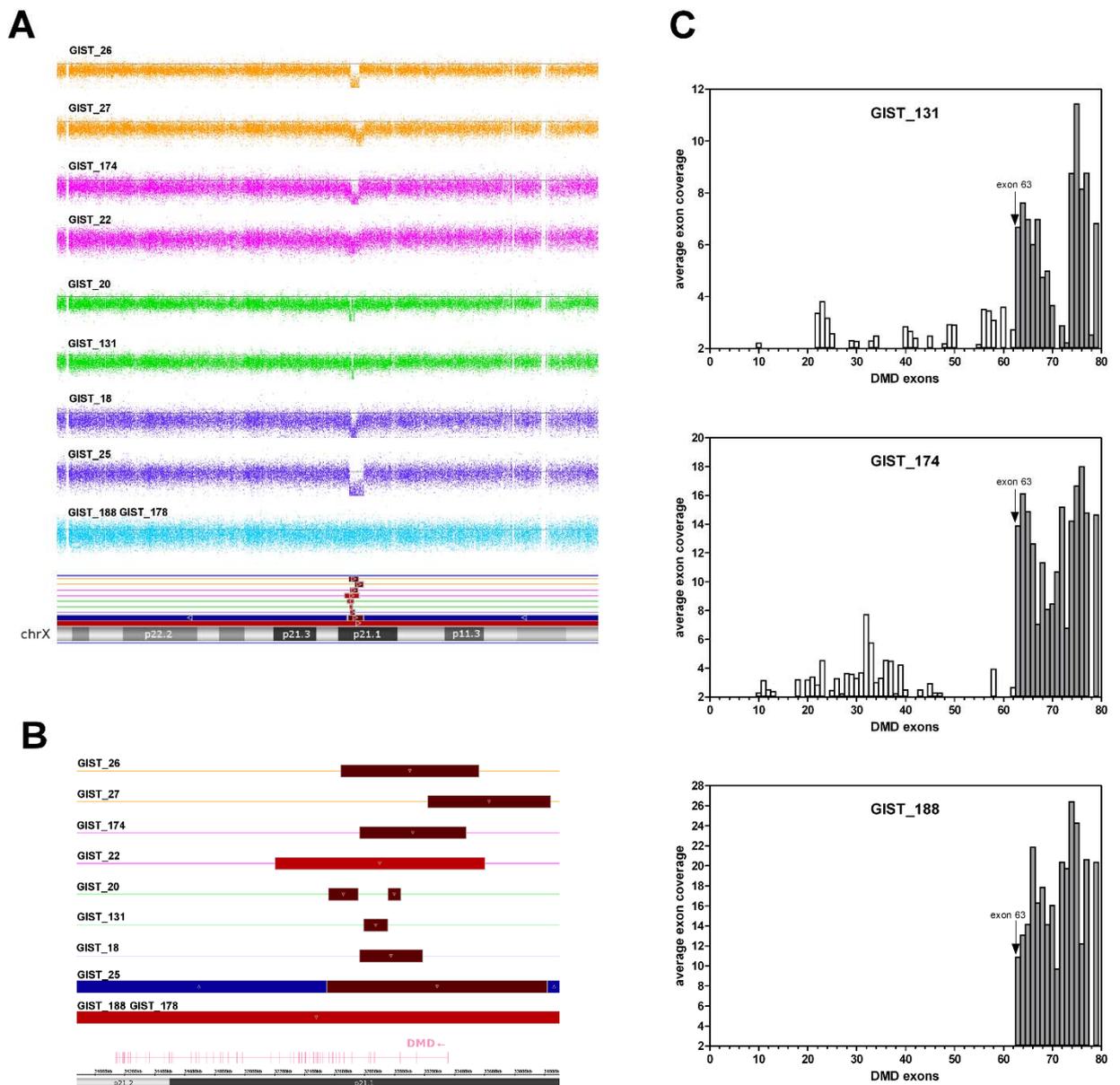


Figura 5. Modello predittivo. Curve di sopravvivenza (Kaplan–Meier) della PFS stimata nei pazienti raggruppati in base al numero di alleli di rischio o protettivi presenti negli SNP rs1202283 (ABCB4), rs2273697 (ABCC2) e rs10517 (NQO1). Sulla destra sono riportate le combinazioni di genotipi componenti i 4 gruppi rischio. A sinistra è riportata la curva di sopravvivenza.

ABCB4 rs1202283	ABCC2 rs2273697	NQO1 rs10517	Group
TT/TC	AA/AG	TT/TC	1
TT/TC	GG	TT/TC	1
TT/TC	AA/AG	CC	1
TT/TC	GG	CC	2
CC	GG	TT/TC	3
CC	AA/AG	CC	3
CC	GG	CC	4

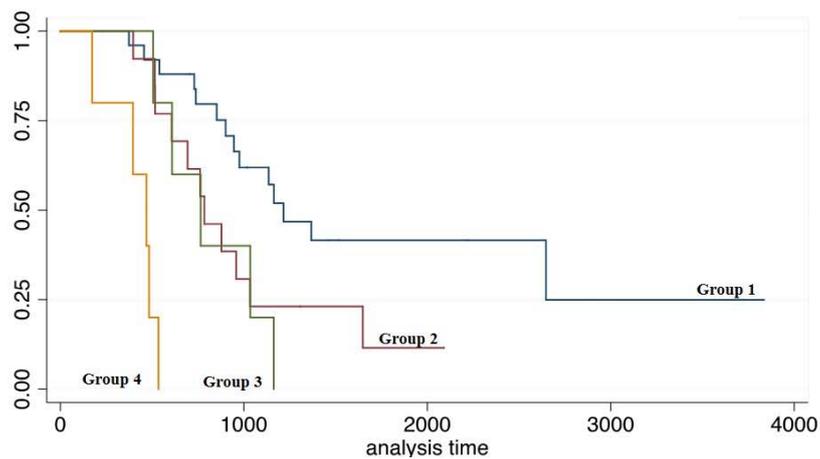


Figura 6. Alterazione di SDHC nel caso GIST_21 A) Western blot di SDHA e SDHB mostra come il caso GIST_21 fosse negativo per SDHB allo stesso livello dei casi SDHA^{mut}. L'actina è stata usata come controllo. B) Down-regolazione a livello del trascritto di SDHC nel caso GIST_21 (rosso) rispetto sia ai casi SDHA^{mut} (arancione) che ai KIT/PDGFR^{mut} (azzurro). C) Cromatogramma parziale del prodotto di PCR della regione promotrice di SDHC. Il DNA tumorale del caso GIST_21 e di 11 GIST di controllo (3 SDHA^{mut} and 8 KIT/PDGFR^{mut}) sono stati trattati con bisolfito e sequenziati in Sanger. Sopra è riportato il cromatogramma del caso GIST_21, in cui sono evidenziate con una stella tutte le CpG metilate (conversione C>T incompleta); sotto invece è riportato un cromatogramma di controllo negativo di metilazione (completa conversione C>T in tutti i siti). Le stelle indicano la posizione dei dinucleotidi CG dell'isola CpG; le barrette nere indicano le posizioni delle C non facenti parte di un dinucleotide CG dell'isola CpG e quindi completamente convertite in T a seguito del trattamento con bisolfito

