

**Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni**

**Šiklův ústav patologie LF a FN v Plzni**



## **Vzácné nádory trávicího traktu**

**Rare tumors of gastrointestinal tract**

**MUDr. Magdaléna Dubová**

**Doktorská dizertační práce**

Plzeň 2017

Obor: Patologie

Školitel: Doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.

## **Předmluva**

Předkládaná doktorská dizertační práce je rozdělena do dvou částí. První část je věnována obecné problematice vzácných nádorů trávicího traktu se zvláštním přihlédnutím ke gastrointestinálnímu stromálnímu tumoru.

Ve druhé části jsou shrnuty cíle a výsledky práce v podobě pěti komentovaných článků, na kterých se autorka podílela a jejichž plné znění je součástí dizertační práce. Ve třech případech se jedná o články publikované v zahraničních periodících s impact factorem, čtvrtý příspěvek byla přijat k tisku v tuzemském recenzovaném časopisu. Poslední práce zařazená do obsahu nebyla v době psaní doktorské dizertační práce dosud publikována.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité zdroje a literaturu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze své práce v databázi UK LF Plzeň a s možností zapůjčení tištěné verze této práce.

V Plzni

MUDr. Magdaléna Dubová

## **Abstrakt**

Nádory trávicího traktu zaujímají v celosvětové incidenci přední postavení. Z epidemiologického hlediska se jedná především o adenokarcinomy. Neepitelové nádory naproti tomu představují minoritní skupinu, která je klinicky neméně významná, avšak detailní informace o jednotlivých nádorech jsou vzhledem k jejich nízkému zastoupení v populaci často insuficientní.

Tato skupina je reprezentována zejména mezenchymálními neopláziemi, z nichž nejčastější a nejvýznamnější jednotkou je gastrointestinální stromální tumor (GIST). Díky současným diagnostickým možnostem bylo zjištěno, že v patogenezi tohoto nádoru hraje roli celá řada genů. Na základě těchto poznatků lze GIST rozdělit do několika genetických variant, které se liší svojí prezentací i odpovědí na léčbu. Diferenciálně diagnosticky je důležité odlišit od sebe tyto jednotlivé varianty, ale i nádory, které morfoloicky či imunohistochemicky GIST připomínají. Molekulární genetika hraje často v těchto diagnosticky nejasných případech zásadní roli a kromě určení správné diagnózy jsou její výsledky podkladem k indikaci specifické terapie.

## **Summary**

Tumors of digestive tract hold a leading position in the global incidence. From the epidemiological point of view, these are predominantly adenocarcinomas. On the other hand, nonepithelial tumors represent a minority group that is equally clinically important, but detailed information on individual tumors is often insufficient due to their low prevalence.

This group is mainly represented by mesenchymal tumors, of which the most common and most important is the gastrointestinal stromal tumor (GIST). Thanks to the current diagnostic methods it has been found that plenty of genes play a role in the pathogenesis of this tumor. On the basis of these findings, GIST may be divided into several genetic variants which differ in their clinical presentation and response to treatment. The aim of differential diagnosis is to distinguish these individual variants from each other, as well as from tumors resembling GIST morphologically or immunohistochemically. Genetic investigation plays often crucial role in such diagnostically unclear cases. Besides being essential to reach precise diagnosis, the results of molecular genetic investigation significantly influence the choice of treatment.

# Obsah doktorské disertační práce

ABSTRAKT .....	3
ABECEDNÍ SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	6
1. ÚVOD .....	8
1.1 Gastrointestinální stromální tumor (GIST) – současné poznatky .....	8
1.1.1 Molekulárně genetická klasifikace GISTu .....	14
1.1.2 Diferenciální diagnostika GISTu .....	26
2. CÍLE PRÁCE A PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY .....	37
2.1 Daum O., Sedivcova M., Dubova M., Michal M. (2012): KIT mutations and sequence changes in genes encoding SDH complex possibly need not be mutually exclusive in gastrointestinal stromal tumors. ....	37
2.2 Dubova M., Sedivcova M., Michal M., Kokoskova B., Ryska A., Smid D., Daum O. (2015): Utility of immunohistochemical investigation of SDHB and molecular genetic analysis of SDH genes in the differential diagnosis of mesenchymal tumors of GIT. ....	41
2.3 Dubova M, Sedivcova M., Saskova B., Hadravská S., Daum O. (2016): Nonsyndromic Intestinal Lipomas are Probably not Associated With Mutations of PDGFRA. ....	53
2.4 Dubová M., Daum O., Salajka P., Fabián P., Babánková I., Švajdler M. (2017): Jaká je Vaše diagnóza? DOG1 imunoexpres v měkkotkáňových nádorech. ....	58
2.5 M. Dubova, M. Svajdler, P. Fabian, L. Kren, I. Babankova, M. Jezova, J. Stehlik, M. Michal, O. Daum. (2017): Distribution of <i>SDHC</i> methylation in neoplastic and non-neoplastic tissue in patients with Carney triad. ....	64
3. ZÁVĚR .....	80
4. LITERATURA .....	81

## Abecední seznam použitých zkratk

**Akt** - Proteinkináza B (Thymoma of AKR mice)

**ALK** - Anaplastic lymphoma kinase

**AMA** – Antimitochondrial antigen antibody

**APC** - Adenomatous polyposis coli

**ARID1A** - AT-rich interactive domain-containing protein 1A

**ARID1B** - AT-rich interactive domain-containing protein 1B

**ATIC** - 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase

**ATP** - Adenosintrifosfát

**ATR** - Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein

**BCOR** - BCL-6 corepressor

**BRAF** - v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

**CARS** - CysteinyI-tRNA synthetase

**CBL** - Casitas B-lineage Lymphoma

**CLTC** - Clathrin heavy chain

**COL4A5** - Collagen Type IV Alpha 5 Chain

**COL4A6** - Collagen Type IV Alpha 6 Chain

**CSF1-R** - Colony stimulating factor 1 receptor

**ctDNA** – Circulating tumor DNA

**CTNND2** - Catenin Delta 2

**CTNNB1** - Catenin Beta 1

**DNA** – Deoxyribonukleová kyselina

**DOG1** – Discovered on GIST1

**EBER** - Epstein-Barr encoding region

**EBNA2** - Epstein-Barr virus nuclear antigen 2

**EBV** - Epstein-Barr virus

**EGIST** – Extragastrointestinální stromální tumor

**EMA** - Endomysial antibody

**EML4** - Echinoderm microtubule-associated protein-like 4

**ER** – Estrogenový receptor

**ESS** – Endometriální stromální sarkom

**ETV6** - Ets Variant Gene 6

**FAD** - Flavinadeninindinukleotid

**FGFR1** - Fibroblast growth factor receptor 1

**FGFR4** - Fibroblast growth factor receptor 4

**FLT3** - Fms like tyrosine kinase 3

**FN1** - Fibronectin 1

**FOXO1** - Forkhead box O1

**GFAP** - Glial fibrillary acidic protein

**GIST** – Gastrointestinální stromální tumor

**GLUT1** - Glucose transporter 1

**HIF1- $\alpha$**  - Hypoxia-inducible factor 1- alpha

**HMB45** - Human Melanoma Black 45

**HOOK3** - Hook Microtubule Tethering Protein 3

**HRAS** - Hras proto-oncogene (Harvey rat sarcoma virus oncogene)

**HSP90** - Heat shock protein 90

**CHD4** - Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4

**ICC** – Intersticiální Cajalovy buňky

**IFP** – Inflamatorní fibroidní polyp

**IGF1-R** - Insulin-like growth factor 1 receptor

**IMT** – Inflamatorní myofibroblastický tumor

**IRS1** - Insulin receptor substrate 1

**JAZF1** - Juxtaposed with another zinc finger protein 1

**KIT** - KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase

**KRAS** - Kras proto-oncogene (Kirsten rat sarcoma virus oncogene)

**LMNA** - Lamin A/C

**LTK** - Leukocyte receptor tyrosine kinase

**MAPK** - Mitogen-activated protein kinases

**MARK2** - Microtubule Affinity Regulating Kinase 2

**MAX** - Myc-associated factor X

**MEN1** – Mnohočetná endokrinní neoplázie typu 1

**MEN2b** – Mnohočetná endokrinní neoplázie typu 2b

**MM** – Maligní melanom

**mRNA** - Messenger RNA

**mTOR** - Mammalian target of rapamycin

**MYOD1** - Myogenic Differentiation 1 gene

**NAB2** - NGFI-A binding protein 2

**NCOA2** - Nuclear Receptor Coactivator 2

**NELFCD** - Negative elongation factor C/D

**NF1** – Neurofibromatóza typu 1

**NF2** – Neurofibromatóza typu 2

**NFP** – Neurofilament protein

**NRAS** - Nras proto-oncogene

**NSE** - Neuron Specific Enolase

**NTRK3** - Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 3

**OCT3/4** - Octamer binding transcription factor 3/4

**OSCAR** - Osteoclast associated receptor

**PARK2** - Parkinson disease (autosomal recessive, juvenile) 2

**PAS** - Periodic acid–Schiff

**PCR** – polymerázová řetězová reakce

**PDGFRA** - Platelet-derived growth factor receptor alpha

**PDGFRB** - Platelet-derived growth factor receptor beta

**PET/CT** – pozitronová emisní tomografie/výpočetní tomografie

**PIK3** – Fosfatidylinositol 3-kináza

**PPFIA1** - Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type F Polypeptide-Interacting Protein Alpha-1

**PR** – Progesteronový receptor

**PRKAR1A** - CAMP-Dependent Protein Kinase Type I-Alpha Regulatory Chain

**PTEN** - Phosphatase and tensin homolog

**PTPN11** - Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11

**RAF** - Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

**RANBP2** - RAN binding protein 2

**RAS** - rat sarcoma viral proto-oncogene

**RET** - ret proto-oncogene

**RNFP** – Reaktivní fibrózní nodulární pseudotumor

**ROS1** - ROS proto-oncogene 1

**RTK** – Receptorová tyrosinkináza

**SALL4** - Spalt-like transcription factor 4

**SDH** - Sukcinátdehydrogenáza

**SDHA, B, C, D** – Sukcinátdehydrogenázové podjednotky A, B, C, D

**SDHAF1** - Succinate dehydrogenase assembly factor 1

**SDHAF2** - Succinate dehydrogenase assembly factor 2

**SEC31A** - Sec31 homolog A (S. cerevisiae)

**SFT** – Solitární fibrózní tumor

**SMA** – Smooth muscle actin

**SPRED2** - Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 2

**SS** – Synoviální sarkom

**STAT6** - Signal transducer and activator of transcription 6

**SUFU** - Suppressor of fused homolog

**SUZ12** - Suppressor of zeste 12 homolog

**SSX** - Synovial sarcoma, X (SSX) breakpoint

**SYT** - Synovial sarcoma translocation, chromosome 18

**TACC1** - Transforming acidic coiled-coil-containing protein 1

**TGF** – Transforming growth factor

**TIE2** - Tunica interna endothelial cell kinase 2

**TLE-1** - Transducin-like enhancer protein 1

**TP53** - Tumor protein p53

**TPM** – Tropomyosin gene family

**VEGF** – Vascular endothelial growth factor

**VEGFR** - Vascular endothelial growth factor receptor

**VHL** – von Hippel-Lindau tumor supressor

**ZNF217** - Zinc finger protein 217

## **1. Úvod**

Nádory trávicího traktu patří celosvětově mezi nejčastější neoplázie. Morfologicky i klinicky jde o heterogenní skupinu lézí, v níž přední místo zauímají nádory epitelového původu. Ve stínu této majoritní skupiny zůstávají vzácnější nádory neepitelové provenience, zejména nádory mezenchymální. Díky současným diagnostickým možnostem byla odhalena patogeneze i molekulárně genetická podstata řady těchto lézí. Získané informace ovlivnily nejen diferenciálně diagnostický postup, ale přispěly i k vývoji cílené terapie, čímž vedly k prodloužení přežívání a zvýšení kvality života postižených pacientů.

### **1.1 Gastrointestinální stromální tumor (GIST) – současné poznatky**

Ačkoli incidence gastrointestinálního stromálního tumoru (GISTu) nepřesahuje 10-15 nových případů na 1 milion obyvatel za rok, představuje GIST nejčastější nádor trávicího traktu mezenchymálního původu. GIST se vyskytuje především v dospělosti, průměrný věk pacientů se pohybuje okolo 60 let. Obě pohlaví bývají postižena stejnou měrou, výjimku tvoří podskupina tzv. pediatrických GISTů, u nichž byla zaznamenána vyšší prevalence postižených dívek. Klinická prezentace nádoru zahrnuje abdominální dyskomfort, krvácení či obstrukční symptomy, malé tumory mohou být však zcela asymptomatické a představují náhodný nález při endoskopickém vyšetření z jiných příčin. Mikroskopicky je nádor tvořen vřetenitými a/nebo epiteloidními buňkami, které jsou všeobecně považovány za deriváty buněčných linií diferencujících se směrem k intersticiálním (pacemakerovým) Cajalovým buňkám (ICC) [255].



GIST byl v minulosti řazen mezi neoplázie vycházející z hladkosvalových buněk [97]. Teprve v 80. letech 20. století byl nádor vyčleněn jako samostatná entita pod názvem stromální tumor, přičemž tento termín zahrnoval mezenchymální nádory, které nevykazovaly známky neurogení ani hladkosvalové diferenciace [168]. V roce 1998, který lze považovat z hlediska poznání GISTu za přelomový, byla zjištěna imunopozitivita nádorových buněk v průkazu proteinu KIT (CD117) i jejich podobnost s ICC [233]. Ve stejném roce byla kolektivem japonských autorů publikována práce popisující aktivační („gain of function“) mutace genu *KIT* v GISTu [116]. Přes počáteční skepticismus byla v roce 2001 potvrzena účinnost léčby GISTu imatinibem, selektivním kompetitivním inhibitorem receptorových tyrosinkináz [128]. Pozdější průkaz mutací genů *PDGFRA* [111, 117], *BRAF* [2, 8] či mutací v genech kódujících podjednotky mitochondriální sukcinát dehydrogenázy (*SDHx*) [125] potvrdil, že jde o geneticky heterogenní skupinu nádorů s různým klinickým obrazem i biologickými vlastnostmi.

Recentní práce shrnující poznatky z 29 studií (zahrnující epidemiologická data od více než 13 000 pacientů) udává nejvyšší výskyt GISTů v žaludeční stěně (56,6%) a v tenkém střevě (31,8%), čímž potvrzuje dosavadní představu o predilekční lokalizaci tohoto nádoru. V menší míře může GIST postihovat tlusté střevo a jícen [255]. Vzácně se GISTy nacházejí mimo trávicí trakt, např. v retroperitoneu, mesenteriu, omentu [49, 180, 220] či pankreatu [61]. Tyto nádory však pravděpodobně nelze považovat za pravé extragastrointestinální stromální tumory (EGISTy), neboť zřejmě představují subserózní GISTy žaludku či střeva, které se extrémně vyklenují mimo stěnu gastrointestinálního traktu a ztrácejí s ní kontakt [4]. Raritní skupinou jsou GISTy vznikající např. v prostatě [151, 270], vagině [43], děloze [287] či na pleuře [156].

Makroskopicky jde převážně o dobře ohraničené tumory šedobílé barvy, elastické konzistence, homogenní až naznačeně fibrilární struktury, někdy s regresivními změnami, které nejčastěji vycházejí z muscularis propria žaludeční či střevní stěny a vyklenují se do lumen, případně na serózní povrch trávicí trubice.

Z morfologického hlediska lze GISTy rozdělit na vřetenobuněčné (70%), epiteloidní (20%) a na GISTy se smíšeným fenotypem (10%), přičemž každá skupina má řadu specifických subtypů. Nádorové buňky bývají často uspořádány do svazků oddělených fibrozním či myxoidním stromatem, výjimkou nejsou ani varianty storiformní, difúzní, alveolární, případně vytvářející organoidní struktury [185]. Za patognomické znaky jsou považovány perinukleární vakuolizace [177] a skenoidní vlákna (eosinofilní, PAS pozitivní extracelulární materiál) [112].

Přestože ve většině případů má GIST charakteristický morfologický obraz již v konvenčním barvení hematoxylinem a eozinem, je nutné tuto diagnózu potvrdit imunohistochemickým vyšetřením.

Zlatým standardem je imunohistochemický průkaz proteinu KIT (CD117), který bývá pozitivní až v 90% GISTů, včetně těch, které nesou jiné mutace než *KIT* [175]. Zavádějící však může být pozitivita v některých lézích vstupujících do diferenciální diagnostiky GISTu, jako např. v intraabdominální fibromatóze [51]. Negativní výsledek tohoto barvení diagnózu GISTu nevylučuje [172, 235]. KIT-negativní GISTy mohou být asociovány s aktivačními mutacemi genu *PDGFRA*. Tyto nádory jsou pozitivní v imunohistochemickém průkazu *PDGFRA* a bývá pro ně typická žaludeční lokalizace, epiteloidní morfologie a myxoidní stroma s mastocytární infiltrací a mnohojadernými buňkami [58, 214, 232, 281]. Reakce s protilátkou *PDGFRA* může však být pozitivní i v intraabdominální fibromatóze [153].

Za nejspolehlivější imunohistochemický marker je v současné době považován DOG1 [158, 203, 289]. Přesto, že je tato protilátka exprimována téměř ve všech GISTech nezávisle na jejich genetickém profilu [283], nelze ani tuto považovat za stoprocentně specifickou, neboť pozitivita tohoto markeru byla rovněž prokázána i v malé populaci synoviálních sarkomů, leiomyosarkomů, maligním melanomu i solidně pseudopapilárním tumoru pankreatu [26, 293].

Protilátka CD34, dříve hojně využívaná k odlišení GISTu od nádorů vycházejících z hladké svaloviny, má v současnosti vzhledem ke své nízké specificitě omezený význam [203].

V důsledku možné parciální leiomyocelulární diferenciace může GIST reagovat pozitivně s některými hladkosvalovými markery, především hladkosvalovým aktinem (SMA). Desmin bývá pozitivní jen vzácně, naopak pozitivita h-caldesmonu byla opakovaně potvrzena [107, 187]. Pozitivní průkaz proteinu S100 by měl v první řadě vzbudit podezření na schwannom, i přesto je tento protein exprimován až v 10 % GISTů, zejména asociovaných s neurofibromatózou 1. typu [173, 262], a podle některých studií má jeho pozitivní exprese negativní prognostický význam [216, 234].

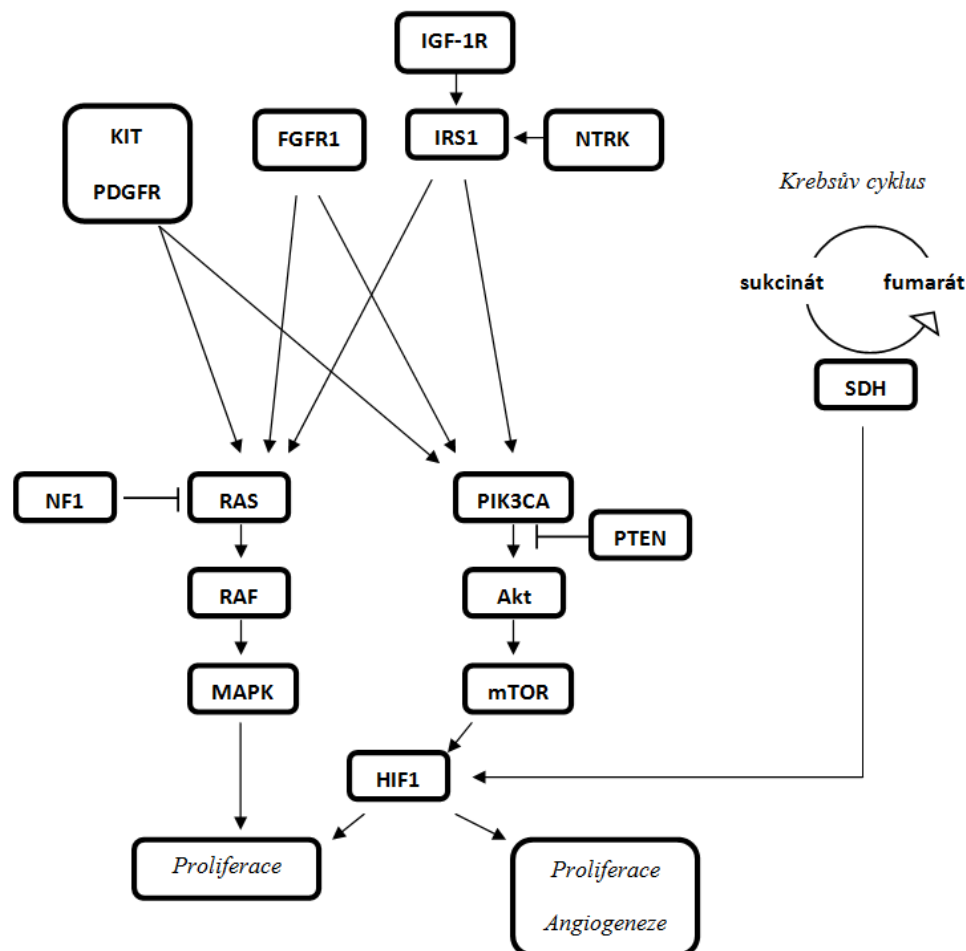
Všechny GISTy je nutné považovat za potenciálně maligní nádory. Agresivní chování lze predikovat na základě velikosti, mitotického indexu i lokalizace nádoru, přičemž riziko agresivního chování bývá nejmenší u tumorů nepřesahujících 2 cm, s nízkým mitotickým indexem ( $< 5$  mitóz/5 mm<sup>2</sup>), lokalizovaných v žaludku. Se špatnou prognózou jsou naopak spojovány nádory objemné ( $> 10$  cm), mitoticky aktivní ( $> 5$  mitóz/5 mm<sup>2</sup>), lokalizované mimo žaludeční stěnu [81, 176, 178, 185]. Infiltrativní růst, přítomnost nekróz, vzdálené metastázy, vysoká celularita nádoru ale i různé genové alterace (viz kapitulu 1.1.1) patří rovněž mezi prognosticky nepříznivé znaky [142].

Resekce může, zejména v případě malých nádorů, představovat definitivní terapeutické řešení. U lokálně pokročilých, inoperabilních či metastazujících GISTů je systémovým lékem volby imatinib, inhibitor receptorových tyrosinkináz KIT a PDGFRA, který se na základě prvotních výborných výsledků stal základní terapeutickou modalitou [128]. Řada nádorů však v důsledku své primární či sekundárně vzniklé mutace na tuto léčbu nereaguje. Ve snaze překonat primární i sekundární rezistenci GISTů je vyvíjena celá řada alternativních léků, které zasahují na různých úrovních příslušných signálních kaskád. Multikinázový inhibitor sunitinib schopný vazby na aktivní místo proteinových kináz PDGFRA, PDGFRB, VEGFR2, VEGFR3, FLT3, CSF1-R a RET představuje klinický přínos pro pacienty s GISTem rezistentním na léčbu imatinibem či intolerancí k této léčbě [303]. Terapeutikem vyčleněným pro léčbu imatinib a sunitinib-rezistentních GISTů je regorafenib, který inhibuje tyrosinkinázy KIT, PDGFR, RET, RAF1, BRAF, VEGFR1-3, TIE2 a FGFR a výrazně snižuje riziko progresu onemocnění [69]. Slibné výsledky přináší i terapie širokospektrými inhibitory nové generace (nilotinib, dasatinib, sorafenib) [236].

Nově identifikované mutace jsou podnětem k dalšímu vývoji a testování léčiv, z nichž některá jsou již využívána k terapii jiných onemocnění. Pacienti s GISTy mutovanými v genu *BRAF* by mohli profitovat z léčby dabrafenibem [79]. Potenciální terapii *RAS*-mutovaných GISTů představují inhibitory *RAS* signální dráhy (lonafarnib, tipifarnib či salirasib) [20]. GISTy nesoucí mutace v genech zapojených do PIK3/Akt/mTOR signální kaskády by mohly být terapeuticky ovlivnitelné pomocí inhibitorů PIK3 (pictilisib) [9, 85, 264] a inhibitorů mTOR (everolimus, sirolimus) [268]. Inhibitory IGF1R (linsitinib) jsou novou perspektivou v léčbě *SDHB*-deficientních GISTů [89]. Ve fázi testování je inhibitor tropomyosinových tyrosinkináz (larotrectinib), který by mohl být využit v terapii GISTů, u nichž byla nedávno prokázána fúze genu *NTRK*. Systémová aplikace selektivních inhibitorů FGFR (lenvatinib,

ponatinib, pazopanib) se nabízí jako nová terapeutická možnost pro pacienty s GISTy mutovanými v genu *FGFR1* [240]. Jako terapeuticky přínosné se jeví i využití inhibitoru chaperonového proteinu HSP90 (Heat shock protein 90), zvláště v léčbě imatinib a sunitinib-rezistentních GISTů [275], které je však prozatím pouze experimentální.

### 1.1.1 Molekulárně genetická klasifikace GISTu



*Schematické znázornění signálních drah uplatňujících se v patogenezi GISTu*

GIST představuje geneticky heterogenní skupinu nádorů. Díky současným možnostem molekulární genetiky byl GIST stratifikován do řady subtypů, které se liší svým biologickým chováním i klinickou prezentací. Pokračující výzkum v tomto oboru je zcela zásadní nejen z hlediska diagnostiky, ale je i základem individuálního přístupu k pacientovi a volby správného terapeutického postupu [11].

Sporadické adultní GISTy jsou zdaleka nejčastěji asociovány se somatickými mutacemi genů kódujících receptorové tyrosinkinázy KIT nebo PDGFRA. Ve vzácných případech může jít o germinální mutace těchto genů, které vedou k rodinnému výskytu mnohočetných nádorů a v některých případech i abnormální pigmentaci a mastocytóze [25, 165, 201, 223].

Receptorové tyrosinkinázy (RTK) patří mezi transmembránové proteiny, jejichž extracelulární část vytváří receptor pro specifický ligand a intracelulární katalytická část je schopna vázat a fosforylovat příslušné substráty. Po vazbě ligandu na extracelulární doménu dochází ke konformačním změnám receptoru vedoucím k jeho enzymatické aktivaci. Na intracelulární doméně tyto změny umožní vazbu ATP a substrátu na aktivní místo enzymu, čímž je spuštěna kaskáda dějů, která prostřednictvím několika proteinů přenáší extracelulární signál do jádra buňky, v němž dochází ke změnám úrovně exprese příslušných genů. Aktivační mutace („gain of function“) genů kódujících RTK vedou k ligand-independentní aktivaci příslušné RTK a tím i četných signálních drah, z nichž nejlépe prozkoumané jsou signální kaskády RAS/RAF/MAPK a PI3K/Akt/mTOR [226, 254, 265].

Pro problematiku GISTu má největší význam rodina RTK označovaných jako PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor), přičemž v patogenezi se uplatňují mutace genů kódujících RTK KIT a PDGFRA.

*KIT* gen (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog) byl poprvé izolován ve druhé polovině 80. let z akutně transformujícího retroviru kočičího sarkomu [27]. Následně byl protoonkogen *c-kit* identifikován i u člověka. Tento gen kódující transmembránovou receptorovou tyrosinkinázu aktivovanou dimerizací a autofosforylací po vazbě ligandu SCF (stem cell factor) je lokalizován na dlouhém ramenu chromozomu 4 v lokusu 11-12 a sestává z 21 exonů [299]. Mutace *KIT* se v patogenezi GISTu uplatňují

přibližně v 75-85 % případů, přičemž nejčastěji jsou akumulovány v tzv. „hot spots“, které odpovídají exonům 9, 11, 13 a 17 [53, 110, 231]. Velmi vzácné jsou mutace v exonech 8, 12, 14 a 18 [121, 213]. Poprvé popsané a zároveň nejčastější jsou mutace v exonu 11, kódujícím juxtamembránovou doménu proteinu [116]. Oproti původním předpokladům, které spojovaly mutace v exonu 11 obecně s horší prognózou [77], byly tyto později prokázány téměř ve všech GISTech menších než 1 cm (GIST-tumorlets, micro-GISTs), které se až na výjimky chovají benigně [16, 231]. Z prognostického hlediska je však nutné zohlednit typ mutace, neboť delece v exonu 11 jsou asociovány s kratším intervalem bez progresu onemocnění a jsou považovány za marker maligního chování. Naproti tomu substituční mutace bývají spojovány s lepší prognózou [53, 252, 282]. GISTy mutované v exonu 11 *KIT* jsou nejvíce senzitivní k terapii imatinibem.

Přibližně u 10 % všech *KIT* mutovaných GISTů (a téměř u 23 % GISTů tenkého střeva) se vyskytují mutace v exonu 9. Tumory nesoucí tyto mutace jsou spojovány s horší prognózou a častěji vytvářejí metastázy na peritoneu [53, 140]. Přesto však pacienti profitují z léčby imatinibem, pokud je tato podávána ve zvýšené dávce [65].

Mutace v exonech 13 a 17 *KIT* se objevují ve sporadických GISTech vzácně [137, 149] a mohou být rezistentní na terapii inhibitory RTK (imatinib i sunitinib), zvláště pokud se jedná o mutace sekundární [82].

Gen *PDGFRA* (Platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ ) se strukturálně podobá genu *KIT*. Je lokalizován na dlouhém ramenu chromozomu 4 v lokusu 12, sestává z 23 exonů a stejně jako *KIT* náleží do PDGFR tyrosinkinázové rodiny [132]. V roce 2003 byly ve skupině *wt-KIT*/*KIT*-imunonegativních GISTů prokázány aktivační mutace tohoto genu [111, 117], které jsou nejčastěji akumulovány v exonech 12, 14 a 18 [146]. Nejčastější je substituce D842V v exonu 18 [54, 121]. Nádory s tímto typem mutace jsou považovány za rezistentní



k terapii imatinibem, naproti tomu daleko vzácnější mutační změny v exonech 12 a 14 jsou imatinib-senzitivní, asociované s dobrou prognózou [144, 146, 172].

GISTy mutované v *PDGFRA* se predilekčně nacházejí v žaludeční stěně a mají specifický morfologický obraz [58, 144, 214, 215, 232, 300]. Bývá pro ně typická epiteloidní struktura a v jejich myxoidním stromatu lze nalézt mastocytární infiltraci či mnohojaderné buňky [58, 66, 214, 232, 281, 294].

Kromě GISTů byly mutace *PDGFRA* detekovány i v dalších mezenchymálních nádorech trávicího traktu, které spadají do diferenciální diagnostiky. Jde o Vaňkovy tumory (inflammatorní fibroidní polypy, IFP) [59, 148] a tzv. „fibrózní tumory“ [63]. Vaňkovy tumory i „fibrózní tumory“ mohou vznikat sporadicky na podkladě somatické mutace *PDGFRA*, mohou však být i součástí tzv. *PDGFRA*-mutantního syndromu, který je podmíněn germinální mutací *PDGFRA* a je charakterizován familiárním výskytem mnohočetných intestinálních lipomů, „fibrózních tumorů“, IFP a žaludečních GISTů [42, 210, 223].

Přibližně 10-15 % GISTů není asociováno s mutacemi *KIT/PDGFRA* [121]. Největší část této skupiny představují tzv. SDHB-deficientní GISTy charakterizované ztrátou imunoexprese sukcinátdehydrogenázové podjednotky B (SDHB), jejíž absence odráží dysfunkci celého enzymatického komplexu [95, 280]. Sukcinátdehydrogenáza (SDH) je enzymatický komplex vázaný na vnitřní mitochondriální membráně, který katalyzuje oxidaci sukcinátu na fumarát. SDH je jedním z enzymů Krebsova cyklu, zároveň je zapojena i do procesu buněčného dýchání. Jde o heterooligomer složený z podjednotek A, B, C a D, vedlejších asociovaných molekul (SDHAF1 a SDHAF2), kovalentně vázaného koenzymu FAD a tzv. FeS klastrů (metaloproteinů obsahujících komplexy železa s anorganickou sírou) [118]. Inaktivace některé z hlavních podjednotek nebo asociovaných molekul v důsledku mutace či epigenetické dysregulace příslušného genu vede k akumulaci sukcinátu a tím k

destabilizaci SDH. Dochází ke zvýšené transkripci HIF1- $\alpha$  a poklesu demethylace DNA. Tento proces vede k rozvoji pseudohypoxie, která hraje klíčovou úlohu v onkogenezi takto poškozených buněk [98, 272]. Současně dochází ke zvýšení transkripce faktorů VEGF a IGFR1 přispívající k angiogenezi a ke stimulaci buněčného růstu [68, 124, 147, 280].

Na základě ztráty imunoexpresy SDHB byly GISTy rozděleny do dvou velkých skupin a to na SDHB-positivní (většina sporadických adultních GISTů, NF1-asociované GISTy) a SDHB-negativní (deficientní), přičemž GISTy se ztrátou exprese SDHB zahrnují většinu tzv. „pediatrických“ GISTů [95, 108] a dále GISTy vznikající v rámci Carneyho trias [40, 104] a syndromu Carney-Stratakis [41, 125]. Společným jmenovatelem SDHB-deficientních GISTů je predominantní žaludeční lokalizace (často multifokální), epiteloidní morfologie, nodulární či plexiformní uspořádání, abnormální biologické chování, které nekoreluje s velikostí tumoru ani mitotickým indexem, i časně zakládání metastáz především v regionálních lymfatických uzlinách [6, 280]. Tyto GISTy jsou navíc charakterizované overexpresí IGF1R [126, 280]. SDHB-deficientní GISTy bývají rezistentní k terapii imatinibem, pacienti však profitují z léčby multikinasovými inhibitory (sunitinib) [280], přínosem by mohla být i terapie inhibitory IGF1R [89, 263].

**Carneyho trias** byla popsána již v roce 1977 J. A. Carneyem a spolupracovníky jako nefamiliární syndrom neznámé etiologie zahrnující přítomnost žaludečního GISTu (původně považovaného za leiomyosarkom), extraadrenálního paragangliomu a plicního chondromu [40]. Téměř v 80 % případů není tato trias plně vyvinutá (nejčastější kombinací je GIST a plicní chondrom) [36, 241] a navzdory původní definici jsou dnes za součást syndromu považovány i adenomy kůry nadledvin či leiomyomy jícnu [39]. Charakteristicky bývají postiženy mladé ženy. GISTy bývají lokalizované v žaludeční stěně, mohou být multicentrické, v histologickém obraze dominuje epiteloidní komponenta. Oproti

sporadickým GISTům asociovaným s mutacemi *KIT/PDGFRA* zakládají časné metastázy, jsou imatinib-rezistentní, paradoxně je však jejich chování ve většině případů indolentní [29, 38]. Germinální mutace některého z genů *SDH* (*SDHx*), která by se vzhledem k nádorové multiplicitě i *SDHB* deficienci nabízela jako možná příčina onemocnění, nebyla dosud (spolehlivě) prokázána. Proti tomuto tvrzení stojí výsledky pouze jedné recentní práce popisující šest pacientů s Carneyho trias, u nichž byly prokázány germinální mutace v *SDHA*, *SDHB* a *SDHC*, přičemž u pacientky s germinální mutací *SDHC* byl kromě žaludečního GISTu a plicního chondromu přítomen i ganglioneurom [31]. Až do roku 2014 byl jedinou možností, jak odlišit Carneyho trias od syndromu Carney-Stratakis, právě průkaz absence germinálních mutací. V uvedeném roce však byly publikovány dvě významné práce, které prokázaly v nádorových tkáních pacientů s Carneyho trias hypermetylaci promotoru *SDHC* vedoucí ke snížení exprese mRNA a tím ke snížení aktivity *SDH* [104, 135]. Nicméně ani tento specifický znak nevysvětluje prvotní příčinu onemocnění. Jako možná příčina je uváděn postzygotický somatický mozaicismus [241] i možnost mutace některého genu pro regulační faktor účastnící se přenosu signálů od RTK a signálů z mitochondriálních enzymů citlivých na hypoxii. Za možného kandidáta je pokládán transkripční faktor HIF-1 $\alpha$ , který je pod vlivem *SDH*, ale je zároveň zapojen do RAS/RAF/MAPK i PI3K/Akt/mTOR signálních drah řízených prostřednictvím RTK [15].

