

Received: 2015.09.18
Accepted: 2016.03.03
Published: 2016.05.09

Znaczenie mutacji *BRAF* dla progresji i terapii czerniaka, raka brodawkowatego tarczycy i raka jelita grubego*

BRAF mutation in progression and therapy of melanoma, papillary thyroid carcinoma and colorectal adenocarcinoma

Izabela Zaleśna, Mariusz L. Hartman, Małgorzata Czyż

Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Mutacje w *BRAF* bardzo często występują w wielu typach nowotworów, m.in. w czerniaku, raku brodawkowatym tarczycy i raku jelita grubego. *BRAF* jest elementem szlaku sygnałowego RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK), którego ciągła aktywacja prowadzi do wzrostu proliferacji, zdolności komórek nowotworowych do przeżycia, inwazji i tworzenia przerzutów. Niskocząsteczkowe inhibitory zmutowanej kinazy *BRAF* zrewolucjonizowały terapię pacjentów onkologicznych, szczególnie z czerniakiem. Mimo sukcesów w leczeniu pacjentów z czerniakiem za pomocą inhibitorów skierowanych przeciw zmutowanej kinazie *BRAF* i innym elementom szlaku RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK), pojawiająca się oporność ogranicza długotrwałą odpowiedź na te leki. Mechanizmy oporności na inhibitory szlaku MAPK są złożone, występują na poziomie genomu i fenotypu. Często u tego samego pacjenta występuje jednoczesna aktywacja różnych mechanizmów oporności w różnych ogniskach przerzutów lub nawet w obrębie jednej zmiany. W przeglądzie opisujemy obecny stan wiedzy na temat mutacji w *BRAF* i ich udziału w rozwoju nowotworów. Przedstawiamy najnowsze osiągnięcia w terapii pacjentów z tymi mutacjami oraz dyskutujemy różne mechanizmy oporności rozwijającej się w odpowiedzi na terapię skierowaną przeciw wzmożonej aktywności *BRAF*.

Słowa kluczowe:

czerniak • rak brodawkowaty tarczycy • rak jelita grubego • *BRAF* • *BRAF*^{V600E} • inhibitory *BRAF* • szlak sygnałowy MAPK • terapie celowane

Summary

BRAF is mutated at a high frequency in various malignancies, including melanoma, papillary thyroid carcinoma and colorectal adenocarcinoma. *BRAF* is an element of the RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) pathway, which when constitutively active can lead to increased proliferation rate, enhanced survival, invasion and metastasis. The development of small molecule inhibitors of mutant *BRAF* kinase has changed the care of patients, especially with melanoma. Despite the success in treating melanoma with inhibitors of mutant *BRAF* and other elements of RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) pathway, resistance limits the long-term responsiveness to these drugs. The resistance mechanisms to MAPK pathway inhibition are complex, occur at genomic and phenotypic levels, and frequently the same patient can simultaneously develop diverse mechanisms of resistance in different progressive metastases or even in the same lesion. In the

*Artykuł opracowano w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (2014/15/B/NZ7/00947).

Keywords:	current review, we summarize recent research on mutations in <i>BRAF</i> and their importance for the development of tumor. This review will also give an overview on the current knowledge concerning therapies for patients harboring mutation in <i>BRAF</i> and discusses the diverse mechanisms of resistance developed in response to these targeted therapies. melanoma • papillary thyroid carcinoma • colorectal adenocarcinoma • BRAF • BRAF^{V600E} • BRAF inhibitors • MAPK pathway • targeted therapies
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1201719
Word count:	6732
Tables:	1
Figures:	3
References:	119

Adres autorki: prof. Małgorzata Czyż, Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; e-mail: malgorzata.czyz@umed.lodz.pl

Wykaz skrótów: **ACF** – nieprawidłowe ognisko krypt (aberrant crypt foci); **AACE** – American Association of Clinical Endocrinologists; **AJCC** – American Joint Committee on Cancer; **AKT** – kinaza serynowo-treoninowa; **AME** – Associazione Medici Endocrinologi (Italian Association of Clinical Endocrinologists); **APC** – adenomatous polyposis coli; **ARAF** – serynowo-treoninowa kinaza z rodziny RAF; **ATA** – American Thyroid Association; **BACC** – biopsja aspiracyjna cienkoigłowa; **BIM-EL** – białko proapoptotyczne z podrodziny „BH3-only” (Bcl-2 interacting mediator of cell death); **BMF** – białko proapoptotyczne z podrodziny „BH3-only” (Bcl-2 modifying factor); **BRAF^{WT}** – białko BRAF będące produktem niezmutowanego genu kodującego serynowo-treoninową kinazę z rodziny RAF (Wild Type BRAF); **CIMP** – fenotyp metylatora wysp CpG (CpG island methylator phenotype); **CIN** – niestabilność chromosomowa (chromosomal instability); **c-Kit** – receptor o aktywności kinazy tyrozynowej (tyrosine-protein kinase Kit); **COSMIC** – Catalogue of Somatic Mutations in Cancer; **COT/TPK2** – kinaza serynowo-treoninowa (cancer osaka thyroid); **CRAF** – serynowo-treoninowa kinaza z rodziny RAF; **CRC** – rak jelita grubego (colorectal cancer); **CRD** – domena białek RAF bogata w reszty cysteiny (cysteine rich domain); **EGFR** – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor); **EMA** – Europejska Agencja Leków (European Medicines Agency); **ERK1/2** – kinaza aktywowana przez czynniki zewnątrzkomórkowe 1 i 2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2); **ETA** – European Thyroid Association; **FDA** – Amerykańska Agencja do spraw Żywności i Leków (Food and Drug Administration); **FLT-3** – kinaza tyrozynowa (FMS-like tyrosine kinase 3); **HDAC** – deacetylaza histonowa (histone deacetylase); **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor); **HRAS** – białko z rodziny RAS (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog); **IGF1R** – receptor insulinowego czynnika wzrostu 1 (insulin-like growth factor 1 receptor); **JARID1A** – demetylaza histonowa (histone lysine demethylase 1a); **KRAS** – białko z rodziny RAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog); **LOH** – utrata heterozygotyczności (loss of heterozygosity); **MAPK** – kinazy aktywowane mitogenami (mitogen-activated protein kinases); **MEK1/2** – kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenami 1 i 2; **MET** – receptor czynnika wzrostu hepatocytów; **MITF** – czynnik transkrypcyjny (microphthalmia-associated transcription factor); **MLH1** – białko uczestniczące w naprawie DNA (mutL homolog 1); **MMPs** – metaloproteinazy (metalloproteinases); **MMR** – system naprawy błędnie sparowanych nukleotydów (mismatch repair); **MSI** – niestabilność mikrosatelit (microsatellite instability); **NF-κB** – jądrowy czynnik transkrypcyjny κB (nuclear factor κB); **NRAS** – białko z rodziny RAS (neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog); **p16INK4a** – białko p16 (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A-CDKN2A); **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor); **PDGFRβ** – receptor dla płytkopochodnego czynnika wzrostu beta (platelet-derived growth factor receptor beta); **PFS** – czas przeżycia wolny od progresji; **PGC1α** – peroxisome proliferation-activated receptor γ coactivator 1 α; **PI3K** – kinaza 3-fosfatydylinozytolu (phosphoinositide 3-kinase); **PTC** – rak brodawkowy tarczycy (papillary thyroid carcinoma); **PTEN** – fosfataza PIP3 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten); **RBD** – domena białek RAF odpowiedzialna za wiązanie białek RAS (RAS-binding domain); **RECIST** – kryteria odpowiedzi na leczenie guzów litych (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors); **RET/PTC** – rearanżacja *RET* występująca w raku brodawkowym tarczycy; **RGP** – faza

wzrostu radialnego (radial growth phase); **SA-β-Gal** – β-galaktozydaza związana ze starzeniem komórkowym (senescence-associated acidic β-galactosidase); **SCC** – rak kolczystokomórkowy skóry (squamous cell carcinoma); **SMAD4** – SMAD family member 4; **SSA/P** – siedzący gruczolak lub polip ząbkowany (sessile serrated adenoma/polyp); **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu beta (transforming growth factor beta); **TP53** – gen kodujący czynnik transkrypcyjny p53, supresor nowotworów; **TSA** – tradycyjny gruczolak ząbkowany (traditional serrated adenoma); **TSHR** – receptor dla hormonu tyreotropowego (thyreotropiny); **TSP-1** – trombospodyna 1; **VEGFR** – receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor receptor); **VGP** – faza wzrostu wertykalnego (vertical growth phase).

WSTĘP

Szlak RAS/RAF/MEK/ERK reguluje fundamentalne procesy komórkowe, takie jak proliferacja, różnicowanie, migracja i przeżycie [10,32]. Dotychczas poznano całą grupę białek RAS o aktywności małych białek G oraz białka RAF, MEK i ERK, które mają właściwości kinaz serynowo-treoninowych lub tyrozynowych. Należą do nich 3 izoformy białka RAS: NRAS, KRAS i HRAS, 3 izoformy białka RAF: BRAF, CRAF i ARAF, kinazy MEK1 i MEK2 oraz ERK1 i ERK2. W błonie komórkowej znajdują się receptory, które po przyłączeniu cząsteczek sygnałowych ulegają dimeryzacji, co aktywuje białka RAS związane z wewnętrzną stroną błony komórkowej. Aktywowane białko RAS rekrutuje białko RAF z cytosolu do błony komórkowej prowadząc do jego aktywacji. Aktywna kinaza BRAF fosforyluje białka MEK1 i 2, które aktywują białka ERK1 i 2. Sygnał zostaje przekazany do jądra komórkowego, co indukuje ekspresję genów odpowiedzialnych za wzrost i przeżycie komórki [35]. Regulacja aktywności szlaku może zachodzić na każdym jego etapie począwszy od receptorów, ale do głównych miejsc regulacji należą białka RAS i RAF, które w przypadku mutacji stają się onkogenami.