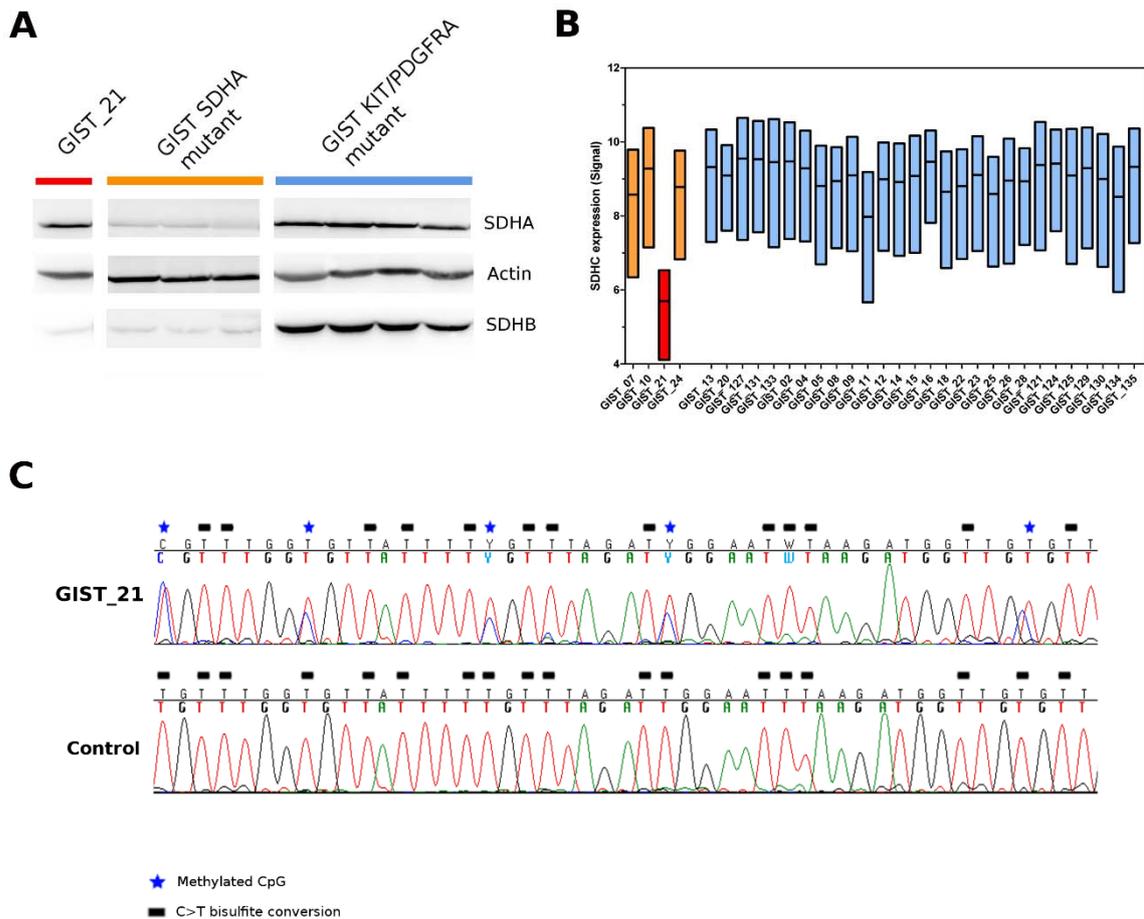
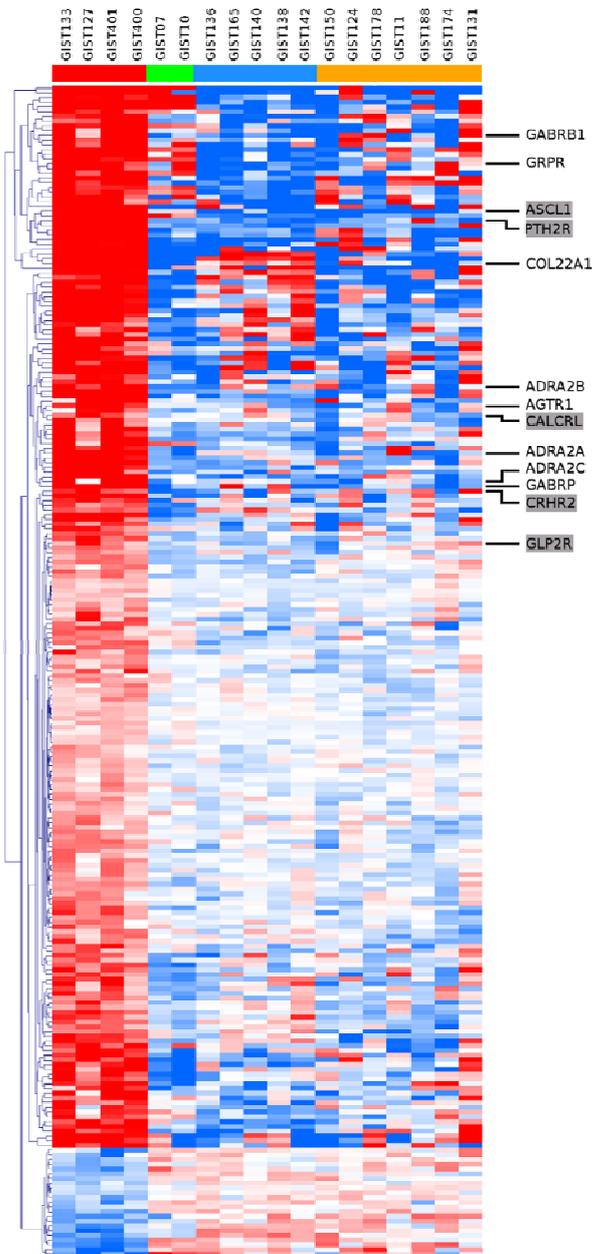
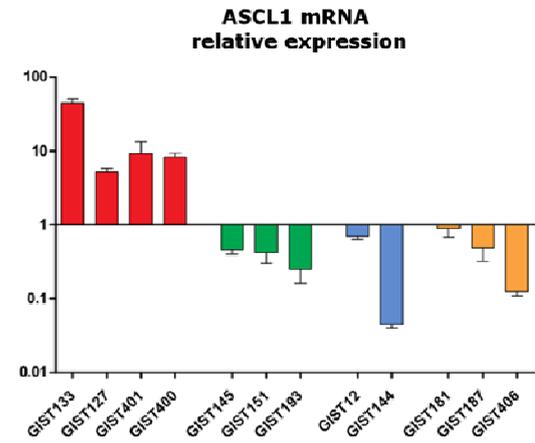


Figura 7. Espressione di marker neurali nei GIST quadrupli WT. A) Heat map rappresentante I 247 geni differenziali (q-values < 0.05) nel confronto tra I quadruple WT e tutti gli altri sottogruppi di GIST (KIT/PDGFRA/SDH^{mut}). Sulla destra sono indicati i geni appartenenti al pathway *Neuroactive ligand-receptor interaction*. B) Livello di espressione del mRNA di ASCL1 valutato in real-time PCR in una casistica aggiunta di 8 casi KIT/PDGFRA/SDH^{mut} GIST. Il livello di espressione è stato misurato in 4 quadrupli WT (rosso), 3 SDH^{mut} (verde) e in 5 KIT/PDGFRA^{mut} (giallo e blu rispettivamente). C) Correlazione dei profili di espressione di miRNA con quello di espressione genica. 17 miRNA, tra i 66 differenziali nei quadrupli WT rispetto agli altri sottogruppi GIST, sono stati identificati come possibili regolatori di 10 geni appartenenti al pathway *Neuroactive ligand-receptor interaction*. In giallo sono evidenziati i geni appartenenti al lineage neuroendocrino. In rosa sono evidenziati i miRNA over-espresi e in verde in sotto-espresi nei quadrupli WT.