**Syndrom Carney-Stratakis** (syndrom „familiární paragangliom-GIST“) byl původně považován za inkompletní formu Carneyho trias. Familiární výskyt s autozomálně dominantním typem dědičnosti (s inkompletní penetrancí), stejnoměrné postižení mužů i žen, nepřítomnost plicního chondromu i vyšší zastoupení paragangliomu ve vyšetřovaném souboru vedly v roce 2002 k vyčlenění tohoto syndromu jako samostatné jednotky [41]. O několik let později byly v nádorech postižených pacientů prokázány germinální inaktivační mutace

v genech *SDHB*, *SDHC* a *SDHD* [170, 211], které jsou rovněž zodpovědné za hereditární feochromocytom/paragangliom syndrom [171]. Kromě ztráty imunoexprese *SDHB* a overexprese *IGF1R*, se *GISTy* i paragangliomy u tohoto syndromu morfologicky neliší od svých sporadických protějšků. Mutace genů *KIT/PDGFR*A nebyly v *GISTech* tohoto syndromu prokázány [278].

Minoritní skupinu z hlediska frekvence výskytu představují *GISTy*, v jejichž patogenezi hrají roli geny *NF1*, *BRAF*, *RAS*, *PIK3CA*, *PTEN*, *NTRK3* či *FGFR1* [57, 198].

Gen *NF1* je lokalizovaný na dlouhém ramenu chromozomu 17 v lokusu 11.2. Genovým produktem je tumor supresorový protein neurofibromin, který se prostřednictvím aktivace proteinu *RAS* podílí na regulaci buněčné proliferace. Germinální mutace tohoto genu je příčinou neurofibromatózy 1. typu (*NF1*), autozomálně dominantně dědičné choroby, jejímiž hlavními znaky jsou kožní skvrny barvy bílé kávy (café au lait), pigmentované hamartomy duhovky a mnohočetné neurofibromy [102]. Pacienti mají rovněž vyšší predispozici ke vzniku dalších benigních i maligních nádorů [202].

*GISTy* se vyskytují u 5-25% pacientů s *NF1* a mohou být i prvním projevem tohoto onemocnění [32]. Obvykle bývají mnohočetné a doprovázené hyperplázií *ICC*. Predilekčně postihují tenké střevo a v jejich histologickém obraze převažuje vřetenobuněčná komponenta [3, 23]. Typická bývá rovněž přítomnost abundančních skenoidních vláken [188, 262]. 40-60 % *NF1*-asociovaných *GISTů* vykazuje pozitivitu v barvení protilátkou proti *S100* proteinu [173, 262]. Většina *GISTů* je rovněž imunohistochemicky pozitivní v průkazu *KIT* a v ojedinělých *GISTech* byly dokonce popsány mutace *KIT* či *PDGFR*A [262, 298]. Pravděpodobně se však jedná o koincidenci *NF1* se sporadickým *GISTem*, neboť v „pravých“ *NF1*-asociovaných *GISTech* nebyly mutace genů *KIT* a *PDGFR*A prokázány [173, 199]. Tyto

nádory mívají nízkou mitotickou aktivitu a nízký maligní potenciál, terapeutická odpověď na podávání imatinibu je však neuspokojivá [196].

Mutace genu *BRAF* se vyskytují až ve 13 % *KIT/PDGFR* wt GISTů [119]. Gen *BRAF* je lokalizovaný na chromozomu 7 v regionu 34, skládá se z 18 exonů a kóduje protein patřící do rodiny serin/threoninových proteinových kináz RAF. Tento protein je součástí intracelulární signální dráhy RAS/RAF/MAPK, mezi jejíž aktivátory patří mimo jiné i KIT. Mutace tohoto genu je přítomna v celé řadě maligních nádorů, např. kolorektálním karcinomu, maligním melanomu, papilárním karcinomu štítné žlázy, nemalobuněčném karcinomu plic a mnohých dalších [22, 133, 163, 256]. V naprosté většině případů jde o substituci V600E v exonu 15, která vede k permanentní aktivaci proteinu BRAF, bez ohledu na signalizaci RAS. GISTy nesoucí mutaci *BRAF* V600E jsou spojovány s vyšším rizikem maligního chování a nelze vyloučit ani roli mutace ve vzniku sekundární rezistence na terapii nádoru imatinibem [8]. Potenciální možnou terapii představují selektivní inhibitory BRAF (dabrafenib), využívané např. v terapii maligního melanomu [79].

Mutace genů *RAS* představují v GISTech poměrně vzácnou genetickou událost [150]. Stejně jako v předchozím případě hraje genová rodina *RAS* ústřední roli v MAPK signální dráze (RAS/RAF/MAPK), jejíž dysregulace způsobená aktivační mutací vede ke vzniku řady maligních nádorů, např. kolorektálního adenokarcinomu, adenokarcinomu pankreatu, adenokarcinomu plic a dalších [20, 33, 78, 284]. V roce 2012 byly poprvé popsány mutace *KRAS* (Kirsten rat sarcoma virus) ve sporadických GISTech mutovaných v *KIT* a *PDGFR*, které byly zodpovědné za rezistenci nádorů k imatinibu [189]. V recentní práci z roku 2015 byly navíc v jednom případě *KIT/PDGFR* wt GISTu lokalizovaného v žaludeční stěně prokázány mutace genů *HRAS* a *PIK3CA*. Tyto simultánní mutace vedoucí k nezávislé aktivaci obou signálních drah RAS/RAF/MAPK a PIK3/Akt/mTOR jsou nejen příčinou

rezistence k terapii imatinibem, ale pravděpodobně i agresivnějšího biologického chování a progresu nádoru [24, 237]. Možnými léky využitelnými v terapii těchto nádorů jsou inhibitory signální dráhy RAS (např. lonafarnib, tipifarnib či salirasib), jejichž účinnost je testována u řady nádorových onemocnění [20].

Mutace genu *PIK3CA* (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha) byla prokázána v primárních GISTech mutovaných v genu *KIT* (i jejich metastázách), v metastáze *BRAF*-mutovaného GISTu i ve výše zmíněné asociaci s mutací *HRAS* [57, 79, 145, 237]. Ve většině případů mutace postihují exon 20. GISTy s mutací *PIK3CA* dosahují obvykle velkých rozměrů (> 10 cm), v morfologickém obraze převažuje vřetenobuněčná komponenta. Nádory bývají pozitivní v imunohistochemickém průkazu KIT, DOG1, CD34 i SMA [145]. Z klinického hlediska jde o nádory s agresivnějším fenotypem, rezistentní k terapii imatinibem. Mutace *PIK3CA* se vyskytují poměrně zřídka, jejich přítomnost by však měla být indikací k využití cílené terapie pomocí specifických inhibitorů PIK3/Akt/mTOR signální dráhy (pictilisib, GDC-0941) [9, 85, 264].

Aktivace signální dráhy PIK3/Akt/mTOR může být kromě výše popsané mutace *PIK3CA* způsobena i ztrátou funkce tumor supresorového genu *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) lokalizovaného v chromozomálním regionu 10q23.3. Genový produkt, protein PTEN, negativně reguluje PIK3/Akt/mTOR signální dráhu a tím i proliferaci a přežívání různých buněčných populací. Správná funkce genu je nezbytná pro normální embryonální vývoj člověka [72]. Germinální mutace *PTEN* se uplatňují v patogenezi několika autozomálně dominantních i recesivních syndromů, pro které jsou charakteristické různé vývojové defekty a zvýšená incidence benigních i maligních nádorů. Somatické mutace *PTEN* se účastní v patogenezi celé řady maligních nádorů, např. adenokarcinomu prostaty, glioblastomu, endometriálního adenokarcinomu etc. [37]. Ztráta

funkce *PTEN* (způsobená nejčastěji somatickou ztrátou jedné alely genu) v GISTech je zodpovědná za sekundární rezistenci tumoru k terapii imatinibem [219]. Zajímavé je, že ke ztrátě funkce *PTEN* může ale rovněž dojít po dlouhodobé expozici nádorových buněk inhibitorům RTK (konkrétně sunitinibu), která vede k epigenetické inaktivaci (metylací promotoru) *PTEN* [296].

Morfologickým korelátem ztráty funkce genu je ztráta exprese proteinu PTEN, kterou lze detekovat imunohistochemicky. Nádory se signifikantně sníženou (nebo žádnou) imunoexpresí PTEN jsou považovány za vysoce maligní, spojené s kratší dobou přežívání [222]. Tyto tumory obvykle dosahují velkých rozměrů a zakládají časně metastázy [306]. Podle několika studií pacienti s imatinib-rezistentním GISTem s imunodeficiencí PTEN profitují z kombinované terapie inhibitory PIK3/Akt/mTOR a imatinibem [249, 271].

Nově popsanými genetickými událostmi uplatňujícími se v onkogenezi GISTu jsou alterace genů *NTRK3* a *FGFR1*, které v konečném důsledku ovlivňují dvě hlavní efektorové signální kaskády RAS/RAF/MAPK a PIK3/Akt/mTOR.

Fúzní gen *ETV6-NTRK3* je výsledkem translokace genetického materiálu mezi *ETV6* lokalizovaným na krátkém ramenu chromozomu 12 v lokusu 13.2 a *NTRK3* nacházejícím se na dlouhém ramenu chromozomu 15 v oblasti 25.3. *ETV6-NTRK3* kóduje chimerický onkoprotein s tyrosinkinázovou aktivitou, který cestou IGF1 receptorové signální dráhy aktivuje kaskády RAS/RAF/MAPK a PIK3/Akt/mTOR, čímž potencuje růst, přežívání a proliferaci postižených buněk [276]. Genová fúze *ETV6-NTRK3* byla popsána dosud pouze v několika sporadických *KIT/PDGFR* wt GISTech, které se vyskytovaly v tenkém i tlustém střevě a rektu [34, 240]. Genová fúze *ETV6-NTRK3* je nalézána v řadě maligních nádorů, např. kongenitálním fibrosarkomu, sekrečním karcinomu prsu, celulárním a smíšeném typu mesoblastického nefromu či nádorech slinných žláz [18, 138, 143, 166, 257]. Stejně jako

v případě jiných nádorů s translokací *ETV6-NTRK3* je i v případě GISTu potenciální léčebnou metodou aplikace inhibitoru tropomyosinových receptorových tyrosinkináz (TRK) larotrectinibu (LOXO-101) [240].

Alterace genu *FGFR1* (Fibroblast growth factor receptor 1), konkrétně genové fúze *FGFR1-HOOK3* a *FGFR1-TACC1* a jedna missense mutace (substituční bodová mutace K656E), byly popsány pouze v několika GISTech [240]. Gen *FGFR1* je lokalizován na krátkém ramenu chromozomu 8 v pozici 11.23. Tento gen kóduje stejnojmenný protein s tyrosinkinázovou aktivitou, který je fyziologicky exprimován v řadě tkání a během embryogeneze řídí tzv. epiteliálně-mezenchymální tranzici buněk primitivního epiblastu na buňky mezodermální [48]. Signalizace prostřednictvím tohoto receptoru se účastní v procesu angiogeneze a buněčné proliferace [305]. *HOOK3* (Hook Microtubule Tethering Protein 3) kódovaný stejnojmenným genem lokalizovaným rovněž na krátkém ramenu chromozomu 8 v pozici 11.21 je součástí rodiny mikrotubulárních vazebných proteinů, které fungují jako adaptorové proteiny a jsou zapojeny do intracelulárního přenosu proteinových komplexů mezi Golgiho aparátem, centrozomy, endozomy a lysozomy [225, 277, 290]. Genové alterace *HOOK3* byly již dříve nalezeny v různých nádorech, např. papilárním karcinomu štítné žlázy či neuroendokrinních tumorech tenkého střeva [21, 46]. *TACC1* gen leží v těsné blízkosti genů *FGFR1* a *HOOK3* (8p11.22). Tento gen kóduje protein TACC1 (Transforming acidic coiled-coil-containing protein 1), jehož zvýšená exprese vedoucí k aktivaci signálních drah RAS/RAF/MAPK a PIK3/Akt/mTOR byla identifikována v řadě maligních nádorů, jako např. karcinomu žaludku [154], prsu [56] či prostaty [70]. Translokace *FGFR1-TACC1* byla rovněž prokázána v buňkách glioblastomu [253].



Pacienti s GISTy s výše popsanými genovými alteracemi *FGFR1* jsou potenciálními kandidáty cílené terapie pomocí inhibitorů FGFR tyrosinkináz, např. lenvatinibu, ponatinibu či pazopanibu [240].

V letošním roce byla publikována kolektivem čínských autorů práce popisující mutace genu *EGFR* (Epidermal growth factor receptor) v exonech 19 a 21 u tří pacientů s wt-GISTy. Všechny tři nádory měly typickou morfologii i imunohistochemický profil. Vzhledem k nízkému mitotickému indexu, malým rozměrům nádorů, nepřítomnosti metastáz či rekurence u všech tří pacientů lze předpokládat nízké riziko agresivního chování těchto GISTů [242].

Gen *EGFR* kóduje stejnojmenný tyrosinkinasaový transmembránový receptor, jehož aktivace vede ke spuštění kaskády dějů, jejímž konečným důsledkem je buněčná proliferace. Mutace tohoto genu byly identifikovány v řadě nádorů (např. nemalobuněčných karcinomech plic, kolorektálním karcinomu či glioblastomu). Inhibitory *EGFR* (erlotinib, gefitinib) v současnosti představují pro pacienty s *EGFR*-mutovanými nádory perspektivní terapeutický přístup a lze se tedy domnívat, že ani *EGFR*-mutované GISTy nebudou výjimkou [266].

Recentní práce popisují řadu dalších translokací a somatických mutací, které byly identifikovány v jednotlivých GISTech: *KIT-PDGFR*, *MARK2-PPF1A1*, *SPRED2-NELFCD*, *TP53*, *MEN1*, *CHD4*, *CTDNN2*, *CBL*, *ARID1A*, *ARID1B*, *BCOR*, *APC*, *ATR*, *LTK*, *SUFU*, *PARK2*, *ZNF217*, *FLT3*, *VHL*, *MAX* [30, 207, 240, 246, 291]. Posledně jmenovaný gen *MAX* (Myc-associated factor X), jehož mutace byly prokázány v hereditárních i sporadických feochromocytoech/paragangliomech [35, 246], kóduje transkripční faktor, který se podílí na proliferaci, diferenciaci a apoptóze buněk. Inaktivace tohoto genu byla zjištěna ve sporadických i NF1-asociovaných GISTech, včetně tzv. GIST-tumorlets (micro-GISTs), a předpokládá se, že způsobuje dysregulaci buněčného cyklu již v prvních fázích vývoje GISTu a vede k jeho progresi z benigních do biologicky agresivnějších forem [246].

### 1.1.2 Diferenciální diagnostika GISTu

Do diferenciální diagnostiky GISTu patří řada maligních i benigních nádorů, včetně některých pseudotumorózních lézí, které mohou s GISTem sdílet nejen podobnou morfolologii, ale i imunohistochemický či molekulárně genetický profil. Rozlišení jednotlivých lézí má zcela zásadní význam při volbě terapeutického postupu.

#### Nádory s leiomyocelulární diferenciací

##### *Leiomyom*

Před érou KIT často diagnostikované hladkosvalové nádory gastrointestinálního traktu jsou ve skutečnosti poměrně vzácnou entitou. *Leiomyomy* se častěji než GIST vyskytují pouze v jícnu [182] a tlustém střevě, přičemž leiomyomy kolorektální oblasti mají původ v muskulární vrstvě sliznice, což je jeden z jejich diagnostických znaků [174]. Mikroskopicky sestávají většinou z blandně vyhlížejících vřetenitých buněk s protáhlými jádry a eozinofilní cytoplazmou bohatou na myofibrily. Epiteloidní morfologie či plexiformní uspořádání nádorových buněk jsou spíše výjimkou [113, 127, 183]. Imunohistochemicky mohou leiomyomy sdílet s GISTy pozitivitu některých hladkosvalových markerů, zejména SMA a h-caldesmonu, bývají však téměř vždy desmin pozitivní, CD34 negativní a KIT negativní [107, 187, 293]. Některé zdánlivě typické leiomyomy mohou obsahovat abundantní příměs CD117/DOG1 pozitivních ICC. Takovéto tumory však spíše než pravý leiomyom reprezentují nodulární hyperplázii či hamartom [288]. Mutace *KIT* či *PDGFRA* nebyly dosud v leiomyomech gastrointestinálního traktu popsány. Leiomyomy trávicího traktu se většinou vyskytují sporadicky, mohou však být součástí mnohočetné endokrinní neoplázie typu 1

(MEN1) [169] či Alportova syndromu podmíněného mutací genu pro kolagen 4 [157, 267]. Zajímavostí je, že obdobné somatické mutace (delece *COL4A5* a *COL4A6*) byly detekovány i ve sporadickém leiomyomu jícnu a lze se tedy domnívat, že tento genetický defekt může souviset s jeho patogenezi [109].

### ***Leiomyosarkom***

*Leiomyosarkomy* trávicího traktu jsou vzácné agresivně se chovající nádory vyznačující se časným zakládáním hematogenních metastáz a vysokým rizikem rekurence [114, 184]. Histologicky jsou tvořeny vřetenitými buňkami s výraznou jadernou pleomofií a vysokou proliferační aktivitou. Imunohistochemický profil sdílí leiomyosarkomy se svými benigními protějšky. Nejčastěji postihují tenké střevo, kde obvykle dosahují značných rozměrů a mohou se projevat krvácením, abdominální bolestí či střevní obstrukcí [5, 103, 162, 186].

### ***EBV-asociované leiomyocelulární nádory***

Biologicky odlišnou jednotkou jsou *leiomyocelulární nádory asociované s infekcí EBV*, které se vyskytují u imunokompromitovaných pacientů. Tyto nádory bývají často mnohočetné, kromě gastrointestinálního traktu se vyskytují i v plicích a játrech, a ačkoli často splňují histologická kritéria leiomyosarkomu, je jejich prognóza velmi dobrá. Nádorové buňky vykazují kromě pozitivitu SMA i variabilní pozitivitu CD21 (EBV receptor) a EBNA2. Užitečnou metodou ke confirmaci diagnózy EBV-asociovaného hladkosvalového nádoru je in situ hybridizace (EBER) [67, 71, 218].

### ***Glomus tumor***

*Glomus tumor* je mezenchymální nádor vycházející z neuromyoarteriálního glomového tělíska, který se vzácně může vyskytovat i v gastrointestinálním traktu, téměř výlučně v žaludečním antru [131, 208]. Histologicky je tvořen uniformními epiteloidními buňkami

uspořádanými do hnízd kolem prominujících dilatovaných cév. Tato klasická varianta může být zaměněna za kulatobuněčnou variantu epiteloidního GISTu. Nádorové buňky jsou difúzně pozitivní v imunohistochemickém průkazu SMA a vykazují charakteristickou pericelulární pozitivitu kolagenu IV. KIT, protein S100, desmin a cytokeratiny jsou negativní [131, 181]. Nádor se predominantně vyskytuje u žen, v naprosté většině případů je benigní, popsány však byly i vzácné maligní varianty [83, 181].

## **Nádory s neurogení diferenciací**

### ***Schwannom***

Predilekční lokalizací benigních gastrointestinálních *schwannomů* je žaludek, méně často může být postižen jícen či tlusté nebo tenké střevo [88, 141, 285]. Od běžné měkkotkáňové varianty se schwannomy trávicího traktu liší přítomností periferního lymfoidního lemu (často s germinálními centry), PAS pozitivních jehlicovitých krystaloidů v některých nádorových buňkách, pozitivním imunohistochemickým průkazem GFAP i absencí tvorby Verocayových tělísek [141, 217, 274, 292]. Mutace genu *NF2* charakteristické pro schwannomy měkkých tkání jsou spíše výjimečnou událostí [204]. Pozitivita proteinu S100 a negativita CD117 a DOG1 (případně i absence *KIT/PDGFR*A mutací) umožňuje ve sporných případech odlišení od GISTu [274].

### ***Slizniční hamartom ze Schwannových buněk***

Kromě typických gastrointestinálních schwannomů prezentujících se jako intramurální tumor byl popsán *slizniční hamartom ze Schwannových buněk*. Tato benigní léze je tvořená drobnými proliferáty S100 pozitivních větvenitých buněk okolo krypt v lamina propria mucosae tlustého střeva [94, 212]. Vyskytuje se obvykle ve formě mnohočetných polypů a na

rozdíl od slizničního neuromu či neurofibromu je celulárnější, více homogenní, postrádá NFP pozitivní axony a dosud nebyl prokázán jeho výskyt v rámci hereditárních syndromů [94, 105].

### ***Maligní nádor pochvy periferního nervu***

*Maligní nádor pochvy periferního nervu* (MPNST) představuje v gastrointestinálním traktu raritní lézi, která vzhledem ke značné morfologické heterogenitě může způsobovat diagnostické obtíže při odlišení od GISTu. Nádory bývají obvykle alespoň fokálně či slabě S100 pozitivní a CD117 negativní a často jsou asociovány s neurofibromatózou typu 1 [76, 192, 206].

### ***Neurofibrom***

*Neurofibromy* trávicího traktu jsou vzácné benigní léze, častěji se vyskytující u pacientů s NF1 [3]. Obvykle tvoří malé polypoidní útvary vycházející ze submukózního plexu tenkého střeva či žaludku. Histologicky sestávají z heterogenní buněčné populace zahrnující Schwannovy buňky, fibroblasty, axony a buňky podobné perineurálním, které jsou obklopeny myxoidní či kolagenózní matrix. Neurofibromy jsou CD117 a DOG1 negativní. Diferenciálně diagnosticky je důležité vyloučit KIT-negativní GIST, který vzácně může neurofibrom morfologicky připomínat [155].

### ***Ganglioneurom***

Gastrointestinální *ganglioneuromy* se mohou vyskytovat ve formě polypoidního ganglioneuromu, ganglioneuromatózní polypózy a difúzní ganglioneuromatózy, přičemž posledně jmenovaná jednotka může být součástí MEN2b, NF1, tuberózní sklerózy, či Cowdenova syndromu [122, 239]. Bimorfní histologický vzhled a pozitivita nádorových

buněk v imunohistochemickém průkazu proteinu S100, NSE a synaptofyzinu umožňuje ve většině případů jejich spolehlivé odlišení od ostatních mezenchymálních nádorů.

### ***Slizniční perineuriom/benigní fibroblastický polyp***

*Slizniční perineuriomy* trávicího traktu známé dříve také jako *benigní fibroblastické polypy* jsou vzácné benigní léze tvořené blandními vřetenitými buňkami se světle eozinofilní cytoplazmou a oválnými jádry připomínajícími fibroblasty. Predominantně vycházejí z lamina propria tlustého střeva. Krypty zavzaté v těchto polypech mají často pilovité („serrated“) kontury, což je některými autory interpretováno jako smíšené hyperplastické a fibroblastické polypy [101]. Ultrastrukturálně i imunohistochemicky (pozitivita EMA, claudinu-1, GLUT1) byly v lézích prokázány znaky perineurálních buněk [100, 304]. Průkaz mutace *BRAF* však podporuje teorii, že se ve skutečnosti jedná o smíšené epiteliálně stromální polypy (hybridní hyperplastické polypy/slizniční perineuriomy), přičemž „perineurální“ komponenta může představovat proliferaci perikryptálních fibroblastů [1].

## **Fibroblastické a myofibroblastické léze**

### ***Intraabdominální fibromatóza***

*Intraabdominální fibromatóza* (desmoid) je tumoriformní léze postihující především mezenterium a retroperitoneum, vzácně však i stěnu gastrointestinálního traktu, kde může být zaměněna za GIST [51, 227]. Vyskytuje se sporadicky či v asociaci s familiární adenomatózní polypózou (FAP) vznikající na podkladě germinální mutace genu *APC* [93, 224]. Ačkoli jde o lézi lokálně agresivní, postrádá intraabdominální fibromatóza metastatický potenciál. Léze je složená z monomorfních vřetenitých buněk, tvořících široké a dlouhé svazky, a abundantního kolagenózního stromatu. Buňky desmoidu vykazují nukleární pozitivitu  $\beta$ -catenin [193]

podmíněnou ve sporadických případech somatickou mutací genu *CTNNB1* [191], pozorována však byla i pozitivita PDGFRA a CD117, která je považována za důsledek nedostatečné specifity polyklonální protilátky [153, 161]. Ačkoli mutace *KIT* ani *PDGFRA* nebyly v desmoidu nikdy popsány, byla zaznamenána jeho terapeutická odpověď na imatinib [164].

### ***Inflamatorní fibroidní polyp / Vaňkův tumor***

*Inflamatorní fibroidní polyp* (IFP) neboli *Vaňkův tumor* poprvé popsán v roce 1949 [273] jako submukózní granulom žaludku s eozinofilní infiltrací je benigní léze postihující především starší pacienty. Mikroskopicky sestává typicky z větvenitých CD34 pozitivních a CD117 negativních buněk tvořících koncentrické periglandulární a perivaskulární formace připomínající slupky cibule (onion-skin pattern). Charakteristická je i přítomnost zánětlivého infiltrátu bohatého na eozinofilní granulocyty v řídkém myxoidním stromatu [59, 136]. Vaňkovy tumory byly dlouhou dobu považovány za reaktivní proces, objev somatických aktivačních mutací genu *PDGFRA* (obdobných jako v GISTech), familiární výskyt IFP i pozdější průkaz germinální mutace téhož genu však podpořil názor, že jde o skutečnou neoplázii [12, 42, 148, 223, 247].

Mezi Vaňkovy tumory je řazena i skupina méně typických případů postrádajících nejen klasickou morfologii, ale i CD34 pozitivitu nádorových buněk. Přestože ojedinělé případy mohou nést mutaci *PDGFRA*, nelze dosud spolehlivě říci, zda se jedná o dvě různé vývojové fáze stejné léze nebo o dvě zcela odlišné jednotky [59, 60].

### ***Plexiformní fibromyxom***

*Plexiformní fibromyxom* (plexiformní angiomyxoidní myofibroblastický tumor) byl jako samostatná jednotka poprvé popsán v roce 2007 [260]. Diferenciálně diagnosticky je nutné jej odlišit od Vaňkova tumoru, myxoidního GISTu či plexiformního neurofibromu. Nádor

sestává z plexiformně uspořádaných neopouzdrěných nodulů tvořených proliferací blandně vyhlížejících větvenitých až ovoidních buněk ve (fibro)myxoidní matrix bohaté na větvičky se kapiláry. Na rozdíl od Vaňkova tumoru nebývá ve stromatu přítomna zánětlivá infiltrace. Buňky nádoru jsou negativní v imunohistochemickém průkazu CD117, DOG1, CD34, EMA, S100, ALK a cytokeratinů. Ve shodě s předpokládanou myofibroblastickou diferenciací byla prokázána v některých případech exprese SMA, vimentinu či h-caldesmonu. Variabilně buňky reagují s protilátkou CD10 [129, 179, 261]. Dosud nebyly v nádoru popsány mutace genu *KIT* ani *PDGFRA*. Přestože většina autorů považuje plexiformní fibromyxom za tumor specifický pro žaludeční muscularis propria, recentně byly popsány případy vyskytující se v duodenu či žlučníku [80, 194].

### ***Inflamatorní myofibroblastický tumor***

*Inflamatorní myofibroblastický tumor* (IMT) nazývaný též inflamatorní pseudotumor [75, 197] je mezenchymální léze, která se kromě své nejčastější lokalizace v plicích může vyskytovat v dutině břišní a vzácně může vycházet i ze stěny trávicí trubice [50, 75, 259]. Vyskytuje se především u dětí a mladých dospělých. Přestože je většina IMT benigní, může až ¼ tumorů lokálně recidivovat, spíše vzácně byly popsány případy maligního chování a zakládání metastáz. U menší části pacientů se mohou vyskytovat klinické příznaky jako anemie, polyklonální hypergamaglobulinemie, trombocytóza a leukocytóza [96]. Histologicky je IMT charakterizován větvenitými buňkami všeobecně pokládanými za myofibroblasty a denzní lymfoplasmocytární infiltrací. Imunohistochemicky nádorové buňky exprimují SMA, desmin a calponin a jsou negativní v průkazu CD34, S100, CD117, DOG1. Přibližně 40-60 % IMT pozitivně reaguje s protilátkou proti ALK proteinu [45, 52]. U části těchto tumorů byla prokázána přítomnost translokace genu *ALK* lokalizovaného na 2. chromosomu na některý z jeho fúzních partnerů: *TPM3/4*, *RANBP2*, *TFG*, *CARS*, *ATIC*, *LMNA*, *PRKARIA*, *CLTC*,



*FNI, SEC31A, EML4*. Recentně byly v IMT popsány genové fúze *ROSI (TGF-ROSI)*, *PDGFRB (NAB2-PDGFRB)*, *ETV6 (ETV6-NTRK3)* a alterace genu *RET*, která byla v publikovaném případě spojena s biologicky agresivním chováním [10, 17, 64, 160, 295].

Podle současných výsledků je téměř 70 % IMT (z toho 90 % IMT vznikajících v dětském věku) asociováno s výše popsanými genovými alteracemi, což podporuje tvrzení o možnosti využití cílené biologické léčby.

### ***Solitární fibrózní tumor***

*Solitární fibrózní tumor* (SFT) je nádor lokalizovaný většinou na pleuře, vzácně se však může vyskytovat na peritoneu či v parenchymatózních orgánech dutiny břišní [106, 190]. Jde o pomalu rostoucí, dobře ohraničený tumor sestávající z vřetenitých buněk s oválnými jádry, mezi kterými jsou přítomny svazky kolagenních vláken a větvící se „parohovité“ cévy. Nádorové buňky jsou pozitivní v imunohistochemickém průkazu CD34, CD99 a bcl-2. Přestože je pozitivita těchto markerů sdílená s GISTem [243], lze diagnózu SFT konfirmovat negativním výsledkem barvení CD117 a pozitivním průkazem exprese antigenu STAT6, který je považován za vysoce specifický marker SFT [139, 302]. Molekulárně genetickým vyšetřením lze prokázat ve většině případů genovou fúzi *NAB2-STAT6* [139].

Biologické chování SFT je obtížně predikovatelné, protože i strukturálně blandně vyhlížející nádory se mohou chovat agresivně. Přestože je většina SFT benigní a kompletní lokální excize představuje definitivní terapeutické řešení, v 10-15 % však může nádor recidivovat či dokonce metastazovat [92, 269]. Za prognosticky nepříznivé znaky je nutno považovat infiltrativní růst, vysokou celularitu nádoru, jadernou pleomorfii, vysokou mitotickou aktivitu (>4/10 HPF) a přítomnost nekrotizací [92].

## Další sarkomy

### *Rhabdomyosarkom*

*Rhabdomyosarkom* se v gastrointestinálním traktu vyskytuje zcela výjimečně, predilekční lokalizací je perianální oblast [115, 205], izolované případy však byly popsány v jícnu, žaludku i duodenu [84, 238, 244]. Jde o agresivní nádor postihující děti i dospělé [87]. K záměně s GISTem může dojít především u vřetenobuněčných variant embryonálního rhabdosarkomu, které mohou exprimovat CD117 [74]. Mutace genu *KIT* však nebyla v rhabdomyosarkomech prokázána. Diferenciálně diagnosticky přichází v úvahu i karcinosarkom [14, 86]. Kromě extenzivního samplingu k vyloučení karcinomové komponenty lze rhabdomyocelulární diferenciaci nádoru ověřit imunohistochemickým průkazem myogeninu a MyoD1 [44, 195]. Ve většině alvelárních rhabdomyosarkomů byly navíc prokázány charakteristické translokace mezi chromosomy 1 a 2 a chromosomem 13 vedoucí ke vzniku fúzních proteinů *PAX3-FOXO1* a *PAX7-FOXO1* [248]. Embryonální rhabdomyosarkomy naproti tomu vykazují značnou genetickou pleomorfii, objeveny byly alterace genů *BRAF*, *CTNNB1*, *FGFR4*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTPN11*, *MYO1*, *NCOA2* [7, 245]. Ačkoli se rhabdomyosarkomy ve většině případů vyskytují sporadicky, byla popsána i řada genetických syndromů asociovaných s těmito nádory, např. Li-Fraumeni syndrom [73], neurofibromatóza typu 1 [55] či Costello syndrom [99].

### *Endometriální stromální sarkom*

*Extrauterinní endometriální stromální sarkom* (ESS) se může v abdominální lokalizaci vyskytovat při rozsevu primárního genitálního nádoru (v některých případech i řadu let po hysterektomii) [19, 134, 258], méně často primárně na podkladě endometriózy [279]. Nádor je tvořen monomorfní populací kulatých až oválných buněk s malým množstvím cytoplazmy,

kteře jsou koncentricky uspořádané kolem prominujících cév připomínajících spirální arterioly. Některé CD117 pozitivní případy [91] mohou vést k diagnostickým rozpakům. Nádorové buňky však typicky exprimují CD10, estrogenové (ER) a progesteronové (PR) receptory. V řadě ESS byly navíc prokázány charakteristické genové fúze, zejména *JAZF1-SUZ12* (alternativní název *JAZF1-JJAZI*), které umožňují jejich odlišení od jiných mezenchymálních nádorů včetně GISTu [120, 123].

### ***Synoviální sarkom***

*Synoviální sarkom* (SS) gastrointestinálního traktu je vzácnou jednotkou postihující nejčastěji žaludek a jícen, ojedinělé případy byly popsány v duodenu, tenkém i tlustém střevě [28, 209, 228]. SS žaludku jsou většinou monofazické, zatímco SS jícnu spíše bifazické. Obzvláště monofazické varianty mohou připomínat GIST a to nejen díky své morfologii, ale i občasně CD117 a DOG1 imunopozitivitě [289, 293] či raritnímu průkazu mutací *KIT* a *PDGFRA* v nádorových buňkách [159]. Na rozdíl od GISTu jsou však SS pozitivní v barvení protilátkami proti cytokeratinům CK7 a CK19, EMA a proteinu TLE-1 [221]. Průkaz charakteristické translokace t(X;18) vedoucí k fúzi genu *SYT* na chromosomu 18 s jedním z členů *SSX* genové rodiny na chromosomu X může rovněž posloužit ke confirmaci diagnózy SS [228].