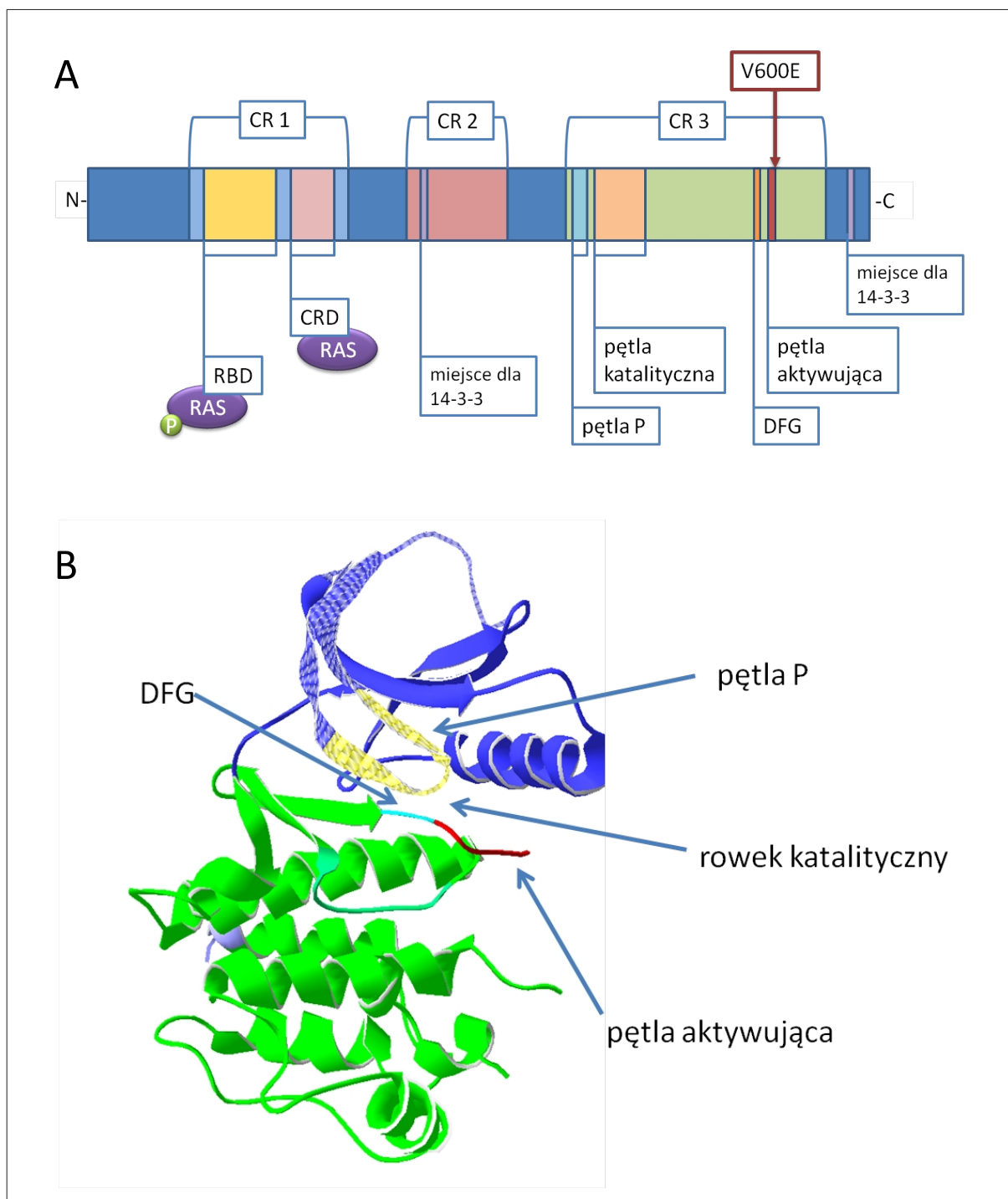
Kinaza BRAF ma budowę typową dla białek RAF. Można w niej wyróżnić trzy konserwatywne regiony: CR1 i CR2 będące domenami regulatorowymi obecnymi na N-końcu białka oraz region CR3 na C-końcu, który pełni funkcję domeny katalitycznej kinazy (ryc. 1A). W regionie CR1 wyróżniamy domenę RBD oraz CRD, które są odpowiedzialne za oddziaływanie z białkiem RAS i lipidami błonowymi [62]. Do RBD może się przyłączyć tylko aktywna, czyli połączona z GTP, postać RAS, natomiast przyłączenie RAS do CRD jest niezależnie od GTP. Region CR2 jest bogaty w reszty seryny i treoniny, przez co odgrywa ważną rolę w aktywacji i umiejscowieniu białka RAF [81]. Region ten ma miejsce fosforylacji odpowiedzialne za przyłączenie regulatorowego białka 14-3-3. W komórkach spoczynkowych białko BRAF hamuje aktywność przez blokowanie domeny katalitycznej. W nieaktywnej postaci region konserwatywny z motywem aminokwasowym DFG, znajdującym się w pętli aktywującej, jest położony blisko bogatej w glicynę pętli P. W konsekwencji fragment pętli aktywującej oraz fragment bogaty w glicynę znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie i są stabilizowane przez oddziaływania hydrofobowe. W wyniku takiego układu przestrzennego

wokół rowka katalitycznego jest brak do niego dostępu. Aktywacja BRAF zachodzi po fosforylacji pętli aktywującej, doprowadzając do zmiany konformacji przestrzennej, która polega na przesunięciu się motywu DFG i destabilizacji oddziaływań hydrofobowych w taki sposób, że motyw DFG odsłania kieszeń dla ATP. Dopiero po usunięciu tej zawady przestrzennej, ATP i substrat białkowy – MEK1/2 mogą się przyłączyć do miejsca katalitycznego (ryc. 1B) [13,81]. Ze wszystkich białek rodziny RAF, BRAF jest najsilniejszym aktywatorem kinazy MEK [13,81]. Jest to związane z wysoką podstawową aktywnością BRAF jako kinazy w porównaniu do CRAF czy ARAF [107]. Ponadto, naładowany ujemnie N-końiec tego białka dużo łatwiej łączy się z białkiem RAS. Tylko MEK1 i 2 są aktywowane przez BRAF. Dzieje się tak dlatego, że na C-końcu MEK1/2 występuje fragment bogaty w prolinę, który nie występuje w innych białkach rodziny MEK [13]. Aktywacja ERK1/2 przez MEK1/2 uruchamia pętlę negatywnego sprzężenia zwrotnego, które ogranicza aktywność BRAF.

Mutacje w BRAF występują z dużą częstością w wielu typach nowotworów, m.in. w czerniaku, raku brodawkowatym tarczycy i raku jelita grubego. Ich rodzaje i znaczenie w rozwoju nowotworów oraz próby ograniczenia onkogennej właściwości zmutowanej kinazy BRAF za pomocą odpowiednich terapii są przedmiotem niniejszego przeglądu.

MUTACJE BRAF W CZERNIAKU

W praktyce klinicznej niezwykle istotna jest znajomość czynników prognostycznych danej choroby, szczególnie nowotworowej w celu zaplanowania leczenia pooperacyjnego i określenia jego skuteczności. Do czynników złego rokowania w czerniaku należą m.in. wielkość guza, głębokość nacieku według Breslowa, stopień Clarka, obecność owrzodzenia czy liczba mitoz. Najistotniejszym czynnikiem rokowniczym dla pacjentów z czerniakiem jest obecność przerzutów do węzłów chłonnych [62]. Decyzje terapeutyczne są podejmowane w oparciu o system klasyfikacji AJCC z wykorzystaniem powyższych parametrów. Niestety w praktyce obserwuje się dużą rozbieżność w przebiegu klinicznym i progresji choroby u pacjentów z tym samym stopniem zaawansowania choroby, dlatego prowadzone są badania mające na celu rozszerzenie standardowej diagnostyki o biomarkery przydatne w rozpoznawaniu pacjentów o podwyższonym ryzyku progresji



Ryc. 1. Struktura białka BRAF; **A** – schemat rozmieszczenia konserwatywnych domen oraz miejsc przyłączenia białek regulatorowych: 14-3-3 i RAS. Zaznaczono miejsce, w którym występuje V600E, najczęstsza mutacja *BRAF*, w obrębie pętli aktywującej. **B** – struktura 3D regionu CR3 zmutowanej kinazy *BRAF*^{V600E}. Kolorem czerwonym zaznaczono pętlę aktywującą, w której występuje mutacja *BRAF*^{V600E}. Model powstał z użyciem programu Swiss-PdbViewer 4.1.0 oraz pliku 3OG7 pobranego z Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

czerniaka. Poszukuje się korelacji między występowaniem mutacji protoonkogenów, takich jak *BRAF* i *NRAS* a cechami kliniczno-patomorfologicznymi.

Omholt i wsp. [74] przeprowadzili analizę zarówno zmian pierwotnych, jak i przerzutów czerniaka pod względem

mutacji *BRAF*^{V600E} i *NRAS*, nie znajdując korelacji między występowaniem mutacji a takimi cechami jak płeć, wiek, stopień zaawansowania, podtyp histologiczny, stopień według Clarka czy występowanie owrzodzenia. Po porównaniu 51 guzów pierwotnych i przerzutowych wykazano, że podczas rozwoju nowotworu nie zmie-

nia się status obu mutacji. Warto zaznaczyć, że mutacje w *BRAF* wykluczają obecność mutacji w *NRAS*, choć zdarzają się pojedyncze przypadki, gdy występują razem, a częstość tego zjawiska szacuje się na 1% [25]. Badania przeprowadzone w fazie wzrostu radialnego (RGP) i wertykalnego (VGP) czerniaka wykazały, że zarówno mutacje *BRAF* i *NRAS* powstają na wczesnym etapie rozwoju czerniaka i są obecne na wszystkich dalszych etapach. Sigalotti i wsp. [96] wykazali, że mutacja *BRAF*^{V600E} nie pojawia się w późniejszych etapach rozwoju nowotworu. Stwierdzono natomiast, że w początkowych etapach rozwoju nowotworu obecna jest mutacja heterozygotyczna *BRAF*^{V600E}, która w zmianach przerzutowych może się stać zmianą homozygotyczną [57]. W kolejnych badaniach przeanalizowano częstość mutacji *BRAF* i *NRAS*, a także *CDKN2A* w próbkach pobranych od 102 pacjentów w III i IV stadium według AJCC z różnych faz rozwoju czerniaka [18]. Aż w 85% próbek potwierdzono występowanie tej samej mutacji *BRAF* lub *NRAS* w zmianach pierwotnych i przerzutach. Szczególnie dużą zgodność obserwowano w przerzutach do węzłów chłonnych i narządów wewnętrznych, odpowiednio 93 i 96%. Już tak wysokiej korelacji nie uzyskano dla przerzutów do mózgu i skóry. Szczegółowa analiza przeprowadzona u 15% pacjentów, u których występowała niezgodność mutacji w zmianach pierwotnych i przerzutowych, sugerowała, że u tego samego pacjenta mogą powstawać subpopulacje komórek czerniaka o różnym profilu genetycznym [18].

Viros i wsp. [105] przeanalizowali 302 próbki pierwotnych czerniaków skóry pod względem takich cech jak formowanie gniazd przez podnaskórkowe melanocyty, głębokość nacieku, czy pigmentacja komórek, które korelowały pozytywnie z obecnością mutacji *BRAF*. Za najbardziej prognostyczny czynnik związany z obecnością mutacji *BRAF* uznano wiek poniżej 55 r.ż., a u pacjentów z mutacją w *BRAF* częściej dochodziło do przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych [105]. W innej kohorcie, w zmianach z mutacją *BRAF* częściej występowały owrzodzenia [27]. W preparatach histopatologicznych pochodzących z guzów z mutacją *BRAF* obserwowano silniejsze naciekanie limfocytów. Nie wykazano natomiast korelacji między obecnością mutacji a całkowitym czasem przeżycia pacjentów. Meckbach i wsp. [66] przeanalizowali znaczenie prognostyczne mutacji *BRAF*^{V600E} na podstawie 437 pacjentów z czerniakiem w I lub II stopniu zaawansowania, wykazując dodatnią korelację pomiędzy mutacją *BRAF*^{V600E} a młodym wiekiem zachorowania, podtypem histologicznym oraz indeksem mitotycznym. Wykazano, że mutacja *BRAF* ma wpływ na czas do wystąpienia przerzutów, natomiast jej obecność nie ma wpływu na całkowity czas przeżycia chorych. Badania te pozostają w sprzeczności z metaanalizą 120 publikacji, która przedstawiła mutację *BRAF* jako czynnik ryzyka decydujący o długości czasu przeżycia pacjentów z czerniakiem [91].