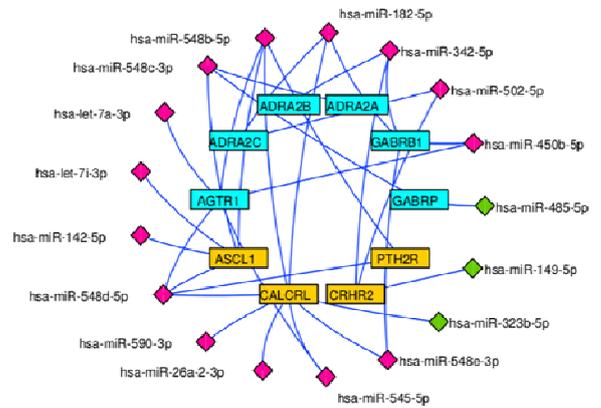
A



B



C



11. BIBLIOGRAFIA

[Agaimy et al, 2009] Agaimy A, Terracciano LM, Dirnhofer S, Tornillo L, Foerster A, Hartmann A, Bihl MP. V600E BRAF mutations are alternative early molecular events in a subset of KIT/PDGFR α wild-type gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol* 2009;62:613-6.

[Alexandrov et al, 2013] Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Børresen-Dale AL, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjörd JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Hutter B, Ilicic T, Imbeaud S, Imielinski M, Jäger N, Jones DT, Jones D, Knappskog S, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013 Aug 22;500(7463):415-21.

[Andersson et al, 2006] Andersson J, Bümming P, Meis-Kindblom JM, et al. Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 11 deletions are associated with poor prognosis. *Gastroenterology* 2006;130:1573-81.

[Angelini et al, 2013] Angelini S, Pantaleo MA, Ravegnini G, Zenesini C, Cavrini G, Nannini M, Fumagalli E, Palassini E, Saponara M, Di Battista M, Casali PG, Hrelia P, Cantelli-Forti G, Biasco G. Polymorphisms in OCTN1 and OCTN2 transporters genes are associated with prolonged time to progression in unresectable gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib therapy., *Pharmacol. Res.* 68 (2013) 1–6.

[Angelini et al, 2015] Angelini S, Ravegnini G, Nannini M, Bermejo JL, Musti M, Pantaleo MA, Fumagalli E, Venturoli N, Palassini E, Consolini N, Casali PG, Biasco G, Hrelia P, Folate-related polymorphisms in gastrointestinal stromal tumours: susceptibility and correlation with tumour characteristics and clinical outcome., *Eur. J. Hum. Genet.* 23 (2015) 817–23.

[Angelopoulos et al, 2015] Angelopoulos K, Richter GH, Schmidt E, Dirksen U, von Heyking K, Moser B, et al. Deep Sequencing in Conjunction with Expression and Functional Analyses Reveals Activation of FGFR1 in Ewing Sarcoma. *Clin Cancer Res* 2015;21:4935-46.

[Antonescu et al. 2014] Antonescu CR, Sung YS, Chen CL, Zhang L, Chen HW, Singer S, Agaram NP, Sboner A, Fletcher CD. Novel ZC3H7B-BCOR, MEAF6-PHF1, and EPC1-PHF1 fusions in ossifying fibromyxoid tumors--molecular characterization shows genetic overlap with endometrial stromal sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014 Feb;53(2):183-93.

[Au et al, 2014] Au A, Baba AA, Azlan H, Norsa'adah B, Ankathil R. Clinical impact of ABCC1 and ABCC2 genotypes and haplotypes in mediating imatinib resistance among chronic myeloid leukaemia patients. *J Clin Pharm Ther.* 2014 Dec;39(6):685-90

[Bajor et al, 2009] Bajor J. Gastrointestinal stromal tumors in patients with type 1 neurofibromatosis. *Clin Exp Med J* 2009;3:247-254.

[Ball, 2004] Ball DW. Achaete-scute homolog-1 and Notch in lung neuroendocrine development and cancer. *Cancer Lett.* 2004 Feb 20;204(2):159-69.

[Bauer et al, 2007] Bauer S, Duensing A, Demetri GD, Fletcher JA. Oncogene. KIT oncogenic signaling mechanisms in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor: PI3-kinase/AKT is a crucial survival pathway. 2007 Nov 29;26:7560-8.

[Belinsky et al, 2015] Belinsky MG, Rink L, Cai KQ, Capuzzi SJ, Hoang Y, Chien J, et al. Somatic loss of function mutations in neurofibromin 1 and MYC associated factor X genes identified by exome-wide sequencing in a wild-type GIST case. *BMC Cancer* 2015;15:887.

[Bignell et al, 2004] Bignell GR, Huang J, Greshock J, et al. High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. *Genome Res* 2004;14:287-95.

[Boikos et al, 2016] Boikos SA, Pappo AS, Killian JK, LaQuaglia MP, Weldon CB, George S, Trent JC, von Mehren M, Wright JA, Schiffman JD, Raygada M, Pacak K, Meltzer PS, Miettinen MM, Stratakis C, Janeway KA, Helman LJ. Molecular Subtypes of KIT/PDGFR Wild-Type Gastrointestinal Stromal Tumors: A Report From the National Institutes of Health Gastrointestinal Stromal Tumor Clinic. *JAMA Oncol.* 2016 Jul 1;2(7):922-8.

[Bouchard et al, 2001] Bouchard C, Dittrich O, Kiermaier A, Dohmann K, Menkel A, Eilers M, et al. Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* 2001;15:2042-7.

[Brenca et al, 2015] Brenca M, Rossi S, Polano M, Gasparotto D, Zanatta L, Racanelli D, et al. Transcriptome sequencing identifies ETV6-NTRK3 as a gene fusion involved in GIST. *J Pathol* 2015;238:543-9.

[Chou et al, 2012] Chou A, Chen J, Clarkson A, Samra JS, Clifton-Bligh RJ, Hugh TJ, Gill AJ. Succinate dehydrogenase-deficient GISTs are characterized by IGF1R overexpression. *Mod Pathol* 2012, 25:1307–1313.

[Corless et al, 2005] Corless CL, Schroeder A, Griffith D, et al. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol* 2005;23: 5357-5364.

[Corless et al, 2008] Corless CL, Heinrich MC. 2008. Molecular pathobiology of gastrointestinal stromal sarcomas. *Annu Rev Pathol* 3:557-86.

[Corless et al, 2011] Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC. 2011. Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. *Nat Rev Cancer* 11(12):865-78.

[Corless et al, 2014] Corless CL, Ballman KV, Antonescu CR, Kolesnikova V, Maki RG, Pisters PW, Blackstein ME, Blanke CD, Demetri GD, Heinrich MC, von Mehren M, Patel S, McCarter MD, Owzar K, DeMatteo RP. Pathologic and molecular features correlate with long-term outcome after adjuvant therapy of resected primary GI stromal tumor: the ACOSOG Z9001 trial. *J Clin Oncol*. 2014 May 20;32(15):1563-70.

[De Matteo et al, 2000] DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* 2000;231:51-8.

[De Matteo et al, 2002] De Matteo RP, Heinrich MC, El-Rifai WM, et al. Clinical management of gastrointestinal stromal tumors: before and after STI-571. *Hum Pathol* 2002;33:466-77.