### **Jiné maligní nádory napodobující mezenchymální neoplázie**

#### ***Maligní melanom***

*Maligní melanom* (MM) je jeden z nejčastějších nádorů metastazujících do gastrointestinálního traktu [250]. Nádor může vznikat primárně v anorektu či jícnu [130, 230, 251], popsány byly i případy MM tenkého střeva [152]. Především amelanotické varianty

mohou vzhledem k poměrně časté pozitivitě CD117 [13] i průkazu mutací genu *KIT* [286] vést k záměně s GISTem. MM by však měl být odlišitelný na základě imunoexprese běžných melanocytárních markerů (HMB-45, Melan-A).

### ***Karcinom***

*Vřetenobuněčný karcinom* (sarkomatoidní karcinom, karcinosarkom) může morfológicky připomínat GIST, zvláště pokud je v buňkách přítomna aberantní exprese CD117 [167].

Naproti tomu i v malé populaci GISTů byla prokázána pozitivní reakce s protilátkami proti cytokeratinům [200, 229]. Kromě důkladného samplingu hraje v diagnosticky nejasných případech hlavní roli molekulárně genetická analýza *KIT* a *PDGFRA*.

### **Nenádorové léze napodobující mezenchymální neoplázie**

#### ***Reaktivní nodulární fibrózní pseudotumor***

Reaktivní nodulární fibrózní pseudotumor (RNFP) byl poprvé popsán v roce 2003 [297]. Jde o benigní lézi, která ve většině případů vychází ze subserózy a často vzniká v asociaci s předchozím chirurgickým výkonem či traumatem. Histologicky je RNFP spíše hypocelulární, tvořený blandními vřetenitými či hvězdicovitými buňkami v kolagenózním, fibromyxoidním či myxoidním stromatu s ložiskovou disperzní monocelulární zánětlivou infiltrací. Buňky této léze pozitivně reagují s vimentinem a SMA, opakovaně byla potvrzena i pozitivita cytokeratinů [62, 90], která by svědčila ve prospěch teorie o původu této afekce z multipotentních subserózních buněk. Přestože původní práce z roku 2003 udává CD117 pozitivitu až v 80 % případů RNFP, nebyla tato jinými studii jednoznačně potvrzena [47, 62, 301]. Bez ohledu na případnou CD117 imunopozitivitu nejsou v RNFP přítomny mutace *KIT* [62].

## 2. Cíle práce a publikované výsledky

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

### Cíl práce

- Reklasifikace primárního extragastrického nádoru a korelace jeho morfologických a imunohistochemických znaků s molekulárně genetickým profilem.

### Souhrn

V rámci rozsáhlejší studie imunohistochemického a molekulárně genetického profilu mezenchymálních nádorů trávicího traktu byl publikován samostatný případ 52letého muže, který podstoupil extirpaci objemného tumoru (rozm. 13,9 x 7,6 x 10,4 cm) lokalizovaného v zadním mediastinu, přičemž nebylo možné vyloučit jeho přímý vztah ke stěně jícnu. Tumor byl na spádovém pracovišti primárně diagnostikován jako pleomorfní rhabdomyosarkom vzhledem k fokální imunopozitivitě nádorových buněk v barvení protilátkou proti desminu. 18 měsíců po operaci byla pomocí PET/CT prokázána přítomnost metastáz v podbrániční krajině a byla indikována resekce distální části jícnu, proximální části žaludku, omenta a sleziny. V omentu bylo nalezeno 8 metastáz tvořených epiteloidními buňkami negativními v imunohistochemickém průkazu protilátkami proti cytokeratinům, S100 proteinu, HMB-45, SMA, desminu, myogeninu, OCT3/4 a SALL4. Vyšetření protilátkou proti SDHB bylo pouze fokálně slabě pozitivní. Naopak pozitivně nádorové buňky reagovaly s protilátkou proti proteinu KIT (CD 117). Následně byla zrevidována i tkáň primárního nádoru, který byl rovněž KIT pozitivní. Nádor byl na základě těchto výsledků reklasifikován na GIST a bylo doplněno molekulárně genetické vyšetření genů *KIT*, *PDGFRA* a *SDHB*, *SDHC* a *SDHD*.

Analýza sledovaných genů v primárním nádoru i v metastázách prokázala nejen delecii v exonu 11 genu *KIT* (p.W557\_K558), ale i změnu sekvence v genu *SDHD* (p.G12S), jejíž význam je dosud nejasný. Lze však předpokládat, že jemně granulární cytoplasma nádorových buněk vzdáleně připomínajících onkocyty, spolu se slabou imunopozitivitou SDHB a naopak silnou granulární pozitivitou AMA, může být odrazem pseudohypoxie vzniklé v důsledku této sekvenční změny, která mohla přispívat k destabilizaci celého mitochondriálního SDH enzymatického komplexu.

Tento případ by mohl vyvracet dosavadní předpoklad, že simultánní mutace genů *KIT/PDGFR* a *SDHx* se vzájemně vylučují. Zároveň lze tento případ považovat za první publikovaný případ SDHB negativního GISTu lokalizovaného mimo žaludeční stěnu.

## **KIT Mutations and Sequence Changes in Genes Encoding SDH Complex Possibly Need Not be Mutually Exclusive in Gastrointestinal Stromal Tumors**

### **To the Editor:**

A small subset of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) is associated with loss of function of the succinate dehydrogenase (SDH) complex of mitochondrial inner membrane proteins detectable as loss of subunit B (SDHB) immunostaining.<sup>1</sup> This group of SDHB-deficient tumors encompasses several clinicopathologic entities.<sup>2,3</sup> First, GISTs may harbor germline mutation of a gene encoding one of the subunits of SDH (ie, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, or *SDHD*), here collectively designated as *SDHx*, either as a part of Carney-Stratakis syndrome (familial paraganglioma-GIST syndrome) or in a sporadic nonsyndromic setting.<sup>4,5</sup> Then, SDHB expression may be lost even in *SDHx* wild-type GISTs. Some of these *SDHx* wild-type GISTs occur in the setting of Carney triad.<sup>5</sup> Despite the wide spectrum of possible clinical and molecular genetic features of the group of SDHB-deficient GISTs (also called pediatric-type GISTs by others),<sup>3</sup> their morphologic appearance is quite characteristic. These tumors are commonly multifocal, epithelioid, and often organized into nodules or plexiform structures. They frequently give rise to lymph node metastases. Unfortunately, their sensitivity to imatinib treatment is very low if any, and their biological behavior does not correlate with their size and mitotic index. To the best of our knowledge, all SDHB-deficient GISTs reported up to now have occurred in the stomach, and *SDHx* and *KIT*/

*PDGFRA* mutations were considered mutually exclusive.<sup>6</sup>

We report a case of GIST presenting as a mass measuring 13.9 × 7.6 × 10.4 cm located in the posterior mediastinum of a 52-year-old white man. The patient underwent tumor extirpation in 2009. Relationship to the outer layer of the distal esophagus could not have been excluded by the surgeon. Primary diagnosis by a regional general pathologist was pleomorphic rhabdomyosarcoma due to focal and faint immunopositivity of desmin. Therefore, he was not treated with imatinib or any other receptor tyrosine kinase inhibitor. Eighteen months later, subdiaphragmatic metastases were found on positron emission tomography/computed tomography, and surgical resection of the distal esophagus, proximal stomach with the greater and lesser omentum, and spleen was performed. Subsequent histologic evaluation of the submitted material at our department revealed 8 nodules of GIST in the greater omentum with no involvement of the esophagus, stomach, or spleen. Histologically, the tumor consisted of epithelioid cells with abundant finely granular cytoplasm (Fig. 1A). Immunohistochemically, the cells were negative on immunostaining for cytokeratins, S100 protein, HMB-45, smooth muscle actin, desmin, myogenin, OCT3/4, and SALL1. In contrast, KIT staining was strikingly positive (Fig. 1B). SDHB staining was only focal and faint. Surprisingly, molecular genetic analysis revealed not only p.W557\_K558 deletion in exon 11 of the *KIT* gene but also p.G12S sequence change in exon 1 of the *SDHD* gene. The results were compared with the material obtained from the primary tumor of the mediastinum and showed no differences. Although this *SDHD* sequence change is currently of questionable pathogenicity, its prevalence is slightly higher in GISTs or paragangliomas than in the control population.<sup>1</sup> Neither existing genetic databases nor current literature provides information on the impact of this sequence change. However, the finely granular appearance of the cytoplasm of the neoplastic cells resembling poorly de-

veloped oncocytes, together with striking contrast between faint immunohistochemical positivity of SDHB (Fig. 1C) and strong granular positivity of antimitochondrial antigen antibody (Fig. 1D), may mirror pseudohypoxia resulting from destabilization of the SDH complex due to the *SDHD* G12S sequence change. Thus, it is possible that mutations in *SDHx* genes and *KIT*/*PDGFRA* are not necessarily mutually exclusive and that they may even cooperate in tumor progression. Furthermore, this case may represent the first description of extragastric SDHB-deficient GIST, because mediastinal localization of the tumor favors its possible esophageal origin over its relationship to the gastric wall.

**Daum Ondrej, MD, PhD\***

**Sedivcova Monika, Ing†**

**Dubova Magdalena\***

**Michal Michal, MD\***

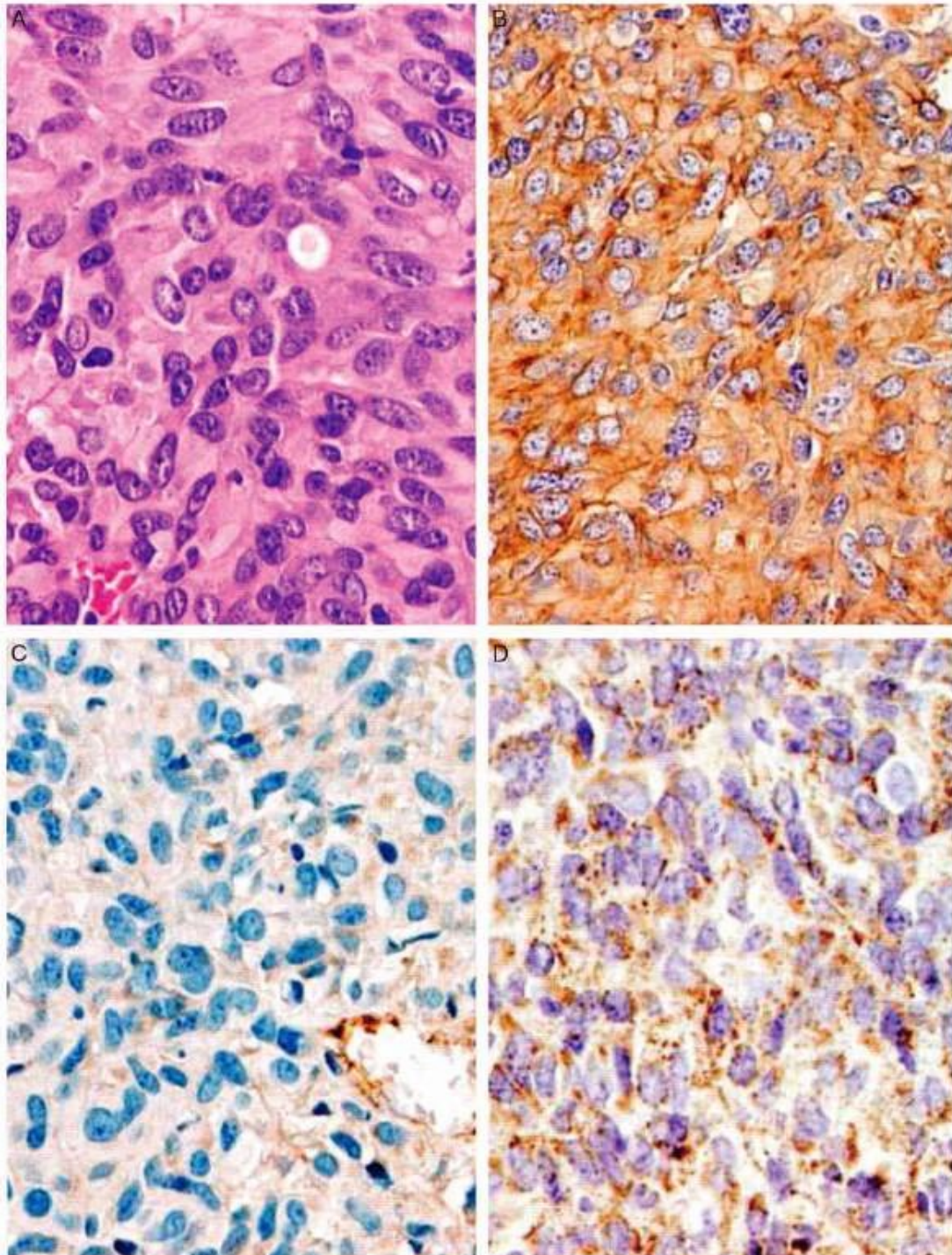
\*Sikl's Department of Pathology, Medical Faculty Hospital, Charles University Plzen

†Biopticka laborator, Plzen Czech Republic

### **REFERENCES**

1. 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.
2. Gill AJ, Chou A, Vilain R, et al. Immunohistochemistry for SDHB divides gastrointestinal stromal tumors (GISTs) into 2 distinct types. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:636-644.
3. Rege TA, Wagner AJ, Corless CL, et al. "Pediatric-type" gastrointestinal stromal tumors in adults: distinctive histology predicts genotype and clinical behavior. *Am J Surg Pathol*. 2011;35:495-504.
4. Pantaleo MA, Astolfi A, Indio V, et al. *SDHA* loss-of-function mutations in *KIT*/*PDGFRA* wild-type gastrointestinal stromal tumors identified by massively parallel sequencing. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103:983-987.
5. Gaal J, Stratakis CA, Carney JA, et al. SDHB immunohistochemistry: a useful tool in the diagnosis of Carney-Stratakis and Carney triad gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol*. 2011;24:147-151.
6. Miettinen M, Wang ZF, Sarlomo-Rikala M, et al. 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;35:1712-1721.

The authors declare no conflict of interest.



**FIGURE 1.** A–D, The tumor is composed of plump spindle-to-epithelioid cells with abundant cytoplasm containing finely granular eosinophilic material (A). KIT staining shows diffuse moderate membranous and focal strong cytoplasmic positivity (B). In contrast, SDHB staining is only faint and focal when compared with endothelial cells serving as positive control (C) and with coarsely granular positivity of antimitochondrial antigen antibody (D).



2.2 Dubova M., Sedivcova M., Michal M., Kokoskova B., Ryska A., Smid D., Daum O. (2015): **Utility of immunohistochemical investigation of SDHB and molecular genetic analysis of SDH genes in the differential diagnosis of mesenchymal tumors of GIT.**

Cíl práce

- Imunohistochemické vyšetření exprese SDHB a ověření přítomnosti mutací genů kódujících mitochondriální sukcinátdehydrogenázu molekulárně genetickým vyšetřením v nádorech, které vstupují do diferenciální diagnostiky GISTu.

Souhrn

Do studie bylo zařazeno 11 *KIT/PDGFR*A wt GISTů, 12 schwannomů žaludku (GS), 20 solitárních fibrózních tumorů (SFT), 4 leiomyomy (LM), 16 leiomyosarkomů (LMS), 5 synoviálních sarkomů (SS), 3 endometriální stromální sarkomy (ESS) a 1 inflammatorní myofibroblastický tumor ilea (IMT). Jako kontroly byly použity 3 sporadické GISTy s prokázanou mutací *KIT/PDGFR*A. Všechny vzorky byly zpracovány standardním způsobem a následně obarveny protilátkou SDHB, k vyloučení falešné negativy byly použity dva různé klony této protilátky (polyclonal, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 21A11, 1:100, Abcam, Cambridge, MA), jako vnitřní kontrola posloužily nenádorové endotelové buňky. DNA pro molekulárně genetické vyšetření kódujících sekvencí genů *KIT*, *PDGFR*A, *SDHB*, *SDHC* a *SDHD* byla extrahována z parafinových bloků (NucleoSpin® Tissue Kit - MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany) a analyzována pomocí PCR a metody přímého sekvenování.

Žádný z vyšetřovaných mezenchymálních nádorů kromě GISTu nebyl skutečně SDHB negativní. U žádného GS, LM, LMS, SS, ESS ani IMT nebyly prokázány mutace v genech

*SDHB*, *SDHC* či *SDHD*. Pouze ve 2 GISTech a 2 SFT byly nalezeny sekvenční změny v genech *SDHB* (p.S163P) a *SDHD* (p.G12S).

Význam těchto změn je prozatím nejasný. Vzhledem k tomu, že 3 z těchto tumorů byly *SDHB* pozitivní, jeden GIST (popsaný výše – viz 2.1) měl mutaci genu *KIT* a navíc byla změna sekvence genu *SDHD* pozorována i v nenádorové tkáni tohoto pacienta, nejedná se pravděpodobně o pravé iniciační mutace, nýbrž o změny charakteru polymorfizmu, které by mohly vést k narušení mitochondriálního metabolismu a přispívat k růstu tumoru iniciovanému jinými mutacemi.

Z této práce dále vyplývá, že hodnocení *SDHB* positivity/negativity v mezenchymálních nádorech trávicího traktu je poměrně obtížné a může být zatíženo subjektivní chybou vzhledem k přítomnosti malého množství cytoplazmy v nádorových buňkách, absenci vnitřní kontroly i použitím klonu protilátky.

# Utility of immunohistochemical investigation of SDHB and molecular genetic analysis of *SDH* genes in the differential diagnosis of mesenchymal tumors of GIT

M. Dubova<sup>1</sup>, M. Sedivcova<sup>2</sup>, M. Michal<sup>1</sup>, B. Kokoskova<sup>1,2</sup>, A. Ryska<sup>3</sup>, D. Smid<sup>4</sup> and O. Daum<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Sikl's Department of Pathology, Medical Faculty Hospital, Charles University, Plzen, <sup>2</sup>Biopsticka laborator s.r.o., Plzen, <sup>3</sup>The Fingerland Department of Pathology, University Hospital, Hradec Kralove and <sup>4</sup>Surgical Clinic, Medical Faculty Hospital, Charles University, Plzen, Czech Republic

**Summary.** Loss of expression of beta subunit of succinate dehydrogenase (SDHB) was proved to be present in a subgroup of *KIT/PDGFR*A wt gastrointestinal stromal tumors (GISTs). To evaluate possible diagnostic utility of SDHB immunohisto-chemistry in the differential diagnostics of mesenchymal tumors of gastrointestinal tract (GIT), 11 cases of *KIT/PDGFR*A wt GISTs, 12 gastric schwannomas (GSs), 20 solitary fibrous tumors (SFTs), 4 leiomyomas (LMs), 16 leiomyosarcomas (LMSs), 5 synovial sarcomas (SSs), 3 endometrioid stromal sarcomas (ESSs), and 1 ileal inflammatory myofibroblastic tumor (IMT) were investigated for SDHB immunopositivity together with molecular genetic analysis of genes encoding succinate dehydrogenase (*SDH*). Three recent cases of *KIT/PDGFR*A mutant GISTs were used as controls. Among the 11 *KIT/PDGFR*A wt GISTs, 6 expressed SDHB, 1 of them harboring a sequence change of *SDHD*. All SDHB-negative cases were *SDHB-D* wt. In 1 of the control GIST cases molecular genetic analysis revealed an *SDHD* sequence change in addition to a mutation in *KIT* exon 11. No SFT was truly SDHB-negative, but in 2 of them the staining was impossible to analyze. Furthermore, 1 SFT carried an *SDHB* and another 1 *SDHD* sequence change. All GSs, LMs, LMSs, SSs, ESSs, and IMT were SDHB-positive or non-analyzable, and *SDHB-D* wt.

Additional factors may play a role in regulating expression of SDHB. Furthermore, SDHB immuno-

histochemistry alone may be misleading in excluding tumors other than GIST (especially SFT) in the differential diagnosis of *KIT/PDGFR*A wt mesenchymal tumors of GIT.

**Key words:** GIST, Stromal tumor, KIT, PDGFRA, SDH

## Introduction

Succinate dehydrogenase (SDH), also known as mitochondrial complex II, is an enzyme complex located in the inner mitochondrial membrane, which consists of four main subunits (SDHA, SDHB, SDHC, and SDHD), assembly factors (SDHAF1, SDHAF2), iron-sulphur centers, and ubiquinone. It participates in the electron transport chain and Krebs cycle by catalyzing oxidative dehydrogenation of succinate to fumarate (Gottlieb and Tomlinson, 2005). As immunopositivity of SDHB is dependent on complete assembly of the whole SDH complex, the immunohistochemical investigation of SDHB represents an important source of information on function of the enzyme complex. The SDHB protein is normally ubiquitously expressed, whereas its loss reflects dysfunction of the SDH complex. Such a dysfunction caused by loss-of-function mutations of the genes encoding individual subunits of SDH (i.e. *SDHx* genes) was first described in familial paraganglioma/pheochromocytoma syndrome (Baysal et al., 2000; Niemann and Muller, 2000; Astuti et al., 2001a,b; van Nederveen et al., 2009).

In 2007, germline mutations of *SDHx* and loss of SDHB expression were identified in gastrointestinal

Offprint requests to: Ondrej Daum, M.D., Ph.D., Sikl's Department of Pathology, Medical Faculty Hospital, Charles University, Edvarda Benese 13, Plzen, 305 99, Czech Republic. e-mail: daum@fnplzen.cz

stromal tumors (GISTs) in patients with Carney-Stratakis syndrome (McWhinney et al., 2007; Pasini et al., 2008). Since then, loss of SDHB expression was reported to occur also in other GISTs lacking mutations of genes encoding receptor tyrosine kinases KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR $\alpha$ ), i. e. so-called *KIT* and *PDGFRA* wild-type (*KIT/PDGFR* wt) GISTs, and immunoexpression of SDHB became a standard tool used to discriminate between SDHB-positive GISTs driven by activation of KIT/ PDGFR $\alpha$  pathway, and SDHB-deficient GISTs which represent a different clinical, genetical and therapeutical entity (Agaimy et al., 2009; Gill et al., 2010, 2011a; Gaal et al., 2011; Miettinen et al., 2011; Rege et al., 2011; Barletta and Hornick, 2012; Doyle et al., 2012).

However, little is known about expression of SDHB in other *KIT/PDGFR* wt mesenchymal tumors of gastrointestinal tract (GIT). Therefore, we performed the study on expression of SDHB in GISTs and their mimics. Furthermore, we correlated SDHB-status with molecular genetic profile of the tumors.

## Materials and methods

Eleven cases of *KIT/PDGFR* wt GISTs (7 gastric, 4 intestinal), 12 gastric schwannomas (GSs), 20 solitary fibrous tumors (SFTs), 4 leiomyomas (LMs), 16 leiomyosarcomas (LMSs), 5 synovial sarcomas (SSs), 3 endometrioid stromal sarcomas (ESSs), and 1 ileal inflammatory myofibroblastic tumor (IMT) were retrieved from our archives. Three recent cases of *KIT* or *PDGFRA* mut GISTs were used as control cases.

Tissue for light microscopy was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin using routine procedures. Five micrometer-thick sections were cut from the tissue blocks and stained with hematoxylin and eosin.

For immunohistochemical investigations the following primary antibodies were used: SDHB (polyclonal, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), SDHB (21A11, 1:100, Abcam, Cambridge, MA), DOG-1 (K9, RTU, Novocastra, Newcastle, UK), Stat6 (S20) (polyclonal, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). No special pretreatment was used. The primary antibodies were visualized using the supersensitive streptavidin-biotin-peroxidase complex (Biogenex, San Ramon, CA). Appropriate positive and negative control slides were employed. Furthermore, non-neoplastic mucosal epithelial or endothelial cells were used as internal positive control. Samples negative in staining with the polyclonal anti-SDHB antibody by Santa Cruz were then stained with the monoclonal antibody by Abcam. Only those samples that did not stain with any of the antibodies, but showed indubitable granular cytoplasmic positivity of intratumoral endothelial cells with at least one of the antibodies, were regarded as SDHB-negative. In the absence of endothelial staining, the sample was labeled as non-analyzable (NA). The diagnosis of SFT

was then proved by immunoexpression of Stat6 and absence of staining with DOG-1 antibody in SDHB-cases.

DNA for molecular genetic investigation was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Several 5  $\mu$ m thick sections were placed on the slides. Hematoxylin and eosin stained slides were examined for determination of area of tumor tissue. Then, tumor tissue from unstained slides was scraped and DNA was isolated by the NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol. Mutational analysis of coding sequence, including exon-intron junctions of *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD* genes was performed by PCR and direct sequencing. In GIST cases, analysis of exons 9, 11, 13 and 17 of the *KIT* gene (accession number U63834), exons 12, 14 and 18 of the *PDGFRA* gene (accession number D50017) was performed as well.

In GIST cases, their pattern (spindled, mixed, epithelioid) was compared with previous markers.

## Results

### GISTs

All GIST cases used in the study were previously defined on the basis of their morphology and pattern of immunoexpression of KIT (CD117), desmin, and S-100 protein, either during routine daily service or in consultation practice. Basic clinical and morphological features of the investigated GISTs are summarized in Table 1. SDHB status was investigated in two steps. In the first step, the Santa Cruz anti-SDHB antibody was used in all cases. As the second step, all SDHB-negative or questionable cases were stained with the Abcam monoclonal anti-SDHB antibody.

Immunohistochemical and molecular genetic

**Table 1.** Clinicopathologic features of GISTs.

No.	Localization	Gender and age	Pattern	Size (cm)	MI
1	stomach	F, 47	mixed	14	1
2	stomach	F, 63	spindle	?	10
3	stomach	F, 43	mixed	7	5
4	stomach	F, 76	mixed	2	2
5	stomach	F, 70	spindle	10	2
6	stomach	M, 62	spindle	7	0
7	stomach	F, 48	epithelioid	6	2
8	stomach	F, 12	mixed	?	10
9	small intestine	M, 75	epithelioid	6	133
10	small intestine	F, 30	epithelioid	7	0
11	small intestine	M, 46	spindle	5	5
12	small intestine	F, 51	mixed	2	4
13	small intestine	M, 60	mixed	2.5	0
14	mediastinum	M, 52	epithelioid	15	25

M, male; F, female; MI, mitotic index (number of mitoses per 5 mm<sup>2</sup>); ?, unknown

## SDHB in the differential diagnostics of GIST

features of the tumors are summarized in Table 2. Briefly, of the 11 GIST *KIT*/*PDGFRA* wt cases, 6 tumors were SDHB+ and 5 were SDHB- when stained with the Santa Cruz antibody. Three of the SDHB- tumors were localized in stomach, 2 of those showed mixed pattern and 1 displayed epithelioid morphology. Two SDHB-GISTs were located in the small intestine, 1 of them being of mixed, the other one of epithelioid cell morphology (Fig. 1). SDHB negativity was confirmed by the Abcam antibody in only one female pediatric gastric GIST of mixed morphology, which was found to be *SDHB-D* wt (Fig. 2). On the contrary, one of the SDHB+ gastric GISTs harbored an SDHB sequence

change in exon 1 (G12S). Other tumors showed no SDHB-D genetic changes.

Of the three *KIT* or *PDGFRA* mut GISTs, which were used as control cases, only 1 was SDHB-negative (Fig. 3), although this case was also shown to bear G12S change in exon 1 of *SDHD* gene in addition to W557\_K558 deletion in exon 11 of *KIT* gene.

All cases were KIT-positive, regardless of their SDHB-status. Membranous pattern was more prominent in tumors composed of spindle-shaped cells (Cases 2, 5, 6 and 11), whereas in epithelioid tumors or epithelioid cells of mixed tumors the dot-like cytoplasmic pattern was more eye-catching. There was no significant difference in KIT staining between SDHB- cases 8 and 14 and other cases.

**Table 2.** Immunohistochemical and molecular genetic features of GISTs.

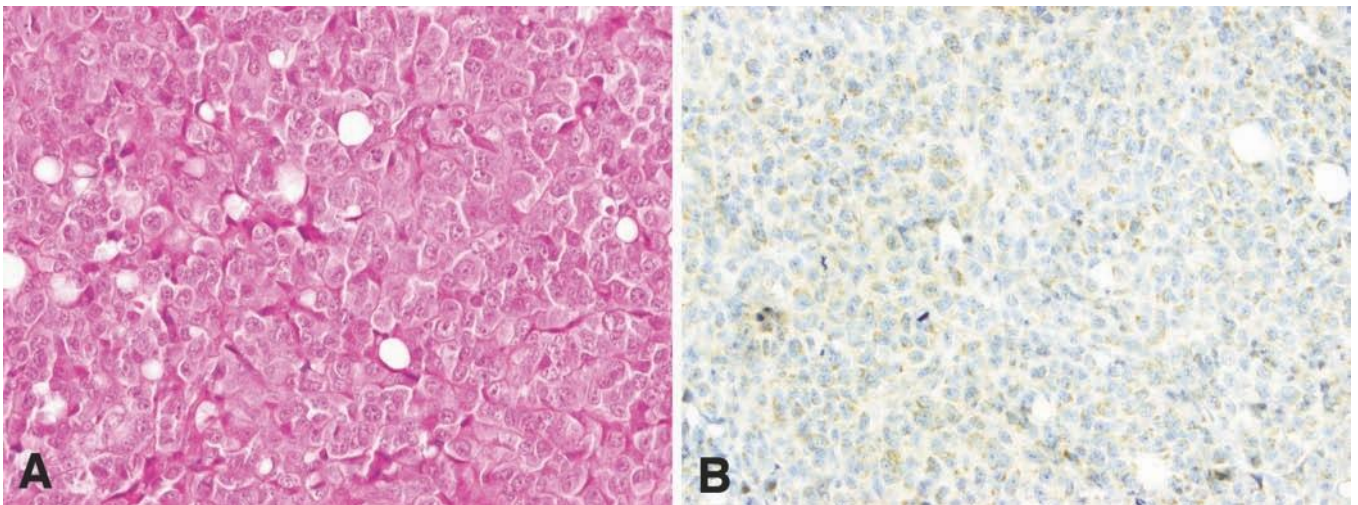
No.	Mutational profile	SDHB	
		Santa Cruz	Abcam
1	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHD</i> p.G12S	+	
2	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> NA	+	
3	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> NA	NA	NA
4	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> p.D842V, <i>SDHB-D</i> wt	+	
5	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> wt	+	
6	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> NA	+	
7	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> NA	NA	NA
8	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> wt	-	-
9	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> NA	+	
10	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHx</i> wt	+	
11	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> NA	NA	NA
12	<i>KIT</i> p.W557_E561del, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> wt	-	+
13	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> NA	NA	NA
14	<i>KIT</i> p. W557_K558del, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHD</i> p.G12S	-	-

NA, not analyzable; *SDHB-D*, genes *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD*; wt, wild type

**Table 3.** Schwannomas.

No.	Sex and age	Size (cm)	<i>SDHB-D</i> status	SDHB Santa Cruz	SDHB Abcam
1	F, 77	4.5	wt	+	
2	F, 74	7	wt	+	
3	M, 16	?	NA	+	
4	F, 88	2.5	wt	+	
5	F, 64	4	wt	+	
6	M, 82	3	wt	+	
7	F, 46	3.5	wt	+	
8	F, 80	?	wt	+	
9	M, 47	?	wt	+	
10	M, 43	3.5	wt	+	
11	F, 26	?	wt	NA	NA
12	M, 63	?	wt	NA	NA

M, male; F, female; ?, unknown; NA, not analyzable; *SDHB-D*, genes *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD*; wt, wild type



**Fig. 1.** GIST Case 9 was located in the small intestine, composed of epithelioid cells, with numerous mitoses (A, H&E), and with striking granular SDHB positivity (B, SDHB Santa Cruz). x 200

### Gastric schwannomas

Of the 12 GSs used in the study, 10 showed at least focal granular staining of neoplastic cells with at least one anti-SDHB antibody (Fig. 4). The 2 remaining cases were found to be impossible to analyze due to the lack of staining of endothelial cells. Eleven tumors were *SDHB-D* wt, only 1 sample was non-analyzable due to poor quality of DNA (Table 3).

### Solitary fibrous tumors

Clinicopathological, immunohistochemical and molecular genetic data are shown in Table 4. In summary, none of the cases was proved to be *SDHB*-, although 2 cases had to be categorized as non-analyzable due to the lack of staining of endothelial cells. However, it has to be stressed that interpretation of *SDHB* staining was extremely difficult in some cases because of small

**Table 4.** Solitary fibrous tumors.

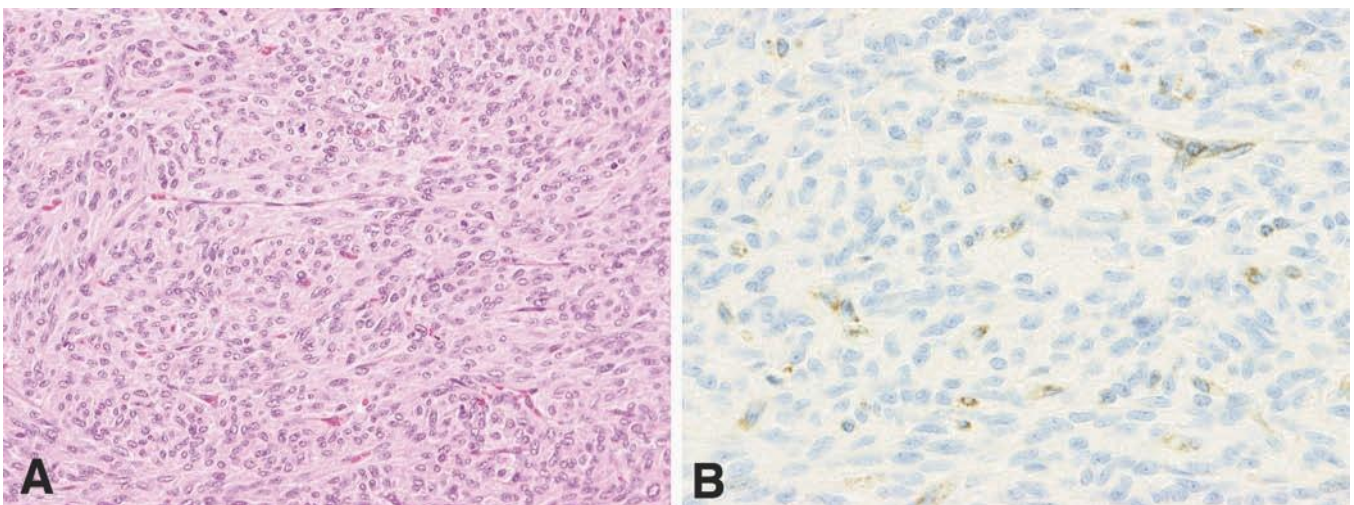
No.	Sex and age	Size (cm)	<i>SDHB-D</i> status	<i>SDHB</i> Santa Cruz	<i>SDHB</i> Abcam
1	M, 33	?	wt	+	
2	M, 59	?	wt	+	
3	F, 45	2	wt	-	+
4	F, 80	"large"	wt	+	
5	M, 74	21	wt	+	
6	F, 55	2.2	wt	+	
7	F, 59	5.5	wt	+	
8	M, 51	6.7	wt	+	
9	M, 77	11	<i>SDHB</i> p.S163P	-	+
10	M, 70	7	wt	+	
11	M, 66	17	wt	+	
12	F, 48	?	NA	-	+
13	F, 73	7	NA	NA	NA
14	M, 48	12	<i>SDHD</i> p.G12S	+	
15	F, 71	19	wt	+	
16	F, 74	?	wt	+	
17	F, 55	?	wt	NA	NA
18	F, 29	17	wt	+	
19	F, 28	"large"	wt	+	
20	F, 67	4	wt	+	

M, male; F, female; ?, unknown; NA, not analyzable; *SDHB-D*, genes *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD*; wt, wild type

**Table 5.** Smooth muscle tumors.

No.	Sex and age	Diagnosis	Size (cm)	<i>SDHB-D</i> status	<i>SDHB</i> Santa Cruz	<i>SDHB</i> Abcam
1	F, 69	LM	4.7	wt	+	
2	M, 36	LM	10	wt	-	+
3	M, 61	LM	7	wt	+	
4	F, 58	LM	1.2	NA	+	
5	F, 35	LMS	4	wt	+	
6	F, 38	LMS	3.5	wt	-	+
7	F, 60	LMS	12	wt	+	
8	F, 56	LMS	?	wt	+	
9	F, 65	LMS	?	NA	+	
10	F, 77	LMS	?	wt	+	
11	F, 49	LMS	9	wt	+	
12	F, 75	LMS	12	wt	+	
13	M, 41	LMS	?	wt	+	
14	M, 74	LMS	?	wt	-	+
15	M, 71	LMS	7.5	wt	+	
16	M, 59	LMS	2	NA	+	
17	F, 69	LMS	3.5	wt	+	
18	M, 65	LMS	?	NA	+	
19	F, 77	LMS	?	NA	+	
20	F, 66	LMS	5	wt	+	

M, male; F, female; LM, leiomyoma; LMS, leiomyosarcoma; ?, unknown; NA, not analyzable; *SDHB-D*, genes *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD*; wt, wild type



**Fig. 2.** Gastric pediatric GIST Case 8 displayed mixed cellular morphology (A, H&E), with the neoplastic cells showing no *SDHB* staining in contrast to positive endothelial cells and scattered infiltrating leucocytes (B, *SDHB* Abcam). A, x 100; B, x 200

volume of the cytoplasm of neoplastic cells. DNA quality was sufficient for *SDHB-D* analysis in 18 cases. Of those, 2 showed gene sequence changes, namely G12S change in *SDHD* (Fig. 5) and S163P in *SDHB*. Both cases were SDHB-positive.