W ostatnim okresie, znacząca liczba badań odnosi się do najbardziej heterogennej pod względem przeżycia popu-

lacji pacjentów z IIIB i IIIC stopniem zaawansowania choroby, w której występują przerzuty do węzłów chłonnych. Wykazano, że obecność mutacji *BRAF* w tej grupie pacjentów koreluje z kilkakrotnie wyższym ryzykiem zgonu z powodu czerniaka niż w przypadku *BRAF*^{WT} [76]. Nie tylko obecność mutacji *BRAF* lub *NRAS*, ale także podwyższona ekspresja genów odpowiedzialnych za odpowiedź immunologiczną wiązana jest z gorszym rokowaniem w tej grupie pacjentów [63]. Dla kontrastu, przeprowadzone badanie kohortowe na polskiej populacji pacjentów z III stopniem zaawansowania i mutacją *BRAF* nie potwierdziło poglądu o gorszym przebiegu choroby, ani krótszym czasie od pojawienia się zmiany pierwotnej do wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych [90]. Obecnie status mutacji *BRAF* jako czynnika prognostycznego pozostaje kontrowersyjny i wymaga dalszych badań. Należy zaznaczyć, że poszukuje się profilu genetycznego pacjentów nie tylko w celu oceny przeżycia, ale także zebrania jak największej ilości informacji o biologii danego czerniaka z myślą o kwalifikacji do leczenia adiuwantowego [16].

Z danych zgromadzonych w bazie COSMIC mutacje genów *RAF*, w tym *BRAF* występują w ponad 50% przypadków czerniaka [14]. Dotychczas znaleziono aż 432 różnych mutacji w *BRAF*. Najwięcej mutacji *BRAF* dotyczy eksonu 11 lub 15 kodującego pętlę bogatą w glicynę i fragment aktywujący. Obecność mutacji w tych regionach powoduje destabilizację oddziaływań hydrofobowych między tymi fragmentami, a tym samym przyczynia się do zmiany konformacji na aktywną i powoduje konstytutywną aktywność *BRAF*. Badania wykazały, że najczęściej występującą zmianą w *BRAF* jest mutacja punktowa w pozycji 1799 T→A prowadząca do zamiany waliny na kwas glutaminowy w pozycji 600 (*BRAF*^{V600E}) znajdującej się blisko motywu DFG w fragmencie aktywującym (ryc. 1B). Mutacja ta występuje również w innych nowotworach, takich jak rak jelita grubego, tarczycy, czy niedrobnokomórkowy rak płuca. Zamiana hydrofobowej reszty waliny na ujemnie naładowaną resztę kwasu glutaminowego powoduje destabilizację oddziaływań hydrofobowych oraz przesunięcie motywu DFG w taki sposób, że białko *BRAF* pozostaje cały czas w aktywnej postaci. Wykazano, że *BRAF*^{V600E} ma 480 razy większą podstawową aktywność i prawie pięciokrotnie wyższą zdolność do aktywacji kinaz ERK w porównaniu z formą niezmutowaną [107]. Powoduje to konstytutywną aktywność szlaku *BRAF*-MEK-ERK i w rezultacie niekontrolowany wzrost i zwiększoną zdolność przeżycia komórek czerniaka.

Opublikowano już znaczącą liczbę prac prezentujących znaczenie *BRAF*^{V600E} zarówno w procesie transformacji nowotworowej jak i korelacji z czynnikami kliniczno-patomorfologicznymi. Pogląd, iż czerniak wywodzi się ze znamion dysplastycznych jest znany od dawna, ale dokładny mechanizm transformacji melanocytów w komórki czerniaka jest nadal nie do końca poznany. *BRAF*^{V600E}, a także mutacje w *NRAS* znajdują się zarówno w znamionach dysplastycznych, jak i wczesnych zmia-

nach melanocytarnych [78]. Jak wykazały badania *in vitro* i *in vivo*, pojedyncza mutacja nie jest czynnikiem wystarczającym do rozwoju czerniaka. W trakcie transformacji obserwowano wzrost ekspresji p16INK4a oraz aktywności β -galaktozydazy związanej z procesem starzenia komórkowego (SA- β -Gal) [34]. W procesie transformacji znaczącą rolę przypisuje się promieniowaniu UV, które działa bezpośrednio na eksponowane komórki, ale także na komórki nieeksponowane, znajdujące się w bardzo bliskim położeniu, przez efekt sąsiedztwa [110]. Klasycznym przykładem mutacji spowodowanej promieniowaniem UV jest tranzycja cytozyny na tyminę, obserwowana w TP53, PTEN czy p16INK4a, natomiast mutacja prowadząca do BRAF^{V600E} polega na zamianie tyminy na adeninę, co wskazuje na mechanizm niezależny od promieniowania UV [41]. Ponadto, z dotychczasowych obserwacji wynika, że czerniaki z mutacją BRAF^{V600E} występują w miejscach o przeciętnej ekspozycji na promieniowanie słoneczne [12,62,78]. Wykazano, że promieniowanie UV indukuje w mysich melanocytach mutację genu TP53, która wraz z mutacją BRAF^{V600E} doprowadza do powstania czerniaka [106]. W ten sposób mutacja w p53 stała się łącznikiem tłumaczącym wpływ UV na rozwój czerniaka. Badania kohortowe wykazały, że na rozwój czerniaka wpływa krótkotrwała, ale intensywna ekspozycja na promieniowanie UV oraz liczba oparzeń słonecznych w dzieciństwie [15]. UV jest ponadto istotnym czynnikiem ryzyka w powstawaniu czerniaka u osób po przeszczepach narządowych, u których stosowana jest immunosupresja [44].

W badaniach nad częstością występowaniu mutacji BRAF wykazano, że drugą po V600E jest mutacja prowadząca do zamiany V600K, która występuje z częstością 10-30% wszystkich mutacji BRAF [1,84]. Wyniki badań zależności między występowaniem BRAF^{V600K} a obrazem kliniczno-patologicznym wykazały, że w fazie przerzutów choroba ma bardziej agresywny przebieg niż czerniak z BRAF^{V600E} [67]. Pacjenci z BRAF^{V600K} szybciej osiągalni IV stopień zaawansowania choroby według AJCC. Mutacja nie wpływa natomiast na takie parametry jak grubość w skali Breslow, obecność owrzodzenia czy typ histologiczny. Zaskakująca jest różnica w lokalizacji pierwotnych czerniaków skóry w zależności od różnych mutacji. Czerniaki z mutacją prowadzącą do zamiany V600E występowały częściej na tułowiu i kończynach, natomiast te z V600K na głowie i szyi [67].

Badania wykazały, że mutacje BRAF prowadzące do innych substytucji, np. G466E, G466V, G596R skutkują powstawaniem kinazy o małej aktywności podstawowej z zachowaniem zdolności do aktywacji kinaz MEK-ERK [107]. Jest to skutkiem utworzenia heterodimeru między zmutowanym białkiem BRAF a kinazą CRAF w cytoplazmie, przy czym proces jest regulowany przez białko 14-3-3, które jest zdolne do łączenia się z obiema kinazami. W czasie wytworzenia dimeru, białko CRAF jest aktywowane przez transfosforylację, w której zmutowany BRAF aktywuje domenę katalityczną kinazy CRAF. Do aktywacji CRAF, zależnej od RAS konieczna jest fos-

forylacja N-końca, fosforylacja pętli aktywującej oraz przyłączenie białka 14-3-3 do N-końca. Połączenie zmutowanej kinazy BRAF i kinazy CRAF pełni taką samą funkcję jak fosforylacja N-końca CRAF. Jest to zatem alternatywna droga aktywacji MEK-ERK, niezależna od białka RAS, występująca zarówno w komórkach nowotworowych jak i prawidłowych [32,107].

MUTACJE BRAF W RAKU BRODAWKOWATYM TARCZYCY

Szlak sygnałowy RAS/RAF/MEK/ERK został także dogłębnie przebadany w raku brodawkowatym tarczycy (PTC), najczęściej występującym nowotworze endokrynologicznym [89]. U pacjentów z PTC znaleziono mutacje w BRAF, RAS lub rearanżacje RET/PTC. Rearanżacja RET powoduje powstanie chimerycznej formy receptora znanego jako RET/PTC. Dotychczas opisano 12 różnych genów fuzyjnych dla RET i 15 typów rearanżacji RET/PTC, przy czym do najczęściej występujących w PTC należy RET/PTC1 i 3 [89].

Mutacje w RAS rzadko występują w PTC [119]. Najistotniejsza dla komórek PTC jest jednak mutacja BRAF^{V600E}, której częstość występowania szacuje się na około 49%, 30-80% w zależności od regionu geograficznego, w którym było przeprowadzane badanie [22]. Wykazano, że komórki PTC z ekspresją BRAF^{V600E}, w porównaniu z komórkami z rearanżacją RET/PTC, charakteryzują się wyższą ekspresją metaloproteinaz: MMP3, MMP9 oraz MMP13 i tym samym wyższą inwazyjnością, co wiąże się z gorszym rokowaniem [89].

Tak jak i w czerniaku zmiana BRAF^{V600E} powstaje na wczesnych etapach rozwoju PTC, w mikroraku brodawkowatym [103]. Białko BRAF^{V600E} przez indukowanie niestabilności chromosomalnej (CIN) [68] jest nie tylko inicjatorem PTC, ale również elementem istotnym w rozwoju choroby [60]. BRAF^{V600E} w komórkach tarczycy powoduje zależną od nadekspresji TGF- β utratę połączeń komórki z macierzą zewnątrzkomórkową, a proces przebiega przez szlak MAPK [51]. Zdolność komórek z mutacją BRAF^{V600E} do tworzenia przerzutów i neoangiogenezy jest związana z nadekspresją trombospodiny 1 (TSP-1), a także podwyższoną ekspresją PDGF, istotnego w inwazji torebki tarczycy [89]. Innym następstwem mutacji jest obniżenie ekspresji receptora tyreotropiny (TSHR), co powoduje odróżnicowanie komórek pęcherzykowych i ich rozwój w kierunku komórek nowotworowych, a następnie ich oporność na leczenie radiojodem [72].

Tak samo jak w czerniaku badania skupiły się na znalezieniu związku między obecnością mutacji w BRAF a swoistymi cechami kliniczno-patologicznymi mającymi wpływ na diagnostykę, prognozowanie i wybór metod terapeutycznych. Za poznane czynniki istotne dla progresji raka brodawkowego tarczycy uważa się starszy wiek w chwili rozpoznania, wielkość guza, przerzuty do szyjnych węzłów chłonnych, naciekanie poza torebkę tarczycy, przerzuty odległe i stopień zaawansowania według AJCC [113]. Pierwsze doniesienia wska-

zywały na prawdopodobny wpływ mutacji BRAF^{V600E} na gorsze rokowanie u pacjentów z PTC i rakami powstającymi przez odróżnicowanie PTC. Analiza 219 próbek pacjentów z PTC wykazała silną korelację między występowaniem mutacji BRAF^{V600E} a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych, III i IV stopniem zaawansowania choroby oraz nawrotami choroby [114]. Od tamtej pory ukazało się wiele publikacji, z których część nie potwierdziła tych obserwacji, co wynikało zarówno z metodologii badań oraz populacji na jakiej zostały przeprowadzone [112]. Warto wspomnieć, że ukazały się dwie prace opisujące wyniki badań na polskiej populacji niepotwierdzające korelacji między mutacją w BRAF a obrazem klinicznym [11,22]. Ostatecznie w metaanalizie opracowanej na podstawie 26 doniesień [50] dowiedziono, że obecność BRAF^{V600E} jest uważana za czynnik złego rokowania u pacjentów z PTC i wiąże się z częstszą inwazją raka poza torebkę tarczycy, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych, a tym samym ze stopniem zaawansowania nowotworu. W ostatnio opublikowanym badaniu wielośrodkowym wykazano, że pacjenci z BRAF^{V600E} mają większe prawdopodobieństwo nawrotu choroby [112].