[De Matteo et al, 2007] De Matteo RP, Owzar K, Maki R, and the American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) Intergroup Adjuvant GIST Study Team. Adjuvant imatinib mesylate increases recurrence free survival (RFS) in patients with completely resected localized primary gastrointestinal stromal tumor (GIST): North American Intergroup Phase III trial ACOSOG Z9001. *J Clin Oncol* 2007; 25:10079

[Debiec-Rychter et al, 2004a] Debiec-Rychter M, Wasag B, Stul M, et al. Gastrointestinal stromal tumours (GISTs) negative for KIT (CD117 antigen) immunoreactivity. *J Pathol* 2004;202:430-8.

[Debiec-Rychter et al, 2004b] Debiec-Rychter M, Dumez H, Judson I, et al. Use of c-KIT/PDGFR α mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2004;40:689-695.

[Debiec-Rychter et al, 2006] Debiec-Rychter M, Sciot R, Le Cesne A, et al. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors. *Eur J Cancer* 2006; 42:1093-1103.

[Deeken et al, 2009] Deeken J. The Affymetrix DMET platform and pharmacogenetics in drug development. *Curr Opin Mol Ther.* 2009 Jun;11(3):260-8. Review.

[Demetri et al, 2002] Demetri GD, Von Mehren M, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002;347:472-480

[Demetri et al, 2006] Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib a randomised controlled trial. *Lancet* 2006;368:1329-1338.

[Demetri et al, 2013] Demetri GD, Reichardt P, Kang YK, Blay JY, Rutkowski P, Gelderblom H, Hohenberger P, Leahy M, von Mehren M, Joensuu H, Badalamenti G, Blackstein M, Le Cesne A, Schöffski P, Maki RG, Bauer S, Nguyen BB, Xu J, Nishida T, Chung J, Kappeler C, Kuss I, Laurent D, Casali PG; GRID study investigators. Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2013 Jan 26;381(9863):295-302.

[Di Battista et al, 2009] Di Battista M, Saponara M, Pantaleo MA, et al. Microscopic margins of resection in gastrointestinal stromal tumor (GIST): An analysis of 122 patients. *J Clin Oncol* 27:15s, 2009 (suppl; abstr 10554).

[Duensing et al, 2004] Duensing A, Medeiros F, McConarty B, et al. Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene* 2004;23:3999-4006.

[Edmonson et al, 2002] Edmonson JH, Marks RS, Buckner JC, et al. Contrast of response to dacarbazine, mitomycin, doxorubicin, and cisplatin (DMAP) plus GM-CSF between patients with advanced malignant gastrointestinal stromal tumors and patients with other advanced leiomyosarcomas. *Cancer Invest* 2002;20:605-12.

[Eisfeld et al, 2016] Eisfeld AK, Kohlschmidt J, Schwind S, Nicolet D, Blachly JS, Orwick S, Shah C, Bainazar M, Kroll KW, Walker CJ, Carroll AJ, Powell BL, Stone RM, Koltz JE, Baer MR, de la Chapelle A, Mrózek K, Byrd JC, Bloomfield CD. Mutations in the CCND1 and CCND2 genes are frequent events in adult patients with t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016 Nov 15

[Ernst et al, 1998] Ernst SI, Hubbs AE, Przygodzki RM, Emory TS, Sobin LH, O'Leary TJ. KIT mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Lab Invest* 1998;78:1633-6.

[Falchook et al, 2013] Falchook GS, Trent JC, Heinrich MC, Beadling C, Patterson J, Bastida CC, Blackman SC, Kurzrock R. BRAF mutant gastrointestinal stromal tumor: first report of regression with BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) and whole exomic sequencing for analysis of acquired resistance. *Oncotarget*. 2013 Feb;4(2):310-5.

[Fletcher et al, 2002] Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol*.2002;33:459-65.

[Fletcher et al, 2003] Fletcher JA, Corless CL, Dimitrijevic S, et al. Mechanisms of resistance to imatinib mesylate (IM) in advanced gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Proc ASCO* 2003;22: abs. 3275.

[Frattini et al, 2013] Frattini V, Trifonov V, Chan JM, Castano A, Lia M, Abate F, et al. The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma. *Nat Genet* 2013;45:1141-9.

[Futreal et al, 2004] Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2004;4:177-83.

[Gaal et al, 2011] Gaal J, Stratakis CA, Carney JA, Ball ER, Korpershoek E, Lodish MB, Levy I, Xekouki P, van Nederveen FH, den Bakker MA, O'Sullivan M, Dinjens WN, de Krijger RR.

SDHB immunohistochemistry: a useful tool in the diagnosis of Carney-Stratakis and Carney triad gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol.* 2011 Jan;24(1):147-51.

[Gasparotto et al, 2017] Gasparotto D, Rossi S, Polano M, Tamborini E, Lorenzetto E, Sbaraglia M, Mondello A, Massani M, Lamon S, Bracci R, Mandolesi A, Frate E, Stanzial F, Agaj J, Mazzoleni G, Pilotti S, Gronchi A, Dei Tos AP, Maestro R. Quadruple-Negative GIST Is a Sentinel for Unrecognized Neurofibromatosis Type 1 Syndrome. *Clin Cancer Res.* 2017 Jan 1;23(1):273-282.

[George et al, 2009] George S, Blay JY, Casali PG, et al. Clinical evaluation of continuous daily dosing of sunitinib malate in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after imatinib failure. *Eur J Cancer* 2009;45:1959-68.

[George et al, 2012] George S, Wang Q, Heinrich MC, et al. Efficacy and Safety of Regorafenib in Patients With Metastatic and/or Unresectable GI Stromal Tumor After Failure of Imatinib and Sunitinib: A Multicenter Phase II Trial. *J Clin Oncol* 2012;30:2401-7.

[Gill et al, 2010] Gill AJ, Chou A, Vilain R, Clarkson A, Lui M, Jin R, Tobias V, Samra J, Goldstein D, Smith C, Sioson L, Parker N, Smith RC, Sywak M, Sidhu SB, Wyatt JM, Robinson BG, Eckstein RP, Benn DE, Clifton-Bligh RJ. Immunohistochemistry for SDHB divides gastrointestinal stromal tumors (GISTs) into 2 distinct types. *Am J Surg Pathol.* 2010 May;34(5):636-44.

[Giusti et al, 2015] Giusti F, Marini F, Brandi ML. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. 2005 Aug 31 updated 2015 Feb 12]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Fong CT, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews® Internet*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016.

[Golub et al, 1999] Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-7.

[Gonzalez-Perez et al, 2013] Gonzalez-Perez A, Jene-Sanz A, Lopez-Bigas N. The mutational landscape of chromatin regulatory factors across 4,623 tumor samples. *Genome Biol* 2013;14:r106

[Gramza et al, 2009] Gramza AW, Corless CL, Heinrich MC. Resistance to Tyrosine Kinase

Inhibitors in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin Cancer Res* 2009;15:7510-7518

[Haller et al, 2014] Haller F, Moskalev EA, Faucz FR, Barthelmeß S, Wiemann S, Bieg M, et al. Aberrant DNA hypermethylation of SDHC: a novel mechanism of tumor development in Carney triad. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21:567-77

[Hanahan et al, 2000] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.

[Heinemann et al, 2014] Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran SE, Heintges T, Lerchenmüller C, Kahl C, Seipelt G, Kullmann F, Stauch M, Scheithauer W, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014; 15: 1065-1075.

[Heinrich et al, 2002] Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, Fletcher JA. Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum Pathol* 2002;33:484-95.

[Heinrich et al, 2003a] Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003;299:708-10.

[Heinrich et al, 2003b] Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2003;21:4342-4349.

[Heinrich et al, 2006] Heinrich MC, Corless CL, Blanke CD, et al. Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2006;24:4764-4774.