#### Smooth muscle tumors

LMs and LMSs are grouped together in Table 5. Generally, all tumors were SDHB-positive, although usually the staining was difficult to interpret, mainly in slender spindle shaped cells. All samples with sufficient quality of DNA were *SDHB-D* wt.

#### Synovial sarcomas, endometrial stromal sarcomas, and inflammatory myofibroblastic tumor

Due to the low number of cases, all 5 SSs, 3 ESSs, and 1 IMT are lumped together in Table 6. Briefly, expression of SDHB was difficult to evaluate as all tumors were composed of short spindled cells with diminutive amount of cytoplasm, although on thorough investigation all were finally found to be at least focally SDHB+. All but 1 SS and 1 ESS were successfully tested for *SDHB-D* mutations, with negative results in all tested SSs, ESSs and IMT.

#### Discussion

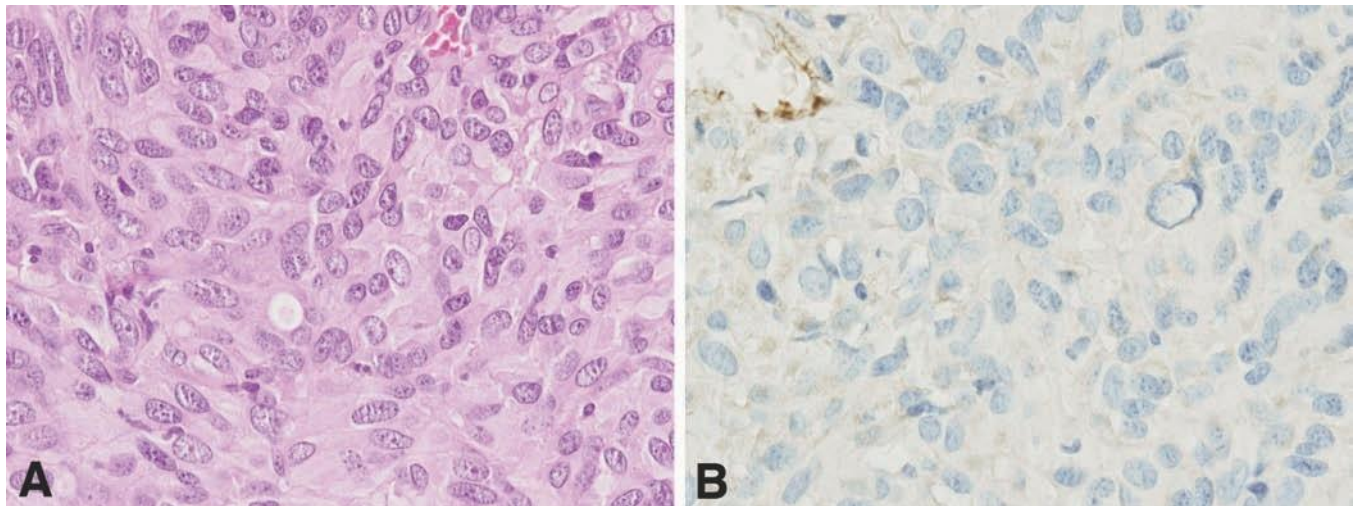
The majority of GISTs harbor mutations in *KIT* or *PDGFRA* leading to ligand-independent activation of the respective receptor tyrosine kinases (Hirota et al., 1998, 2003; Heinrich et al., 2003). However, about 15% of GISTs occurring in adults and 90% of GISTs in children lack *KIT* and *PDGFRA* mutations (Corless et al., 2004;

Agaram et al., 2008). A considerable number of such cases is associated with SDH complex dysfunction. It is estimated that 7.5% of all GISTs belong to this category, which is characterized by lack of SDHB-immunostaining, and thus referred to as SDHB-deficient GISTs (previously also type 2 GISTs and pediatric type GISTs) (Miettinen et al., 2011). SDHB-deficient GISTs can be further divided according to their clinical and molecular genetic features into several groups. Carney-Stratakis syndrome is a dyad of gastric GIST and paraganglioma inherited in an autosomal dominant trait, caused by a germ-line mutation of *SDHx* (Carney and Stratakis, 2002; Pasini et al., 2008). It affects mainly young people with no sex predilection. On the other hand, Carney triad lacks familial occurrence, shows striking female predominance, and despite its SDHB-

**Table 6.** Synovial sarcomas, endometrial stromal sarcomas, and inflammatory myofibroblastic tumors.

No.	Sex and age	Diagnosis	Size (cm)	<i>SDHB-D</i> status	SDHB Santa Cruz	SDHB Abcam
1	M, 30	biphasic SS	?	wt	+	
2	M, 34	monophasic SS	3	NA	+	
3	M, 41	monophasic SS	?	wt	+	
4	M, 29	biphasic SS	?	wt	-	+
5	M, 32	monophasic SS	7	wt	+	
6	F, 63	ESS	5	wt	+	
7	F, 38	ESS	2	NA	+	
8	F, 61	ESS	8.5	wt	+	
9	F, 7	IMT	?	wt	+	

M, male; F, female; SS, synovial sarcoma; ESS, endometrial stromal sarcoma; IMT, inflammatory myofibroblastic tumor; ?, unknown; NA, not analyzable; *SDHB-D*, genes *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD*; wt, wild type

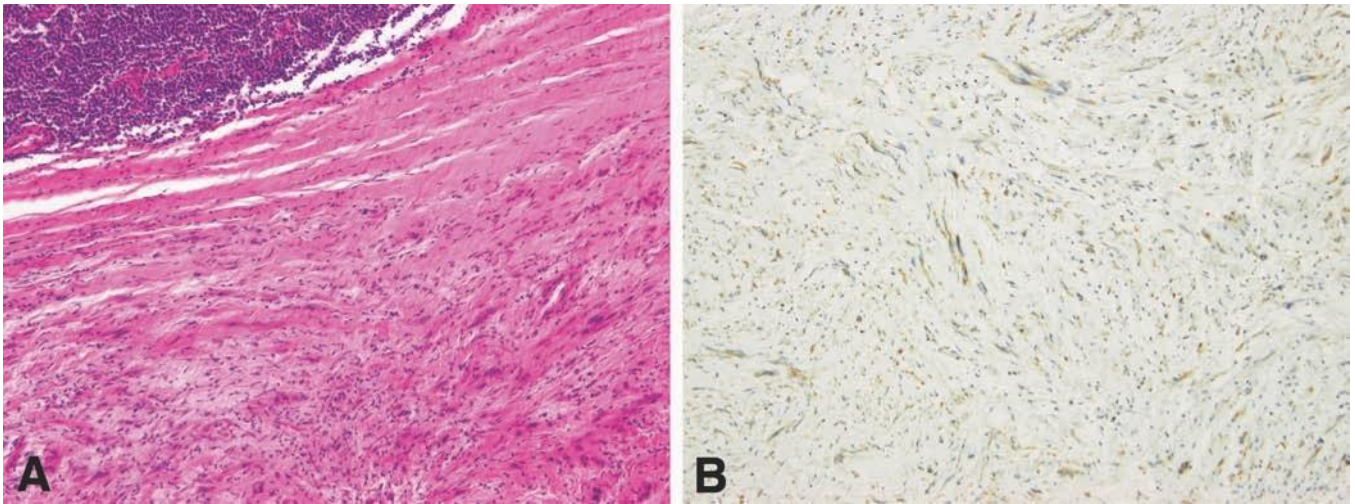


**Fig. 3.** Mediastinal GIST Case 14, which served as a *KIT*-mutated control case, was composed of epithelioid finely granular oncocyte-like cells (A, H&E). The cells showed only faint non-granular SDHB staining much less intensive than in intratumoral endothelial cells or in GIST Case 9 (B, SDHB Abcam).x200

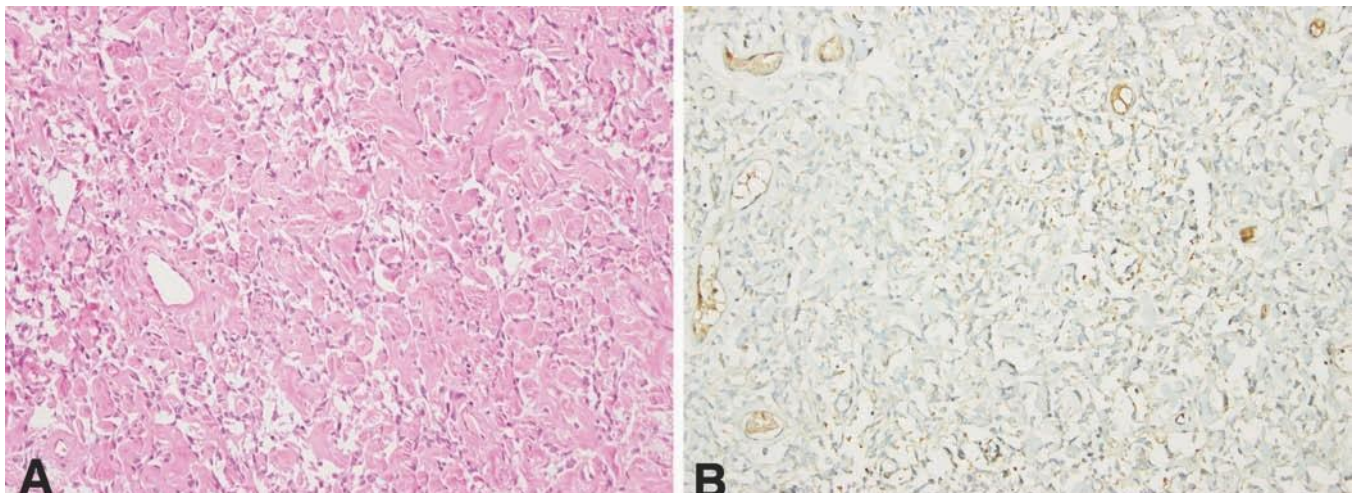
### SDHB in the differential diagnostics of GIST

deficiency, all Carney triad-related tumors were reported to be *SDHx* wt (Carney et al., 1977; Carney, 1979, 1983; Matyakhina et al., 2007). The tumors traditionally associated with Carney triad are gastric GIST, pulmonary chondroma and paraganglioma, but esophageal leiomyoma and adrenocortical adenoma may also be related to this syndrome (Carney, 2009). Furthermore, a subset of apparently non-syndromic sporadic *KIT/PDGFR*A wt GISTs is also associated with SDH complex dysfunction (Gill et al., 2010, 2011a; Rege et al., 2011). Such tumors occur mainly in children and despite their sporadic nature they are more commonly caused by a germ-line rather than somatic

*SDHx* mutation (Janeway et al., 2011; Pantaleo et al., 2011a,b). However, even this category of SDHB-deficient GISTs contains *SDHx* wt tumors, in which the mechanism of their SDH-deficiency remains to be explained (Miettinen et al., 2011; Doyle et al., 2012). Regardless of the exact category of SDHB-deficient GISTs, all such tumors share common clinico-pathological characteristics: gastric localization, epithelioid or mixed cell morphology, multinodular and/or plexiform arrangement, positive KIT immunostaining (but lack of *KIT/PDGFR*A mutations), frequent lymph node metastases, and relatively indolent clinical behavior (Gill et al., 2010).



**Fig. 4.** Gastric schwannoma Case 2 with a peritumoral lymphoid cuff (A, H&E) was composed of SDHB-positive spindle shaped cells (B, SDHB Santa Cruz). x 100



**Fig. 5.** SFT Case 14 composed of short spindle shaped cells intermingled with rosy collagen bundles (A, H&E). The neoplastic cells reacted strongly with anti-SDHB antibody (B, SDHB Santa Cruz). x 100



## SDHB in the differential diagnostics of GIST

Despite the current focus on SDHB-deficient GIST, it is not the only tumor type associated with SDH complex dysfunction. In addition to paraganglioma/pheochromocytoma, which is also well known to occur in an SDHB-deficient form, either in familial or sporadic setting (Gimm et al., 2000; Amar et al., 2005; Mannelli et al., 2009), several other tumors were recently reported to display signs of SDH dysfunction, namely rare renal cell carcinomas (Vanharanta et al., 2004; Ricketts et al., 2008; Gill et al., 2011b,c), pituitary adenoma (Xekouki et al., 2012), and seminoma (Galera-Ruiz et al., 2008). Besides that, neuroblastoma (Schimke et al., 2010), papillary thyroid carcinoma (Neumann et al., 2004), and renal oncocytoma (Henderson et al., 2009) were suggested to be also possible candidates for SDH-deficient tumors, although with no direct immunohistochemical or molecular genetic support.

As we were unaware of any study on SDHB immunoeexpression and/or SDHx mutational analysis of mesenchymal tumors which come into the differential diagnosis of GIST, we collected a short series of the most important GIST mimickers, namely 12 GSs, 20 SFTs, 4 LMs, 16 LMSs, 5 SSs, 3 ESSs, and 1 IMT. For comparison, 11 cases of *KIT/PDGFR* wt GISTs (7 gastric, 4 intestinal) were studied as well. Moreover, 3 recent cases of *KIT* or *PDGFR* mut GISTs were used as control cases.

Originally, we classified tumors as SDHB-negative if they showed a lack of staining of neoplastic cells by the Santa Cruz antibody despite positive staining of epithelial cells on the mucosal surface. Using this approach, the category of SDHB-negative tumors included: 7 GISTs (3 gastric, 3 intestinal, and 1 mediastinal), 2 GSs, 5 SFTs, 1 LM, 2 LMSs, and 1 SS. However, on closer inspection in some cases it was found out that intratumoral endothelial cells were also negative. This prompted us to stain the negative cases with monoclonal Abcam antibody. In this setting, endothelial cells were used as internal control. This second round of immunohistochemical investigation reduced the group of SDHB-deficient tumors to 2 GISTs (1 gastric, 1 mediastinal). Others tumors were either reclassified as SDHB-positive or signed out as non-analyzable due to the lack of endothelial staining.

The gastric case, which was SDHB-deficient (GIST Case 8, Fig. 2), occurred in a 12-year old girl with no familial history of a GIST or paraganglioma. At the time of diagnosis, there were no signs of a possible pulmonary chondroma or paraganglioma on record. Molecular genetic analysis ruled out mutations in the hot spots of *KIT*, *PDGFR*, *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD*. According to our current state of knowledge, the tumor should be then ruled out to harbor *SDHA* mutations, either indirectly by *SDHA* immunohistochemistry or directly by mutational analysis (Pantaleo et al., 2011a,b; Wagner et al., 2013). However, as the issue of *SDHA* status was beyond the scope of this study (SDHB expression in gastrointestinal mesenchymal tumors), the cost/benefit ratio of such an analysis was found to be

unreasonably high.

The other SDHB-deficient tumor was already published as a case report (Daum et al., 2012). Briefly, GIST Case 14 presented as a mass measuring 13.9x7.6x10.4 cm located in the posterior mediastinum of a 52-year-old white man. The tumor consisted of epithelioid cells with abundant finely granular cytoplasm (Fig. 3). Immunohistochemically, the cells were strikingly immunoreactive with CD117 and antimito-chondrial antibody. SDHB staining was only focal and faint, without the characteristic granular pattern. Surprisingly, molecular genetic analysis revealed not only p.W557-K558 deletion in exon 11 of the *KIT* gene but also p.G12S sequence change in exon 1 of the *SDHD* gene. Although this *SDHD* sequence change is currently of questionable pathogenicity, its prevalence is slightly higher in GISTs or paragangliomas than in the control population (Janeway et al., 2011). Neither existing genetic databases nor current literature provides information on the impact of this sequence change. However, the finely granular appearance of the cytoplasm of the neoplastic cells resembling oncocytes, together with striking contrast between faint immunohistochemical positivity of SDHB and strong granular positivity of antimito-chondrial antigen antibody, may mirror pseudohypoxia resulting from partial destabilization of the SDH complex due to the *SDHD* G12S sequence change. The incomplete nature of such destabilization might be also responsible for the residual faint focal staining which differs from both typical positive and negative cases. Thus, it is possible that at least some sequence changes in *SDHx* genes and *KIT/PDGFR* mutations are not necessarily mutually exclusive and that they may even cooperate in tumor progression. Nevertheless, the fact that GIST Case 1, which was undoubtedly SDHB-positive, harbored the same *SDHD* sequence, casts doubt on this theory, although the additional effect of several minor factors cannot be ruled out. Furthermore, the striking oncocyte-like appearance was not observed in other *SDHx* sequence change-positive GIST and SFTs.

No other intraabdominal mesenchymal tumor (namely GS, SFT, LM, LMS, SS, ESS, IMT) was found to be SDHB-deficient if strict criteria (negative reaction of neoplastic cells with two antibodies and positive granular intracytoplasmic staining of endothelial cells) were applied. In spite of SDHB-positivity, 2 SFTs revealed SDHB-D sequence changes. SFT Case 9 showed p.S163P of *SDHB*, and SFT Case 14 harbored p.G12S of *SDHD*.

The significance of *SDHB* and *SDHD* sequence changes detected in 2 GISTs and 2 SFTs remains unclear. As 3 of the tumors were SDHB-positive, and 1 GIST harbored concurrent *KIT* mutation, they can hardly be viewed as “real” oncogenic mutations. The non-neoplastic tissue in GIST Case 14 was proven to contain the same gene sequence as the neoplastic cells did, which, in that setting, speaks more for the possibility of polymorphism than for germ-line mutation. But even

this circumstance does not rule out the possible role of detected changes with certainty. Unfortunately, the other *SDHx* sequence change-positive cases were consultation cases and no non-neoplastic tissue was available for analysis. The precise mechanisms by which SDH complex dysfunction leads to tumor formation have not yet been fully elucidated. An important role is believed to be played by succinate accumulation leading to stabilization of HIF1-alpha, overexpression of VEGF (Burnichon et al., 2010), and alteration of DNA methylation profiles (Killian et al., 2013; Mason and Hornick, 2013), resulting in angiogenesis and cell proliferation. Although SDH dysregulation is currently viewed as a consequence of an *SDHx* mutation leading to disruption of the whole complex with resultant loss of SDHB expression, the effects of “immunohistochemically silent” sequence changes have not been sufficiently studied yet. Even those subtle structural changes that do not lead to disruption of the enzyme complex may result in a minor decrease of enzyme activity, which may promote tumor growth initiated by another (e. g. *KIT* or *PDGFRA*) mutation. Although the SDHB- tumors are not driven by gain of function mutations of *KIT* or *PDGFRA*, they invariably show immunohistochemical staining for *KIT* protein, a phenomenon which is currently not fully understood (Miettinen et al., 2011). Our study showed no significant difference in *KIT* staining between the SDHB-positive and SDHB-deficient GISTs.

In summary, our study found no intraabdominal mesenchymal tumor other than GIST to be SDHB-deficient. However, analysis of SDHB immun-expression must be performed with caution due to the small amount of cytoplasm in neoplastic cells, mainly in SFTs, smooth muscle tumors, and monophasic SSs. Only intratumoral endothelial cells should be used as internal control because the mucosal epithelium, located usually at the edge of the specimen, may differ in its antigen quality from the more distant neoplastic tissue. In the differential diagnostics, attention also should be paid to other morphological features, as SDHB-deficient GIST should be localized in the stomach, arranged in multinodular/plexiform pattern, composed of epithelioid cells, or mixed in cellular composition. Last but not least, our results raise the suspicion of a possible role of *SDHx* sequence changes of questionable pathogenicity, which may promote tumor growth initiated by another genetic event.

---

*Acknowledgements.* This project has been supported by Ministry of Health grant number IGA NT14227.

---

## References

- Agaimy A., Haller F., Gunawan B., Wunsch P.H. and Fuzesi L. (2009). Distinct biphasic histomorphological pattern in gastrointestinal stromal tumours (GISTs) with common primary mutations but divergent molecular cytogenetic progression. *Histopathology* 54, 295-302.
- Agaram N.P., Laquaglia M.P., Ustun B., Guo T., Wong G.C., Socci N.D., Maki R.G., DeMatteo R.P., Besmer P. and Antonescu C.R. (2008). Molecular characterization of pediatric gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Cancer Res.* 14, 3204-3215.
- Amar L., Bertherat J., Baudin E., Ajzenberg C., Bressac-de Paillerets B., Chabre O., Chamontin B., Delemer B., Giraud S., Murat A., Niccoli-Sire P., Richard S., Rohmer V., Sadoul J.L., Stropf L., Schlumberger M., Bertagna X., Plouin P.F., Jeunemaitre X. and Gimenez-Roqueplo A.P. (2005). Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma. *J. Clin. Oncol.* 23, 8812-8818.
- Astuti D., Douglas F., Lennard T.W., Aligianis I.A., Woodward E.R., Evans D.G., Eng C., Latif F. and Maher E.R. (2001a). Germline SDHD mutation in familial pheochromocytoma. *Lancet* 357, 1181-1182.
- Astuti D., Latif F., Dallol A., Dahia P.L., Douglas F., George E., Skoldberg F., Husebye E.S., Eng C. and Maher E.R. (2001b). Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 49-54.
- Barletta J.A. and Hornick J.L. (2012). Succinate dehydrogenase-deficient tumors: diagnostic advances and clinical implications. *Adv. Anat. Pathol.* 19, 193-203.
- Baysal B.E., Ferrell R.E., Willett-Brozick J.E., Lawrence E.C., Myssiorek D., Bosch A., van der Mey A., Taschner P.E., Rubinstein W.S., Myers E.N., Richard C.W. 3rd, Cornelisse C.J., Devilee P. and Devlin B. (2000). Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 287, 848-851.
- Burnichon N., Briere J.J., Libe R., Vescovo L., Riviere J., Tissier F., Jouanno E., Jeunemaitre X., Benit P., Tzagoloff A., Rustin P., Bertherat J., Favier J. and Gimenez-Roqueplo A.P. (2010). SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3011-3020.
- Carney J.A. (1979). The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma, and pulmonary chondroma. *Cancer* 43, 374-382.
- Carney J.A. (1983). The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, pulmonary chondroma, and functioning extra-adrenal paraganglioma: a five-year review. *Medicine (Baltimore)*. 62, 159-169.
- Carney J.A. (2009). Carney triad: a syndrome featuring paraganglionic, adrenocortical, and possibly other endocrine tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 3656-3662.
- Carney J.A. and Stratakis C.A. (2002). Familial paraganglioma and gastric stromal sarcoma: a new syndrome distinct from the Carney triad. *Am. J. Med. Genet.* 108, 132-139.
- Carney J.A., Sheps S. G., Go V.L. and Gordon H. (1977). The triad of gastric leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma and pulmonary chondroma. *N. Engl. J. Med.* 296, 1517-1518.
- Corless C.L., Fletcher J.A. and Heinrich M.C. (2004). Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J. Clin. Oncol.* 22, 3813-3825.
- Daum O., Sedivcova M., Dubova M. and Michal M. (2012). KIT mutations and sequence changes in genes encoding SDH complex possibly need not be mutually exclusive in gastrointestinal stromal tumors. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 20, 523-524.
- Doyle L.A., Nelson D., Heinrich M.C., Corless C.L. and Hornick J.L. (2012). Loss of succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) expression is limited to a distinctive subset of gastric wild-type

## SDHB in the differential diagnostics of GIST

- gastrointestinal stromal tumours: a comprehensive genotype-phenotype correlation study. *Histopathology* 61, 801-809.
- Gaal J., Stratakis C.A., Carney J.A., Ball E.R., Korpershoek E., Lodish M.B., Levy I., Xekouki P., van Nederveen F.H., den Bakker M.A., O'Sullivan M., Dinjens W.N. and de Krijger R.R. (2011). SDHB immunohistochemistry: a useful tool in the diagnosis of Carney-Stratakis and Carney triad gastrointestinal stromal tumors. *Mod. Pathol.* 24, 147-151.
- Galera-Ruiz H., Gonzalez-Campora R., Rey-Barrera M., Rollon-Mayordomo A., Garcia-Escudero A., Fernandez-Santos J.M., DeMiguel M. and Galera-Davidson H. (2008). W43X SDHD mutation in sporadic head and neck paraganglioma. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 30, 119-123.
- Gill A.J., Chou A., Vilain R., Clarkson A., Lui M., Jin R., Tobias V., Samra J., Goldstein D., Smith C., Sioson L., Parker N., Smith R.C., Sywak M., Sidhu S.B., Wyatt J.M., Robinson B.G., Eckstein R.P., Benn D.E. and Clifton-Bligh R.J. (2010). Immunohistochemistry for SDHB divides gastrointestinal stromal tumors (GISTs) into 2 distinct types. *Am. J. Surg. Pathol.* 34, 636-644.
- Gill A.J., Chou A., Vilain R.E. and Clifton-Bligh R.J. (2011a). "Pediatric-type" gastrointestinal stromal tumors are SDHB negative ("type 2") GISTs. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 1245-1247; author reply 1247-1248.
- Gill A.J., Pachter N.S., Clarkson A., Tucker K.M., Winship I.M., Benn D.E., Robinson B.G. and Clifton-Bligh R. J. (2011b). Renal tumors and hereditary pheochromocytoma-paraganglioma syndrome type 4. *N. Engl. J. Med.* 364, 885-886.
- Gill A.J., Pachter N.S., Chou A., Young B., Clarkson A., Tucker K.M., Winship I.M., Earls P., Benn D.E., Robinson B.G., Fleming S. and Clifton-Bligh R.J. (2011c). Renal tumors associated with germline SDHB mutation show distinctive morphology. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 1578-1585.
- Gimm O., Armanios M., Dziema H., Neumann H.P. and Eng C. (2000). Somatic and occult germ-line mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in nonfamilial pheochromocytoma. *Cancer Res.* 60, 6822-6825.
- Gottlieb E. and Tomlinson I.P. (2005). Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat. Rev. Cancer* 5, 857-866.
- Heinrich M.C., Corless C.L., Duensing A., McGreevey L., Chen C.J., Joseph N., Singer S., Griffith D.J., Haley A., Town A., Demetri G.D., Fletcher C.D. and Fletcher J.A. (2003). PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 299, 708-710.
- Henderson A., Douglas F., Perros P., Morgan C. and Maher E.R. (2009). SDHB-associated renal oncocytoma suggests a broadening of the renal phenotype in hereditary paragangliomatosis. *Fam. Cancer* 8, 257-260.
- Hirota S., Isozaki K., Moriyama Y., Hashimoto K., Nishida T., Ishiguro S., Kawano K., Hanada M., Kurata A., Takeda M., Muhammad Tunio G., Matsuzawa Y., Kanakura Y., Shinomura Y. and Kitamura Y. (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279, 577-580.
- Hirota S., Ohashi A., Nishida T., Isozaki K., Kinoshita K., Shinomura Y. and Kitamura Y. (2003). Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 125, 660-667.
- Janeway K.A., Kim S.Y., Lodish M., Nose V., Rustin P., Gaal J., Dahia P.L., Liegl B., Ball E.R., Raygada M., Lai A.H., Kelly L., Hornick J.L., O'Sullivan M., de Krijger R.R., Dinjens W.N., Demetri G.D., Antonescu C.R., Fletcher J.A., Helman L. and Stratakis C.A. (2011). Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 314-318.
- Killian J.K., Kim S.Y., Miettinen M., Smith C., Merino M., Tsokos M., Quezado M., Smith W.I. Jr, Jahromi M.S., Xekouki P., Szarek E., Walker R.L., Lasota J., Raffeld M., Klotzle B., Wang Z., Jones L., Zhu Y., Wang Y., Waterfall J.J., O'Sullivan M.J., Bibikova M., Pacak K., Stratakis C., Janeway K.A., Schiffman J.D., Fan J.B., Helman L. and Meltzer P.S. (2013). Succinate dehydrogenase mutation underlies global epigenomic divergence in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer discov.* 3, 648-657.
- Mannelli M., Castellano M., Schiavi F., Filetti S., Giacche M., Mori L., Pignataro V., Bernini G., Giache V., Bacca A., Biondi B., Corona G., Di Trapani G., Grossrubatscher E., Reimondo G., Arnaldi G., Giacchetti G., Veglio F., Loli P., Colao A., Ambrosio M.R., Terzolo M., Letizia C., Ercolino T. and Opocher G. (2009). Clinically guided genetic screening in a large cohort of italian patients with pheochromocytomas and/or functional or nonfunctional paragangliomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 1541-1547.
- Mason E.F. and Hornick J.L. (2013). Succinate dehydrogenase deficiency is associated with decreased 5-hydroxymethylcytosine production in gastrointestinal stromal tumors: implications for mechanisms of tumorigenesis. *Mod. Pathol.* 26, 1492-1497.
- Matyakhina L., Bei T.A., McWhinney S.R., Pasini B., Cameron S., Gunawan B., Stergiopoulos S.G., Boikos S., Muchow M., Dutra A., Pak E., Campo E., Cid M.C., Gomez F., Gaillard R.C., Assie G., Fuzesi L., Baysal B.E., Eng C., Carney J.A. and Stratakis C.A. (2007). Genetics of carney triad: recurrent losses at chromosome 1 but lack of germline mutations in genes associated with paragangliomas and gastrointestinal stromal tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 2938-2943.
- McWhinney S.R., Pasini B. and Stratakis C.A. (2007). Familial gastrointestinal stromal tumors and germ-line mutations. *N. Engl. J. Med.* 357, 1054-1056.
- Miettinen M., Wang Z.F., Sarlomo-Rikala M., Osuch C., Rutkowski P. and Lasota J. (2011). Succinate dehydrogenase-deficient GISTs: A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 66 gastric GISTs with predilection to young age. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 1712-1721.
- Neumann H.P., Pawlu C., Peczkowska M., Bausch B., McWhinney S.R., Muresan M., Buchta M., Franke G., Klisch J., Bley T.A., Hoegerle S., Boedeker C.C., Opocher G., Schipper J., Januszewicz A. and Eng C. (2004). Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA* 292, 943-951.
- Niemann S. and Muller U. (2000). Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat. Genet.* 26, 268-270.
- Pantaleo M.A., Astolfi A., Indio V., Moore R., Thiessen N., Heinrich M.C., Gnocchi C., Santini D., Catena F., Formica S., Martelli P.L., Casadio R., Pession A. and Biasco G. (2011a). SDHA loss-of-function mutations in KIT-PDGFRA wild-type gastrointestinal stromal tumors identified by massively parallel sequencing. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 983-987.
- Pantaleo M.A., Nannini M., Astolfi A. and Biasco G. (2011b). A distinct pediatric-type gastrointestinal stromal tumor in adults: Potential role of succinate dehydrogenase subunit A mutations. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 1750-1752.
- Pasini B., McWhinney S.R., Bei T., Matyakhina L., Stergiopoulos S., Muchow M., Boikos S.A., Ferrando B., Pacak K., Assie G., Baudin

*SDHB in the differential diagnostics of GIST*

- E., Chompret A., Ellison J.W., Briere J.J., Rustin P., Gimenez-Roqueplo A.P., Eng C., Carney J.A. and Stratakis C.A. (2008). 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.* 16, 79-88.
- Rege T.A., Wagner A.J., Corless C.L., Heinrich M.C. and Hornick J.L. (2011). "Pediatric-type" gastrointestinal stromal tumors in adults: distinctive histology predicts genotype and clinical behavior. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 495-504.
- Ricketts C., Woodward E.R., Killick P., Morris M.R., Astuti D., Latif F. and Maher E.R. (2008). Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 1260-1262.
- Schimke R.N., Collins D.L. and Stolle C.A. (2010). Paraganglioma, neuroblastoma, and a SDHB mutation: Resolution of a 30-year-old mystery. *Am. J. Med. Genet. A* 152A, 1531-1535.
- van Nederveen F.H., Gaal J., Favier J., Korpershoek E., Oldenburg R.A., de Bruyn E.M., Sleddens H.F., Derkx P., Riviere J., Dannenberg H., Petri B.J., Komminoth P., Pacak K., Hop W.C., Pollard P.J., Mannelli M., Bayley J.P., Perren A., Niemann S., Verhofstad A.A., de Bruine A.P., Maher E.R., Tissier F., Meatchi T., Badoual C., Bertherat J., Amar L., Alataki D., Van Marck E., Ferrau F., Francois J., de Herder W.W., Peeters M.P., van Linge A., Lenders J.W., Gimenez-Roqueplo A.P., de Krijger R.R. and Dinjens W.N. (2009). An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *Lancet Oncol.* 10, 764-771.
- Vanharanta S., Buchta M., McWhinney S.R., Virta S.K., Peczkowska M., Morrison C.D., Lehtonen R., Januszewicz A., Jarvinen H., Juhola M., Mecklin J.P., Pukkala E., Herva R., Kiuru M., Nupponen N.N., Aaltonen L.A., Neumann H.P. and Eng C. (2004). Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparanganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 153-159.
- Wagner A.J., Remillard S.P., Zhang Y.X., Doyle L.A., George S. and Hornick J.L. (2013). Loss of expression of SDHA predicts SDHA mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Mod. Pathol.* 26, 289-294.
- Xekouki P., Pacak K., Almeida M., Wassif C.A., Rustin P., Nesterova M., de la Luz Sierra M., Matro J., Ball E., Azevedo M., Horvath A., Lyssikatos C., Quezado M., Patronas N., Ferrando B., Pasini B., Lytras A., Tolis G. and Stratakis C.A. (2012). Succinate dehydrogenase (SDH) D subunit (SDHD) inactivation in a growth-hormone-producing pituitary tumor: a new association for SDH? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E357-366.