Wiedza na temat związku mutacji w BRAF z agresywnym fenotypem PTC i opornością na radioterapię wydaje się istotna ze względu na sposób postępowania diagnostycznego i terapeutycznego. Obecnie w diagnostyce zmian guzkowych tarczycy podstawowe miejsce zajmuje ultrasonografia (USG) i biopsja aspiracyjna cienkoigłowa pod kontrolą USG (BACC), a w ostatnim czasie także elastografia. Bezsporne jest stwierdzenie, że pacjenci z podejrzeniem lub rozpoznaniem raka tarczycy w BACC powinni być operowani. W zaleceniach ATA/AACE/AME/ETA nadal trwają dyskusje na temat zakresu zabiegu, szczególnie u pacjentów, którzy klinicznie zaliczani są do grupy niskiego ryzyka [113]. Dyskusyjna jest także kwestia wykonywania profilaktycznej limfadenektomii przedziału centralnego. Polskie rekomendacje w tej kwestii są bardziej kateryczne [45]. Pacjenci poddawani są całkowitej resekcji gruczołu tarczowego z limfadenektomią przedziału centralnego. Wyjątkiem od tej procedury jest przedoperacyjne rozpoznanie mikroraka, wówczas dopuszcza się wykonanie lobektomii bez usuwania węzłów przedziału centralnego.

Idea rozszerzenia diagnostyki o obecność mutacji w BRAF w trakcie BACC jest podyktowana trudnościami zarówno w rozpoznawaniu zmian wczesnych, szczególnie w przypadku podejrzenia nowotworu pęcherzykowego w BACC oraz podjęciu decyzji o zakresie operacji na układzie chłonnym. W literaturze anglojęzycznej dyskutowane jest stosowanie terapii radiojodem u pacjentów z niskim ryzykiem nawrotu choroby [117]. Wyniki wielu prac potwierdzają, iż diagnostyka mutacji w BRAF w materiale pobranym podczas BACC znacząco pomaga w różnicowaniu guzków tarczycy [75,87], a w przypadku PTC koreluje z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych przedziału centralnego. Z tego powodu ta podgrupa pacjentów powinna być poddana profilaktycznej

limfadenektomii centralnej celem zabezpieczenia przed nawrotem choroby [43]. Diagnostyka przedoperacyjna w kierunku obecności mutacji w BRAF jest także przydatna w podejmowaniu decyzji co do zakresu operacji w mikroraku tarczycy wskazując podgrupę pacjentów, u których należy wykonać całkowitą tyroidektomię [118] z profilaktyczną limfadenektomią przedziału centralnego [58]. Obecnie nie ma rekomendacji do włączenia testów na obecność mutacji w BRAF do standardowej diagnostyki guzków tarczycy.

MUTACJE BRAF W RAKU JELITA GRUBEGO

Z obserwacji klinicznych wynika, że zmianami prekursorowymi dla raka jelita grubego (CRC) są gruczolaki jelita grubego. Uważa się, że większość przypadków CRC powstaje z konwencjonalnych gruczolaków jelita grubego, a usuwanie wczesnych zmian podczas kolonoskopii daje szansę na przerwanie procesu i niedopuszczenie do rozwoju CRC. Niestety co trzeci przypadek CRC rozwija się na podłożu siedzących gruczolaków lub polipów ząbkowanych (SSA/P), które ze względu na morfologię i częstsze występowanie w proksymalnej części jelita grubego mogą zostać przeoczone podczas kolonoskopii [97]. Z badań populacyjnych wynika, że przeciętny czas transformacji SSA/P do CRC wynosi 15 lat i jest 2-3 razy dłuższy niż w gruczolakach konwencjonalnych [56]. Jednak w porównaniu z konwencjonalnymi gruczolakami, SSA/P częściej są przyczyną powstawania tzw. raków interwałowych, definiowanych jako wystąpienie CRC od 6 miesięcy do 5 lat od przesiewowego badania kolonoskopowego [93].

Vogelstein jako pierwszy przedstawił podłoże molekularne przejścia gruczolak-rak [29]. Od czasu odkrycia szlaku mutatorowego w raku jelita grubego przez Vogelsteina wiedza na temat rozwoju tego nowotworu została znacznie poszerzona. CRC jest bardzo heterogennym nowotworem zarówno pod względem morfologii, lokalizacji, obrazu klinicznego, rokowania oraz odpowiedzi na leczenie systemowe. W badaniach nad heterogennością odkryto nowe drogi transformacji nowotworu, a tym samym nowe możliwości zarówno w diagnostyce, jak i leczeniu. Opisano dwie przyczyny powstawania sporadycznego raka jelita grubego [8,33]. Najczęściej występującą (75% przypadków) jest ścieżka zaproponowana przez Vogelsteina (ryc. 2), której podstawą jest niestabilność chromosomowa (CIN) w następstwie gromadzenia licznych aneuploidii oraz strukturalnych aberracji chromosomalnych powodujących utratę heterozygotyczności (LOH). W szlaku tym dochodzi do nagromadzenia mutacji w protoonkogenach i genach supresorowych, takich jak APC, KRAS, SMAD4 i TP53. Ważnym elementem wczesnych wydarzeń w rozwoju CRC jest aktywacja szlaku APC/beta-katenina/WNT. Inną przyczyną jest indukcja niestabilności mikrosatelit (MSI), która jest wynikiem metylacji promotora genu kodującego białko MLH1, uczestniczącego w naprawie DNA [7]. W komórkach z obniżoną ekspresją MLH1 nie działa system naprawy błędnie sparowanych nukleotydów (MMR)

i dochodzi do nagromadzenia mutacji, które występują również w mikrosatelitach. Szlak niestabilności mikrosatelit występuje w 12-17% przypadków CRC [7], ale jest także związany z rozwojem dziedzicznego CRC w zespole Lyncha [69]. Podejmowanych jest wiele prób klasyfikacji molekularnej CRC. W związku z tym pojawiają się alternatywne koncepcje opisujące mechanizmy odpowiedzialne za rozwój CRC. Przykładem może być koncepcja wiążąca CRC ze zwiększoną metylacją wysp CpG umiejscowionych w promotorach genów. Jest to częsty mechanizm odpowiadający za wyciszanie ekspresji genów supresorowych. Jeśli pojawia się w obrębie całego genomu mówimy o fenotypie metylatora wysp CpG (CIMP). Pierwsze prace sugerowały możliwość zdefiniowania CIMP w CRC za pomocą swoistych markerów [109], aczkolwiek kolejne prace wykazały, że mechanizm ten może być bardziej złożony [42,70].

W patogenezie CRC duże znaczenie odgrywają mutacje w genach *RAS* i *BRAF*, które powodują konstytutywną aktywność szlaku MAPK w odpowiedzi na aktywację receptorów czynników wzrostu, a zwłaszcza receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR), prowadząc do niekontrolowanego wzrostu i przeżycia komórek nabłonka jelita grubego. Mutacja *KRAS* występuje prawie w 40% przypadków CRC i pojawia się stosunkowo wcześniej w klasycznym szlaku mutatorowym proponowanym przez Vogelsteina i towarzyszy jej CIN. Obecność mutacji w *KRAS* wyklucza obecność mutacji w *BRAF*. Zmiana *BRAF*^{V600E} występuje w ponad 80% przypadków CRC z niestabilnością mikrosatelit (MSI), natomiast w raku jelita grubego, w których nie obserwuje się niestabilności mikrosatelit, częstość mutacji *BRAF*^{V600E} nie przekracza 10%. Mutacja *BRAF* jest natomiast wykrywana w większości zmian nienowotworowych, takich jak siedzące gruczolaki lub polipy ząbkowane (SSA/P), czy tradycyjne gruczolaki ząbkowane (TSA) [101]. Wśród zdarzeń molekularnych związanych z SSA/P poza mutacją *BRAF*^{V600E} należy wymienić fenotyp CIMP obejmujący metylację promotora *MLH1*. To odpowiada za zaburzenia funkcjonowania systemu MMR, wystąpienie MSI i prowadzi do nagromadzenia mutacji [6,46]. Taki szlak rozwoju CRC nazwano szlakiem ząbkowanym (ryc. 2).

Obecność *BRAF*^{V600E} w raku jelita grubego koreluje z cechami kliniczno-patologicznym, takimi jak starszy wiek, płeć żeńska, umiejscowienie w proksymalnej części jelita oraz podtyp śluzowy, które rzutują na bardziej agresywny przebieg choroby [101]. Obecność tej mutacji w komórkach CRC jest związana ze zmniejszeniem czasu przeżycia pacjentów, co zostało potwierdzone w wielu badaniach, w tym w metaanalizie 26 publikacji [71,91].

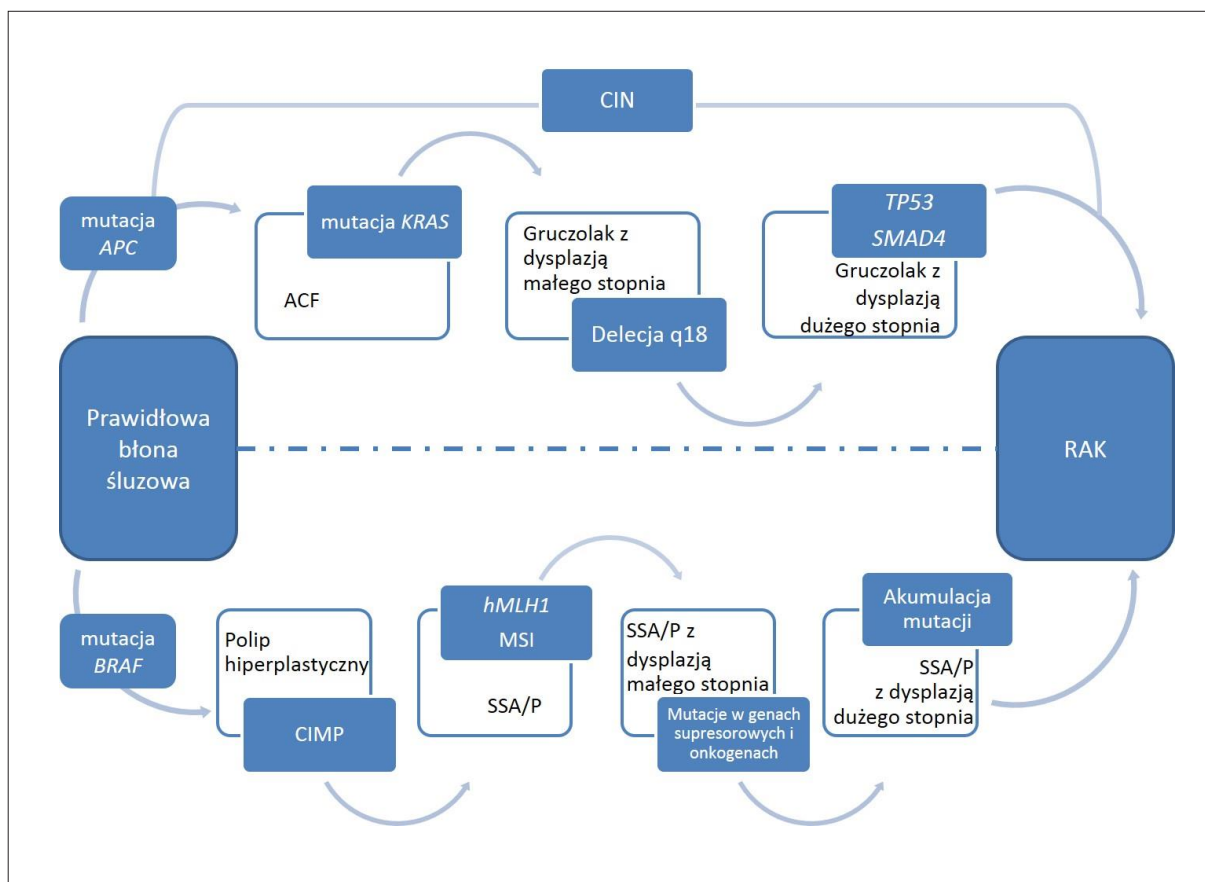
Pacjenci z CRC w II i III stopniu zaawansowania według AJCC są heterogenną grupą pod względem rokowania co do przeżycia i ryzyka wznowy choroby oraz odpowiedzi na leczenie adiuwantowe, które jest skuteczne zaledwie w 50% przypadków. Opracowano testy dla standardowej terapii FOLFOX (5 fluorouracyl, kwas folinowy i oksaliplatyna), niestety ze względu na niewystarczającą swo-

istość i czułość nie weszły do praktyki klinicznej [47,86]. Obecna diagnostyka wraz z wprowadzeniem terapii celowanej została rozszerzona o określenie zmian na poziomie molekularnym, na podstawie których nie tylko można ocenić ryzyko nawrotu choroby [73,83], ale także określić, która z dostępnych terapii okaże się skuteczna. Wykazanie obecności mutacji w genach kodujących elementy szlaku kinazy MAPK, a szczególnie mutacji w *KRAS* lub *NRAS* i *BRAF*, wydaje się konieczne w przypadku stosowania inhibitorów EGFR, cetuximabu lub panitumumabu [24,100].