[Heinrich et al, 2008a] Heinrich MC, Owzar K, Corless CL, et al. 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* 2008;26:5360-7.

[Heinrich et al, 2008b] Heinrich MC, Maki RG, Corless CL, Antonescu CR, Harlow A, Griffith D et al. Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of

sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2008;26:5352–9.

Heinrich et al, 2012] Heinrich MC, Griffith D, McKinley A, Patterson J, Presnell A, Ramachandran A, Debiec-Rychter M. Crenolanib inhibits the drug-resistant PDGFRA D842V mutation associated with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res*. 2012 Aug 15;18(16):4375-84.

[Heinrich et al, 2016] Heinrich MC, Kang G, Warrick A, Corless CL, Beadling C. Oncogenic receptor tyrosine kinase (RTK) translocations in a subset of quadruple wild-type gastrointestinal stromal tumors (GIST). *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl; abstr 11012).

[Hirota et al, 2003] Hirota S, Ohashi A, Nishida T, et al. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 2003;125:660-7

[Huang et al, 1990] Huang E, Nocka K, Beier DR, et al. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* 1990;63:225-33.

[Hyun JK et al, 2005] Hyun JK, Suk Woo N, Hyunki K, Hwanseok R, Nam-Gyun K, Haeryoung K, Woo JH, Sung HN, Joo-Hang K, Chae-Ok Y, Edison TL, Hoguen K Correlation of KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gene activation and expression profiles in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* (2005) 24, 1066–1074.

[Jagani et al, 2010] Jagani Z, Mora-Blanco EL, Sansam CG, McKenna ES, Wilson B, Chen D, Klekota J, Tamayo P, Nguyen PT, Tolstorukov M, Park PJ, Cho YJ, Hsiao K, Buonamici S, Pomeroy SL, Mesirov JP, Ruffner H, Bouwmeester T, Luchansky SJ, Murtie J, Kelleher JF, Warmuth M, Sellers WR, Roberts CW, Dorsch M. Loss of the tumor suppressor Snf5 leads to aberrant activation of the Hedgehog-Gli pathway. *Nat Med*. 2010 Dec;16:1429-33.

[Janeway et al, 2009] Janeway KA, Pappo AS. Pediatric gastrointestinal stromal tumor. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23:15-34.

[Janeway et al, 2011] Janeway KA, Kim SY, Lodish M, et al. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*

2011; 108: 314-318.

[Joensuu et al, 2001] Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 2001;344:1052-6.

[Joensuu et al, 2012a] Joensuu H, Eriksson M, Sundby Hall K, et al. One vs three years of adjuvant imatinib for operable gastrointestinal stromal tumor: a randomized trial. *JAMA* 2012;307:1265-72.

[Joensuu et al, 2012b] Joensuu H, Vehtari A, Riihimäki J, et al. Risk of recurrence of gastrointestinal stromal tumour after surgery: an analysis of pooled population-based cohorts. *Lancet Oncol* 2012;13:265-74.

[Joensuu et al, 2015] Joensuu H, Rutkowski P, Nishida T, Steigen SE, Brabec P, Plank L, Nilsson B, Braconi C, Bordoni A, Magnusson MK, Sufliarsky J, Federico M, Jonasson JG, Hostein I, Bringuier PP, Emile JF. KIT and PDGFRA mutations and the risk of GI stromal tumor recurrence. *J Clin Oncol*. 2015 Feb 20;33(6):634-42.

[Killian et al, 2013] Killian JK, Kim SY, Miettinen M, Smith C, Merino M, Tsokos M, et al. Succinate dehydrogenase mutation underlies global epigenomic divergence in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Discov*. 2013;3:648-57.

[Kim et al, 2011a] Kim EJ, Zalupski MM. 2011. Systemic therapy for advanced gastrointestinal stromal tumors: beyond imatinib. *J Surg Oncol* 104(8):901-6

[Kim et al, 2011b] Kim MS, Chung NG, Kang MR, Yoo NJ, Lee SH. Genetic and expressional alterations of CHD genes in gastric and colorectal cancers. *Histopathology* 2011;58:660-668.

[Kim et al, 2014] Kim KH, Roberts CW. Mechanisms by which SMARCB1 loss drives rhabdoid tumor growth. *Cancer Genet*. 2014 Sep;207:365-72.

[La Rosa et al, 2013] La Rosa S, Marando A, Gatti G, Rapa I, Volante M, Papotti M, Sessa F, Capella C. Achaete-scute homolog 1 as a marker of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of different sites: a validation study using immunohistochemistry and quantitative

real-time polymerase chain reaction on 335 cases. *Hum Pathol.* 2013 Jul;44(7):1391-9. doi: 10.1016/j.humpath.2012.11.013.

[Lasota et al, 2004] Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, Miettinen M. A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab Invest* 2004;84:874-83.

[Lasota et al, 2008] Lasota J, Corless CL, Heinrich MC, et al. Clinicopathologic profile of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with primary KIT exon 13 or exon 17 mutations: a multicenter study on 54 cases. *Mod Pathol* 2008;21:476-84.

[Lasota et al, 2013] Lasota J, Wang Z, Kim SY, Helman L, Miettinen M: Expression of the receptor for type I insulin-like growth factor (IGF1R) in gastrointestinal stromal tumors: an immunohistochemical study of 1078 cases with diagnostic and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 2013, 37:114–119

[Le Cesne et al, 2010] Le Cesne A, Ray-Coquard I, Bui BN, et al; French Sarcoma Group. Discontinuation of imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours after 3 years of treatment: an open-label multicentre randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:942-9

[Ledergerber et al, 2011] Ledergerber C and Dessimoz C. Base-calling for next-generation sequencing platforms. *Brief Bioinform.* 2011 Sep;12(5):489-97.

[Li et al, 2015] Li J, Dang Y, Gao J, Li Y, Zou J, Shen L. PI3K/AKT/ mTOR pathway is activated after imatinib secondary resistance in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Med Oncol.* 2015; 32: 111

[Lorincz et al 2008] Lorincz A, Redelman D, Horváth VJ, Bardsley MR, Chen H, Ordög T. Progenitors of interstitial cells of cajal in the postnatal murine stomach. *Gastroenterology* 2008;134:1083-93.

[Manley et al, 2002] Manley PW, Cowan-Jacob SW, Buchdunger E, et al. imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. *Eur J Cancer* 2002;38(Suppl 5):S19-27.

[Mardis et al, 2011] Mardis ER. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 2011;470:198-203.

[Martin et al, 2005] Martín J, Poveda A, Llombart-Bosch A, , et al. Deletions affecting codons 557–558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J Clin Oncol* 2005;23:6190-8.

[McCarter et al, 2012] McCarter MD, Antonescu CR, Ballman KV, et al. Microscopically positive margins for primary gastrointestinal stromal tumors: analysis of risk factors and tumor recurrence. *J Am Coll Surg* 2012;215:53-9.

[Mendel et al, 2003] Mendel DB, Laird AD, Xin X, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003; 9:327-37

[Metzker et al, 2010] Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):31-46.

[Micci et al, 2014] Micci F, Gorunova L, Gatus S, Matias-Guiu X, Davidson B, Heim S, Panagopoulos I. MEAF6/PHF1 is a recurrent gene fusion in endometrial stromal sarcoma. *Cancer Lett.* 2014 May 28;347(1):75-8

[Miettinen et al, 2003] Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): definition, occurrence, pathology, differential diagnosis and molecular genetics. *Pol J Pathol* 2003;54:3-24.