Accepted September 10, 2014

2.3 Dubova M, Sedivcova M., Saskova B., Hadravska S., Daum O. (2016):  
**Nonsyndromic intestinal lipomas are probably not associated with mutations of PDGFRA.**

Cíl práce

- Molekulárně genetická analýza mutací v exonech 12, 14 a 18 genu *PDGFRA* ve skupině sporadických intestinálních lipomů, které by mohly představovat sporadický protějšek k nádorům vznikajícím v rámci tzv. PDGFRA-mutantního syndromu

Souhrn

PDGFRA-mutantní syndrom je vzácné, autozomálně dominantně dědičné onemocnění podmíněné germinální mutací genu *PDGFRA*, charakterizované výskytem mnohočetných mezenchymálních nádorů, mezi které patří žaludeční GISTy, Vaňkovy tumory, fibromy a intestinální lipomy.

Asociace sporadických GISTů, Vaňkových tumorů a gastrointestinálních fibromů s mutacemi genu *PDGFRA* je známa z literatury již delší dobu, dosud však nebyla provedena studie molekulárně genetického profilu sporadicky se vyskytujících intestinálních lipomů. Do studie bylo zařazeno 20 intestinálních lipomů získaných od 17 pacientů. DNA pro molekulárně genetické vyšetření mutací v exonech 12, 14 a 18 genu *PDGFRA* byla extrahována z parafinových bloků (QIASymphony DNA Mini Kit; Qiagen, Hilden, Germany) a vyšetřena pomocí PCR a metody přímého sekvenování.

4 vzorky byly neanalyzovatelné, v ostatních 16 nádorech nebyly prokázány mutace ani specifické změny sekvence ve vyšetřovaných exonech genu *PDGFRA*.

Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že mutace v tzv. „hot-spots“ odpovídajících exonům 12, 14 a 18 genu *PDGFRA* nehrají významnou roli v patogenezi sporadických intestinálních lipomů.

## AUTHOR QUERY FORM

## RESEARCH ARTICLE

# Nonsyndromic Intestinal Lipomas are Probably not Associated With Mutations of PDGFRA

Magdalena Dubova, MD,\* Monika Sedivcova,<sup>w</sup> Bohuslava Saskova, MD,\*<sup>w</sup>  
Sarka Hadravska, MD,\*<sup>w</sup> and Ondrej Daum, MD, PhD\*<sup>w</sup>

**Abstract:** The purpose of this study was to test the hypothesis that intestinal lipomas occurring in patients devoid of signs of PDGFRA-mutant syndrome might represent sporadic counterparts of familial lipomatous tumors occurring in the spectrum of tumors associated with PDGFRA mutations. PDGFRA-mutant syndrome may manifest with gastrointestinal stromal tumors, Vanek tumors, fibrous tumors, and lipomatous tumors. Until now there has been no molecular genetic study of PDGFRA mutations in intestinal lipomas published in the world literature. A series of 20 intestinal lipomas were obtained from 17 patients, and mutational analysis of exons 12, 14, and 18 of the PDGFRA gene was performed. None of the 16 analyzable tumors showed mutations in PDGFRA. Thus, PDGFRA mutations probably do not play an important role in the development of sporadic lipomas of the intestines.

**Key Words:** sporadic, intestinal lipoma, PDGFRA-mutant syndrome, PDGFRA, familial GIST syndrome

(Appl Immunohistochem Mol Morphol 2016;00:000–000)

Intestinal lipomas are relatively common benign mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract that can be encountered particularly in the large intestine.<sup>1</sup> In most cases, they arise from the submucosa and only occasionally extend into the muscularis propria and subserosa. Histologically, they do not differ significantly from lipomas located in soft tissues. Small tumors are mostly asymptomatic and may be discovered incidentally at colonoscopy, through radiologic examination, or at autopsy. Larger intestinal lipomas (usually >2 cm in diameter) are more likely to cause various symptoms, for example,

abdominal pain, intestinal obstruction, hemorrhage, or intussusception.<sup>2–4</sup>

Intestinal lipomas can occur either in a sporadic setting or as a component of a familial tumor syndrome, which is associated with germline mutations of the PDGFRA gene, so-called PDGFRA-mutant syndrome.<sup>5,6</sup> PDGFRA-mutant syndrome is a condition inherited in autosomal dominant trait, formerly termed intestinal neurofibromatosis (neurofibromatosis 3b) and later recognized as a subtype of familial GIST syndrome.<sup>5,7–9</sup> Tumors found in this syndrome encompass stomach-restricted gastrointestinal stromal tumors (GISTs) without accompanying Cajal cell hyperplasia, Vanek tumors (inflammatory fibroid polyps), fibrous tumors, and intestinal lipomas.<sup>6</sup>

Although PDGFRA-mutated GISTs, Vanek tumors, and fibrous tumors are known to occur also sporadically in a nonsyndromic setting,<sup>7,8,10–12</sup> sporadic PDGFRA-mutated lipomas have not been recorded yet. We aimed to find out whether mutations of PDGFRA gene could take part in the development of sporadic intestinal lipomas. Therefore, we performed this study of 20 sporadic intestinal lipomas, in which we analyzed their molecular-genetic profile.

## MATERIALS AND METHODS

A series of 20 intestinal lipomas obtained from 17 patients were retrieved from our archives. All tumors used in this study were previously defined on the basis of their morphology during routine daily service and reviewed by 2 authors (S. H. and O. D.). As the second step, molecular genetic analysis of exons 12, 14, and 18 was performed in all cases.

Tissue for light microscopy was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin using routine procedures. DNA for molecular genetic investigation was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues. Several 5-mm-thick sections were placed on the slides. Hematoxylin and eosin-stained slides were examined for determination of the area of tumor tissue. Then, tumor tissue from unstained slides was scraped and DNA from FFPE tumor tissue was extracted using the QIA-symphony DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) on the automated extraction system (QIASymphony SP; Qiagen) according to the manufacturer's supplementary protocol for FFPE samples (purification of genomic DNA

Received for publication January 10, 2016; accepted February 8, 2016. From the \*Sikl's Department of Pathology, Medical Faculty Hospital, Medical Faculty in Plzen, Charles University in Prague; and <sup>w</sup>Biopsticka Laborator s.r.o, Plzen, Czech Republic.

The study has been partially supported by Ministry of Health grant number IGA NT14227 and the Charles University Research Fund SVV 260171/2015.

The authors declare no conflict of interest.

Reprints: Magdalena Dubova, MD, Sikl's Department of Pathology Medical Faculty Hospital, Medical Faculty in Plzen, Charles University in Prague, Edvarda Benese 13, Plzen 305 99, Czech Republic (e-mail: dubovam@fnplzen.cz).

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

from FFPE tissue using the QIAamp DNA FFPE tissue kit and deparaffinization solution). Concentration and purity of isolated DNA was measured using NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE). DNA integrity was examined by amplification of control genes in a multiplex PCR.

Mutational analysis of exons 12, 14, and 18 of the PDGFRA gene (accession number D50017) was performed using PCR and direct sequencing.

PCR was carried out using primers shown in Table 1. The reaction conditions were as follows: 12.5 mL of Hot-Start Taq PCR Master Mix (Qiagen), 10 pmol of each primer, 100 ng of template DNA, and distilled water up to 25 mL. The amplification program consisted of denaturation at 95°C for 15 minutes and then 40 cycles of denaturation at 95°C for 1 minute, annealing at 55°C for 1 minute, and extension at 72°C for 1.5 minutes for all amplicons. The program was completed by 72°C incubation for 7 minutes. The PCR products were separated by electrophoresis through a 2% agarose gel.

Successfully amplified PCR products were purified with magnetic particles Agencourt AMPure (Agencourt Bioscience Corporation, A Beckman Coulter Company, Beverly, MA), both side sequenced using Big Dye Terminator Sequencing kit (PE/Applied Biosystems, Foster City, CA) and purified with magnetic particles Agencourt CleanSEQ (Agencourt Bioscience Corporation, A Beckman Coulter Company), all according to the manufacturer's protocol, and then they were run on an automated sequencer ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems) at a constant voltage of 13.2 kV for 20 minutes.

## RESULTS

Details on the patients and tumors are shown in Table 2. Briefly, the M/F ratio was 8/9; age of the patients ranged from 45 to 84 years (average: 64.7 y); lipomas were situated in the small intestine (n = 1), ileocecal valve (n = 3), cecum (n = 3), ascending colon (n = 4), hepatic flexure (n = 2), transverse colon (n = 1), ileal flexure (n = 1), sigmoid colon (n = 3), and rectum (n = 2); and the maximum size of the tumors ranged from 0.3 to 6 cm (average: 1.76 cm). One patient presented with 3 lipomas, another one with 2 lipomas, and 15 patients each had only 1 lipoma detected. In most cases there were additional pathologic findings present, which are summarized in Table 2.

DNA of 4 tumors was nonanalyzable; all remaining 16 tumors with sufficient quality of DNA were found to bear wild-type alleles of exons 12, 14, and 18 of the PDGFRA gene.

## DISCUSSION

PDGFRA, the gene encoding platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  (PDGFRA), is located in the long arm of chromosome 4 in close vicinity of the KIT gene, another member of the PDGFRA family of receptor tyrosine kinases.<sup>13</sup> In human pathology, activating mutations of PDGFRA are mostly known to be associated with a subset of GIST.<sup>13,14</sup> Activating mutations of PDGFRA were reported to be responsible for 30% to 60% of KIT-immunonegative and/or KIT-wild-type tumors fulfilling histologic criteria of GIST. The PDGFRA-mutated GISTs are predominantly located in the stomach,<sup>15-18</sup> are composed of epithelioid cells,<sup>15-22</sup> and contain admixture of multinucleated giant cells,<sup>21</sup> myxoid stroma, and infiltrates of mast cells.<sup>22,23</sup>

Notably, activating mutations of PDGFRA were also detected in Vanek tumors (also called inflammatory fibroid polyps)<sup>10,11,24</sup> and peculiar fibrous stromal tumors.<sup>7,12</sup>

All the aforementioned tumors can also occur in a setting of familial tumor syndrome caused by germline mutations of PDGFRA, currently termed PDGFRA-mutant syndrome.<sup>6</sup> This condition inherited in the autosomal dominant trait is a subtype of familial GIST syndrome formerly designated intestinal neurofibromatosis (neurofibromatosis 3b).<sup>5,7-9</sup> Unlike KIT-dependent familial GIST syndrome, multiple GISTs occurring in the setting of PDGFRA-mutant syndrome may be accompanied by multiple Vanek tumors (inflammatory fibroid polyps) and gastrointestinal CD34-positive fibrous tumors of uncertain classification, which we term "fibrous stromal tumors." Furthermore, in contrast to KIT-dependent familial GIST syndrome, if present, GISTs are limited to the gastric area and diffuse Cajal cell hyperplasia is not observed.<sup>6,25</sup> Apart from these 3 classic PDGFRA-mutated tumors types, in individual families additional lesions were described, namely abnormally large hands<sup>26</sup> and multiple intestinal lipomas (or "fatty tumors").<sup>5,8</sup>

Intestinal lipomas are relatively common tumors of the gastrointestinal tract. In overwhelming majority of cases, they occur in a sporadic setting; however, recent studies reported on multiple occurrence of intestinal lipomas in the setting of PDGFRA-mutant syndrome.<sup>5,6</sup> Even though there is a well-known occurrence of PDGFRA-mutated gastrointestinal mesenchymal tumors, such as GISTs and Vanek tumors, in sporadic non-syndromic setting, until now, no study on PDGFRA-mutant status of intestinal lipomas has been published.

As we were unaware of any study on PDGFRA mutational analysis of intestinal fatty tumors, we collected a series of 20 intestinal lipomas obtained from

TABLE 1. Primers Used for PCR Amplification and Sequencing of PDGFRA Gene

PDGFRA Exon	Forward Primer Sequence 5'-3'	Reverse Primer Sequence 5'-3'
12	TCCAGTCACTGTGCTGCTTC	GGAGGTTACCCCATGGAACT
14	TCACAGGATTAGTCATATTCTTGTT	TGAAAATCCTCACTCCAGGTC
18	GCTACAGATGGCTTGATCCTG	GACCAGTGAGGGAAGTGAGG

TABLE 2. Clinicopathologic Features and PDGFRA Status

Patient No.	Sex	Age (y)	Size	Localization	PDGFRA	Other Findings
1	F	78	Max. dim. 0.5 cm	Cecum	wt	Adenocarcinoma of the sigmoid colon
2	F	69	2, 2.1, 1.2 cm, 1.5	Hepatic flexure (2), sigmoid colon (1)	wt	2 tubular adenomas, 2 uterine leiomyomas, meningioma
3	F	45	1.5, 1, 0.7 cm	Rectum	wt	
4	M	75	Max. dim. 2 cm	Cecum	wt	Hepatocellular carcinoma
5	M	45	Max. dim. 0.3 cm	Sigmoid colon	wt	Cutaneous basaloma
6	F	72	1.7, 1.4, 1 cm	Sigmoid colon	wt	Nuchal lipoma
7	M	56	6, 4, 3 cm	Lienal flexure	wt	Nonalcoholic fatty liver disease
8	F	55	5, 4.5, 3.8 cm	Ascending colon	wt	Preperitoneal lipoma
9	F	61	Max. dim. 1 cm	Cecum	wt	Mammary invasive ductal adenocarcinoma
10	M	68	Max. dim. 2.2 cm	Small intestine	wt	Intussusception
11	M	58	Max. dim. 0.6 cm	Transverse colon	wt	
12	F	80	1.5, 0.5, 1 cm	Ileocecal valve	wt	Several tubular and tubulovillous adenomas
13	M	65	3.3, 2.5, 1 cm	Ileocecal valve	NA	Adenocarcinoma of the hepatic flexure
14	M	71	Max. dim. 0.9 cm	Ascending colon	NA	Vulgar verruca, ganglion
15	F	63	Max. dim. 0.6 cm	Rectum	NA	
16	F	56	Max. dim. 0.3 cm	Ileocecal valve	NA	
17	M	84	Max. dim. 1.2 cm and 0.5 cm	Ascending colon (2)	wt	Tubulovillous adenoma

F indicates female; M, male; max. dim., maximum dimension; NA, nonanalyzable; wt, PDGFRA wild-type.

patients devoid of signs of PDGFRA-mutant syndrome and carried out molecular genetic investigation to test the hypothesis that sporadic intestinal lipomas may represent sporadic counterparts of the “fatty tumors” described in association with PDGFRA-mutant syndrome. Our study did not reveal any mutations in PDGFRA exons 12, 14, and 18 in any of the 16 analyzable tumors.

Thus, we suggest that PDGFRA mutations probably do not play an important role in the development of sporadic intestinal lipomas, and their pathogenesis, as well as relation to the syndromic fatty tumors, is currently still questionable.

In conclusion, our study is the first study investigating PDGFRA status in sporadic nonsyndromic intestinal lipomas. In contrast to lipomas occurring in the setting of PDGFRA-mutant syndrome, their sporadic counterparts do not harbor mutations in any of the hot spots of PDGFRA gene.

REFERENCES

1. Atila K, Terzi C, Obuz F, et al. Symptomatic intestinal lipomas requiring surgical interventions secondary to ileal intussusception and colonic obstruction: report of two cases. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2007;13:227–231.
2. Presti ME, Flynn MF, Schuval DM, et al. Colonic lipoma with gastrointestinal bleeding and intussusception. *ACG Case Rep J.* 2015;2:135–136.
3. Tascilar O, Cakmak GK, Gun BD, et al. Clinical evaluation of submucosal colonic lipomas: decision making. *World J Gastroenterol.* 2006;12:5075–5077.
4. Mouaqit O, Hasnain H, Chbani L, et al. Pedunculated lipoma causing colo-colonic intussusception: a rare case report. *BMC Surg.* 2013;13:51.
5. Carney JA, Stratakis CA. Stromal, fibrous, and fatty gastrointestinal tumors in a patient with a PDGFRA gene mutation. *Am J Surg Pathol.* 2008;32:1412–1420.
6. Ricci R, Martini M, Cenci T, et al. PDGFRA-mutant syndrome. *Mod Pathol.* 2015;28:954–964.
7. Liu T, Willmore-Payne C, Layfield LJ, et al. A gastrointestinal stromal tumor of the stomach morphologically resembling a neurofibroma: demonstration of a novel platelet-derived growth factor receptor alpha exon 18 mutation. *Hum Pathol.* 2008;39:1849–1853.
8. Pasini B, Matyakhina L, Bei T, et al. Multiple gastrointestinal stromal and other tumors caused by platelet-derived growth factor receptor alpha gene mutations: a case associated with a germline V561D defect. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:3728–3732.
9. De Raedt T, Cools J, Debiec-Rychter M, et al. Intestinal neurofibromatosis is a subtype of familial GIST and results from a dominant activating mutation in PDGFRA. *Gastroenterology.* 2006;131:1907–1912.
10. Schildhaus HU, Cavlar T, Binot E, et al. Inflammatory fibroid polyps harbour mutations in the platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) gene. *J Pathol.* 2008;216:176–182.
11. Lasota J, Wang ZF, Sobin LH, et al. Gain-of-function PDGFRA mutations, earlier reported in gastrointestinal stromal tumors, are common in small intestinal inflammatory fibroid polyps. A study of 60 cases. *Mod Pathol.* 2009;22:1049–1056.
12. Daum O, Zalud R, Grossmann P, et al. A case of imatinib-naive ileal fibrous stromal tumor with unusual morphology and double PDGFRA mutation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010;18:484–485.
13. Kawagishi J, Kumabe T, Yoshimoto T, et al. Structure, organization, and transcription units of the human alpha-platelet-derived growth factor receptor gene, PDGFRA. *Genomics.* 1995;30:224–232.
14. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 2003;299:708–710.



15. Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, et al. A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab Invest.* 2004;84:874–883.
16. Debiec-Rychter M, Wasag B, Stul M, et al. Gastrointestinal stromal tumours (GISTs) negative for KIT (CD117 antigen) immunoreactivity. *J Pathol.* 2004;202:430–438.
17. Wardelmann E, Hrychuk A, Merkelbach-Bruse S, et al. Association of platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *J Mol Diagn.* 2004;6:197–204.
18. Penzel R, Aulmann S, Moock M, et al. The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. *J Clin Pathol.* 2005;58:634–639.
19. Yamamoto H, Oda Y, Kawaguchi K, et al. c-kit and PDGFRA mutations in extragastrointestinal stromal tumor (gastrointestinal stromal tumor of the soft tissue). *Am J Surg Pathol.* 2004;28:479–488.
20. Yi ES, Strong CR, Piao Z, et al. Epithelioid gastrointestinal stromal tumor with PDGFRA activating mutation and immunoreactivity. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2005;13:157–161.
21. Pauls K, Merkelbach-Bruse S, Thal D, et al. PDGFRA $\alpha$ - and c-kit-mutated gastrointestinal stromal tumours (GISTs) are characterized by distinctive histological and immunohistochemical features. *Histopathology.* 2005;46:166–175.
22. Sakurai S, Hasegawa T, Sakuma Y, et al. Myxoid epithelioid gastrointestinal stromal tumor (GIST) with mast cell infiltrations: a subtype of GIST with mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene. *Hum Pathol.* 2004;35:1223–1230.
23. Daum O, Grossmann P, Vanecek T, et al. Diagnostic morphological features of PDGFRA-mutated gastrointestinal stromal tumors: molecular genetic and histologic analysis of 60 cases of gastric gastrointestinal stromal tumors. *Ann Diagn Pathol.* 2007;11:27–33.
24. Daum O, Hatlova J, Mandys V, et al. Comparison of morphological, immunohistochemical, and molecular genetic features of inflammatory fibroid polyps (Vanek's tumors). *Virchows Arch.* 2010;456:491–497.
25. Antonescu CR, Viale A, Sarran L, et al. Gene expression in gastrointestinal stromal tumors is distinguished by KIT genotype and anatomic site. *Clin Cancer Res.* 2004;10:3282–3290.
26. Chompret A, Kannengiesser C, Barrois M, et al. PDGFRA germline mutation in a family with multiple cases of gastrointestinal stromal tumor. *Gastroenterology.* 2004;126:318–321.

2.4 Dubová M., Daum O., Salajka P., Fabián P., Babánková I., Švajdler M. (2017):  
**Jaká je Vaše diagnóza? DOG1 imunoexprese v měkkotkáňových nádorech.**

Cíl práce

- Poukázání na tzv. „pitfall“ případy, které mohou díky své morfolologii, prezentaci, neobvyklé lokalizaci i aberantní imunoexpresi DOG1 představovat závažný diagnostický problém.

Souhrn

V této práci byly prezentovány tři případy měkkotkáňových nádorů recentně diagnostikovaných na našem pracovišti, v jejichž diagnostice sehrálo ve všech případech zásadní roli molekulárně genetické vyšetření.

První případ představoval nádorový uzel v periskapulární lokalizaci. Jednalo se o 56letou ženu, která před 11 lety podstoupila resekci GISTu. Současná léze byla tvořená svazky blandně vyhlížejících vřetenitých buněk obklopených kolagenózním stromatem, které byly pozitivní v průkazu SMA,  $\beta$ -cateninu a negativní v barvení protilátkou proti CD117 a DOG1. Přestože morfologie, imunohistochemický profil i lokalizace vzbuzovaly v prvé řadě podezření na desmoid, byla vzhledem k anamnestickému údaji o resekci GISTu v minulosti provedena analýza mutací *KIT*, *PDGFRA* a *CTNNB1*. Molekulárně genetické vyšetření překvapivě odhalilo mutaci v exonu 11 genu *KIT* a případ byl uzavřen jako metastáza GISTu.

Ve druhém případě se jednalo o 46letou ženu, které byl v 15 letech resekován nádor žaludku diagnostikovaný jako leiomyosarkom. Této pacientce bylo ve 35 letech diagnostikováno ložisko v pravé plicí suspektní z metastázy tumoru žaludku, v anamnéze byl rovněž přítomen údaj o histologicky verifikovaném extraadrenálním paragangliomu

odstraněném v minulosti a podezření na adenom pravé nadledviny a feochromocytom levé nadledviny z posledního CT vyšetření. Na naše pracoviště byl zaslán parafinový blok obsahující tkáň primárního nádoru žaludku, který byl tvořen smíšenou populací vřetenitých a epiteloidních buněk s plexiformním a nodulárním uspořádáním, které byly CD117 a DOG1 imunopozitivní. Na základě výsledků imunohistochemického vyšetření byl nádor reklasifikován na GIST. Vzhledem k typické morfologii, lokalizaci i nádorové multiplicitě pacientky bylo doplněno komplexní imunohistochemické vyšetření, které prokázalo ztrátu exprese SDHB, která byla sdílená s feochromocytomem levé nadledviny. Vzhledem k těmto výsledkům bylo vysloveno podezření na Carneyho trias či Carney-Stratakis syndrom, k jejichž odlišení bylo provedeno molekulárně genetické vyšetření, které neprokázalo germinální mutaci *SDHx*, ale odhalilo metylaci promotoru genu *SDHC*, která je diagnostickým znakem Carneyho trias.

Třetím případem byl maligní nádor žaludku 78leté ženy se suspektním metastatickým rozsevem v levé plicí a na peritoneu. Nádor sestával z monotónní infiltrace buňkami s minimálním množstvím cytoplazmy, které byly DOG1 imunopozitivní. Průkaz exprese proteinu CD117 a cytokeratinů protilátkou OSCAR byl negativní. Vzhledem morfologii netypické pro GIST bylo doplněno imunohistochemické vyšetření protilátkou TLE-1, které bylo pozitivní, a dále molekulárně genetické vyšetření, které vyloučilo mutace *KIT* a *PDGFRA* a prokázalo translokaci t(X;18) charakteristickou pro synoviální sarkom.

# Jaká je Vaše diagnóza? (2)

Téma: DOG1 imunoexprese v měkkotkáňových nádorech

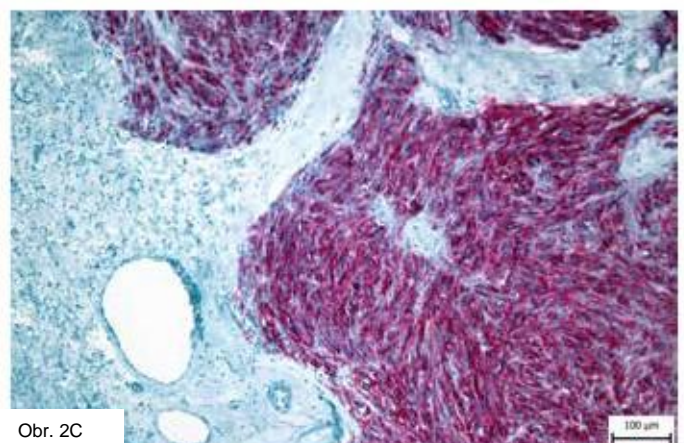
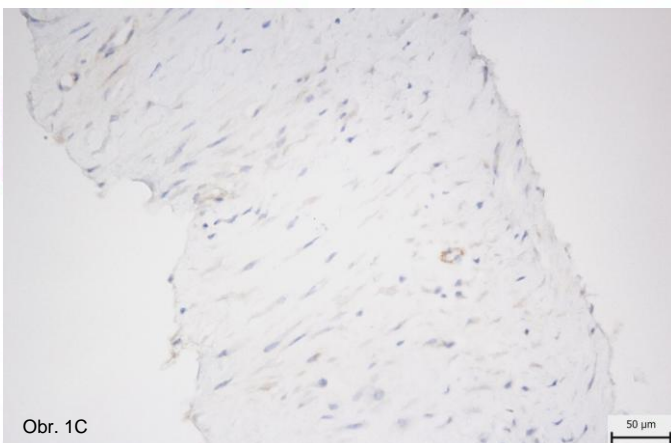
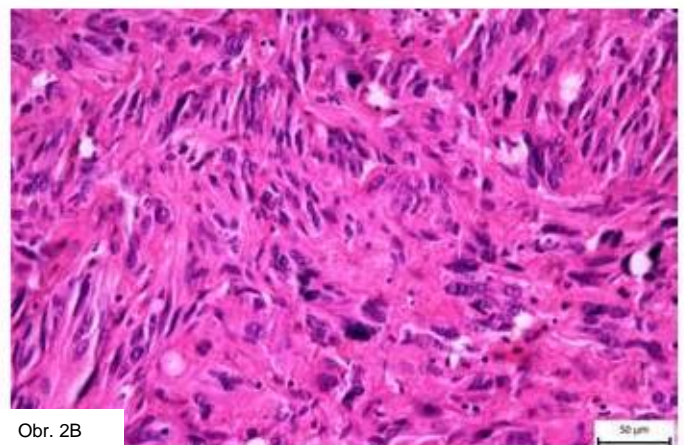
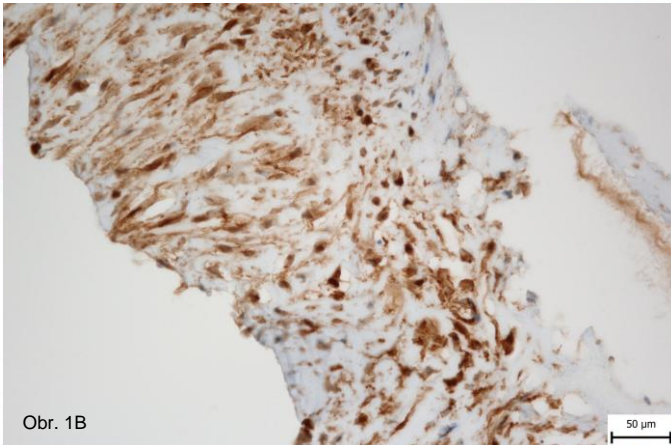
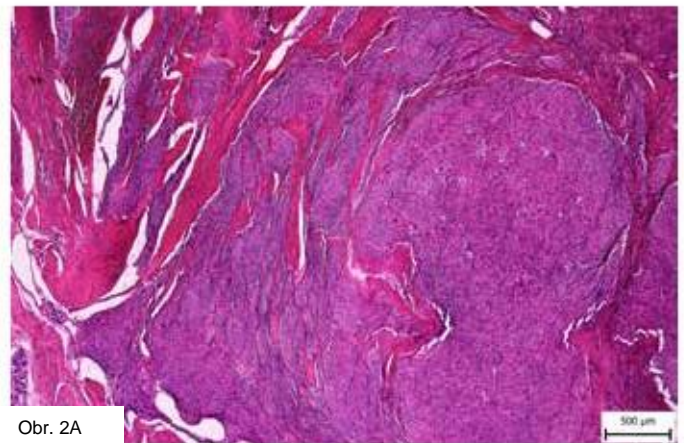
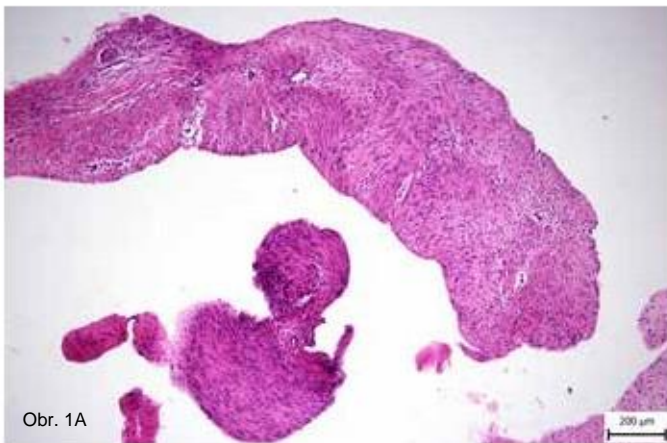
Magdaléna Dubová<sup>1,2</sup>, Ondřej Daum<sup>1,2</sup>, Marián Švajdler<sup>1,2</sup>, Pavel Salajka<sup>3</sup>,  
Pavel Fabián<sup>4</sup>, Iva Babánková<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Šiklův ústav patologie LF UK a FN Plzeň

<sup>2</sup> Bioptická laboratoř s.r.o., Plzeň

<sup>3</sup> Patologicko-anatomické oddělení Krajské nemocnice T.Bati, a.s., Zlín

<sup>4</sup> Oddělení onkologické patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno



#### Případ č. 1

Žena, 56 let, v anamnéze retroperitoneální GIST s peritoneálním rozsevem resekovaný před 11 lety. Nyní nádorový uzel v periskapulární lokalizaci.

V konvenčním barvení hematoxylinem a eosinem jsou v punkčním vzorku patrné svazky blandně vyhlížejících vřetenitých buněk obklopené kolagenózním stromatem (Obr. 1A). Nádorové buňky jsou pozitivní v imunohistochemickém průkazu hladkosvalového aktinu (SMA) a vykazují jadernou pozitivitu  $\beta$ -catenininu (Obr. 1B), imunohistochemické vyšetření exprese proteinů KIT (CD117) a DOG1 je negativní (Obr. 1C).

#### Případ č. 2

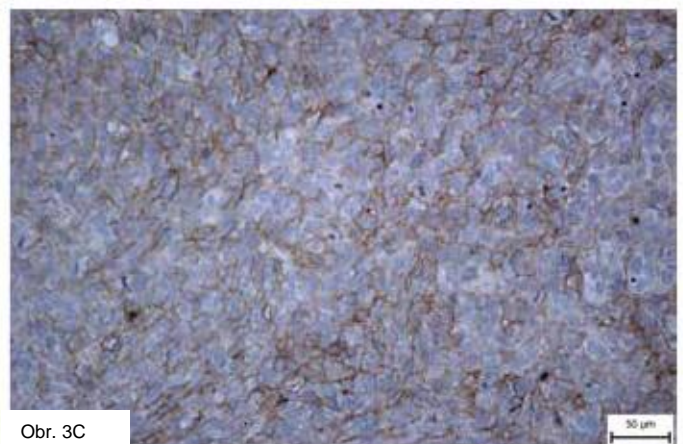
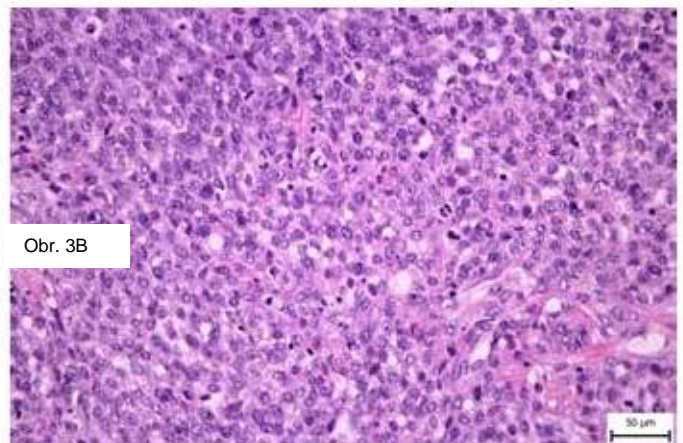
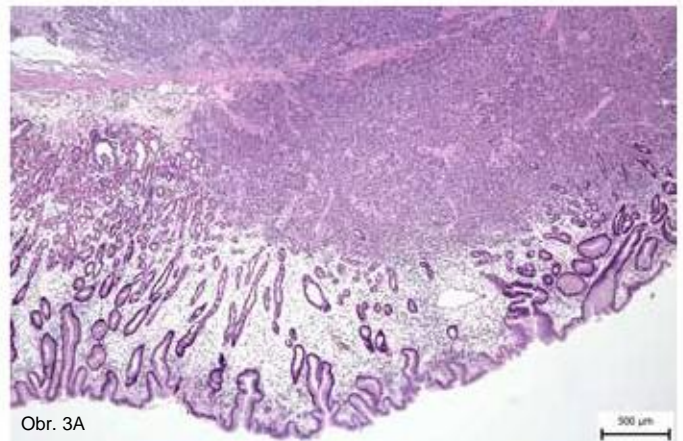
Žena, 45 let. V 15 letech odstraněn nádor žaludku diagnostikovaný jako leiomyosarkom. V anamnéze dále suspektní metastáza v pravé plicí dle CT vyšetření ve 35 letech (dosud bez chirurgické intervence), histologicky verifikovaný extraadrenální paragangliom a podezření na adenom pravé nadledviny a feochromocytom levé nadledviny z CT vyšetření.

Nádor žaludku je tvořen smíšenou populací vřetenitých a epitheloidních buněk s plexiformním a nodulárním uspořádáním (Obr. 2A, B). Imunohistochemické vyšetření exprese proteinu KIT (CD117) a DOG1 je difúzně pozitivní (Obr. 2C).

#### Případ č. 3

Žena, 78 let. Maligní nádor žaludku (rozměrů 4,5x4x1,5 cm) se suspektním metastatickým rozsevem v levé plicí a na peritoneu.