TERAPIE UKIERUNKOWANE PRZECIW BRAF W LECZENIU CZERNIAKA

Zidentyfikowanie mutacji *BRAF*^{V600E} w komórkach czerniaka, a także poznanie jej znaczenia w rozwoju i progresji tego nowotworu zapoczątkowało badania nad związkami hamującymi aktywność nieprawidłowego białka BRAF. Pierwszym zastosowanym w badaniach klinicznych związkiem był BAY43-9006 (sorafenib), doustny inhibitor kinaz tyrozynowych. Sorafenib został zsyntetyzowany jako inhibitor CRAF do stosowania w nowotworach z mutacją *RAS*, jednak ze względu na duże podobieństwo strukturalne kieszeni wiążącej ATP różnych kinaz zakres działania sorafenibu obejmuje także hamowanie PDGFRβ, c-KIT, FLT-3, VEGFR2 i 3, *BRAF*^{WT} oraz *BRAF*^{V600E} [26]. Zachęcające wyniki badań przedklinicznych, w tym na modelach mysich, doprowadziły do badań klinicznych. Badanie II fazy u pacjentów z przerzutowym czerniakiem nie potwierdziło jednak przeciwnowotworowej aktywności sorafenibu, gdyż tylko jedna spośród 37 osób odpowiedziała na leczenie zgodnie z kryteriami RECIST dla guzów litych [26]. Przeprowadzono wiele innych badań klinicznych II i III fazy, w których nie udowodniono działania sorafenibu ani samodzielnie, ani z karboplatiną i paklitaksem u pacjentów z czerniakiem [30,38]. Minimalna skuteczność sorafenibu wobec czerniaka z mutacją *BRAF*^{V600E} doprowadziła do powstania inhibitorów BRAF nowej generacji.

Wemurafenib (PLX4032, Zelboraf) jest niskocząsteczkowym inhibitorem *BRAF*^{V600E} do stosowania doustnego. W badaniach *in vitro* wemurafenib indukował zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, co wynikało z zahamowania fosforylacji ERK w komórkach czerniaka z mutacją w *BRAF*, natomiast nie obserwowano tego działania w komórkach z niezmutowanym *BRAF* [102,115]. Na modelach mysich z mutacją w *BRAF*, wemurafenib powodował zahamowanie wzrostu guza, nawet po zakończeniu jego stosowania [115]. W badaniu klinicznym I fazy przeprowadzonym w 32-osobowej grupie pacjentów z przerzutowym czerniakiem uzyskano dobre wyniki zarówno pod względem przeciwnowotworowej skuteczności wemurafenibu, jak i w ocenie toksyczności stosowanej dawki. Na leczenie odpowiedziało aż 81% pacjentów, z czego u 2 pacjentów zanotowano całkowitą odpowiedź [31]. Po tym sukcesie z użyciem wemurafenibu przeprowadzono wieloośrodkowe badanie II i III fazy, które potwierdziło skuteczność i bezpieczeństwo



Ryc. 2. Szlaki transformacji nowotworowej zachodzące w nabłonku jelita grubego; górna część diagramu - szlak mutatorowy zaproponowany przez Vogelsteina [29], dolna część diagramu - szlak ząbkowany, związany z hipermetylacją wysp CpG; opis w tekście

jego stosowania [62,102]. Podczas terapii obserwowano działania niepożądane, takie jak łysienie, bóle stawowe, nadwrażliwość na światło, wysypkę i zmęczenie [62,102]. Już po 2-3 miesiącach od rozpoczęcia terapii obserwowano także pojawienie się wtórnych nowotworów, takich jak rak kolczystokomórkowy skóry (SCC) oraz rógowiak kolczystokomórkowy (keratoacanthoma), z częstością około 26% [31,62,102]. Zjawisko to tłumaczy się paradoksalnym aktywowaniem białek RAS w wyniku blokowania kinazy BRAF [62]. Wemurafenib po satysfakcjonujących wynikach trzech wieloośrodkowych badań klinicznych pod akronimem BRIM (1, 2 i 3) został zaaprobowany w 2011 r. przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) do leczenia dorosłych pacjentów z zaawansowanym lub nieresekcyjnym czerniakiem z mutacją BRAF^{V600E}. W następnym roku taką samą rekomendację uzyskał wemurafenib od Europejskiej Agencji Medycznej (EMA). Już podczas przygotowań do badań klinicznych opracowano test o nazwie COBAS® 4800 BRAF V600 Mutation, za pomocą którego techniką PCR w materiale z blozków parafinowych wykrywa się obecność mutacji BRAF^{V600E}, co jest warunkiem koniecznym do włączenia pacjenta do terapii wemurafenibem. Dotychczas opracowano różne testy molekularne celem identyfikacji mutacji w BRAF w materiale z blozków parafinowych. Należą do nich m.in. sekwencjonowanie metodą Sangera, pirosekwen-

cjonowanie, SNaPshot i HRM (high-resolution melting). Charakteryzują się dużą czułością wykrywania mutacji BRAF, ale także występowaniem w niektórych przypadkach reakcji krzyżowych [21]. Pojawienie się przeciwciał monoklonalnych VE1 i B-RAF stworzyło możliwość wykrywania białka BRAF^{V600E} za pomocą immunohistochemii, techniki powszechnie używanej w laboratoriach patomorfologicznych [88].

Innym wysoce selektywnym inhibitorem kinazy BRAF zaaprobowanym do leczenia pacjentów z zaawansowanym czerniakiem jest dabrafenib (Tafinlar, GSK2118436). W badaniach przedklinicznych wykazano jego 400 razy silniejsze powinowactwo do BRAF niż do innych testowanych kinaz [4]. Zablockowanie aktywności kinazy BRAF^{V600E} przez dabrafenib powodowało zahamowanie aktywności kinaz ERK, co wiązało się z działaniem cytostatycznym przez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, wskazując na analogiczny do wemurafenibu mechanizm działania. Dabrafenib był testowany na liniach komórkowych czerniaka i raka jelita grubego, zawierających mutację BRAF^{V600E} oraz na modelach mysich [4]. Tak jak w przypadku wemurafenibu, w badaniach klinicznych I, II i III fazy pod akronimem BREAK uzyskano odpowiedź na leczenie. W fazie I/II badania zaobserwowano obiektywną odpowiedź u pacjen-

tów z mutacją $BRAF^{V600E}$, a także u tych z przerzutami do mózgu i mutacją $BRAF^{V600}$ inną niż $V600E$ [28]. Aktywność dabrafenibu została ostatecznie potwierdzona w wieloośrodkowym badaniu open-label III fazy [102]. Pacjenci z nieoperacyjnym lub przerzutowym czerniakiem z mutacją $BRAF^{V600E}$ leczeni dabrafenibem mieli wydłużony czas przeżycia wolny od progresji (PFS) w porównaniu z dakarbazyną. Uzyskano podobną skuteczność i odpowiedź kliniczną jak w przypadku stosowania wemurafenibu, ale także działania niepożądane, w tym wysoką gorączkę. Częstość pojawienia się SCC w trakcie leczenia dabrafenibem szacuje się na około 15% [62].

Sukces wemurafenibu i dabrafenibu przyczynił się do opracowania kolejnego inhibitora BRAF, LGX818 (encorafenib), który dłużej wiąże się z nieprawidłową kinazą BRAF. Wyniki badań I i II fazy są obiecujące zarówno pod względem skuteczności jak i toksyczności tego związku. Całkowitą odpowiedź uzyskano u 58% pacjentów z czerniakiem wcześniej nieleczonych żadnym inhibitorem BRAF oraz u 11% już poddanych takiej terapii. Obserwowano także mniej działań niepożądanych w porównaniu z terapią wemurafenibem lub dabrafenibem [102]. LGX818 jest obecnie testowany w skojarzeniu z inhibitorem MEK162 (binimetinib; badanie NCT01909453). Należy podkreślić, że wszystkie dotychczasowe opracowywane terapie celowane były skierowane do pacjentów z mutacją $BRAF^{V600}$. Wynalezienie MEK162 (binimetinib) dało szansę na zastosowanie terapii celowanej u pacjentów z niezmutowanym BRAF, ale z mutacją $NRAS$. Po uzyskaniu zadowalających wyników II fazy [2] obecnie trwa badanie III fazy, które ma na celu określenie skuteczności i bezpieczeństwa stosowania binimetinibu w porównaniu z dakarbazyną (badanie NCT01763164).

W poszukiwaniu inhibitorów szlaku sygnałowego MAPK opracowano wiele inhibitorów kinazy MEK1/2, spośród których do badań klinicznych włączono GSK1120212 (trametinib). Trametinib jest selektywnym, allosterycznym inhibitorem obu izoform kinazy MEK. W badaniach przedklinicznych *in vitro* i *in vivo*, podobnie jak w poprzednich inhibitorach, wykazano jego działanie cytostatyczne związane z zahamowaniem aktywności kinaz ERK [102]. Badania kliniczne z zastosowaniem trametinibu przeprowadzono w grupie 206 pacjentów z różnymi nowotworami, tj. rakiem niedrobnokomórkowym płuca, rakiem jelita grubego, trzustki, jajnika i czerniakiem. Najlepszą odpowiedź uzyskano u pacjentów z czerniakiem z mutacją $BRAF^{V600E}$. W badaniu II fazy podzielono pacjentów z czerniakiem mających mutację $BRAF$ na dwie grupy. Pierwsza (kohorta A, n=40) to pacjenci, którzy wcześniej byli leczeni inhibitorami BRAF, natomiast drugą grupę (kohorta B, n=58) stanowili pacjenci poddani wcześniej chemioterapii lub immunoterapii. W grupie A nie uzyskano obiektywnej odpowiedzi u żadnego pacjenta. W grupie drugiej uzyskano jedną całkowitą i 13 częściowych odpowiedzi, a u 29 pacjentów uzyskano stabilizację choroby. Badanie to sugeruje,