[Miettinen et al, 2005] Miettinen M, Lasota J, Sobin LH. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach in children and young adults: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases with long-term follow-up and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1373–1381.

[Miettinen et al, 2006] Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* 2006;23:70-83.

[Miettinen et al, 2009] Miettinen M, Wang ZF, Lasota J. DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases. *Am J Surg Pathol* 2009;33:1401-8.

[Miettinen et al, 2011] Miettinen M, Wang ZF, Sarlomo-Rikala M, Osuch C, Rutkowski P, Lasota J. Succinate dehydrogenase-deficient GISTs: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 66 gastric GISTs with predilection to young age. *Am J Surg Pathol* 2011;35:1712-21.

[Millar et al, 2010] Millar RP, Newton CL. The year in G protein-coupled receptor research. *Mol Endocrinol*. 2010 Jan;24(1):261-74. doi: 10.1210/me.2009-0473. Epub 2009 Dec 17.

[Minetti et al, 2016] Minetti M, Grossman A. Somatic and germline mutations in NETs: Implications for their diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2016;30:115-27.

[Mir et al, 2016] Mir O, Cropet C, Toulmonde M, Cesne AL, Molimard M, Bompas E, Cassier P, Ray-Coquard I, Rios M, Adenis A, Italiano A, Bouché O, Chauzit E, Duffaud F, Bertucci F, Isambert N, Gautier J, Blay JY, Pérol D; PAZOGIST study group of the French Sarcoma Groupe-Groupe d'Etude des Tumeurs Osseuses (GSF-GETO). Pazopanib plus best supportive care versus best supportive care alone in advanced gastrointestinal stromal tumours resistant to imatinib and sunitinib (PAZOGIST): a randomised, multicentre, open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016 May;17(5):632-41. doi: 10.1016/S1470-2045(16)00075-9.

[Monaco et al, 1985] Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldridge J, Fischbeck KH, Bartlett R, Pericak-Vance MA, Roses AD, Kunkel LM. Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature*. 1985 Aug 29-Sep 4;316(6031):842-5.

[Nannini et al, 2013] Nannini M, Astolfi A, Paterini P, Urbini M, Santini D, Catena F, Indio V, Casadio R, Pinna AD, Biasco G, Pantaleo MA. Expression of IGF-1 receptor in KIT/PDGF receptor- α wild-type gastrointestinal stromal tumors with succinate dehydrogenase complex dysfunction. *Future Oncol*. 2013 Jan;9(1):121-6.

[Nannini et al, 2014] Nannini M, Astolfi A, Urbini M, Indio V, Santini D, Heinrich MC, Corless

CL, Ceccarelli C, Saponara M, Mandrioli A, Lolli C, Ercolani G, Brandi G, Biasco G, Pantaleo MA. Integrated genomic study of quadruple-WT GIST (KIT/PDGFR α /SDH/RAS pathway wild-type GIST). *BMC Cancer*. 2014 Sep 20;14:685.

[Nopparat et al, 2015] Nopparat J, Zhang J, Lu JP, Chen YH, Zheng D, Neuffer PD, et al. δ -Catenin, a Wnt/ β -catenin modulator, reveals inducible mutagenesis promoting cancer cell survival adaptation and metabolic reprogramming. *Oncogene* 2015;34:1542-52.

[O'Brien et al, 2013] O'Brien KM, Orlow I, Antonescu CR, Ballman K, McCall L, DeMatteo R, Engel LS. Gastrointestinal stromal tumors, somatic mutations and candidate genetic risk variants. *PLoS One*. 2013 Apr 18;8(4):e62119.

[Pantaleo et al, 2011a] Pantaleo MA, Astolfi A, Nannini M, Ceccarelli C, Formica S, Santini D, Heinrich MC, Corless C, Dei Tos AP, Paterini P, Catena F, Maleddu A, Saponara M, Di Battista M, Biasco G: Differential expression of neural markers in KIT and PDGFR α wild-type gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2011, 59:1071–1080

[Pantaleo et al, 2011b] Pantaleo MA, Astolfi A, Indio V, Moore R, Thiessen N, Heinrich MC, Gnocchi C, Santini D, Catena F, Formica S, Martelli PL, Casadio R, Pession A, Biasco G. SDHA loss-of-function mutations in KIT-PDGFR α wild-type gastrointestinal stromal tumors identified by massively parallel sequencing. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Jun 22;103(12):983-7.

[Pantaleo et al, 2014] Pantaleo MA, Astolfi A, Urbini M, Nannini M, Paterini P, Indio V, Saponara M, Formica S, Ceccarelli C, Casadio R, Rossi G, Bertolini F, Santini D, Pirini MG, Fiorentino M, Basso U, Biasco G; GIST Study Group. Analysis of all subunits, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, of the succinate dehydrogenase complex in KIT/PDGFR α wild-type GIST. *Eur J Hum Genet*. 2014 Jan;22(1):32-9.

[Pantaleo et al, 2015a] Pantaleo MA, Lolli C, Nannini M, Astolfi A, Indio V, Saponara M, Urbini M, La Rovere S, Gill A, Goldstein D, Ceccarelli C, Santini D, Rossi G, Fiorentino M, Di Scioscio V, Fusaroli P, Mandrioli A, Gatto L, Catena F, Basso U, Ercolani G, Pinna AD, Biasco G. Good survival outcome of metastatic SDH-deficient gastrointestinal stromal tumors harboring SDHA mutations. *Genet Med*. 2015 May;17(5):391-5. doi: 10.1038/gim.2014.115. Epub 2014 Sep 4.

[Pantaleo et al, 2015b] Pantaleo MA, Nannini M, Corless CL, Heinrich MC. Quadruple wild-type

(WT) GIST: defining the subset of GIST that lacks abnormalities of KIT, PDGFRA, SDH, or RAS signaling pathways. *Cancer Med.* 2015 Jan;4(1):101-3.

[Pasini et al; 2008] Pasini B, McWhinney SR, Bei T, Matyakhina L, Stergiopoulos S, Muchow M, Boikos SA, Ferrando B, Pacak K, Assie G, Baudin E, Chompret A, Ellison JW, Briere JJ, Rustin P, Gimenez-Roqueplo AP, Eng C, Carney JA, Stratakis CA. Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD. *Eur J Hum Genet.* 2008 Jan;16(1):79-88.

[Pelczar et al, 2013] Pelczar P, Zibat A, van Dop WA, Heijmans J, Bleckmann A, Gruber W, Nitzki F, Uhmann A, Guijarro MV, Hernando E, Dittmann K, Wienands J, Dressel R, Wojnowski L, Binder C, Taguchi T, Beissbarth T, Hogendoorn PC, Antonescu CR, Rubin BP, Schulz-Schaeffer W, Aberger F, van den Brink GR, Hahn H. Inactivation of Patched1 in mice leads to development of gastrointestinal stromal-like tumors that express *Pdgfra* but not *kit*. *Gastroenterology.* 2013 Jan;144:134-144.e6

[Quattrone et al, 2014] Quattrone A, Wozniak A, Dewaele B, Floris G, Vanspauwen V, Van Looy T, Schöffski P, Rutkowski P, Sciot R, Debiec-Rychter M. Frequent mono-allelic loss associated with deficient PTEN expression in imatinibresistant gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol.* 2014; 27: 1510-1520.