Tumor žaludku je histologicky tvořen monotónní infiltrací buňkami s minimem cytoplasmy (Obr. 3A, 3B) pozitivními v imunohistochemickém průkazu proteinu DOG1 (Obr. 3C), průkaz exprese proteinu KIT (CD117) a cytokeratinů protilátkou OSCAR je negativní.



Odpovědi na str. XXX

#### □ Adresa pro korespondenci:

MUDr. Magdaléna Dubová  
Šíklův ústav patologie LF UK a FN Plzeň  
Edvarda Beneše 1128/13, 305 99 Plzeň  
tel.: 377 402 251  
fax.: 377 402 634  
email: dubovam@fnplzen.cz

# Jaká je Vaše diagnóza? (2)

## Téma: DOG1 imunoexpresse v měkkotkáňových nádorech

Magdaléna Dubová<sup>1,2</sup>, Ondřej Daum<sup>1,2</sup>, Marián Švajdler<sup>1,2</sup>, Pavel Salajka<sup>3</sup>,  
Pavel Fabián<sup>4</sup>, Iva Babánková<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Šiklův ústav patologie LF UK a FN Plzeň

<sup>2</sup> Biopstická laboratoř s.r.o., Plzeň

<sup>3</sup> Patologicko-anatomické oddělení Krajské nemocnice T.Bati, a.s., Zlín

<sup>4</sup> Oddělení onkologické patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Případ č. 1 - odpověď: Fibromatosis-like GIST

Morfologie, imunoprofil i lokalizace léze vzbuzovala v prvé řadě podezření na extraabdominální fibromatózu (desmoid). Vzhledem k anamnestickému údaji o resekci GISTu (gastrointestinálního stromálního tumoru) v minulosti byla navíc provedena sekvenční analýza genů *KIT*, *PDGFRA* a genu kódujícího  $\beta$ -catenin (*CTNNB1*). Molekulárně genetické vyšetření překvapivě prokázalo mutaci v exonu 11 genu *KIT*. Případ byl uzavřen jako metastáza GISTu.

Fibromatóza (desmoid) patří do skupiny vřetenobuněčných lézí vstupujících do diferenciální diagnostiky především s GISTy lokalizovanými v retroperitoneu a mesenteriu. Jde o lokálně agresivně se chovající tumoriformní afekci složenou z monomorfních vřetenitých buněk řazených podélně s dlouhou osou, které tvoří široké a dlouhé svazky s abundančním kolagenózním stromatem. Buňky této léze vykazují imunohistochemicky nukleární pozitivitu  $\beta$ -catenin (1). Zavádějící může být pozitivní průkaz proteinu KIT (CD117), který je považován za důsledek nedostatečné specifity polyklonální protilátky (2). Mutace genů *KIT* ani *PDGFRA* nebyly v desmoidu zjištěny (3-5). V abdominální lokalizaci obvykle nečiní rozlišení desmoidu a GISTu větší diagnostické obtíže, vzhledem k rozdílné morfologii buněk, vyšší celularitě i obvyklé intramurální lokalizaci GISTu. Extraabdominální lokalizace GISTu s aberantním imunohistochemickým profilem představují diagnostický problém, ve kterém má molekulární genetika své nezastupitelné místo a často hraje rozhodující diagnostickou úlohu.

### Případ č. 2 - odpověď: SDHB-negativní GIST v rámci Carneyho trias

Na základě pozitivního průkazu exprese proteinů KIT (CD117) a DOG1 byl nádor reklasifikován na GIST. Vzhledem k typickému morfologickému obrazu, žaludeční lokalizaci a nádorové multiplicitě pacientky bylo doplněno komplexní imunohistochemické vyšetření, které prokázalo ztrátu exprese proteinu SDHB, která byla následně potvrzena i ve feochromocytomu z levé nadledviny. Tato sdílená exprese v GISTu a feochromocytomu vzbuzovala podezření na některý z nádorových syndromů, přičemž v úvahu přicházel syndrom Carney-Stratakis s germinální mutací v *SDHx* nebo Carneyho trias bez této mutace. Molekulárně genetickým vyšetřením nebyla germinální mutace prokázána, byla však prokázána hypermetylace promotoru *SDHC*, případ byl tedy uzavřen jako Carneyho trias.

Carneyho trias byla v roce 1977 definována jako nefamiliární syndrom neznámé etiologie zahrnující přítomnost žaludečního GISTu, plicního chondromu a extraadrenálního paragangliomu (6). Téměř v 80 % případů však není tato trias plně vyvinutá a nejčastější kombinací je v takovém případě GIST a plicní chondrom (7). Navzdory původní definici jsou v současnosti do této trias řazeny i adenomy kůry nadledvin a leiomyomy jícnu popisované u pacientů s tímto syndromem (8). Postiženy bývají především mladé ženy, u kterých nacházíme GISTy v typické žaludeční loka-

lizaci, v jejichž histologickém obraze dominuje epiteloidní komponenta. Oproti sporadickým GISTům mohou být multicentrické a zakládají časné metastázy (9). Přestože v rámci Carneyho trias vznikají mnohočetné tumory na různých místech, nebyla u pacientů prokázána germinální mutace *SDH*, která by se přirozeně nabízel jako možná příčina onemocnění. Až do roku 2014 byla jediným znakem umožňujícím odlišit Carneyho trias od syndromu Carney-Stratakis absence mutací, ale opakovaně prokázána přítomnost hypermetylace promotoru genu *SDHC*, která má za následek snížení exprese mRNA a tím snížení aktivity SDH, se nyní dostává do popředí vědeckého zájmu (10). Nicméně ani tento znak nevysvětluje prvotní příčinu postižení při Carneyho trias. Jako možná příčina je uváděn postzygotický somatický mosaicismus (11), diskutována je i role faktoru indukovaného hypoxií (HIF 1 $\alpha$ ), jehož deregulace má za následek destabilizaci a ztrátu enzymatické funkce celého SDH komplexu (12).

### Případ č. 3 - odpověď: Monofazický synoviální sarkom žaludku

Morfologie nádoru spolu s pozitivním imunohistochemickým průkazem exprese TLE-1 (Transducin Like Enhancer Of Split 1), průkazem translokace t(X;18) a vyloučením mutací genů *KIT* a *PDGFRA* potvrdila diagnózu špatně diferencovaného monofazického synoviálního sarkomu. Na základě vyšetření nebylo možné s jistotou říci, zda se jedná o primární tumor žaludku či o metastázu. Pacientka zemřela 1 měsíc po resekci žaludku, pitva nebyla klinickým lékařem indikována.

Synoviální sarkom patří mezi vzácné nádory gastrointestinálního traktu, které vstupují do diferenciální diagnostiky GISTu. Zvláště monofazické varianty mohou vést k diagnostickým rozpakům díky své občasně KIT (CD117)- a DOG1-imunopozitivitě (13, 14) i raritnímu průkazu mutace genu *KIT* nebo *PDGFRA* (15) v nádorových buňkách. Monofazická varianta synoviálního sarkomu je histologicky tvořena difúzní monotónní infiltrací oválnými nebo vřetenitými buňkami s malým množstvím světlé cytoplasmy. Imunohistochemicky jsou nádorové buňky pozitivní v průkazu cytokeratinů CK7 a CK19, epitelálního membránového antigenu (EMA) a proteinu TLE-1(16). Ačkoli imunoexpresse posledně jmenovaného markeru není exkluzivní pouze pro synoviální sarkom ale i jiné měkkotkáňové nádory jako např. maligní nádor z pochvy periferního nervu (MPNST), schwannom nebo extrauterinní endometriální stromální sarkom (17), může být jeho imunohistochemický průkaz společně s průkazem charakteristické translokace t(X;18), vedoucí k fúzi genu *SYT* na chromosomu 18 s jedním z členů *SSX* genové rodiny na chromosomu X, považován za jednoznačný diagnostický znak synoviálního sarkomu.

### PODĚKOVÁNÍ

Práce byla podpořena grantem MŠMT SVV-2017-260 391. The work was supported by the Ministry of education, youth and sports grant SVV-2016-260282.

## LITERATURA

1. Montgomery E, Torbenson MS, Kaushal M, Fisher C, Abraham SC. Beta-catenin immunohistochemistry separates mesenteric fibromatosis from gastrointestinal stromal tumor and sclerosing mesenteritis. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(10): 1296-1301.
2. Lucas DR, al-Abbadi M, Tabaczka P, et al. c-Kit expression in desmoid fibromatosis. Comparative immunohistochemical evaluation of two commercial antibodies. *Am J Clin Pathol* 2003; 119(3): 339-345.
3. Liegl B, Leithner A, Bauernhofer T, et al. Immunohistochemical and mutational analysis of PDGF and PDGFR in desmoid tumours: is there a role for tyrosine kinase inhibitors in c-kit-negative desmoid tumours? *Histopathology* 2006; 49(6): 576-581.
4. Yantiss RK, Spiro IJ, Compton CC, Rosenberg AE. Gastrointestinal stromal tumor versus intra-abdominal fibromatosis of the bowel wall: a clinically important differential diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2000; 24(7): 947-957.
5. Colombo P, Rahal D, Grizzi F, Quagliuolo V, Roncalli M. Localized intra-abdominal fibromatosis of the small bowel mimicking a gastrointestinal stromal tumor: a case report. *World J Gastroenterol* 2005; 11(33): 5226-5228.
6. Carney JA, Sheps SG, Go VL, Gordon H. The triad of gastric leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma and pulmonary chondroma. *N Engl J Med* 1977; 296(26): 1517-1518.
7. Candanedo-Gonzalez FA, Krause-Senties L, Bencosme-Vinas CM, Santiago-Payan H. Incomplete form of Carney's triad: clinical and morphologic analysis of a case in Mexico. *Endocr Pathol* 2000; 11(4): 287-294.
8. Carney JA. Gastric stromal sarcoma, pulmonary chondroma, and extra-adrenal paraganglioma (Carney Triad): natural history, adrenocortical component, and possible familial occurrence. *Mayo Clin Proc* 1999; 74(6): 543-552.
9. Blei E, Gonzalez-Crussi F. The intriguing nature of gastric tumors in Carney's triad. Ultrastructural and immunohistochemical observations. *Cancer* 1992; 69(2): 292-300.
10. Haller F, Moskalev EA, Faucz FR, et al. Aberrant DNA hypermethylation of SDHC: a novel mechanism of tumor development in Carney triad. *Endocrine-related cancer* 2014; 21(4): 567-577.
11. Shi G, Cui Y, He Y, Gong M. An unusual case of incomplete Carney triad: an 18-year-old girl suffering from multiple benign tumors. *J Thorac Dis* 2016; 8(10): E1202-E1206.
12. Amieux PS. Getting the GIST of the Carney Triad: growth factors, rare tumors, and cellular respiration. *Pediatr Dev Pathol* 2004; 7(4): 306-308.
13. Yamaguchi U, Hasegawa T, Masuda T, et al. Differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumor and other spindle cell tumors in the gastrointestinal tract based on immunohistochemical analysis. *Virchows Arch* 2004; 445(2): 142-150.
14. Wong NA, Shelley-Fraser G. Specificity of DOG1 (K9 clone) and protein kinase C theta (clone 27) as immunohistochemical markers of gastrointestinal stromal tumour. *Histopathology* 2010; 57(2): 250-258.
15. Lopez-Guerrero JA, Navarro S, Noguera R, et al. Mutational analysis of the c-KIT AND PDGFRalpha in a series of molecularly well-characterized synovial sarcomas. *Diagn Mol Pathol* 2005; 14(3): 134-139.
16. Rekhi B, Basak R, Desai SB, Jambhekar NA. Immunohistochemical validation of TLE1, a novel marker, for synovial sarcomas. *Indian J Med Res* 2012; 136(5): 766-775.
17. Kosemehmetoglu K, Vrana JA, Folpe AL. TLE1 expression is not specific for synovial sarcoma: a whole section study of 163 soft tissue and bone neoplasms. *Mod Pathol* 2009; 22(7): 872-878.

2.5 M. Dubova, M. Svajdler, P. Fabian, L. Kren, I. Babankova, M. Jezova, J. Stehlik, M. Michal, O. Daum. (2017): **Distribution of SDHC methylation in neoplastic and non-neoplastic tissue in patients with Carney triad.**

Cíl práce

- Potvrzení či vyloučení metylace promotoru genu *SDHC* v nenádorové tkáni u pacientů s Carneyho trias a diskuse nad jejím možným významem.

Souhrn

Nedávno prokázaná hypermetylace promotoru genu *SDHC* umožňující odlišení Carneyho trias od syndromu Carney-Stratakis je v současné době předmětem vědeckého zájmu.

Hypermetylace promotoru genu *SDHC* byla popsána nejen v nádorové tkáni, ale i v krvi a slinách pacientů s Carneyho trias. Zejména v případě krevních vzorků však nelze spolehlivě vyloučit možnost jejich kontaminace cirkulující nádorovou DNA (ctDNA).

Cílem této práce bylo ověření přítomnosti hypermetylace *SDHC* v nádorové i solidní nenádorové tkáni tří pacientů s potvrzenou diagnózou Carneyho trias. Ve všech třech případech se jednalo o ženy, kterým byl v dětství resekován žaludeční GIST, jehož buňky vykazovaly ztrátu exprese *SDHB* (která byla v jednom případě sdílená s feochromocytomem). Ve dvou případech byly přítomny další nádory charakteristické pro Carneyho trias. Molekulárně genetické vyšetření *KIT*, *PDGFRA*, *SDHB*, *SDHC* a *SDHD* prokázalo pouze v jednom GISTu polymorfismus v genech *KIT* (exon 17) a *PDGFRA* (exony 12 a 18). Následně bylo provedeno vyšetření metylace promotoru genu *SDHC*, které bylo pozitivní ve všech třech GISTech a nenádorové žaludeční tkáni jedné pacientky, zatímco ve stěně duodena



a břišní lymfatické uzlině získaných od druhých dvou pacientek nebyla tato hypermetylace prokázána. Na základě těchto výsledků lze ve shodě s dalšími studiemi předpokládat, že genetickým podkladem Carneyho trias je postzygotický somatický mozaicismus. Domníváme se, že průkaz hypermetylace promotoru genu *SDHC* v nenádorové žaludeční tkáni by mohl vysvětlovat multifokální distribuci GISTu typickou pro Carneyho trias. Není rovněž vyloučeno, že u takovýchto pacientů hrozí vyšší riziko rekurence či vzniku dalších nádorů.

Bohužel dosud zůstává nevysvětleno, jaké prvotní příčiny vedou k hypermetylaci promotoru genu *SDHC*, stejně tak není jasné, proč se tato epigenetická změna vyskytuje pouze ve vybraných morfologicky i embryologicky nesourodých tkáních.

## Histology and Histopathology

### Distribution of SDHC methylation in neoplastic and non-neoplastic tissue in patients with Carney triad --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Distribution of SDHC methylation in neoplastic and non-neoplastic tissue in patients with Carney triad
<b>Short Title:</b>	SDHC methylation pattern in Carney triad
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Corresponding Author:</b>	Ondrej Daum, M.D., Ph.D. Charles University, Faculty of Medicine in Pilsen Plzen, CZECH REPUBLIC
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Charles University, Faculty of Medicine in Pilsen
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Magdalena Dubova, M.D.
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Magdalena Dubova, M.D. Marian Svajdler, M.D., Ph.D. Pavel Fabian, M.D., Ph.D. Leos Kren, M.D., Ph.D. Iva Babankova, M.D. Marta Jezova, M.D. Jan Stehlik, Mgr. Michal Michal, M.D. Ondrej Daum, M.D., Ph.D.
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	Carney triad is a multitumor syndrome affecting almost exclusively young women in a non-familial setting, which manifests with multifocal gastric gastrointestinal stromal tumors, paragangliomas and pulmonary chondroma. The Carney triad-associated tumors are characterized by deficiency of mitochondrial succinate dehydrogenase enzymatic complex. Recently, it was found out, that the deficiency results from epigenetic silencing of SDHC gene promoter by its hypermethylation. To elucidate the topical distribution of SDHC promoter methylation in Carney triad patients and thus to shed some light on the possible natural development of this epigenetic change, both neoplastic and available non-neoplastic tissue of 3 newly diagnosed patients with Carney triad was tested for hypermethylation at the SDHC promoter site. Lack of SDHC epigenetic silencing in the non-neoplastic lymphoid and duodenal tissue (i. e. tissues not involved in the development of Carney triad-associated tumors) in association with the finding of SDHC promoter hypermethylation in non-neoplastic gastric wall favors the hypothesis of postzygotic somatic mosaicism as the biological background of Carney triad, as well as it explains the multifocality of gastrointestinal stromal tumors of the stomach occurring in this scenario. However, precise mechanism responsible for the peculiar organ-specific distribution of Carney triad-associated tumors is still unknown.
<b>Manuscript Classifications:</b>	Histopathology; Conventional staining; Human; Immunohistochemistry; Lymph nodes;

**Title:** Distribution of *SDHC* methylation in neoplastic and non-neoplastic tissue in patients with Carney triad

**Authors:**

M. Dubova<sup>1,2</sup>, M. Svajdler<sup>1,2</sup>, P. Fabian<sup>3</sup>, L. Kren<sup>4</sup>, I. Babankova<sup>3</sup>, M. Jezova<sup>4</sup>, J. Stehlik<sup>2</sup>, M. Michal<sup>1</sup>, O. Daum<sup>1,2</sup>

**Institutions:**

1 - Sıkl's Department of Pathology, Medical Faculty Hospital, Charles University in Prague, Medical Faculty in Plzen, Plzen, Czech Republic

2 - Biopticka Laborator s.r.o, Plzen, Czech Republic

3 - Masaryk Memorial Cancer Institute, Department of Diagnostic and Experimental Pathology, Brno, Czech Republic

4 - Department of Pathology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

**Running title:** SDHC methylation pattern in Carney triad

**Key words:** Carney triad – somatic mosaicism – SDHC – methylation

## SUMMARY

Carney triad is a multitumor syndrome affecting almost exclusively young women in a non-familial setting, which manifests with multifocal gastric gastrointestinal stromal tumors, paragangliomas and pulmonary chondroma. The Carney triad-associated tumors are characterized by deficiency of mitochondrial succinate dehydrogenase enzymatic complex. Recently, it was found out, that the deficiency results from epigenetic silencing of *SDHC* gene promoter by its hypermethylation. To elucidate the topical distribution of *SDHC* promoter methylation in Carney triad patients and thus to shed some light on the possible natural development of this epigenetic change, both neoplastic and available non-neoplastic tissue of 3 newly diagnosed patients with Carney triad was tested for hypermethylation at the *SDHC* promoter site. Lack of *SDHC* epigenetic silencing in the non-neoplastic lymphoid and duodenal tissue (i. e. tissues not involved in the development of Carney triad-associated tumors) in association with the finding of *SDHC* promoter hypermethylation in non-neoplastic gastric wall favors the hypothesis of postzygotic somatic mosaicism as the biological background of Carney triad, as well as it explains the multifocality of gastrointestinal stromal tumors of the stomach occurring in this scenario. However, precise mechanism responsible for the peculiar organ-specific distribution of Carney triad-associated tumors is still unknown.

## INTRODUCTION

Carney triad is a rare multitumoral syndrome of unknown etiology defined by occurrence of gastric gastrointestinal stromal tumors (GISTs) along with pulmonary chondromas and paragangliomas (Carney et al., 1977). This non-familial syndrome with significant female predilection may be associated with a variety of other lesions including pheochromocytomas, adrenocortical tumors and esophageal leiomyomas (Carney, 1999). The majority of patients have two of these tumors, GISTs and pulmonary chondromas being the most common combination (Candanedo-Gonzalez et al., 2000). GISTs and paragangliomas arising in patients with Carney triad share a similar morphology with tumors arising in the setting of Carney-Stratakis syndrome and hereditary paraganglioma-pheochromocytoma syndromes. The tumors show impairment of function of the mitochondrial enzyme complex succinate dehydrogenase (SDH) due to loss of any of its subunits, which leads to destabilization of the SDH complex and absence of subunit B (SDHB) protein by immunohistochemistry (Pasini and Stratakis, 2009; Stratakis and Carney, 2009). In contrast to Carney-Stratakis syndrome, a

dyad of GIST and paraganglioma, or hereditary paraganglioma-pheochromocytoma syndromes, in which the associated tumors are caused by a germline mutation of succinate dehydrogenase subunits genes (*SDHx*), the tumors arising in most Carney triad patients demonstrate *SDHC* promoter hypermethylation (Haller et al., 2014; Killian et al., 2014; Urbini et al., 2015). Unfortunately, the explanation of multiple occurrence of tumors in the non-familial setting of Carney triad, as well as their specific tissue distribution is still lacking. In order to shed some light on the possible mechanism of oncogenesis in patients affected by Carney triad we analyzed the distribution of *SDHC* promoter methylation in various neoplastic and non-neoplastic tissues in a small series of cases.

## **MATERIALS AND METHODS:**

Samples of neoplastic and non-neoplastic tissue of 3 patients with Carney triad were retrieved from consultation archives of the authors.

Tissue for light microscopy was fixed in 4 % formaldehyde and embedded in paraffin using routine procedures. Five micrometer-thick sections were cut from the tissue blocks and stained with hematoxylin and eosin.

For immunohistochemical investigations the following primary antibodies were used: CD117, c-kit (polyclonal, 1:800, Dako, Glostrup, Denmark), DOG1 (SP31, RTU, Ventana, Tucson, AZ), Desmin (D33, 1:200, Dako, Glostrup, Denmark), S100 (polyclonal, RTU, Ventana, Tucson, AZ), SDHB (21A11, 1:100, Abcam, Cambridge, UK), SDHA (2E3GC12FB2AE2, 1:1000, Abcam, Cambridge, UK), Chromogranin A (DAK-A3, 1:400, Dako, Glostrup, Denmark), Synaptophysin (SP11, RTU, Ventana, Tucson, AZ), Melan A (A103, 1:100, Dako, Glostrup, Denmark), Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26, RTU, Ventana, Tucson, AZ). No special pretreatment was used. The primary antibodies were visualized employing the enzyme alkaline phosphatase as the detecting system (Ventana Medical System, Inc., Tucson, Arizona). Appropriate positive and negative control slides were employed. Furthermore, non-neoplastic endothelial cells were used as internal positive control.

All GIST cases included in the study were previously defined on the basis of their morphology combined with immunoexpression of KIT (CD117) and DOG1, and lack of immunoexpression of desmin and S-100 protein. The diagnosis of pheochromocytoma was

based on its typical morphology along with positive immunohistochemical finding of expression of chromogranin and synaptophysin, while Pan Keratin cocktail and melan A were found to be negative.

DNA from FFPE tissue was extracted using a QIA-symphony DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) on an automated extraction system (QIA-symphony SP, Qiagen) according to the manufacturer's supplementary protocol for FFPE samples.

Mutational analysis of coding sequence, including exon-intron junctions of *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD* genes was performed by PCR and direct sequencing as published elsewhere (Dubova et al., 2015). In GIST cases, analysis of exons 9, 11, 13 and 17 of the *KIT* gene (accession number U63834), exons 12, 14 and 18 of the *PDGFRA* gene (accession number D50017) was performed as well.

For *SDHC* promoter aberrant methylation analysis the tumor DNA samples were subjected to bisulfite conversion ("EZ DNA Methylation-Gold Kit;" Zymo Research, Burlington, ON, Canada) and methylation-specific PCR targeting the *SDHC* promoter. Primers SDHC-MF 5'TAAATTAGTTAGGTAGAGTTGAGC3' and SDHC-MR 5'CGATCTAAACGAAAATAACG3' were used for amplification of 146bp long fragment of methylated DNA. Primers SDHC-UF 5'AGTAAATTAGTTAGGTAGAGTTGAGT3' and SDHC-UR 5'TCCAATCTAAACAAAATAACA3' were used for amplification of 150bp long fragment of unmethylated DNA. The following amplification program was used: initial denaturation at 95°C/10 minutes, then 40 amplification cycles (95°C/ 30s, 53°C/45s, 72°C/60s) and final extension at 72°C/7 minutes. The size of all PCR products was confirmed on 2 % agarose gel electrophoresis.

## RESULTS

Details on the patients, tumors and available non-neoplastic tissues are shown in the Table. Briefly, all 3 patients were females, mean age at the time of first presentation was 13.3 years. SDHB-negative epithelioid GISTs of the stomach were present in all cases. Moreover, Patient 1 was also found to have a pulmonary chondroma, and Patient 3 had a pheochromocytoma of the left adrenal, adenoma of the right adrenal, extraadrenal paraganglioma and a nodular lesion 49 mm in diameter in the right lung, which was suspicious of pulmonary chondroma, but not verified histologically. All GISTs and the pheochromocytoma were

immunohistochemically negative for SDHB, but positive for SDHA. *KIT*, *PDGFRA* and *SDHB-D* genes were found to be wild type, with the exception of polymorphisms in *KIT* exon 17 and *PDGFRA* exons 12 and 18 in Patient 1. All GISTs were found to bear *SDHC* promoter hypermethylation. Further, *KIT*, *DOG1* and *SDHB* immunoexpression, as well as *SDHC* hypermethylation status of the available non-neoplastic tissues (namely perigastric lymph node, duodenum, and stomach) were investigated in all 3 patients. In Patients 1 and 2, the tissues of a perigastric lymph node and duodenum were unmethylated at the *SDHC* promoter site, whereas the non-neoplastic tissue of the stomach from Patient 3 displayed *SDHC* promoter hypermethylation. Presence of neoplastic cells in these control tissues was excluded both by conventional histology and the immunohistochemistry mentioned above.

## DISCUSSION

SDH, also known as mitochondrial complex II, is an enzyme complex composed of four main subunits (SDHA, SDHB, SDHC, and SDHD), assembly factors (SDHAF1, SDHAF2), iron-sulphur centers and ubiquinone, which is located in the inner mitochondrial membrane. It participates in the electron transport chain and Krebs cycle by catalyzing oxidative dehydrogenation of succinate to fumarate (Gottlieb and Tomlinson, 2005). Information on function of the whole enzyme complex can be brought by immunohistochemical analysis of expression of SDHB, because the immunoexpression of SDHB is dependent on complete assembly of the whole SDH complex. While the SDHB protein is ubiquitously expressed under normal conditions, its expression is lost in cases of dysfunction of the SDH complex. Such a dysfunction caused by loss-of-function mutations of the *SDHx* genes was first described in familial paraganglioma/pheochromocytoma syndrome (Astuti et al., 2001a; Astuti et al., 2001b; Baysal et al., 2000; McWhinney et al., 2004; Niemann and Muller, 2000; van Nederveen et al., 2009). Later on, germline mutations of *SDHx* associated with loss of SDHB expression were identified in GISTs in patients with Carney-Stratakis syndrome (McWhinney et al., 2007; Pasini et al., 2008). Since then, loss of SDHB expression was reported to occur also in other so-called *KIT* and *PDGFRA* wild-type GISTs, including familial GISTs caused by germline *SDHx* mutations, but, compared to Carney-Stratakis syndrome, devoid of the paraganglioma/pheochromocytoma component, sporadic GISTs associated with germline *SDHx* mutations, and sporadic GISTs bearing a somatic mutation of *SDHx* (Barletta and Hornick, 2012; Doyle et al., 2012; Gaal et al., 2011; Gill et al., 2010; Gill

et al., 2011; Miettinen et al., 2011; Rege et al., 2011). However, a subset of SDHB-deficient gastric GISTs could not be explained by germline or somatic *SDHx* mutations. These GISTs occur in the setting of Carney triad, which was defined as a non-familial syndrome of unknown etiology manifesting with gastric GIST, pulmonary chondroma and paraganglioma in 1977 (Carney et al., 1977). In fact, up to 78% of patients demonstrate incomplete triad, the most common combination being gastric GIST and pulmonary chondroma (Carney, 1979, 1983, 1999; Segal et al., 1994). Some patients may also develop adrenocortical adenoma and/or esophageal leiomyoma (Carney, 1999). The GISTs of Carney triad are *KIT* and *PDGFRA* wild type (Diment et al., 2005; Knop et al., 2006), and although SDHB-deficient, they were found *SDHx* wild type (Matyakhina et al., 2007).

In contrast to Carney-Stratakis syndrome, the tumors arising in most Carney triad patients demonstrate *SDHC* promoter hypermethylation (Haller et al., 2014; Killian et al., 2014; Urbini et al., 2015), although a small subset of these patients may also harbor germline *SDHx* mutations (Boikos et al., 2016). Somatic promoter hypermethylation of the *SDHC* gene is a rare event, which leads to silencing of the *SDHC* gene locus with functional impairment of the SDH enzyme complex activity (Haller et al., 2014). Current data on tissue distribution of promoter hypermethylation of *SDHC* are rather conflicting. First, *SDHC* hypermethylation was identified in tumor tissue as well as in blood and saliva of Carney triad patients. This finding was interpreted as a mosaic constitutional epimutation clonally expanding in tumor cells (Killian et al., 2014). Another recent study describes significant *SDHC* promoter hypermethylation in two sporadic SDHB-negative paragangliomas and low-level methylation in coincidental adrenocortical adenoma in a patient without *SDHx* germline mutation. Blood and reference benign adrenal tissue were unmethylated at the *SDHC* promoter site (Richter et al., 2016). Nevertheless, the blood and saliva analysis lacks information on cellular localization of the investigated DNA, which was found to be methylated in the first study. Thus, especially in blood samples, possible contamination by circulating tumor DNA (ctDNA) cannot be ruled out.

To further specify the distribution of *SDHC* promoter hypermethylation in the body of patients with Carney triad, we investigated promoter hypermethylation status of *SDHC* in neoplastic and non-neoplastic tissues of 3 new patients with Carney triad. All patients were young women and they were all affected by *KIT/PDGFRA* wild type SDHB-deficient epithelioid gastric GISTs. Further tumors detected in the 3 patients included pulmonary chondroma, pheochromocytoma, adrenocortical adenoma, and extraadrenal paraganglioma.



As all investigated tumors were *SDHA*-positive, only *SDHB-D* genes were subjected to sequence analysis and they were all found wild type. Subsequently, *SDHC* promoter hypermethylation was proven in all cases of GIST. Non-neoplastic tissues tested for *SDHC* promoter hypermethylation comprised perigastric lymph node, duodenum and stomach. While the lymph node and duodenal samples were unmethylated at the *SDHC* promoter site, the gastric tissue devoid of neoplastic cells displayed *SDHC* promoter hypermethylation.

Our results further support the hypothesis of postzygotic somatic mosaicism of *SDHC* promoter hypermethylation as a molecular genetic background of Carney triad. The finding of *SDHC* hypermethylation in non-neoplastic gastric wall explains the typical multifocal distribution and common recurrences of gastric GISTs in the setting of Carney triad, as it is reasonable to hypothesize that Carney triad patients with hypermethylation of non-neoplastic tissue may be at greater risk of recurrent or additional tumors, because of maintenance of *SDHC* epimutation (Killian et al., 2014). Unfortunately, the deregulatory events leading to *SDHC* epimutation during early developmental period and subsequent impairment of activity of SDH enzyme complex in selected cells and its descendants are currently unknown. Similarly, it remains unresolved, why the *SDHC* hypermethylation leading to Carney triad-associated tumors occurs only in selected tissues. Namely, the syndromic infliction of stomach, paraganglia and bronchial cartilage instead of a more or less regular distribution of tumors throughout foregut structures remains an enigma.

In conclusion, we present 3 new cases of Carney triad and investigate distribution of hypermethylation at the *SDHC* promoter site in the tumors and in the non-neoplastic tissue of the stomach, duodenum and lymph node. The fact, that only the gastric non-tumorous tissue displayed *SDHC* promoter hypermethylation, probably mirrors postzygotic somatic mosaicism of *SDHC* epimutation and also explains the well-known multifocality of gastric GISTs in Carney triad patients.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The study has been supported by Ministry of Education, Youth and Sports grant SVV 2017-260 391.

## REFERENCES

- Astuti D., Douglas F., Lennard T. W., Aligianis I. A., Woodward E. R., Evans D. G., Eng C., Latif F. and Maher E. R. (2001a). Germline SDHD mutation in familial pheochromocytoma. *Lancet* 357, 1181-1182.
- Astuti D., Latif F., Dallol A., Dahia P. L., Douglas F., George E., Skoldberg F., Husebye E. S., Eng C. and Maher E. R. (2001b). Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 49-54.
- Barletta J. A. and Hornick J. L. (2012). Succinate dehydrogenase-deficient tumors: diagnostic advances and clinical implications. *Adv. Anat. Pathol.* 19, 193-203.
- Baysal B. E., Ferrell R. E., Willett-Brozick J. E., Lawrence E. C., Myssiorek D., Bosch A., van der Mey A., Taschner P. E., Rubinstein W. S., Myers E. N., Richard C. W., 3rd, Cornelisse C. J., Devilee P. and Devlin B. (2000). Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 287, 848-851.
- Boikos S. A., Xekouki P., Fumagalli E., Faucz F. R., Raygada M., Szarek E., Ball E., Kim S. Y., Miettinen M., Helman L. J., Carney J. A., Pacak K. and Stratakis C. A. (2016). Carney triad can be (rarely) associated with germline succinate dehydrogenase defects. *Eur. J. Hum. Genet.* 24, 569-573.
- Candanedo-Gonzalez F. A., Krause-Senties L., Bencosme-Vinas C. M. and Santiago-Payan H. (2000). Incomplete form of Carney's triad: clinical and morphologic analysis of a case in Mexico. *Endocr. Pathol.* 11, 287-294.
- Carney J. A. (1979). The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma, and pulmonary chondroma. *Cancer* 43, 374-382.
- Carney J. A. (1983). The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, pulmonary chondroma, and functioning extra-adrenal paraganglioma: a five-year review. *Medicine (Baltimore)*. 62, 159-169.
- Carney J. A. (1999). Gastric stromal sarcoma, pulmonary chondroma, and extra-adrenal paraganglioma (Carney triad): natural history, adrenocortical component, and possible familial occurrence. *Mayo Clin. Proc.* 74, 543-552.

- Carney J. A., Sheps S. G., Go V. L. and Gordon H. (1977). The triad of gastric leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma and pulmonary chondroma. *N. Engl. J. Med.* 296, 1517-1518.
- Diment J., Tamborini E., Casali P., Gronchi A., Carney J. A. and Colecchia M. (2005). Carney triad: case report and molecular analysis of gastric tumor. *Hum. Pathol.* 36, 112-116.
- Doyle L. A., Nelson D., Heinrich M. C., Corless C. L. and Hornick J. L. (2012). Loss of succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) expression is limited to a distinctive subset of gastric wild-type gastrointestinal stromal tumours: a comprehensive genotype-phenotype correlation study. *Histopathology* 61, 801-809.
- Dubova M., Sedivcova M., Michal M., Kokoskova B., Ryska A., Smid D. and Daum O. (2015). Utility of immunohistochemical investigation of SDHB and molecular genetic analysis of SDH genes in the differential diagnosis of mesenchymal tumors of GIT. *Histol. Histopathol.* 30, 223-232.
- Gaal J., Stratakis C. A., Carney J. A., Ball E. R., Korpershoek E., Lodish M. B., Levy I., Xekouki P., van Nederveen F. H., den Bakker M. A., O'Sullivan M., Dinjens W. N. and de Krijger R. R. (2011). SDHB immunohistochemistry: a useful tool in the diagnosis of Carney-Stratakis and Carney triad gastrointestinal stromal tumors. *Mod. Pathol.* 24, 147-151.
- Gill A. J., Chou A., Vilain R., Clarkson A., Lui M., Jin R., Tobias V., Samra J., Goldstein D., Smith C., Sioson L., Parker N., Smith R. C., Sywak M., Sidhu S. B., Wyatt J. M., Robinson B. G., Eckstein R. P., Benn D. E. and Clifton-Bligh R. J. (2010). Immunohistochemistry for SDHB divides gastrointestinal stromal tumors (GISTs) into 2 distinct types. *Am. J. Surg. Pathol.* 34, 636-644.
- Gill A. J., Chou A., Vilain R. E. and Clifton-Bligh R. J. (2011). "Pediatric-type" gastrointestinal stromal tumors are SDHB negative ("type 2") GISTs. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 1245-1247.
- Gottlieb E. and Tomlinson I. P. (2005). Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat. Rev. Cancer* 5, 857-866.