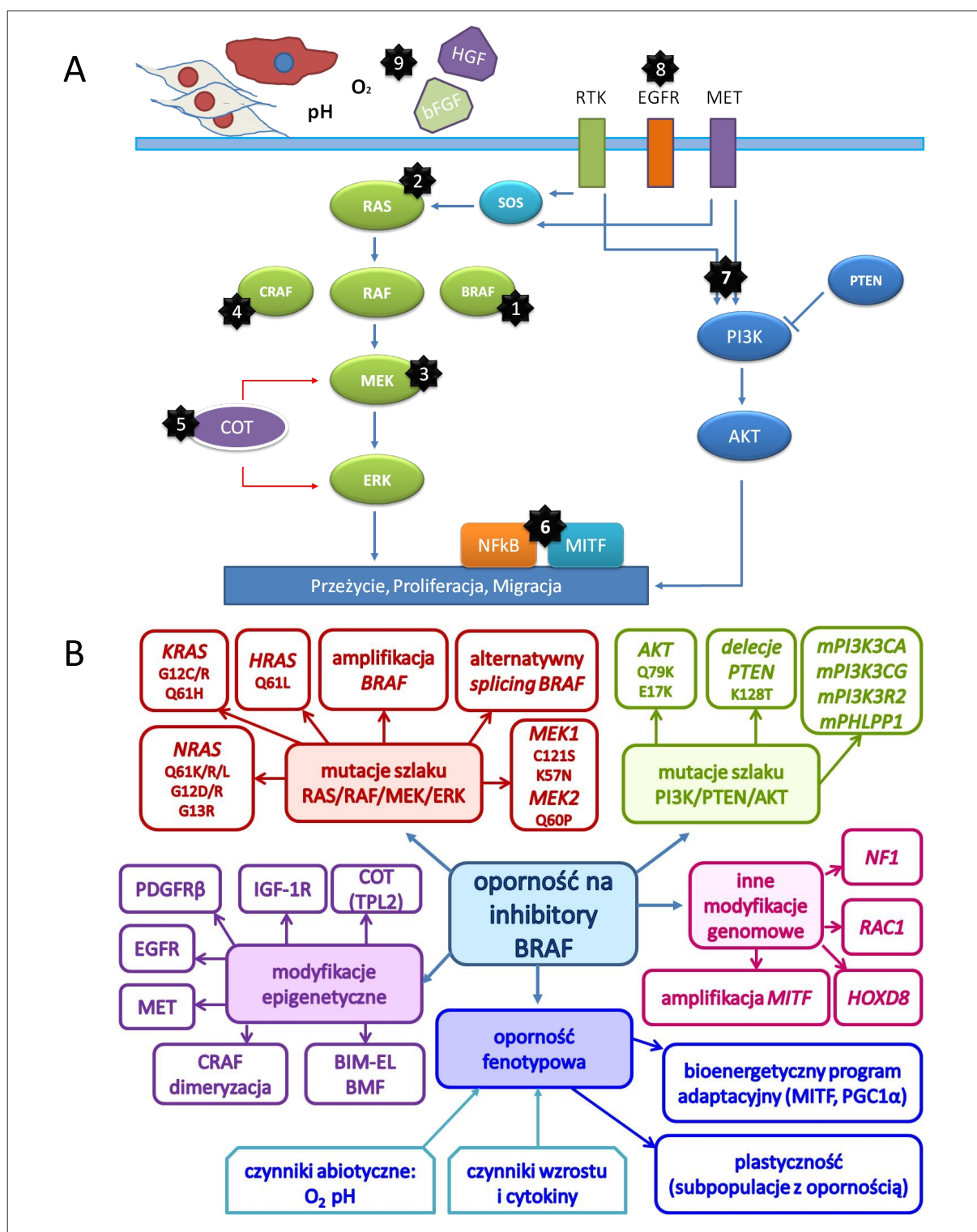
że trametinib nie jest aktywny w sekwencyjnej terapii u pacjentów wcześniej leczonych inhibitorami BRAF [49]. Ostatecznie badanie III fazy u pacjentów z przerzutowym czerniakiem z mutacją $BRAF^{V600E/K}$, którzy nie byli wcześniej leczeni inhibitorem BRAF lub MEK, a także ipilimumabem, potwierdziło skuteczność trametinibu mierzoną czasem przeżycia i czasem wolnym od choroby, ale niestety nie są to ciągle odpowiedzi długotrwałe [62]. Wśród pozytywnych skutków stosowania trametinibu należy wymienić brak korelacji z powstawaniem SCC, która wystąpiła po leczeniu wemurafenibem i dabrafenibem.

Wśród nowych inhibitorów MEK należy wspomnieć o cobimetinibie – ATP niekompetytywnym inhibitorze kinazy MEK1/2, który został już przebadany w połączeniu z wemurafenibem. Uzyskano znacząco mniej działań niepożądanych, w tym wtórnych nowotworów skóry [80]. Barbour i wsp. sugerują, że ocena obecności mutacji $BRAF$ powinna stać się procedurą podstawową celem kwalifikacji do leczenia adiuwantowego inhibitorami BRAF/MEK, gdyż jest to grupa pacjentów charakteryzująca się znacznie większym ryzykiem progresji i tworzenia przerzutów [5].

MECHANIZMY OPORNOŚCI NA TERAPIE UKIERUNKOWANE PRZECIW ELEMENTOM SZLAKU MAPK W CZERNIAKU

Istotnym problemem monoterapii lekami skierowanymi przeciwko białkom szlaku MAPK jest ich krótki czas działania przeciwnowotworowego. Już po 5-7 miesiącach od rozpoczęcia terapii u znaczącej części pacjentów dochodzi do wznowy choroby, a tylko u niewielkiej części efekty terapii utrzymują się przez 2 lata [62,102]. Doświadczenia ze stosowania terapii celowanych w przewlekłej białaczce szpikowej (CML) i nowotworu podścieliska przewodu pokarmowego (GIST) wykazują, że głównym mechanizmem oporności na lek jest najczęściej wtórna mutacja uniemożliwiająca przyłączenie leku [62,82]. W przypadku czerniaka jest inaczej. Badając mechanizmy oporności komórek czerniaka na inhibitory BRAF stwierdzono, że najczęstszym mechanizmem jest ominięcie blokowanego terapią białka przez aktywację innych elementów danego szlaku lub aktywację innego szlaku sygnałowego (ryc. 3A). Liczba poznanych mechanizmów rozwoju oporności na leki celowane w czerniaku ciągle rośnie. Ze względu na czas pojawienia się oporności od zastosowania leku oporność dzieli się na pierwotną i wtórną. Oporność pierwotna na wemurafenib występuje u 50% pacjentów poddanych leczeniu. U pozostałych 50% pacjentów rozwija się oporność wtórna. Ze względu na podłoże molekularne oporność można podzielić na wynikającą z mechanizmów genetycznych i fenotypowych (ryc. 3B).

Jeden z mechanizmów odkryto podczas poszukiwania przyczyn powstawania wtórnych nowotworów skóry, tj. raka kolczystokomórkowego skóry i rogowiaka kolczystokomórkowego, po zastosowaniu inhibitorów BRAF. Su i wsp. [62] przebadali pod kątem obecności mutacji $HRAS$,



Ryc. 3. Mechanizmy oporności na terapię celowaną w czerniaku; **A** - podstawowe szlaki, z zaznaczeniem białek uczestniczących w rozwoju oporności na terapię celowaną. Najważniejsze miejsca zmian prowadzących do rozwoju oporności wtórnej zaznaczono odpowiednimi numerami: 1 - amplifikacja *BRAF* lub alternatywny splicing; 2 - mutacje *RAS*; 3 - mutacje *MEK*; 4 - aktywacja CRAF przez homo- lub heterodimeryzację; 5 - wzrost ekspresji COT/TP2 (MAP3K8); 6 - zmiany ekspresji i aktywności czynników transkrypcyjnych MIF i NF-κB; 7 - delekcja/mutacja punktowa *PTEN* i aktywacja szlaku PI3K/AKT; 8 - podwyższona ekspresja EGFR, MET i innych receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK) tj. PDGFRβ i IGF1R; 9 - oddziaływanie mikrośrodowiska: wpływ czynników wzrostu, tj. EGF, bFGF, HGF, IGF oraz czynników abiotycznych np. pH i poziomu tlenu. **B** - podłoże molekularne rozwoju oporności na inhibitory BRAF z uwzględnieniem mechanizmów genetycznych i fenotypowych. Mutacje somatyczne w genach kodujących białka szlaku MAPK stanowią aż 70% mutacji pojawiających się w czasie rozwoju oporności wtórnej. Niektóre zmiany na poziomie genetycznym wzajemnie się wykluczają, inne współwystępują u jednego pacjenta

KRAS, *NRAS*, *CDKN2A* i *TP53* 21 próbek guzów pobranych od pacjentów leczonych wemurafenibem. W 60% przypadków stwierdzono obecność mutacji w *RAS*, a najczęściej występującą była *HRAS*^{Q61L}. Linie komórkowe z tą mutacją szybciej proliferowały w obecności wemurafenibu i wiązało się to z aktywacją szlaku MAPK mierzoną za pomocą poziomu aktywnej kinazy ERK. Wykazano również, że wemurafenib zwiększa liczebność subpopulacji komórek mających mutację *HRAS*, a wzrost ten może zostać zablokowany z użyciem inhibitora MEK.

Interesującym odkryciem w badaniach rozwoju oporności była obserwacja, że farmakologiczne hamowanie BRAF powoduje paradoksalną aktywację CRAF przez jego homodimeryzację lub heterodimeryzację z BRAF oraz następczą transdukcję sygnału skutkującą wzmożoną aktywnością podziałową komórki [62]. Wykazano, że w komórkach ze zmutowanym *RAS* inhibitor BRAF indukuje zależne od *RAS* przyłączenie BRAF do CRAF i dalszą indukcję sygnału na szlaku MAPK. Inny mechanizm ponownej aktywacji szlaku MAPK wskazuje na udział MAP3K8 (COT/TP2) jako agonisty MAPK powodującego oporność linii komórkowych z mutacją BRAF^{V600E} na inhibitory BRAF [62]. Mechanizm ten uważa się za wtórną oporność na inhibitory BRAF obserwowaną aż w 10% czerniaków z mutacją BRAF^{V600E}. Wewnątrzkomórkowe stężenia białek COT i BRAF są odwrotnie proporcjonalne, a zastosowanie inhibitora dla BRAF^{V600E} powoduje podwyższenie ekspresji COT. Ekspresja COT jest wystarczająca do aktywacji ERK w sposób zależny od MEK bez udziału białek RAF. Wykazano również, że białko COT warunkuje oporność na allosteryczne inhibitory MEK, co wskazuje na możliwość aktywacji ERK przez COT w sposób niezależny od MEK. Stwierdzono także, że w komórkach COT-pozytywnych nie ma mutacji *RAS* [62].