[Ravegnini et al, 2016] Ravegnini G, Nannini M, Simeon V, Musti M, Sammarini G, Saponara M, Gatto L, Urbini M, Astolfi A, Biasco G, Pantaleo MA, Venturoli N, Hrelia P, Angelini S. Polymorphisms in DNA repair genes in gastrointestinal stromal tumours: susceptibility and correlation with tumour characteristics and clinical outcome. *Tumour Biol.* 2016 Oct;37(10):13413-13423.

[Roberts et al, 2000] Roberts CW, Galusha SA, McMenamin ME, Fletcher CD, Orkin SH. Haploinsufficiency of *Snf5* (integrase interactor 1) predisposes to malignant rhabdoid tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 5;97:13796-800.

[Rubin et al, 2007] Rubin BP, Heinrich MC, Corless CL. Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet.* 2007 May 19;369(9574):1731-41.

[Rubin et al, 2005] Rubin BP, Antonescu CR, Scott-Browne JP, et al. A knock-in mouse model of gastrointestinal stromal tumor harboring kit K641E. *Cancer Res* 2005;65:6631-9.

[Sanger et al, 1977] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-7.

[Schneider-Stock et al, 2003] Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Miettinen M, Peters B, Pross M, Roessner A, Günther T. High prognostic value of p16INK4 alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 1688-1697.

[Schöffski et al, 2010] Schöffski P, Reichardt P, Blay JY, Dumez H, Morgan JA, Ray-Coquard I, Hollaender N, Jappe A, Demetri GD. A phase I-II study of everolimus (RAD001) in combination with imatinib in patients with imatinibresistant gastrointestinal stromal tumors. *Ann Oncol.* 2010 Oct;21:1990-8.

[Shi et al, 2016] Shi E, Chmielecki J, Tang CM, Wang K, Heinrich MC, Kang G, Corless CL, Hong D, Fero KE, Murphy JD, Fanta PT, Ali SM, De Siena M, Burgoyne AM, Movva S, Madlensky L, Heestand GM, Trent JC, Kurzrock R, Morosini D, Ross JS, Harismendy O, Sicklick JK. FGFR1 and NTRK3 actionable alterations in "Wild-Type" gastrointestinal stromal tumors. *J Transl Med.* 2016 Dec 14;14(1):339.

[Sicar et al, 1999] Sircar K, Hewlett BR, Huizinga JD, et al. Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 1999;23:377-89.

[Singer et al, 2002] Singer S, Rubin BP, Lux ML, et al. Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2002;20:3898-905.

[Sommer et al, 2003] Sommer G, Agosti V, Ehlers I, et al. Gastrointestinal stromal tumors in a mouse model by targeted mutation of the Kit receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6706-11.

[Stratakis et al, 2009] Stratakis CA, Carney JA. The triad of paragangliomas, gastric stromal tumors and pulmonary chondromas (Carney triad), and the dyad of paragangliomas and gastric stromal sarcomas (Carney-Stratakis syndrome): a molecular genetics and clinical implications. *J*

Internal Med. 2009;266:43-52.

[Subramanian et al, 2004] Subramanian S, West RB, Corless CL, Ou W, Rubin BP, Chu KM, Leung SY, Yuen ST, Zhu S, Hernandez-Boussard T, Montgomery K, Nielsen TO, Patel RM, Goldblum JR, Heinrich MC, Fletcher JA, van de Rijn M. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with KIT and PDGFRA mutations have distinct gene expression profiles. *Oncogene*. 2004 Oct 14;23(47):7780-90.

[Tang et al, 2015] Tang CM, Lee TE, Syed SA, Burgoyne AM, Leonard SY, Gao F, Chan JC, Shi E, Chmielecki J, Morosini D, Wang K, Ross JS, Kendrick ML, Bardsley MR, De Siena M, Mao J, Harismendy O, Ordog T, Sicklick JK. Hedgehog pathway dysregulation contributes to the pathogenesis of human gastrointestinal stromal tumors via GLI-mediated activation of KIT expression. *Oncotarget*. 2016 Oct 25

[Taniguchi et al, 1999] Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, et al. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 1999;59:4297-300.

[van Oosterom et al, 2001] van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, et al. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* 2001;358:1421-3.

[Versteeg et al, 1998] Versteeg I, Sévenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, Aurias A, Delattre O. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature*. 1998 Jul 9;394:203-6.

[Verweij et al, 2004] Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet* 2004;364:1127-34.

[Wang et al, 2011a] Wang JH, Lasota J, Miettinen M. Succinate Dehydrogenase Subunit B (SDHB) Is Expressed in Neurofibromatosis 1-Associated Gastrointestinal Stromal Tumors (Gists): Implications for the SDHB Expression Based Classification of Gists. *J Cancer*. 2011 Feb 16;2:90-3.

[Wang et al, 2011b] Wang WL, Conley A, Reynoso D, Nolden L, Lazar AJ, George S, Trent JC.

2011b. Mechanisms of resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Chemother Pharmacol* 67 Suppl 1:S15-24

[Wang et al, 2014] Wang Y, Marino-Enriquez A, Bennett RR, Zhu M, Shen Y, Eilers G, Lee JC, Henze J, Fletcher BS, Gu Z, Fox EA, Antonescu CR, Fletcher CD, et al. Dystrophin is a tumor suppressor in human cancers with myogenic programs. *Nat Genet.* 2014; 46: 601-606.

[Wasag et al, 2004] Wasag B, Debiec-Rychter M, Pauwels P, et al Differential expression of KIT/PDGFR α mutant isoforms in epithelioid and mixed variants of gastrointestinal stromal tumors depends predominantly on the tumor site. *Mod Pathol* 2004;17:889-94.

[Wilhelm et al, 2011] Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, et al. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer* 2011;129:245-55.

[Wu et al, 2014] Wu RC, Wang TL, Shih IeM. The emerging roles of ARID1A in tumor suppression. *Cancer Biol Ther.* 2014 Jun 1;15:655-64.

[Yang et al, 2013] Yang YJ, Song TY, Park J, Lee J, Lim J, Jang H, et al. Menin mediates epigenetic regulation via histone H3 lysine 9 methylation. *Cell Death Dis* 2013;4:e583.

[Zhang et al, 2010] Zhang Y, Cao H, Wang M, Zhao WY, Shen ZY, Shen DP, Ni XZ, Wu ZY, Shen YY, Song YY. Loss of chromosome 9p21 and decreased p16 expression correlate with malignant gastrointestinal stromal tumor. *World J Gastroenterol.* 2010; 16: 4716-4724. 38.

[Zhou et al, 2011] Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, Zhang S, Wang J, Zhou S, Ren S, Lu S, Zhang L, Hu C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-smallcell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2011; 12: 735-742.

[Zong et al, 2012] Zong L, Chen P, Xu Y. Correlation between P53 expression and malignant risk of gastrointestinal stromal tumors: evidence from 9 studies. *Eur J Surg Oncol* 2012;38:189-95.