- Haller F., Moskalev E. A., Faucz F. R., Barthelmeß S., Wiemann S., Bieg M., Assie G., Bertherat J., Schaefer I. M., Otto C., Rattenberry E., Maher E. R., Strobel P., Werner M., Carney J. A., Hartmann A., Stratakis C. A. and Agaimy A. (2014). Aberrant DNA hypermethylation of SDHC: a novel mechanism of tumor development in Carney triad. *Endocr. Relat. Cancer* 21, 567-577.
- Killian J. K., Miettinen M., Walker R. L., Wang Y., Zhu Y. J., Waterfall J. J., Noyes N., Retnakumar P., Yang Z., Smith W. I., Jr., Killian M. S., Lau C. C., Pineda M., Walling J., Stevenson H., Smith C., Wang Z., Lasota J., Kim S. Y., Boikos S. A., Helman L. J. and Meltzer P. S. (2014). Recurrent epimutation of SDHC in gastrointestinal stromal tumors. *Sci. Transl. Med.* 6, 268ra177.
- Knop S., Schupp M., Wardelmann E., Stueker D., Horger M. S., Kanz L., Einsele H. and Kroeber S. M. (2006). A new case of Carney triad: gastrointestinal stromal tumours and leiomyoma of the oesophagus do not show activating mutations of KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha. *J. Clin. Pathol.* 59, 1097-1099.
- Matyakhina L., Bei T. A., McWhinney S. R., Pasini B., Cameron S., Gunawan B., Stergiopoulos S. G., Boikos S., Muchow M., Dutra A., Pak E., Campo E., Cid M. C., Gomez F., Gaillard R. C., Assie G., Fuzesi L., Baysal B. E., Eng C., Carney J. A. and Stratakis C. A. (2007). Genetics of Carney triad: recurrent losses at chromosome 1 but lack of germline mutations in genes associated with paragangliomas and gastrointestinal stromal tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 2938-2943.
- McWhinney S. R., Pasini B. and Stratakis C. A. (2007). Familial gastrointestinal stromal tumors and germ-line mutations. *N. Engl. J. Med.* 357, 1054-1056.
- McWhinney S. R., Pilarski R. T., Forrester S. R., Schneider M. C., Sarquis M. M., Dias E. P. and Eng C. (2004). Large germline deletions of mitochondrial complex II subunits SDHB and SDHD in hereditary paraganglioma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 5694-5699.
- Miettinen M., Wang Z. F., Sarlomo-Rikala M., Osuch C., Rutkowski P. and Lasota J. (2011). Succinate dehydrogenase-deficient GISTs: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 66 gastric GISTs with predilection to young age. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 1712-1721.

- Niemann S. and Muller U. (2000). Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat. Genet.* 26, 268-270.
- Pasini B., McWhinney S. R., Bei T., Matyakhina L., Stergiopoulos S., Muchow M., Boikos S. A., Ferrando B., Pacak K., Assie G., Baudin E., Chompret A., Ellison J. W., Briere J. J., Rustin P., Gimenez-Roqueplo A. P., Eng C., Carney J. A. and Stratakis C. A. (2008). 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.* 16, 79-88.
- Pasini B. and Stratakis C. A. (2009). SDH mutations in tumorigenesis and inherited endocrine tumours: lesson from the pheochromocytoma-paraganglioma syndromes. *J. Intern. Med.* 266, 19-42.
- Rege T. A., Wagner A. J., Corless C. L., Heinrich M. C. and Hornick J. L. (2011). "Pediatric-type" gastrointestinal stromal tumors in adults: distinctive histology predicts genotype and clinical behavior. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 495-504.
- Richter S., Klink B., Nacke B., de Cubas A. A., Mangelis A., Rapizzi E., Meinhardt M., Skondra C., Mannelli M., Robledo M., Menschikowski M. and Eisenhofer G. (2016). Epigenetic mutation of the succinate dehydrogenase C promoter in a patient with two paragangliomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 359-363.
- Segal A., Carello S., Caterina P., Papadimitriou J. M. and Spagnolo D. V. (1994). Gastrointestinal autonomic nerve tumors: a clinicopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of 10 cases. *Pathology (Phila).* 26, 439-447.
- Stratakis C. A. and Carney J. A. (2009). The triad of paragangliomas, gastric stromal tumours and pulmonary chondromas (Carney triad), and the dyad of paragangliomas and gastric stromal sarcomas (Carney-Stratakis syndrome): molecular genetics and clinical implications. *J. Intern. Med.* 266, 43-52.
- Urbini M., Astolfi A., Indio V., Heinrich M. C., Corless C. L., Nannini M., Ravegnini G., Biasco G. and Pantaleo M. A. (2015). SDHC methylation in gastrointestinal stromal tumors (GIST): a case report. *BMC Med. Genet.* 16, 87.
- van Nederveen F. H., Gaal J., Favier J., Korpershoek E., Oldenburg R. A., de Bruyn E. M., Sleddens H. F., Derkx P., Riviere J., Dannenberg H., Petri B. J., Komminoth P., Pacak

K., Hop W. C., Pollard P. J., Mannelli M., Bayley J. P., Perren A., Niemann S., Verhofstad A. A., de Bruine A. P., Maher E. R., Tissier F., Meatchi T., Badoual C., Bertherat J., Amar L., Alataki D., Van Marck E., Ferrau F., Francois J., de Herder W. W., Peeters M. P., van Linge A., Lenders J. W., Gimenez-Roqueplo A. P., de Krijger R. R. and Dinjens W. N. (2009). An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *Lancet Oncol.* 10, 764-771.

**TABLE:** Summary of clinical, morphological and molecular genetic findings

Patient No.	1	2	3
Sex	F	F	F
Age	12	14	14 (GIST); 48 (chondroma); 57 (pheochromocytoma)
Tumor(s) (localization, size)	GIST (stomach, 60 mm); pulmonary chondroma	GIST (stomach, 58 x 40 x 35 mm)	GIST (stomach 38x36x32 mm); extraadrenal paraganglioma; pheochromocytoma (left adrenal, 75 mm); adrenal adenoma (right adrenal); stable pulmonary calcified nodular lesion , v. s. chondroma (right lung, 49x43x28 mm)
Molecular genetic profile (tumor)	Polymorphism in <i>KIT</i> exon 17 wt/2484C-T; <i>PDGFRA</i> exon 12 1701A-G/1701A-G; <i>PDGFRA</i> exon 18 wt/2472C-T; <i>SDHB-D</i> - wt	<i>KIT</i> – wt; <i>PDGFRA</i> – wt; <i>SDHB-D</i> - wt	<i>KIT</i> – wt; <i>PDGFRA</i> – wt; <i>SDHB-D</i> - wt
Metastases	Liver	Lymph nodes, liver, diaphragm, omentum	Liver (GIST)
SDHC hypermethylation (tumor)	GIST - positive	GIST - positive	GIST – positive Pheochromocytoma - positive
SDHC hypermethylation (non-neoplastic tissue)	Perigastric lymph node – negative	Duodenum – negative	Stomach – positive
Treatment	Imatinib	Sunitinib Regorafenib	0

F: female

*SDHB-D*: genes *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD*

wt: wild type

### 3. Závěr

Ačkoli by se mohlo zdát, že témata pro výzkum mezenchymálních nádorů trávicího traktu jsou již do značné míry vyčerpaná, přinášejí menší i rozsáhlé studie každoročně nové informace, díky nimž je možné nahlédnout do patogeneze i molekulární podstaty těchto jednotek.

Studie v rámci doktorské dizertační práce prokázaly několik variant genů *SDHx* dosud nejasného významu v souboru solitárních fibrózních tumorů a v ojedinělém případě mediastinálního GISTu s patogenní mutací genu *KIT*. Dále byla prokázána absence somatických mutací genu *PDGFRA* v intestinálních lipomech, což uvádí v pochybnost předpoklad o úloze germinálních mutací *PDGFRA* v onkogenezi lipomů vyskytujících se v rámci „*PDGFRA*-mutantního syndromu“. Kazuistickou formou byla demonstrována problematika imunoexprese DOG1 v diferenciální diagnostice mezenchymálních nádorů trávicího traktu. V poslední, dosud nepublikované studii distribuce metylace *SDHC* v nenádorových tkáních pacientů s Carneyho trias byla prokázána metylace *SDHC* v nenádorové stěně žaludku, avšak nikoli v lymfatických uzlinách nebo duodenu, což by mohlo vysvětlovat tendenci k multifokalitě a recidivám žaludečního GISTu u těchto pacientů.



## 4. Literatura

1. Agaimy, A., Stoehr, R., Vieth, M., et al. Benign serrated colorectal fibroblastic polyps/intramucosal perineuriomas are true mixed epithelial-stromal polyps (hybrid hyperplastic polyp/mucosal perineurioma) with frequent BRAF mutations. *Am J Surg Pathol*, 2010, 34(11): 1663-71.
2. Agaimy, A., Terracciano, L.M., Dirnhofer, S., et al. V600E BRAF mutations are alternative early molecular events in a subset of KIT/PDGFR $\alpha$  wild-type gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol*, 2009, 62(7): 613-6.
3. Agaimy, A., Vassos, N., Croner, R.S. Gastrointestinal manifestations of neurofibromatosis type 1 (Recklinghausen's disease): clinicopathological spectrum with pathogenetic considerations. *Int J Clin Exp Pathol*, 2012, 5(9): 852-62.
4. Agaimy, A., Wunsch, P.H. Gastrointestinal stromal tumours: a regular origin in the muscularis propria, but an extremely diverse gross presentation. A review of 200 cases to critically re-evaluate the concept of so-called extra-gastrointestinal stromal tumours. *Langenbecks Arch Surg*, 2006, 391(4): 322-9.
5. Agaimy, A., Wunsch, P.H. True smooth muscle neoplasms of the gastrointestinal tract: morphological spectrum and classification in a series of 85 cases from a single institute. *Langenbecks Arch Surg*, 2007, 392(1): 75-81.
6. Agaimy, A., Wunsch, P.H. Lymph node metastasis in gastrointestinal stromal tumours (GIST) occurs preferentially in young patients  $\leq$  40 years: an overview based on our case material and the literature. *Langenbecks Arch Surg*, 2009, 394(2): 375-81.
7. Agaram, N.P., Chen, C.L., Zhang, L., et al. Recurrent MYO10 mutations in pediatric and adult sclerosing and spindle cell rhabdomyosarcomas: evidence for a common pathogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014, 53(9): 779-87.
8. Agaram, N.P., Wong, G.C., Guo, T., et al. Novel V600E BRAF mutations in imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008, 47(10): 853-9.
9. Akinleye, A., Avvaru, P., Furqan, M., et al. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol*, 2013, 6(1): 88.
10. Alassiri, A.H., Ali, R.H., Shen, Y., et al. ETV6-NTRK3 Is Expressed in a Subset of ALK-Negative Inflammatory Myofibroblastic Tumors. *Am J Surg Pathol*, 2016, 40(8): 1051-61.
11. Alkhuziem, M., Burgoyne, A.M., Fanta, P.T., et al. The Call of "The Wild"-Type GIST: It's Time for Domestication. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017, 15(5): 551-554.
12. Allibone, R.O., Nanson, J.K., Anthony, P.P. Multiple and recurrent inflammatory fibroid polyps in a Devon family ('Devon polyposis syndrome'): an update. *Gut*, 1992, 33(7): 1004-5.
13. Altinok, G., Himmetoglu, C., Gurel, B., et al. Clinicopathological features and immunohistochemical staining for c-kit protein (CD117) in metastatic and primary malignant melanoma of the gastrointestinal tract. Abstract. *Virchows Archiv*, 2005, 447: 678-679.
14. Amatya, V.J., Takeshima, Y., Kaneko, M., et al. Esophageal carcinosarcoma with basaloid squamous carcinoma and rhabdomyosarcoma components with TP53 mutation. *Pathol Int*, 2004, 54(10): 803-9.
15. Amieux, P.S. Getting the GIST of the Carney Triad: growth factors, rare tumors, and cellular respiration. *Pediatr Dev Pathol*, 2004, 7(4): 306-8.

16. Andersson, J., Sjogren, H., Meis-Kindblom, J.M., et al. The complexity of KIT gene mutations and chromosome rearrangements and their clinical correlation in gastrointestinal stromal (pacemaker cell) tumors. *Am J Pathol*, 2002, 160(1): 15-22.
17. Antonescu, C.R., Suurmeijer, A.J., Zhang, L., et al. Molecular characterization of inflammatory myofibroblastic tumors with frequent ALK and ROS1 gene fusions and rare novel RET rearrangement. *Am J Surg Pathol*, 2015, 39(7): 957-67.
18. Argani, P., Fritsch, M., Kadkol, S.S., et al. Detection of the ETV6-NTRK3 chimeric RNA of infantile fibrosarcoma/cellular congenital mesoblastic nephroma in paraffin-embedded tissue: application to challenging pediatric renal stromal tumors. *Mod Pathol*, 2000, 13(1): 29-36.
19. Asada, Y., Isomoto, H., Akama, F., et al. Metastatic low-grade endometrial stromal sarcoma of the sigmoid colon three years after hysterectomy. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(15): 2367-9.
20. Baines, A.T., Xu, D., Der, C.J. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med Chem*, 2011, 3(14): 1787-808.
21. Banck, M.S., Kanwar, R., Kulkarni, A.A., et al. The genomic landscape of small intestine neuroendocrine tumors. *J Clin Invest*, 2013, 123(6): 2502-8.
22. Barras, D. BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. *Biomark Cancer*, 2015, 7(Suppl 1): 9-12.
23. Basile, U., Cavallaro, G., Polistena, A., et al. Gastrointestinal and retroperitoneal manifestations of type 1 neurofibromatosis. *J Gastrointest Surg*, 2010, 14(1): 186-94.
24. Bauer, S., Duensing, A., Demetri, G.D., et al. KIT oncogenic signaling mechanisms in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor: PI3-kinase/AKT is a crucial survival pathway. *Oncogene*, 2007.
25. Beghini, A., Tibiletti, M.G., Roversi, G., et al. Germline mutation in the juxtamembrane domain of the kit gene in a family with gastrointestinal stromal tumors and urticaria pigmentosa. *Cancer*, 2001, 92(3): 657-62.
26. Bergmann, F., Andrulis, M., Hartwig, W., et al. Discovered on gastrointestinal stromal tumor 1 (DOG1) is expressed in pancreatic centroacinar cells and in solid-pseudopapillary neoplasms-novel evidence for a histogenetic relationship. *Hum Pathol*, 2011, 42(6): 817-23.
27. Besmer, P., Murphy, J.E., George, P.C., et al. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*, 1986, 320(6061): 415-21.
28. Billings, S.D., Meisner, L.F., Cummings, O.W., et al. Synovial sarcoma of the upper digestive tract: a report of two cases with demonstration of the X;18 translocation by fluorescence in situ hybridization. *Mod Pathol*, 2000, 13(1): 68-76.
29. Blei, E., Gonzalez-Crussi, F. The intriguing nature of gastric tumors in Carney's triad. Ultrastructural and immunohistochemical observations. *Cancer*, 1992, 69(2): 292-300.
30. Boikos, S.A., Pappo, A.S., Killian, J.K., et al. 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, 2(7): 922-8.
31. Boikos, S.A., Xekouki, P., Fumagalli, E., et al. Carney triad can be (rarely) associated with germline succinate dehydrogenase defects. *Eur J Hum Genet*, 2016, 24(4): 569-73.
32. Boldorini, R., Tosoni, A., Leutner, M., et al. Multiple small intestinal stromal tumours in a patient with previously unrecognised neurofibromatosis type 1: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Pathology*, 2001, 33(3): 390-5.
33. Brand, T.M., Wheeler, D.L. KRAS mutant colorectal tumors: past and present. *Small GTPases*, 2012, 3(1): 34-9.

34. Brenca, M., Rossi, S., Polano, M., et al. Transcriptome sequencing identifies ETV6-NTRK3 as a gene fusion involved in GIST. *J Pathol*, 2016, 238(4): 543-9.
35. Burnichon, N., Cascon, A., Schiavi, F., et al. MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(10): 2828-37.
36. Candanedo-Gonzalez, F.A., Krause-Senties, L., Bencosme-Vinas, C.M., et al. Incomplete form of Carney's triad: clinical and morphologic analysis of a case in Mexico. *Endocr Pathol*, 2000, 11(4): 287-294.
37. Cantley, L.C., Neel, B.G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(8): 4240-5.
38. Carney, J.A. The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, pulmonary chondroma, and functioning extra-adrenal paraganglioma: a five-year review. *Medicine (Baltimore)*, 1983, 62(3): 159-69.
39. Carney, J.A. Gastric stromal sarcoma, pulmonary chondroma, and extra-adrenal paraganglioma (Carney Triad): natural history, adrenocortical component, and possible familial occurrence. *Mayo Clin Proc*, 1999, 74(6): 543-52.
40. Carney, J.A., Sheps, S.G., Go, V.L., et al. The triad of gastric leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma and pulmonary chondroma. *N Engl J Med*, 1977, 296(26): 1517-8.
41. Carney, J.A., Stratakis, C.A. Familial paraganglioma and gastric stromal sarcoma: a new syndrome distinct from the Carney triad. *Am J Med Genet*, 2002, 108(2): 132-9.
42. Carney, J.A., Stratakis, C.A. Stromal, fibrous, and fatty gastrointestinal tumors in a patient with a PDGFRA gene mutation. *Am J Surg Pathol*, 2008, 32(9): 1412-20.
43. Ceballos, K.M., Francis, J.A., Mazurka, J.L. Gastrointestinal stromal tumor presenting as a recurrent vaginal mass. *Arch Pathol Lab Med*, 2004, 128(12): 1442-4.
44. Cessna, M.H., Zhou, H., Perkins, S.L., et al. Are myogenin and myoD1 expression specific for rhabdomyosarcoma? A study of 150 cases, with emphasis on spindle cell mimics. *Am J Surg Pathol*, 2001, 25(9): 1150-7.
45. Cessna, M.H., Zhou, H., Sanger, W.G., et al. Expression of ALK1 and p80 in inflammatory myofibroblastic tumor and its mesenchymal mimics: a study of 135 cases. *Mod Pathol*, 2002, 15(9): 931-8.
46. Ciampi, R., Giordano, T.J., Wikenheiser-Brokamp, K., et al. HOOK3-RET: a novel type of RET/PTC rearrangement in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*, 2007, 14(2): 445-52.
47. Ciftci, B., Vardar, E., Tasli, F., et al. Reactive Nodular Fibrous Pseudotumor Presenting as a Huge Intra abdominal Mass after Abdominal Surgery: a Case Report. *Iran J Pathol*, 2015, 10(2): 149-54.
48. Ciruna, B.G., Schwartz, L., Harpal, K., et al. Chimeric analysis of fibroblast growth factor receptor-1 (Fgfr1) function: a role for FGFR1 in morphogenetic movement through the primitive streak. *Development*, 1997, 124(14): 2829-41.
49. Clary, B.M., DeMatteo, R.P., Lewis, J.J., et al. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcoma of the abdomen and retroperitoneum: a clinical comparison. *Ann Surg Oncol*, 2001, 8(4): 290-9.
50. Coffin, C.M., Watterson, J., Priest, J.R., et al. Extrapulmonary inflammatory myofibroblastic tumor (inflammatory pseudotumor). A clinicopathologic and immunohistochemical study of 84 cases. *Am J Surg Pathol*, 1995, 19(8): 859-72.
51. Colombo, P., Rahal, D., Grizzi, F., et al. Localized intra-abdominal fibromatosis of the small bowel mimicking a gastrointestinal stromal tumor: a case report. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(33): 5226-8.

52. Cook, J.R., Dehner, L.P., Collins, M.H., et al. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) expression in the inflammatory myofibroblastic tumor: a comparative immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol*, 2001, 25(11): 1364-71.
53. Corless, C.L. Gastrointestinal stromal tumors: what do we know now? *Mod Pathol*, 2014, 27 Suppl 1: S1-16.
54. Corless, C.L., 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(23): 5357-64.
55. Crucis, A., Richer, W., Brugieres, L., et al. Rhabdomyosarcomas in children with neurofibromatosis type I: A national historical cohort. *Pediatr Blood Cancer*, 2015, 62(10): 1733-8.
56. Cully, M., Shiu, J., Piekorz, R.P., et al. Transforming acidic coiled coil 1 promotes transformation and mammary tumorigenesis. *Cancer Res*, 2005, 65(22): 10363-70.
57. Daniels, M., Lurkin, I., Pauli, R., et al. Spectrum of KIT/PDGFR $\alpha$ /BRAF mutations and Phosphatidylinositol-3-Kinase pathway gene alterations in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Cancer Lett*, 2011, 312(1): 43-54.
58. Daum, O., Grossmann, P., Vanecek, T., et al. Diagnostic morphological features of PDGFRA-mutated gastrointestinal stromal tumors: molecular genetic and histologic analysis of 60 cases of gastric gastrointestinal stromal tumors. *Ann Diagn Pathol*, 2007, 11(1): 27-33.
59. Daum, O., Hatlova, J., Mandys, V., et al. Comparison of morphological, immunohistochemical, and molecular genetic features of inflammatory fibroid polyps (Vanek's tumors). *Virchows Arch*, 2010, 456(5): 491-497.
60. Daum, O., Hes, O., Vanecek, T., et al. Vanek's tumor (inflammatory fibroid polyp). Report of 18 cases and comparison with three cases of original Vanek's series. *Ann Diagn Pathol*, 2003, 7(6): 337-47.
61. Daum, O., Klecka, J., Ferda, J., et al. Gastrointestinal stromal tumor of the pancreas: case report with documentation of KIT gene mutation. *Virchows Arch*, 2005, 446(4): 470-2.
62. Daum, O., Vanecek, T., Sima, R., et al. Reactive nodular fibrous pseudotumors of the gastrointestinal tract: report of 8 cases. *Int J Surg Pathol*, 2004, 12(4): 365-74.
63. Daum, O., Zalud, R., Grossmann, P., et al. A case of imatinib-naive ileal fibrous stromal tumor with unusual morphology and double PDGFRA mutation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2010, 18(5): 484-485.
64. Debelenko, L.V., Arthur, D.C., Pack, S.D., et al. Identification of CARS-ALK fusion in primary and metastatic lesions of an inflammatory myofibroblastic tumor. *Lab Invest*, 2003, 83(9): 1255-65.
65. Debiec-Rychter, M., Sciot, R., Le Cesne, A., et al. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Cancer*, 2006, 42(8): 1093-103.
66. Debiec-Rychter, M., Wasag, B., Stul, M., et al. Gastrointestinal stromal tumours (GISTs) negative for KIT (CD117 antigen) immunoreactivity. *J Pathol*, 2004, 202(4): 430-8.
67. Delecluse, H.J., Feederle, R., O'Sullivan, B., et al. Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist. *J Clin Pathol*, 2007, 60(12): 1358-64.
68. Demetri, G.D. Differential properties of current tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors. *Semin Oncol*, 2011, 38 Suppl 1: S10-9.
69. Demetri, G.D., Reichardt, P., Kang, Y.K., et al. 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, 381(9863): 295-302.
70. Devilard, E., Bladou, F., Ramuz, O., et al. FGFR1 and WT1 are markers of human prostate cancer progression. *BMC Cancer*, 2006, 6: 272.
  71. Deyrup, A.T., Lee, V.K., Hill, C.E., et al. Epstein-Barr virus-associated smooth muscle tumors are distinctive mesenchymal tumors reflecting multiple infection events: a clinicopathologic and molecular analysis of 29 tumors from 19 patients. *Am J Surg Pathol*, 2006, 30(1): 75-82.
  72. Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., et al. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet*, 1998, 19(4): 348-55.
  73. Diller, L., Sexsmith, E., Gottlieb, A., et al. Germline p53 mutations are frequently detected in young children with rhabdomyosarcoma. *J Clin Invest*, 1995, 95(4): 1606-11.
  74. Diniz, G., Aktas, S., Ortac, R., et al. Kit expression in spindle cell rhabdomyosarcoma can possibly create a different approach for its tumorigenesis and therapy. *Pathol Res Pract*, 2006, 202(9): 671-7.
  75. Donner, L.R., Trompler, R.A., White, R.R.t. Progression of inflammatory myofibroblastic tumor (inflammatory pseudotumor) of soft tissue into sarcoma after several recurrences. *Hum Pathol*, 1996, 27(10): 1095-8.
  76. Doorn, P.F., Molenaar, W.M., Buter, J., et al. Malignant peripheral nerve sheath tumors in patients with and without neurofibromatosis. *Eur J Surg Oncol*, 1995, 21(1): 78-82.
  77. Ernst, S.I., Hubbs, A.E., Przygodzki, R.M., et al. KIT mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Lab Invest*, 1998, 78(12): 1633-6.
  78. Eser, S., Schnieke, A., Schneider, G., et al. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 2014, 111(5): 817-22.
  79. Falchook, G.S., Trent, J.C., Heinrich, M.C., et al. 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, 4(2): 310-5.
  80. Fassan, M., Salmaso, R., Saraggi, D., et al. Plexiform fibromyxoma of the gallbladder. *Pathologica*, 2015, 107(3-4): 181-4.
  81. Fletcher, C.D., Berman, J.J., Corless, C., et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol*, 2002, 33(5): 459-65.
  82. Fletcher, J.A. KIT Oncogenic Mutations: Biologic Insights, Therapeutic Advances, and Future Directions. *Cancer Res*, 2016, 76(21): 6140-6142.
  83. Folpe, A.L., Fanburg-Smith, J.C., Miettinen, M., et al. Atypical and malignant glomus tumors: analysis of 52 cases, with a proposal for the reclassification of glomus tumors. *Am J Surg Pathol*, 2001, 25(1): 1-12.
  84. Fox, K.R., Moussa, S.M., Mitre, R.J., et al. Clinical and pathologic features of primary gastric rhabdomyosarcoma. *Cancer*, 1990, 66(4): 772-8.
  85. Fruman, D.A., Rommel, C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(2): 140-56.
  86. Fujjie, M., Yamamoto, M., Taguchi, K., et al. Gastric carcinosarcoma with rhabdomyosarcomatous differentiation: a case report and review. *Surg Case Rep*, 2016, 2(1): 52.
  87. Furlong, M.A., Mentzel, T., Fanburg-Smith, J.C. Pleomorphic rhabdomyosarcoma in adults: a clinicopathologic study of 38 cases with emphasis on morphologic variants and recent skeletal muscle-specific markers. *Mod Pathol*, 2001, 14(6): 595-603.

88. Gallo, S.H., Sagatelian, M.A. Benign schwannoma of the small intestine: an unusual cause of gastrointestinal bleeding. *J Ky Med Assoc*, 1995, 93(7): 291-4.
89. Garlipp, B., Bruns, C.J. State of the Art in the Treatment of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Gastrointest Tumors*, 2014, 1(4): 221-36.
90. Gauchotte, G., Bressenot, A., Serradori, T., et al. Reactive nodular fibrous pseudotumor: a first report of gastric localization and clinicopathologic review. *Gastroenterol Clin Biol*, 2009, 33(12): 1076-81.
91. Geller, M.A., Argenta, P., Bradley, W., et al. Treatment and recurrence patterns in endometrial stromal sarcomas and the relation to c-kit expression. *Gynecol Oncol*, 2004, 95(3): 632-6.
92. Gengler, C., Guillou, L. Solitary fibrous tumour and haemangiopericytoma: evolution of a concept. *Histopathology*, 2006, 48(1): 63-74.
93. Giarola, M., Wells, D., Mondini, P., et al. Mutations of adenomatous polyposis coli (APC) gene are uncommon in sporadic desmoid tumours. *Br J Cancer*, 1998, 78(5): 582-7.
94. Gibson, J.A., Hornick, J.L. Mucosal Schwann cell "hamartoma": clinicopathologic study of 26 neural colorectal polyps distinct from neurofibromas and mucosal neuromas. *Am J Surg Pathol*, 2009, 33(5): 781-7.
95. Gill, A.J., Chou, A., Vilain, R., et al. Immunohistochemistry for SDHB divides gastrointestinal stromal tumors (GISTs) into 2 distinct types. *Am J Surg Pathol*, 2010, 34(5): 636-44.
96. Gleason, B.C., Hornick, J.L. Inflammatory myofibroblastic tumours: where are we now? *J Clin Pathol*, 2008, 61(4): 428-37.
97. Golden, T., Stout, A.P. Smooth muscle tumours of the gastrointestinal tract and retroperitoneal tissues. *Surg Gynecol Obstet*, 1941, 73(3): 784-790.
98. Gottlieb, E., Tomlinson, I.P. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(11): 857-66.
99. Gripp, K.W. Tumor predisposition in Costello syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2005, 137C(1): 72-7.
100. Groisman, G.M., Polak-Charcon, S. Fibroblastic polyp of the colon and colonic perineurioma: 2 names for a single entity? *Am J Surg Pathol*, 2008, 32(7): 1088-94.
101. Groisman, G.M., Polak-Charcon, S., Appelman, H.D. Fibroblastic polyp of the colon: clinicopathological analysis of 10 cases with emphasis on its common association with serrated crypts. *Histopathology*, 2006, 48(4): 431-7.
102. Gutmann, D.H., Ferner, R.E., Listernick, R.H., et al. Neurofibromatosis type 1. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17004.
103. Guzel, T., Mech, K., Mazurkiewicz, M., et al. A very rare case of a small bowel leiomyosarcoma leading to ileocaecal intussusception treated with a laparoscopic resection: a case report and a literature review. *World J Surg Oncol*, 2016, 14(1): 48.
104. Haller, F., Moskalev, E.A., Faucz, F.R., et al. Aberrant DNA hypermethylation of SDHC: a novel mechanism of tumor development in Carney triad. *Endocr Relat Cancer*, 2014, 21(4): 567-77.
105. Han, J., Chong, Y., Kim, T.J., et al. Mucosal Schwann Cell Hamartoma in Colorectal Mucosa: A Rare Benign Lesion That Resembles Gastrointestinal Neuroma. *J Pathol Transl Med*, 2017, 51(2): 187-189.
106. Hasegawa, T., Matsuno, Y., Shimoda, T., et al. Extrathoracic solitary fibrous tumors: their histological variability and potentially aggressive behavior. *Hum Pathol*, 1999, 30(12): 1464-73.

107. Hasegawa, T., Matsuno, Y., Shimoda, T., et al. Gastrointestinal stromal tumor: consistent CD117 immunostaining for diagnosis, and prognostic classification based on tumor size and MIB-1 grade. *Hum Pathol*, 2002, 33(6): 669-76.
108. Hayashi, Y., Okazaki, T., Yamataka, A., et al. Gastrointestinal stromal tumor in a child and review of the literature. *Pediatr Surg Int*, 2005, 21(11): 914-7.
109. Heidet, L., Boye, E., Cai, Y., et al. Somatic deletion of the 5' ends of both the COL4A5 and COL4A6 genes in a sporadic leiomyoma of the esophagus. *Am J Pathol*, 1998, 152(3): 673-8.
110. Heinrich, M.C., Corless, C.L., Demetri, G.D., et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol*, 2003, 21(23): 4342-9.
111. Heinrich, M.C., Corless, C.L., Duensing, A., et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*, 2003, 299(5607): 708-10.
112. Hemmi, A., Inaniwa, Y., Ohno, S., et al. Relationship between skeinoid fibers and stromal matrix in gastrointestinal stromal tumors: morphometric analysis with quick-freezing and deep-etching method. *Pathol Int*, 2001, 51(5): 338-48.
113. Higa, S., Matsumoto, M., Tamai, O., et al. Plexiform leiomyoma of the esophagus: a peculiar gross variant simulating plexiform neurofibroma. *J Gastroenterol*, 1996, 31(1): 100-4.
114. Hilal, L., Barada, K., Mukherji, D., et al. Gastrointestinal (GI) leiomyosarcoma (LMS) case series and review on diagnosis, management, and prognosis. *Med Oncol*, 2016, 33(2): 20.
115. Hill, D.A., Dehner, L.P., Gow, K.W., et al. Perianal rhabdomyosarcoma presenting as a perirectal abscess: A report of 11 cases. *J Pediatr Surg*, 2002, 37(4): 576-81.
116. Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*, 1998, 279(5350): 577-80.
117. 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(3): 660-7.
118. Hoekstra, A.S., Bayley, J.P. The role of complex II in disease. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1827(5): 543-51.
119. Hostein, I., Faur, N., Primois, C., et al. BRAF mutation status in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Pathol*, 2010, 133(1): 141-8.
120. Hrzenjak, A. JAZF1/SUZ12 gene fusion in endometrial stromal sarcomas. *Orphanet J Rare Dis*, 2016, 11: 15.
121. Huss, S., Kunstlinger, H., Wardelmann, E., et al. A subset of gastrointestinal stromal tumors previously regarded as wild-type tumors carries somatic activating mutations in KIT exon 8 (p.D419del). *Mod Pathol*, 2013, 26(7): 1004-12.
122. Chan, O.T., Haghghi, P. Hamartomatous polyps of the colon: ganglioneuromatous, stromal, and lipomatous. *Arch Pathol Lab Med*, 2006, 130(10): 1561-6.
123. Choi, Y.J., Jung, S.H., Kim, M.S., et al. Genomic landscape of endometrial stromal sarcoma of uterus. *Oncotarget*, 2015, 6(32): 33319-28.
124. Chou, A., Chen, J., Clarkson, A., et al. Succinate dehydrogenase-deficient GISTs are characterized by IGF1R overexpression. *Mod Pathol*, 2012, 25(9): 1307-13.
125. Janeway, K.A., Kim, S.Y., 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(1): 314-8.
126. Janeway, K.A., Zhu, M.J., Barretina, J., et al. Strong expression of IGF1R in pediatric gastrointestinal stromal tumors without IGF1R genomic amplification. *Int J Cancer*, 2010, 127(11): 2718-22.