W próbkach od pacjentów poddanych terapii inhibitorami BRAF i MEK wykazano istnienie innych mechanizmów oporności, takich jak mutacja MEK1^{C121S} [62] i aktywacja szlaku kinaz PI3K/AKT, w której pośredniczy zmniejszenie aktywności PTEN lub aktywacja IGF1R [62]. Badając linie komórkowe czerniaka uzyskane z próbek pobranych od pacjentów przed i po zastosowaniu wemurafenibu stwierdzono, że oporność wtórna może wynikać z podwyższonej ekspresji PDGFRβ lub mutacji w *NRAS*, przy czym obecność jednej z tych zmian wyklucza drugą [62]. Potwierdzono to blokując PDGFRβ lub *NRAS* i uzyskując zahamowanie wzrostu komórek. W kontekście oporności wtórnej na wemurafenib rozpatrywane są również dwa geny kodujące białka apoptotyczne z grupy „BH3-only”: BIM-EL oraz BMF [94]. Ponieważ ekspresja tych genów jest wyciszana epigenetycznie, w celu ponownego uwrażliwienia komórek czerniaka na wemurafenib zastosowano worinostat, inhibitor deacetylazy histonowej (HDAC). Coraz więcej badań wskazuje na możliwość jednoczesnej aktywacji u jednego pacjenta różnych mechanizmów oporności na inhibitory BRAF. Stwierdzono np. obecność mutacji w *NRAS* (Q61R/K) w połączeniu z amplifikacją BRAF lub mutacją w *MEK1* w różnych przerzutach u tego

samego pacjenta [86,104]. Z badań Shi i wsp. wynika, że u ponad 20% pacjentów oporność wtórna na inhibitory szlaku MAPK rozwija się pod wpływem więcej niż jednego mechanizmu [95]. Taką heterogenność przerzutów obserwowano w biopsjach pobranych od tego samego pacjenta. Na przykład u pacjenta leczonego przez 726 dni dabrafenibem znaleziono wiele różnych zmian na poziomie genomu w 9 biopsjach z różnych przerzutów, w tym alternatywny splicing BRAF^{V600E}, amplifikację BRAF, mutację *KRAS*^{G12C} oraz delecję *PTEN* [95]. Na podstawie tych danych uzyskanych metodą sekwencjonowania całych eksomów można było przedstawić drzewo filogenetyczne ewolucji klonalnej odpowiedzialnej za rozwój oporności wtórnej, w którym odporne klonny powstawały w wyniku ewolucji nieliniowej.

Przyczyną oporności na wemurafenib może być także fenotyp komórek czerniaka charakteryzujący się niską ekspresją czynnika transkrypcyjnego MITF, a dużą aktywnością NF-κB [53]. Aktywność białka MITF ma znaczenie w pierwotnej oporności na wemurafenib przez regulację ekspresji MET, receptora czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) [108]. Poza receptorem MET na rozwój oporności wpływa także ekspresja EGFR. Wykazano, że podwyższenie ekspresji EGFR w komórkach czerniaka po zastosowaniu inhibitorów BRAF lub MEK jest przejściowe, a zastosowanie przerwy w podawaniu leku ('drug holidays') może wywołać ponowną wrażliwość komórek na te inhibitory [59]. W innych badaniach komórki czerniaka, które uzyskały oporność na wemurafenib przez podwyższony poziom EGFR były eliminowane, gdy z podłoża hodowlanego usuwano wemurafenib [99]. Innym przykładem odzyskiwania wrażliwości na wemurafenib po przerwie w jego stosowaniu są badania Thakur i wsp. [23]. Wiele badań wskazuje na zasadność kontynuowania terapii inhibitorami BRAF, nawet w przypadku progresji choroby [3,23,37].

Uważa się, że oporność fenotypowa na inhibitory BRAF może być również związana ze zmianami w programach metabolicznych, w których istotną rolę odgrywa czynnik transkrypcyjny MITF (ryc. 3B). Czynnikiem ten jest odpowiedzialny m.in. za indukcję ekspresji PGC1α. Oba białka, MITF i PGC1α są elementami programu adaptacji bioenergetycznej, który zapewnia wydajną syntezę ATP w wyniku fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) w czasie stosowania inhibitorów BRAF [36]. Oporność fenotypowa jest również związana z dużą plastycznością komórek czerniaka i obecnością subpopulacji komórek wolno dzielących się [85]. Fenotyp ten, którego cechą jest wysoka ekspresja JARID1A, może być uruchomiony przez czynniki mikrośrodowiska, takie jak niski poziom tlenu. Subpopulacja komórek JARID1A-pozytywnych charakteryzuje się opornością wielolekową, prawdopodobnie już przy pierwszym kontakcie z lekami [85,116]. Stwierdzono znacząco podwyższoną aktywację cyklu Krebsa i OXPHOS w komórkach o wysokiej ekspresji JARID1A. Zastosowanie w badaniach *in vitro* i *in vivo* inhibitorów mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów lub syntazy ATP w skojarzeniu z wemurafenibem

doprowadziło do wyeliminowania komórek JARID1A-pozytywnych, opornych na terapię [85,116].

W rozwoju oporności na wemurafenib znaczącą rolę odgrywają czynniki wzrostu wydzielane przez komórki zrębu tworzące biotyczne mikrośrodowisko dla komórek czerniaka (ryc. 3B). Największą rolę przypisuje się HGF. Czynniki ten jest wydzielany m.in. przez fibroblasty i aktywuje receptor MET w komórkach czerniaka, co powoduje przekazanie sygnału zarówno szlakiem MAPK jak i PI3K/AKT i odpowiada za pierwotną oporność na wemurafenib [98]. Sieć powiązań w mikrośrodowisku jest na tyle silna, że fibroblasty pod wpływem wemurafenibu mogą wytwarzać czynniki wzrostu, w tym HGF, co warunkuje wtórną oporność komórek czerniaka na wemurafenib [39]. Crizotinib, inhibitor c-MET zniósł oporność w badaniach *in vitro* i na modelach zwierzęcych. Wykazano ponadto, że badając stężenie HGF w surowicy pacjentów przed terapią można było określić odpowiedź na wemurafenib, z czego wynika, że HGF może się stać biomarkerem istotnym przy podejmowaniu decyzji terapeutycznych [111]. Komórki nowotworowe również wytwarzają czynniki wzrostu, tj. HGF, bFGF, EGF i IGF, które aktywują odpowiednie szlaki sygnałowe i przyczyniają się do wytworzenia zarówno oporności pierwotnej jak i wtórnej na wemurafenib [111]. Stosowana terapia może również wpływać na mikrośrodowisko, np. przez zmianę liczby limfocytów T w masie guza [52].

W celu ograniczenia rozwoju oporności i zmniejszenia toksyczności stosowanych leków poszukuje się ich odpowiednich kombinacji [55,65]. Kolejne fazy badań klinicznych nad skutecznością i bezpieczeństwem stosowania dabrafenibu i trametinibu, zwane CombiD, zakończyły się zaaprobowaniem tego połączenia przez FDA do leczenia pacjentów z zaawansowanym czerniakiem. Kombinacja zaowocowała większym odsetkiem odpowiedzi całkowitych i czasem wolnym od progresji w porównaniu z monoterapią wemurafenibem lub dabrafenibem [80]. Uzyskano spadek częstości występowania SCC. W porównaniu z wynikami II fazy badań klinicznych nad trametinibem, w których nie uzyskano odpowiedzi u żadnego pacjenta wcześniej leczonego inhibitorem BRAF, zastosowanie trametinibu w skojarzeniu z dabrafenibem u takich pacjentów wykazało nieznaczną skuteczność kliniczną, ale zależną od rodzaju odpowiedzi na inhibitor BRAF [48].

W obecnie prowadzonych badaniach klinicznych wykorzystuje się wiedzę na temat mechanizmów oporności na inhibitory BRAF. Najbardziej interesujące badania kliniczne wyszczególniono w tabeli 1. Na uwagę zasługuje LCCC 1128, które jest badaniem typu open-label II fazy z zastosowaniem dabrafenibu i trametinibu w celu oceny mechanizmu oporności. Wykorzystana zostanie technika sekwencjonowania NextGEN DNA uwzględniająca 150 onkogenów i genów supresorowych, w tym BRAF, NRAS, MEK1, MAP3K8, COT i PTEN (badanie NCT01726738). Innym przykładem badań mechanizmu oporności jest

NCT02263898, w którym podczas terapii z zastosowaniem LGX818 i MEK162 będąc badane komórki czerniaka cyrkulujące w krwiobiegu pod kątem ekspresji białek zaangażowanych w oporność na leki.

INHIBITORY BRAF I MEK W LECZENIU RAKA BRODAWKOWATEGO TARCZYCY I RAKA JELITA GRUBEGO

Wspomniany wyżej sorafenib został zatwierdzony przez FDA do leczenia pacjentów z rakiem tarczycy, nerki i wątrobowokomórkowym. Badanie III fazy pod akronimem DECISION potwierdziło skuteczność i bezpieczeństwo stosowania sorafenibu w porównaniu do placebo u pacjentów ze zróżnicowanym rakiem tarczycy opornym na radioaktywny jod [9]. Typowe objawy niepożądane to wysypka skórna, biegunka i łysienie bliznowate. W badaniu tym zasugerowano, że mutacje BRAF i RAS nie wpływają na czas wolny od choroby. Zaproponowano, że markerem skuteczności stosowania sorafenibu jest niski poziom ufosforylowanego AKT w jądrze komórkowym.

W badaniach przedklinicznych na liniach komórkowych PTC testowano zarówno inhibitory MEK jak i BRAF [61,92]. Do badań klinicznych włączeni zostali pacjenci z rakiem tarczycy z mutacją BRAF^{V600E} i opornością na jodoterapię definiowaną na podstawie jednego z następujących kryteriów:

- widoczne w badaniach obrazowych ognisko nowotworu bez wychwytu ¹³¹I,
- ognisko, które uległo progresji zgodnie z kryteriami RECIST w ciągu 12 miesięcy mimo leczenia ¹³¹I,
- wychwyt jodu w czasie leczenia,
- skumulowana aktywność ¹³¹I <600 mCi [113].

W badaniu klinicznym I fazy z użyciem wemurafenibu uzyskano odpowiedź kliniczną u 3 z 9 pacjentów z rakiem brodawkowatym tarczycy mających mutację BRAF^{V600E} [81]. Częściową odpowiedź zanotowano u 35% chorych z BRAF^{V600E} opornych na radiojod. Podobne wyniki uzyskano w badaniu I fazy z użyciem dabrafenibu [28]. Trwają obecnie prace nad zastosowaniem trametinibu i w skojarzeniu z dabrafenibem u pacjentów z rakiem tarczycy (badanie NCT01723202).

Aktywacja zmutowanego szlaku MAPK obniża aktywność symportera sodowo-jodowego oraz peroksydazy tarczycowej, pełniących podstawowe role w terapii radiojodem. Obecnie trwają badania, które mają ocenić skutek zastosowania terapii radioaktywnym jodem z wemurafenibem (NCT02145143) i dabrafenibem (NCT01534897). We wcześniejszych badaniach wykazano, że zastosowanie inhibitorów MEK uwrażliwia komórki na radiojod [40].

Mutacja w KRAS, ale także w BRAF odgrywa znaczącą rolę w rozwoju raka jelita grubego. Obecność mutacji BRAF i KRAS odpowiada za brak skuteczności terapii z użyciem przeciwciał przeciw EGFR [20]. Potwierdziła to metaanaliza badań klinicznych, która wykazała brak odpowie-

dzi u pacjentów z zaawansowanym CRC otrzymujących przeciwciała monoklonalne przeciw EGFR (cetuximab lub panitumumab), jeżeli występowała mutacja w *BRAF* [77]. Pierwsze wyniki badań nad zastosowaniem wemurafenibu w czerniaku zachęciły badaczy do stosowania tej terapii w raku jelita grubego. Niestety zastosowanie wemurafenibu w CRC nie dało oczekiwanych wyników, ponieważ tylko u jednego z 21 pacjentów z przerzutowym CRC zanotowano częściową odpowiedź [54]. Późniejsze badania wykazały, że hamowanie aktywności *BRAF*^{V600E} bardzo szybko indukuje aktywność EGFR [79]. Zastosowanie wemurafenibu w skojarzeniu z przeciwciałem monoklonalnym przeciw EGFR synergistycznie zahamowało wzrost komórek CRC zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [19,79]. Jednym z mechanizmów pierwotnej oporności CRC na wemurafenib jest duża aktywność szlaku PI3K/AKT, w porównaniu z jego aktywnością w czerniaku, przy małej aktywności szlaku MAPK [64]. Jednoczesne zablokowanie szlaku PI3K/AKT i aktywności zmutowanej kinazy *BRAF* powodowało zahamowanie proliferacji w liniach komórkowych CRC [17,64]. W oparciu o te dane są obecnie prowadzone badania kliniczne nad skutecznością terapii inhibitorem EGFR (panitumumab) w skojarzeniu z inhibitorami kinaz szlaków MAPK i PI3K/AKT (tabela 1).