12. PUBBLICAZIONI INERENTI IL PROGETTO DI DOTTORATO

- I. Nannini M, Astolfi A, **Urbini M**, Indio V, Santini D, Heinrich MC, Corless CL, Ceccarelli C, Saponara M, Mandrioli A, Lolli C, Ercolani G, Brandi G, Biasco G, Pantaleo MA. *Integrated genomic study of quadruple-WT GIST (KIT/PDGFR α /SDH/RAS pathway wild-type GIST)*. BMC Cancer. 2014 Sep 20;14:685.
- II. Saponara M*, **Urbini M***, Astolfi A, Indio V, Ercolani G, Del Gaudio M, Santini D, Pirini MG, Fiorentino M, Nannini M, Lolli C, Mandrioli A, Gatto L, Brandi G, Biasco G, Pinna AD, Pantaleo MA. *Molecular characterization of metastatic exon 11 mutant gastrointestinal stromal tumors (GIST) beyond KIT/PDGFR α genotype evaluated by Next Generation Sequencing (NGS)*. Oncotarget Oncotarget. 2015 Dec 8;6(39):42243-57.
*co-authorship
- III. Pantaleo MA, Astolfi A, **Urbini M**, Fuligni F, Saponara M, Nannini M, Lolli C, Indio V, Santini D, Ercolani G, Brandi G, Pinna AD, Biasco G. *Dystrophin deregulation is associated with tumor progression in KIT/PDGFR α mutant gastrointestinal stromal tumors*. Clin Sarcoma Res. 2014 Aug 9;4:9.
- IV. Ravegnini G, **Urbini M**, Genovese C, Simeon V, Astolfi A, Nannini M, Gatto L, Saponara M, Ianni M, Indio V, Brandi G, Trino S, Hrelia P, Biasco G, Angelini S*, Pantaleo MA*. *Identification of a genetic signature associated with imatinib response in gastrointestinal stromal tumor by DMET array*. Articolo in revisione a Frontiers in Pharmacology
- V. Indio V, Patterson J, Della Valle I, Astolfi A, **Urbini M**, Castellani G, Remondini D, Santini D, Nannini M, Saponara M, Gatto L, Fiorentino M, Biasco G, Heinrich MC, Pantaleo MA. *Wide molecular characterization of PDGFR α D842V mutant gastrointestinal stromal tumors (GIST) evaluated by whole genome sequencing*. Articolo in stesura
- VI. **Urbini M**, Astolfi A, Indio V, Heinrich MC, Corless CL, Nannini M, Ravegnini G, Biasco G, Pantaleo MA. *SDHC methylation in gastrointestinal stromal tumors (GIST): a case report*. BMC Med Genet. 2015 Sep 28;16(1):87.

- VII. Pantaleo MA, Urbini M, Indio V, Ravegnini G, Nannini M, De Luca M, Tarantino G, Angelini S, Gronchi A, Vincenzi B, Grignani G, Colombo C, Fumagalli E, Gatto L, Saponara M, Ianni M, Paterini P, Santini D, Pirini MG, Ceccarelli C, Altimari A, Gruppioni E, Renne SL, Collini P, Stacchiotti S, Brandi G, Casali PG, Pinna AD, Astolfi A, Biasco G. *Genome-wide Analyses Identifies MEN1 and MAX Mutations and a Neuroendocrine-like Molecular Heterogeneity in Quadruple WT GIST*. Mol Cancer Res. 2017 Jan 27. Epub ahead of print.

13. PUBBLICAZIONI DURANTE IL PERIODO DI DOTTORATO NON INERENTI AL PROGETTO

- I. Ravegnini G, Nannini M, Zenesini C, Simeon V, Sammarini G, **Urbini M**, Gatto L, Saponara M, Biasco G, Pantaleo MA, Venturoli N, Hrelia P, Angelini S. *An exploratory association of polymorphisms in angiogenesis-related genes with susceptibility, clinical response and toxicity in gastrointestinal stromal tumors receiving sunitinib after imatinib failure*. *Angiogenesis*. 2016 Nov 28. Epub ahead of print.
- II. Pantaleo MA, Ravegnini G, Astolfi A, Simeon V, Nannini M, Saponara M, **Urbini M**, Gatto L, Indio V, Sammarini G, Santini D, Ferracin M, Negrini M, Hrelia P, Biasco G, Angelini S. *Integrating miRNA and gene expression profiling analysis revealed regulatory networks in gastrointestinal stromal tumors*. *Epigenomics*. 2016 Oct;8(10):1347-1366.
- III. Ravegnini G, Nannini M, Simeon V, Musti M, Sammarini G, Saponara M, Gatto L, **Urbini M**, Astolfi A, Biasco G, Pantaleo MA, Venturoli N, Hrelia P, Angelini S. *Polymorphisms in DNA repair genes in gastrointestinal stromal tumours: susceptibility and correlation with tumour characteristics and clinical outcome*. *Tumour Biol*. 2016 Jul 27
- IV. Stacchiotti S, Astolfi A, Gronchi A, Fontana A, Pantaleo MA, Negri T, Brenca M, Tazzari M, **Urbini M**, Indio V, Colombo C, Radaelli S, Brich S, Dei Tos AP, Casali PG, Castelli C, Dagrada GP, Pilotti S, Maestro R. *Evolution of Dermatofibrosarcoma Protuberans to DFSP-Derived Fibrosarcoma: An Event Marked by Epithelial-Mesenchymal Transition-like Process and 22q Loss*. *Mol Cancer Res*. 2016 Sep;14(9):820-9
- V. Astolfi A; **Urbini M**; Indio V; Nannini M; Genovese CG; Santini D; Saponara M; Mandrioli A; Ercolani G; Brandi G; Biasco G; Pantaleo MA. *Whole exome sequencing (WES) on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue in gastrointestinal stromal tumors (GIST)*. *BMC Genomics* 2015 Nov 3;16:892.
- VI. Astolfi A, Melchionda F, Perotti D, Fois M, Indio V, **Urbini M**, Genovese CG, Collini P, Salfi N, Nantron M, D'Angelo P, Spreafico F, Pession A. *Whole transcriptome sequencing identifies BCOR internal tandem duplication as a common feature of clear cell sarcoma of the kidney*. *Oncotarget*. 2015 Dec 1;6(38):40934-9.

- VII. Stacchiotti S, Pantaleo MA, Negri T, Astolfi A, Tazzari M, Dagrada GP, **Urbini M**, Indio V, Maestro R, Gronchi A, Fiore M, Dei Tos AP, Conca E, Palassini E, Vincenzi B, Grosso F, Pilotti S, Castelli C, Casali PG. *Efficacy and Biological Activity of Imatinib in Metastatic Dermatofibrosarcoma Protuberans (DFSP)*. Clin Cancer Res. 2016 Feb 15;22(4):837-46
- VIII. Pantaleo MA, Lolli C, Nannini M, Astolfi A, Indio V, Saponara M, **Urbini M**, La Rovere S, Gill A, Goldstein D, Ceccarelli C, Santini D, Rossi G, Fiorentino M, Di Scioscio V, Fusaroli P, Mandrioli A, Gatto L, Catena F, Basso U, Ercolani G, Pinna AD, Biasco G. *Good survival outcome of metastatic SDH-deficient gastrointestinal stromal tumors harboring SDHA mutations*. Genet Med. 2015 May;17(5):391-5.
- IX. Nannini M, Astolfi A, **Urbini M**, Biasco G, Pantaleo MA. *Liquid biopsy in gastrointestinal stromal tumors: a novel approach*. J Transl Med. 2014 Aug 14;12:210.
- X. Nannini M, Biasco G, Astolfi A, **Urbini M**, Pantaleo MA. *Insulin-like Growth Factor (IGF) system and gastrointestinal stromal tumours (GIST): present and future*. Histol Histopathol. 2014 Feb;29(2):167-75.
- XI. Pantaleo MA, Astolfi A, **Urbini M**, Nannini M, Paterini P, Indio V, Saponara M, Formica S, Ceccarelli C, Casadio R, Rossi G, Bertolini F, Santini D, Pirini MG, Fiorentino M, Basso U, Biasco G; GIST Study Group. *Analysis of all subunits, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, of the succinate dehydrogenase complex in KIT/PDGFR α wild-type GIST*. Eur J Hum Genet. 2014 Jan;22(1):32-9.