127. Jaroszewski, D.E., Lam-Himlin, D., Gruden, J., et al. Plexiform leiomyoma of the esophagus: a complex radiographic, pathologic and endoscopic diagnosis. *Ann Diagn Pathol*, 2011, 15(5): 342-6.
128. Joensuu, H., Roberts, P.J., 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(14): 1052-6.
129. Jonaitis, L., Kiudelis, M., Slepavicius, P., et al. Plexiform angiomyxoid myofibroblastic tumor of stomach: A rare case. *World J Gastrointest Endosc*, 2016, 8(18): 674-678.
130. Jora, C., Pankaj, P., Verma, R., et al. Primary malignant melanoma of the esophagus. *Indian J Nucl Med*, 2015, 30(2): 162-4.
131. Kang, G., Park, H.J., Kim, J.Y., et al. Glomus tumor of the stomach: a clinicopathologic analysis of 10 cases and review of the literature. *Gut Liver*, 2012, 6(1): 52-7.
132. Kawagishi, J., Kumabe, T., Yoshimoto, T., et al. Structure, organization, and transcription units of the human alpha-platelet-derived growth factor receptor gene, PDGFRA. *Genomics*, 1995, 30(2): 224-32.
133. Kebebew, E., Weng, J., Bauer, J., et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg*, 2007, 246(3): 466-70.
134. Kethu, S.R., Zheng, S., Eid, R. Metastatic low-grade endometrial stromal sarcoma presented as a subepithelial mass in the stomach was diagnosed by EUS-guided FNA. *Gastrointest Endosc*, 2005, 62(5): 814-6.
135. Killian, J.K., Miettinen, M., Walker, R.L., et al. Recurrent epimutation of SDHC in gastrointestinal stromal tumors. *Sci Transl Med*, 2014, 6(268): 268ra177.
136. Kim, M.K., Higgins, J., Cho, E.Y., et al. Expression of CD34, bcl-2, and kit in inflammatory fibroid polyps of the gastrointestinal tract. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2000, 8(2): 147-53.
137. Kinoshita, K., Isozaki, K., Hirota, S., et al. c-kit gene mutation at exon 17 or 13 is very rare in sporadic gastrointestinal stromal tumors. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18(2): 147-51.
138. Knezevich, S.R., McFadden, D.E., Tao, W., et al. A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma. *Nat Genet*, 1998, 18(2): 184-7.
139. Koelsche, C., Schweizer, L., Renner, M., et al. Nuclear relocation of STAT6 reliably predicts NAB2-STAT6 fusion for the diagnosis of solitary fibrous tumour. *Histopathology*, 2014, 65(5): 613-22.
140. Kunstlinger, H., Huss, S., Merkelbach-Bruse, S., et al. Gastrointestinal Stromal Tumors With KIT Exon 9 Mutations: Update on Genotype-Phenotype Correlation and Validation of a High-Resolution Melting Assay for Mutational Testing. *Am J Surg Pathol*, 2013, 37(11): 1648-59.
141. Kwon, M.S., Lee, S.S., Ahn, G.H. Schwannomas of the gastrointestinal tract: clinicopathological features of 12 cases including a case of esophageal tumor compared with those of gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas of the gastrointestinal tract. *Pathol Res Pract*, 2002, 198(9): 605-13.
142. Lamba, G., Gupta, R., Lee, B., et al. Current management and prognostic features for gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Exp Hematol Oncol*, 2012, 1(1): 14.
143. Lannon, C.L., Sorensen, P.H. ETV6-NTRK3: a chimeric protein tyrosine kinase with transformation activity in multiple cell lineages. *Semin Cancer Biol*, 2005, 15(3): 215-23.



144. Lasota, J., Dansonka-Mieszkowska, A., Sobin, L.H., et al. A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab Invest*, 2004, 84(7): 874-83.
145. Lasota, J., Felisiak-Golabek, A., Wasag, B., et al. Frequency and clinicopathologic profile of PIK3CA mutant GISTs: molecular genetic study of 529 cases. *Mod Pathol*, 2016, 29(3): 275-82.
146. Lasota, J., Stachura, J., Miettinen, M. GISTs with PDGFRA exon 14 mutations represent subset of clinically favorable gastric tumors with epithelioid morphology. *Lab Invest*, 2006, 86(1): 94-100.
147. Lasota, J., Wang, Z., Kim, S.Y., et al. 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(1): 114-9.
148. Lasota, J., Wang, Z.F., Sobin, L.H., et al. Gain-of-function PDGFRA mutations, earlier reported in gastrointestinal stromal tumors, are common in small intestinal inflammatory fibroid polyps. A study of 60 cases. *Mod Pathol*, 2009, 22(8): 1049-56.
149. Lasota, J., Wozniak, A., Sarlomo-Rikala, M., et al. Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases. *Am J Pathol*, 2000, 157(4): 1091-5.
150. Lasota, J., Xi, L., Coates, T., et al. No KRAS mutations found in gastrointestinal stromal tumors (GISTs): molecular genetic study of 514 cases. *Mod Pathol*, 2013, 26(11): 1488-91.
151. Lee, C.H., Lin, Y.H., Lin, H.Y., et al. Gastrointestinal stromal tumor of the prostate: a case report and literature review. *Hum Pathol*, 2006, 37(10): 1361-5.
152. Lens, M., Bataille, V., Krivokapic, Z. Melanoma of the small intestine. *Lancet Oncol*, 2009, 10(5): 516-21.
153. Liegl, B., Leithner, A., Bauernhofer, T., et al. Immunohistochemical and mutational analysis of PDGF and PDGFR in desmoid tumours: is there a role for tyrosine kinase inhibitors in c-kit-negative desmoid tumours? *Histopathology*, 2006, 49(6): 576-81.
154. Line, A., Slucka, Z., Stengrevics, A., et al. Altered splicing pattern of TACC1 mRNA in gastric cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 2002, 139(1): 78-83.
155. Liu, T., Willmore-Payne, C., Layfield, L.J., et al. A gastrointestinal stromal tumor of the stomach morphologically resembling a neurofibroma: demonstration of a novel platelet-derived growth factor receptor alpha exon 18 mutation. *Hum Pathol*, 2008, 39(12): 1849-53.
156. Long, K.B., Butrynski, J.E., Blank, S.D., et al. Primary extragastrointestinal stromal tumor of the pleura: report of a unique case with genetic confirmation. *Am J Surg Pathol*, 2010, 34(6): 907-12.
157. Lonsdale, R.N., Roberts, P.F., Vaughan, R., et al. Familial oesophageal leiomyomatosis and nephropathy. *Histopathology*, 1992, 20(2): 127-33.
158. Lopes, L.F., West, R.B., Bacchi, L.M., et al. DOG1 for the diagnosis of gastrointestinal stromal tumor (GIST): Comparison between 2 different antibodies. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2010, 18(4): 333-7.
159. Lopez-Guerrero, J.A., Navarro, S., Noguera, R., et al. Mutational analysis of the c-KIT AND PDGFRalpha in a series of molecularly well-characterized synovial sarcomas. *Diagn Mol Pathol*, 2005, 14(3): 134-9.
160. Lovly, C.M., Gupta, A., Lipson, D., et al. Inflammatory myofibroblastic tumors harbor multiple potentially actionable kinase fusions. *Cancer Discov*, 2014, 4(8): 889-95.

161. Lucas, D.R., al-Abadi, M., Tabaczka, P., et al. c-Kit expression in desmoid fibromatosis. Comparative immunohistochemical evaluation of two commercial antibodies. *Am J Clin Pathol*, 2003, 119(3): 339-45.
162. Luis, J., Ejtehadi, F., Howlett, D.C., et al. Leiomyosarcoma of the small bowel: Report of a case and review of the literature. *Int J Surg Case Rep*, 2015, 6C: 51-4.
163. Luk, P.P., Yu, B., Ng, C.C., et al. BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*, 2015, 4(2): 142-8.
164. Mace, J., Sybil Biermann, J., Sondak, V., et al. Response of extraabdominal desmoid tumors to therapy with imatinib mesylate. *Cancer*, 2002, 95(11): 2373-9.
165. Maeyama, H., Hidaka, E., Ota, H., et al. Familial gastrointestinal stromal tumor with hyperpigmentation: association with a germline mutation of the c-kit gene. *Gastroenterology*, 2001, 120(1): 210-5.
166. Majewska, H., Skalova, A., Stodulski, D., et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands: a new entity associated with ETV6 gene rearrangement. *Virchows Arch*, 2015, 466(3): 245-54.
167. Martland, G.T., Goodman, A.J., Shepherd, N.A. CD117 expression in oesophageal carcinosarcoma: a potential diagnostic pitfall. *Histopathology*, 2004, 44(1): 77-80.
168. Mazur, M.T., Clark, H.B. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol*, 1983, 7(6): 507-19.
169. McKeeby, J.L., Li, X., Zhuang, Z., et al. Multiple leiomyomas of the esophagus, lung, and uterus in multiple endocrine neoplasia type 1. *Am J Pathol*, 2001, 159(3): 1121-7.
170. McWhinney, S.R., Pasini, B., Stratakis, C.A. Familial gastrointestinal stromal tumors and germ-line mutations. *N Engl J Med*, 2007, 357(10): 1054-6.
171. McWhinney, S.R., Pilarski, R.T., Forrester, S.R., et al. Large germline deletions of mitochondrial complex II subunits SDHB and SDHD in hereditary paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(11): 5694-9.
172. Medeiros, F., Corless, C.L., Duensing, A., et al. KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol*, 2004, 28(7): 889-94.
173. Miettinen, M., Fetsch, J.F., Sobin, L.H., et al. Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. *Am J Surg Pathol*, 2006, 30(1): 90-6.
174. Miettinen, M., Furlong, M., Sarlomo-Rikalala, M., et al. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the rectum and anus: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 144 cases. *Am J Surg Pathol*, 2001, 25(9): 1121-33.
175. Miettinen, M., Killian, J.K., Wang, Z.F., et al. Immunohistochemical loss of succinate dehydrogenase subunit A (SDHA) in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) signals SDHA germline mutation. *Am J Surg Pathol*, 2013, 37(2): 234-40.
176. Miettinen, M., Lasota, J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol*, 2006, 23(2): 70-83.
177. Miettinen, M., Lasota, J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*, 2006, 130(10): 1466-78.
178. Miettinen, M., Makhlof, H., Sobin, L.H., et al. Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol*, 2006, 30(4): 477-89.

179. Miettinen, M., Makhlof, H.R., Sobin, L.H., et al. Plexiform fibromyxoma: a distinctive benign gastric antral neoplasm not to be confused with a myxoid GIST. *Am J Surg Pathol*, 2009, 33(11): 1624-32.
180. Miettinen, M., Monihan, J.M., Sarlomo-Rikala, M., et al. Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors (GISTs) primary in the omentum and mesentery: clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *Am J Surg Pathol*, 1999, 23(9): 1109-18.
181. Miettinen, M., Paal, E., Lasota, J., et al. Gastrointestinal glomus tumors: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 32 cases. *Am J Surg Pathol*, 2002, 26(3): 301-11.
182. Miettinen, M., Sarlomo-Rikala, M., Lasota, J. Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Hum Pathol*, 1999, 30(10): 1213-20.
183. Miettinen, M., Sarlomo-Rikala, M., Sobin, L.H., et al. Esophageal stromal tumors: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 17 cases and comparison with esophageal leiomyomas and leiomyosarcomas. *Am J Surg Pathol*, 2000, 24(2): 211-22.
184. Miettinen, M., Sarlomo-Rikala, M., Sobin, L.H., et al. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcomas in the colon: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases. *Am J Surg Pathol*, 2000, 24(10): 1339-52.
185. Miettinen, M., Sobin, L.H., Lasota, J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol*, 2005, 29(1): 52-68.
186. Miettinen, M., Sobin, L.H., Lasota, J. True smooth muscle tumors of the small intestine: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 25 cases. *Am J Surg Pathol*, 2009, 33(3): 430-6.
187. Miettinen, M.M., Sarlomo-Rikala, M., Kovatich, A.J., et al. Calponin and h-caldesmon in soft tissue tumors: consistent h-caldesmon immunoreactivity in gastrointestinal stromal tumors indicates traits of smooth muscle differentiation. *Mod Pathol*, 1999, 12(8): 756-62.
188. Min, K.W., Balaton, A.J. Small intestinal stromal tumors with skeinoid fibers in neurofibromatosis: report of four cases with ultrastructural study of skeinoid fibers from paraffin blocks. *Ultrastruct Pathol*, 1993, 17(3-4): 307-14.
189. Miranda, C., Nucifora, M., Molinari, F., et al. KRAS and BRAF mutations predict primary resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(6): 1769-76.
190. Miyamoto, H., Molena, D.A., Schoeniger, L.O., et al. Solitary fibrous tumor of the pancreas: a case report. *Int J Surg Pathol*, 2007, 15(3): 311-4.
191. Miyoshi, Y., Iwao, K., Nawa, G., et al. Frequent mutations in the beta-catenin gene in desmoid tumors from patients without familial adenomatous polyposis. *Oncol Res*, 1998, 10(11-12): 591-4.
192. Mohtaram, A., Mesmoudi, S., M'Rabti, H., et al. Malignant peripheral nerve sheath tumor of the small bowel: an unusual presentation with fatal outcome. *Case Rep Oncol Med*, 2013, 2013: 423867.
193. Montgomery, E., Torbenson, M.S., Kaushal, M., et al. Beta-catenin immunohistochemistry separates mesenteric fibromatosis from gastrointestinal stromal tumor and sclerosing mesenteritis. *Am J Surg Pathol*, 2002, 26(10): 1296-301.
194. Moris, D., Spanou, E., Sougioultzis, S., et al. Duodenal plexiform fibromyxoma as a cause of obscure upper gastrointestinal bleeding: A case report. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(1): e5883.

195. Morotti, R.A., Nicol, K.K., Parham, D.M., et al. An immunohistochemical algorithm to facilitate diagnosis and subtyping of rhabdomyosarcoma: the Children's Oncology Group experience. *Am J Surg Pathol*, 2006, 30(8): 962-8.
196. Mussi, C., Schildhaus, H.U., Gronchi, A., et al. Therapeutic consequences from molecular biology for gastrointestinal stromal tumor patients affected by neurofibromatosis type 1. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(14): 4550-5.
197. Nakamura, Y., Inui, K., Yoshino, J., et al. Inflammatory myofibroblastic tumor (inflammatory fibrosarcoma) of the pancreas: a case report. *Hepatogastroenterology*, 2005, 52(62): 625-8.
198. Nannini, M., Astolfi, A., Urbini, M., et al. Integrated genomic study of quadruple-WT GIST (KIT/PDGFR $\alpha$ /SDH/RAS pathway wild-type GIST). *BMC Cancer*, 2014, 14: 685.
199. Nemoto, H., Tate, G., Schirinzi, A., et al. Novel NF1 gene mutation in a Japanese patient with neurofibromatosis type 1 and a gastrointestinal stromal tumor. *J Gastroenterol*, 2006, 41(4): 378-82.
200. Nga, M.E., Wong, A.S., Wee, A., et al. Cytokeratin expression in gastrointestinal stromal tumours: a word of caution. *Histopathology*, 2002, 40(5): 480-1.
201. Nishida, T., Hirota, S., Taniguchi, M., et al. Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene. *Nat Genet*, 1998, 19(4): 323-4.
202. Nishida, T., Tsujimoto, M., Takahashi, T., et al. Gastrointestinal stromal tumors in Japanese patients with neurofibromatosis type I. *J Gastroenterol*, 2016, 51(6): 571-8.
203. Novelli, M., Rossi, S., Rodriguez-Justo, M., et al. DOG1 and CD117 are the antibodies of choice in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology*, 2010, 57(2): 259-70.
204. Ogasawara, N., Sasaki, M., Ishiguro, H., et al. Gastric schwannoma with adjacent external progression harbored aberrant NF2 gene. *Dig Endosc*, 2009, 21(3): 192-5.
205. Okamura, K., Yamamoto, H., Ishimaru, Y., et al. Clinical characteristics and surgical treatment of perianal and perineal rhabdomyosarcoma: analysis of Japanese patients and comparison with IRSG reports. *Pediatr Surg Int*, 2006, 22(2): 129-34.
206. Pandey, D., Verma, A., Akhtar, A., et al. Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumour of Small Intestine Presenting as Ileo-Ileal Intussusception - A Rare Tumour with Unusual Complication. *J Clin Diagn Res*, 2015, 9(5): XD03-XD04.
207. Pantaleo, M.A., Urbini, M., Indio, V., et al. Genome-Wide Analysis Identifies MEN1 and MAX Mutations and a Neuroendocrine-Like Molecular Heterogeneity in Quadruple WT GIST. *Mol Cancer Res*, 2017, 15(5): 553-562.
208. Papadelis, A., Brooks, C.J., Albaran, R.G. Gastric glomus tumor. *J Surg Case Rep*, 2016, 2016(11).
209. Parfitt, J.R., Xu, J., Kontozoglou, T., et al. Primary monophasic synovial sarcoma of the colon. *Histopathology*, 2007, 50(4): 521-3.
210. Pasini, B., Matyakhina, L., Bei, T., et al. Multiple gastrointestinal stromal and other tumors caused by platelet-derived growth factor receptor alpha gene mutations: a case associated with a germline V561D defect. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(9): 3728-32.
211. Pasini, B., McWhinney, S.R., Bei, T., et al. 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, 16(1): 79-88.
212. Pasquini, P., Baiocchini, A., Falasca, L., et al. Mucosal Schwann cell "Hamartoma": a new entity? *World J Gastroenterol*, 2009, 15(18): 2287-9.

213. Patil, D.T.,Rubin, B.P. Gastrointestinal stromal tumor: advances in diagnosis and management. *Arch Pathol Lab Med*, 2011, 135(10): 1298-310.
214. Pauls, K., Merkelbach-Bruse, S., Thal, D., et al. PDGFRalpha- and c-kit-mutated gastrointestinal stromal tumours (GISTs) are characterized by distinctive histological and immunohistochemical features. *Histopathology*, 2005, 46(2): 166-75.
215. Penzel, R., Aulmann, S., Moock, M., et al. The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. *J Clin Pathol*, 2005, 58(6): 634-9.
216. Perez, D., Demartines, N., Meier, K., et al. Protein S100 as prognostic marker for gastrointestinal stromal tumors: a clinicopathological risk factor analysis. *J Invest Surg*, 2007, 20(3): 181-6.
217. Prevot, S., Bienvenu, L., Vaillant, J.C., et al. Benign schwannoma of the digestive tract: a clinicopathologic and immunohistochemical study of five cases, including a case of esophageal tumor. *Am J Surg Pathol*, 1999, 23(4): 431-6.
218. Purgina, B., Rao, U.N., Miettinen, M., et al. AIDS-Related EBV-Associated Smooth Muscle Tumors: A Review of 64 Published Cases. *Patholog Res Int*, 2011, 2011: 561548.
219. Quattrone, A., Wozniak, A., Dewaele, B., et al. Frequent mono-allelic loss associated with deficient PTEN expression in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol*, 2014, 27(11): 1510-20.
220. Reith, J.D., Goldblum, J.R., Lyles, R.H., et al. Extragastrintestinal (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. *Mod Pathol*, 2000, 13(5): 577-85.
221. Rekhi, B., Basak, R., Desai, S.B., et al. Immunohistochemical validation of TLE1, a novel marker, for synovial sarcomas. *Indian J Med Res*, 2012, 136(5): 766-75.
222. Ricci, R., Maggiano, N., Castri, F., et al. Role of PTEN in gastrointestinal stromal tumor progression. *Arch Pathol Lab Med*, 2004, 128(4): 421-5.
223. Ricci, R., Martini, M., Cenci, T., et al. PDGFRA-mutant syndrome. *Mod Pathol*, 2015, 28(7): 954-64.
224. Righetti, A.E., Jacomini, C., Parra, R.S., et al. Familial adenomatous polyposis and desmoid tumors. *Clinics (Sao Paulo)*, 2011, 66(10): 1839-42.
225. Richardson, S.C., Winistorfer, S.C., Poupon, V., et al. Mammalian late vacuole protein sorting orthologues participate in early endosomal fusion and interact with the cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(3): 1197-210.
226. Robertson, S.C., Tynan, J., Donoghue, D.J. RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends Genet*, 2000, 16(8): 265-271.
227. Rodriguez, J.A., Guarda, L.A., Rosai, J. Mesenteric fibromatosis with involvement of the gastrointestinal tract. A GIST simulator: a study of 25 cases. *Am J Clin Pathol*, 2004, 121(1): 93-8.
228. Romeo, S., Rossi, S., Acosta Marin, M., et al. Primary Synovial Sarcoma (SS) of the digestive system: a molecular and clinicopathological study of fifteen cases. *Clin Sarcoma Res*, 2015, 5: 7.
229. Rossi, G., Sartori, G., Valli, R., et al. The value of c-kit mutational analysis in a cytokeratin positive gastrointestinal stromal tumour. *J Clin Pathol*, 2005, 58(9): 991-3.
230. Row, D., Weiser, M.R. Anorectal melanoma. *Clin Colon Rectal Surg*, 2009, 22(2): 120-6.
231. Rubin, B.P., Singer, S., Tsao, C., et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*, 2001, 61(22): 8118-21.
232. Sakurai, S., Hasegawa, T., Sakuma, Y., et al. Myxoid epithelioid gastrointestinal stromal tumor (GIST) with mast cell infiltrations: a subtype of GIST with mutations of

- platelet-derived growth factor receptor alpha gene. *Hum Pathol*, 2004, 35(10): 1223-30.
233. Sarlomo-Rikala, M., Kovatich, A.J., Barusevicius, A., et al. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol*, 1998, 11(8): 728-34.
  234. Segal, A., Carello, S., Caterina, P., et al. Gastrointestinal autonomic nerve tumors: a clinicopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of 10 cases. *Pathology*, 1994, 26(4): 439-47.
  235. Seo, H.S., Hyeon, J.Y., Shin, O.R., et al. C-Kit-Negative Gastrointestinal Stromal Tumor in the Stomach. *J Gastric Cancer*, 2015, 15(4): 290-4.
  236. Serrano, C., George, S. Recent advances in the treatment of gastrointestinal stromal tumors. *Ther Adv Med Oncol*, 2014, 6(3): 115-27.
  237. Serrano, C., Wang, Y., Marino-Enriquez, A., et al. KRAS and KIT Gatekeeper Mutations Confer Polyclonal Primary Imatinib Resistance in GI Stromal Tumors: Relevance of Concomitant Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Dysregulation. *J Clin Oncol*, 2015, 33(22): e93-6.
  238. Shah, R., Sabanathan, S., Okereke, C.D., et al. Rhabdomyosarcoma of the oesophagus. A case report. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 1995, 36(1): 99-100.
  239. Shekitka, K.M., Sobin, L.H. Ganglioneuromas of the gastrointestinal tract. Relation to Von Recklinghausen disease and other multiple tumor syndromes. *Am J Surg Pathol*, 1994, 18(3): 250-7.
  240. Shi, E., Chmielecki, J., Tang, C.M., et al. FGFR1 and NTRK3 actionable alterations in "Wild-Type" gastrointestinal stromal tumors. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 339.
  241. Shi, G., Cui, Y., He, Y., et al. An unusual case of incomplete Carney triad: an 18-year-old girl suffering from multiple benign tumors. *J Thorac Dis*, 2016, 8(10): E1202-E1206.
  242. Shi, S.S., Wu, N., He, Y., et al. EGFR gene mutation in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology*, 2017, 71(4): 553-561.
  243. Shidham, V.B., Chivukula, M., Gupta, D., et al. Immunohistochemical comparison of gastrointestinal stromal tumor and solitary fibrous tumor. *Arch Pathol Lab Med*, 2002, 126(10): 1189-92.
  244. Shimamura, Y., Omata, F., Nakamura, K., et al. Adult Duodenal Pleomorphic Rhabdomyosarcoma. *ACG Case Rep J*, 2014, 2(1): 11-2.
  245. Shukla, N., Ameer, N., Yilmaz, I., et al. Oncogene mutation profiling of pediatric solid tumors reveals significant subsets of embryonal rhabdomyosarcoma and neuroblastoma with mutated genes in growth signaling pathways. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(3): 748-57.
  246. Schaefer, I.M., Wang, Y., Liang, C.W., et al. MAX inactivation is an early event in GIST development that regulates p16 and cell proliferation. *Nat Commun*, 2017, 8: 14674.
  247. Schildhaus, H.U., Cavlar, T., Binot, E., et al. Inflammatory fibroid polyps harbour mutations in the platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) gene. *J Pathol*, 2008, 216(2): 176-82.
  248. Schmitt-Ney, M., Camussi, G. The PAX3-FOXO1 fusion protein present in rhabdomyosarcoma interferes with normal FOXO activity and the TGF-beta pathway. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121474.
  249. Schoffski, P., Reichardt, P., Blay, J.Y., et al. A phase I-II study of everolimus (RAD001) in combination with imatinib in patients with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Ann Oncol*, 2010, 21(10): 1990-8.

250. Simons, M., Ferreira, J., Meunier, R., et al. Primary versus Metastatic Gastrointestinal Melanoma: A Rare Case and Review of Current Literature. *Case Rep Gastrointest Med*, 2016, 2016: 2306180.
251. Singer, M., Mutch, M.G. Anal melanoma. *Clin Colon Rectal Surg*, 2006, 19(2): 78-87.
252. Singer, S., Rubin, B.P., Lux, M.L., et al. Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol*, 2002, 20(18): 3898-905.
253. Singh, D., Chan, J.M., Zoppoli, P., et al. Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science*, 2012, 337(6099): 1231-5.
254. Sleijfer, S., Wiemer, E., Verweij, J. Drug Insight: gastrointestinal stromal tumors (GIST)--the solid tumor model for cancer-specific treatment. *Nat Clin Pract Oncol*, 2008, 5(2): 102-11.
255. Soreide, K., Sandvik, O.M., Soreide, J.A., et al. Global epidemiology of gastrointestinal stromal tumours (GIST): A systematic review of population-based cohort studies. *Cancer Epidemiol*, 2016, 40: 39-46.
256. Spagnolo, F., Ghiorzo, P., Orgiano, L., et al. BRAF-mutant melanoma: treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 157-68.
257. Stenman, G. Fusion oncogenes in salivary gland tumors: molecular and clinical consequences. *Head Neck Pathol*, 2013, 7 Suppl 1: S12-9.
258. Styron, S.L., Burke, T.W., Linville, W.K. Low-grade endometrial stromal sarcoma recurring over three decades. *Gynecol Oncol*, 1989, 35(2): 275-8.
259. Tada, T., Wakabayashi, T., Kishimoto, H. Plasma cell granuloma of the stomach. A report of a case associated with gastric cancer. *Cancer*, 1984, 54(3): 541-4.
260. Takahashi, Y., Shimizu, S., Ishida, T., et al. Plexiform angiomyxoid myofibroblastic tumor of the stomach. *Am J Surg Pathol*, 2007, 31(5): 724-8.
261. Takahashi, Y., Suzuki, M., Fukusato, T. Plexiform angiomyxoid myofibroblastic tumor of the stomach. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(23): 2835-40.
262. Takazawa, Y., Sakurai, S., Sakuma, Y., et al. Gastrointestinal stromal tumors of neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease). *Am J Surg Pathol*, 2005, 29(6): 755-63.
263. Tarn, C., Rink, L., Merkel, E., et al. Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for gastrointestinal stromal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(24): 8387-92.
264. Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., Zhao, J.J. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(1): 7-24.
265. Tornillo, L., Terracciano, L.M. An update on molecular genetics of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol*, 2006, 59(6): 557-63.
266. Troiani, T., Napolitano, S., Della Corte, C.M., et al. Therapeutic value of EGFR inhibition in CRC and NSCLC: 15 years of clinical evidence. *ESMO Open*, 2016, 1(5): e000088.
267. Ueki, Y., Naito, I., Oohashi, T., et al. Topoisomerase I and II consensus sequences in a 17-kb deletion junction of the COL4A5 and COL4A6 genes and immunohistochemical analysis of esophageal leiomyomatosis associated with Alport syndrome. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(2): 253-61.
268. Vadakara, J., von Mehren, M. Gastrointestinal stromal tumors: management of metastatic disease and emerging therapies. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2013, 27(5): 905-20.

269. Vallat-Decouvelaere, A.V., Dry, S.M., Fletcher, C.D. Atypical and malignant solitary fibrous tumors in extrathoracic locations: evidence of their comparability to intrathoracic tumors. *Am J Surg Pathol*, 1998, 22(12): 1501-11.
270. Van der Aa, F., Sciot, R., Blyweert, W., et al. Gastrointestinal stromal tumor of the prostate. *Urology*, 2005, 65(2): 388.
271. Van Looy, T., Wozniak, A., Floris, G., et al. Phosphoinositide 3-kinase inhibitors combined with imatinib in patient-derived xenograft models of gastrointestinal stromal tumors: rationale and efficacy. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(23): 6071-82.
272. van Nederveen, F.H., Gaal, J., Favier, J., et al. An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *Lancet Oncol*, 2009, 10(8): 764-71.
273. Vanek, J. Gastric submucosal granuloma with eosinophilic infiltration. *Am J Pathol*, 1949, 25(3): 397-411.
274. Voltaggio, L., Murray, R., Lasota, J., et al. Gastric schwannoma: a clinicopathologic study of 51 cases and critical review of the literature. *Hum Pathol*, 2012, 43(5): 650-9.
275. Wagner, A.J., Chugh, R., Rosen, L.S., et al. A phase I study of the HSP90 inhibitor retaspimycin hydrochloride (IPI-504) in patients with gastrointestinal stromal tumors or soft-tissue sarcomas. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(21): 6020-9.
276. Wai, D.H., Knezevich, S.R., Lucas, T., et al. The ETV6-NTRK3 gene fusion encodes a chimeric protein tyrosine kinase that transforms NIH3T3 cells. *Oncogene*, 2000, 19(7): 906-15.
277. Walenta, J.H., Didier, A.J., Liu, X., et al. The Golgi-associated hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. *J Cell Biol*, 2001, 152(5): 923-34.
278. Wang, J.H., 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, 2: 90-3.
279. Wang, Q., Zhao, X., Han, P. Endometrial stromal sarcoma arising in colorectal endometriosis: a case report and review of the literature. *Case Rep Obstet Gynecol*, 2015, 2015: 534273.
280. Wang, Y.M., Gu, M.L., Ji, F. Succinate dehydrogenase-deficient gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(8): 2303-14.
281. Wardelmann, E., Hrychyk, A., Merkelbach-Bruse, S., et al. Association of platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *J Mol Diagn*, 2004, 6(3): 197-204.
282. Wardelmann, E., Losen, I., Hans, V., et al. Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer*, 2003, 106(6): 887-95.
283. West, R.B., Corless, C.L., Chen, X., et al. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol*, 2004, 165(1): 107-13.
284. Westcott, P.M., To, M.D. The genetics and biology of KRAS in lung cancer. *Chin J Cancer*, 2013, 32(2): 63-70.
285. Wilde, B.K., Senger, J.L., Kanthan, R. Gastrointestinal schwannoma: an unusual colonic lesion mimicking adenocarcinoma. *Can J Gastroenterol*, 2010, 24(4): 233-6.
286. Wilson, M.A., Nathanson, K.L. Molecular testing in melanoma. *Cancer J*, 2012, 18(2): 117-23.



287. Wingen, C.B., Pauwels, P.A., Debiec-Rychter, M., et al. Uterine gastrointestinal stromal tumour (GIST). *Gynecol Oncol*, 2005, 97(3): 970-2.
288. Wong, N.A. Gastrointestinal stromal tumours--an update for histopathologists. *Histopathology*, 2011, 59(5): 807-21.
289. Wong, N.A., Shelley-Fraser, G. Specificity of DOG1 (K9 clone) and protein kinase C theta (clone 27) as immunohistochemical markers of gastrointestinal stromal tumour. *Histopathology*, 2010, 57(2): 250-8.
290. Xu, L., Sowa, M.E., Chen, J., et al. An FTS/Hook/p107(FHIP) complex interacts with and promotes endosomal clustering by the homotypic vacuolar protein sorting complex. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(12): 5059-71.
291. Xu, Z., Huo, X., Tang, C., et al. Frequent KIT mutations in human gastrointestinal stromal tumors. *Sci Rep*, 2014, 4: 5907.
292. Yagihashi, N., Kaimori, M., Katayama, Y., et al. Crystalloid formation in gastrointestinal schwannoma. *Hum Pathol*, 1997, 28(3): 304-8.
293. Yamaguchi, U., Hasegawa, T., Masuda, T., et al. Differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumor and other spindle cell tumors in the gastrointestinal tract based on immunohistochemical analysis. *Virchows Arch*, 2004, 445(2): 142-50.
294. Yamamoto, H., Oda, Y., Kawaguchi, K., et al. c-kit and PDGFRA mutations in extragastrointestinal stromal tumor (gastrointestinal stromal tumor of the soft tissue). *Am J Surg Pathol*, 2004, 28(4): 479-88.
295. Yamamoto, H., Yoshida, A., Taguchi, K., et al. ALK, ROS1 and NTRK3 gene rearrangements in inflammatory myofibroblastic tumours. *Histopathology*, 2016, 69(1): 72-83.
296. Yang, J., Ikezoe, T., Nishioka, C., et al. Long-term exposure of gastrointestinal stromal tumor cells to sunitinib induces epigenetic silencing of the PTEN gene. *Int J Cancer*, 2012, 130(4): 959-66.
297. Yantiss, R.K., Nielsen, G.P., Lauwers, G.Y., et al. Reactive nodular fibrous pseudotumor of the gastrointestinal tract and mesentery: a clinicopathologic study of five cases. *Am J Surg Pathol*, 2003, 27(4): 532-40.
298. Yantiss, R.K., Rosenberg, A.E., Sarran, L., et al. Multiple gastrointestinal stromal tumors in type I neurofibromatosis: a pathologic and molecular study. *Mod Pathol*, 2005, 18(4): 475-84.
299. Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T., et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *Embo J*, 1987, 6(11): 3341-51.
300. Yi, E.S., Strong, C.R., Piao, Z., et al. Epithelioid gastrointestinal stromal tumor with PDGFRA activating mutation and immunoreactivity. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2005, 13(2): 157-61.
301. Yi, X.J., Chen, C.Q., Li, Y., et al. Rare case of an abdominal mass: Reactive nodular fibrous pseudotumor of the stomach encroaching on multiple abdominal organs. *World J Clin Cases*, 2014, 2(4): 111-9.
302. Yoshida, A., Tsuta, K., Ohno, M., et al. STAT6 immunohistochemistry is helpful in the diagnosis of solitary fibrous tumors. *Am J Surg Pathol*, 2014, 38(4): 552-9.
303. Younus, J., Verma, S., Franek, J., et al. Sunitinib malate for gastrointestinal stromal tumour in imatinib mesylate-resistant patients: recommendations and evidence. *Curr Oncol*, 2010, 17(4): 4-10.
304. Zamecnik, M., Chlumska, A. Perineurioma versus fibroblastic polyp of the colon. *Am J Surg Pathol*, 2006, 30(10): 1337-9.

305. Zhang, X., Ibrahimi, O.A., Olsen, S.K., et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem*, 2006, 281(23): 15694-700.
306. Zhang, Y., Yu, D., Li, X., et al. Reduced expression of PTEN protein and its prognostic significance in the gastrointestinal stromal tumor. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2010, 30(2): 165-9.