PRZYSZŁOŚĆ TERAPII UKIERUNKOWANYCH PRZECIW *BRAF*

Zastosowanie terapii celowanych jest prawdziwym przełomem w leczeniu pacjentów onkologicznych. Ma nie tylko olbrzymie znaczenie kliniczne, ale także poznawcze, gdyż umożliwia badanie zachowania się nowotworu w jego naturalnym środowisku, w organizmie pacjenta. Dzięki temu również problemy pojawiające się w trakcie leczenia, w tym przede wszystkim rozwój oporności wtórnej, są coraz lepiej poznawane. Niewątpliwym wyzwaniem jest udoskonalenie metod diagnostycznych tak, aby uwzględniały nie tylko różnice genetyczne między nowotworami od różnych pacjentów, ale także heterogenność genetyczną i fenotypową występującą u tego samego pacjenta, również w obrębie jednego guza. Trwają prace nad terapiami skojarzonymi, które skutecznie usuwałyby wszystkie rodzaje komórek nowotworowych obecne w heterogennym guzie, tym samym eliminując oporność pierwotną i zapobiegając rozwojowi oporności wtórnej. Wydaje się, że inhibitory zmutowanego białka *BRAF* będą ważnym elementem terapii skojarzonych przeciw różnym typom nowotworów zależnym od szlaku sygnałowego RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK).

Tabela 1. Obecnie prowadzone badania kliniczne w czerniaku, raku jelita grubego i raku brodawkowatym tarczycy z wykorzystaniem inhibitorów kinaz szlaku MAPK (na podstawie www.clinicaltrial.gov)

	Numer identyfikacyjny	Badane leki
Czerniak	NCT01657591	Wemurafenib* + XL888 (inhibitor HSP90)
	NCT01754376	Wemurafenib* + Aldesleukin (IL-2)
	NCT01940809	Ipilimumab (przeciwciało anty-CTLA-4)/Dabrafenib**/Trametinib***
	NCT01902173	Trametinib*** + Dabrafenib** + GSK2141795 (inhibitor AKT)
	NCT01495988	Wemurafenib* + Cobimetinib*** +/- Bevacizumab (przeciwciało anty-VEGF-A)
	NCT02036086	Wemurafenib* + Cobimetinib***
	NCT01943422	Wemurafenib* + Interferon α-2b
	NCT01909453	LGX818 (inhibitor <i>BRAF</i> ^{V600E}) + MEK162*** vs. Wemurafenib* lub LGX818 (inhibitor <i>BRAF</i> ^{V600E})
	NCT01972347	Trametinib*** + Dabrafenib**
	NCT01989585	Trametinib*** + Dabrafenib** + Navitoclax (mimetyk białek "BH3-only")
Rak brodawkowaty tarczycy	NCT01723202	Trametinib*** + Dabrafenib**
	NCT02145143	Wemurafenib* + I131
	NCT01534897	Dabrafenib** + I131
	NCT01709292	Wemurafenib*
Rak jelita grubego	NCT01750918	Dabrafenib**/Trametinib***/Panitumumab (przeciwciało anty-EGFR)
	NCT02164916	Cetuximab (przeciwciało anty-EGFR) + Irinotekan (inhibitor topoizomazy I) +/- Wemurafenib*
	NCT01719380	LGX818 (inhibitor <i>BRAF</i> ^{V600E}) + Cetuximab (przeciwciało anty-EGFR) +/- BYL719 (inhibitor PI3K)
	NCT01902173	Trametinib*** + Dabrafenib** + GSK2141795 (inhibitor AKT)

* inhibitor *BRAF*^{V600E}, ** inhibitor *BRAF*^{V600E} i *BRAF*^{V600K}, *** inhibitor MEK

PIŚMIENICTWO

- [1] Amanuel B., Grieu F., Kular J., Millward M., Iacopetta B.: Incidence of BRAF p.Val600Glu and p.Val600Lys mutations in a consecutive series of 183 metastatic melanoma patients from a high incidence region. *Pathology*, 2012; 44: 357-359
- [2] Ascierto P.A., Minor D., Ribas A., Lebbe C., O'Hagan A., Arya N., Guckert M., Schadendorf D., Kefford R.F., Grob J.J., Hamid O., Amaravadi R., Simeone E., Wilhelm T., Kim K.B. i wsp.: Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2013; 31: 3205-3211
- [3] Azer M.W., Menzies A.M., Haydu L.E., Kefford R.F., Long G.V.: Patterns of response and progression in patients with BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain who were treated with dabrafenib. *Cancer*, 2014; 120: 530-536
- [4] Ballantyne A.D., Garnock-Jones K.P.: Dabrafenib: first global approval. *Drugs*, 2013; 73: 1367-1376
- [5] Barbour A.P., Tang Y.H., Armour N., Dutton-Regester K., Krause L., Loffler K.A., Lambie D., Burmeister B., Thomas J., Smithers B.M., Hayward N.K.: BRAF mutation status is an independent prognostic factor for resected stage IIIB and IIIC melanoma: implications for melanoma staging and adjuvant therapy. *Eur. J. Cancer*, 2014; 50: 2668-2676
- [6] Bettington M., Walker N., Clouston A., Brown I., Leggett B., Whitehall V.: The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology*, 2013; 62: 367-386
- [7] Boland C.R., Goel A.: Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 2010; 138: 2073-2087.e3
- [8] Bosman F., Yan P.: Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol. J. Pathol.*, 2014; 65: 257-266
- [9] Brose M.S., Nutting C.M., Jarzab B., Elisei R., Siena S., Bastholt L., de la Fouchardiere C., Pacini F., Paschke R., Shong Y.K., Sherman S.I., Smit J.W., Chung J., Kappeler C., Peña C. i wsp.: Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet*, 2014; 384: 319-328
- [10] Bryk D., Olejars W., Zapolska-Downar D.: Kinazy aktywowane mitogenami i ich znaczenie w patogenezie miażdżycy. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 10-22
- [11] Brzezińska E., Pastuszek-Lewandoska D., Wojciechowska K., Migdalska-Sek M., Cyniak-Magierska A., Nawrot E., Lewiński A.: Investigation of V600E BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in the Polish population. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 2007; 28: 351-359
- [12] Candido S., Rapisarda V., Marconi A., Malaponte G., Bevelacqua V., Gangemi P., Scalisi A., McCubrey J.A., Maestro R., Spandido D.A., Fenga C., Libra M.: Analysis of the B-RafV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure. *Oncol. Rep.*, 2014; 31: 1079-1082
- [13] Cantwell-Dorris E.R., O'Leary J.J., Sheils O.M.: BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol. Cancer Ther.*, 2011; 10: 385-394
- [14] Catalogue of somatic mutation in cancer (COSMIC). <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=BRAF> (05.05.2015)
- [15] Chang Y.M., Barrett J.H., Bishop D.T., Armstrong B.K., Bataille V., Bergman W., Berwick M., Bracci P.M., Elwood J.M., Ernstoff M.S., Gallagher R.P., Green A.C., Gruis N.A., Holly E.A., Ingvar C., et al.: Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. *Int. J. Epidemiol.*, 2009; 38: 814-830
- [16] Cirenajwis H., Ekedahl H., Lauss M., Harbst K., Carneiro A., Enoksson J., Rosengren F., Werner-Hartman L., Törnqvist L., Kvist A., Fredlund E., Bendahl P.O., Jirstrom K., Lundgren L., Howlin J., et al.: Molecular stratification of metastatic melanoma using gene expression profiling: prediction of survival outcome and benefit from molecular targeted therapy. *Oncotarget*, 2015; 6: 12297-12309
- [17] Coffee E.M., Faber A.C., Roper J., Sinnamon M.J., Goel G., Keung L., Wang W.V., Vecchione L., de Vriendt V., Weinstein B.J., Bronson R.T., Tejpar S., Xavier R.J., Engelman J.A., Martin E.S., Hung K.E.: Concomitant BRAF and PI3K/mTOR blockade is required for effective treatment of BRAF^{V600E} colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2013; 19: 2688-2698
- [18] Colombino M., Capone M., Lissia A., Cossu A., Rubino C., De Giorgi V., Massi D., Fonsatti E., Staibano S., Nappi O., Pagani E., Casula M., Manca A., Sini M., Franco R. i wsp.: BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2012; 30: 2522-2529
- [19] Corcoran R.B., Ebi H., Turke A.B., Coffee E.M., Nishino M., Cogdill A.P., Brown R.D., Della Pelle P., Dias-Santagata D., Hung K.E., Flaherty K.T., Piris A., Wargo J.A., Settleman J., Mino-Kenudson M. i wsp.: EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discov.*, 2012; 2: 227-235
- [20] Cui D., Cao D., Yang Y., Qiu M., Huang Y., Yi C.: Effect of BRAF V600E mutation on tumor response of anti-EGFR monoclonal antibodies for first-line metastatic colorectal cancer treatment: a meta-analysis of randomized studies. *Mol. Biol. Rep.*, 2014; 41: 1291-1298
- [21] Curry J.L., Torres-Cabala C.A., Tetzlaff M.T., Bowman C., Prieto V.G.: Molecular platforms utilized to detect BRAF V600E mutation in melanoma. *Semin. Cutan. Med. Surg.*, 2012; 31: 267-273
- [22] Czarniecka A., Rusinek D., Stobiecka E., Krajewska J., Kowal M., Kropińska A., Zebracka J., Kowalska M., Włoch J., Maciejewski A., Handkiewicz-Junak D.: Occurrence of BRAF mutations in a Polish cohort of PTC patients – preliminary results. *Endokrynol. Pol.*, 2010; 61: 462-466
- [23] Das Thakur M., Salangsang F., Landman A.S., Sellers W.R., Pryer N.K., Levesque M.P., Dummer R., McMahon M., Stuart D.D.: Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature*, 2013; 494: 251-255
- [24] Douillard J.Y., Oliner K.S., Siena S., Tabernero J., Burkes R., Barugel M., Humblet Y., Bodoky G., Cunningham D., Jassem J., Rivera F., Kocákova I., Ruff P., Błasińska-Morawiec M., Šmakal M. i wsp.: Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2013; 369: 1023-1034
- [25] Edlundh-Rose E., Egyházi S., Omholt K., Månsson-Brahme E., Platz A., Hansson J., Lundeberg J.: NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res.*, 2006; 16: 471-478
- [26] Eisen T., Ahmad T., Flaherty K.T., Gore M., Kaye S., Marais R., Gibbens I., Hackett S., James M., Schuchter L.M., Nathanson K.L., Xia C., Simantov R., Schwartz B., Poulin-Costello M. i wsp.: Sorafenib in advanced melanoma: a phase II randomised discontinuation trial analysis. *Br. J. Cancer*, 2006; 95: 581-586
- [27] Ellerhorst J.A., Greene V.R., Ekmekcioglu S., Warneke C.L., Johnson M.M., Cooke C.P., Wang L.E., Prieto V.G., Gershenwald J.E., Wei Q., Grimm E.A.: Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 2011; 17: 229-235
- [28] Falchook G.S., Long G.V., Kurzrock R., Kim K.B., Arkenau T.H., Brown M.P., Hamid O., Infante J.R., Millward M., Pavlick A.C., O'Day S.J., Blackman S.C., Curtis C.M., Lebowitz P., Ma B. i wsp.: Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 2012; 379: 1893-1901
- [29] Fearon E.R., Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990; 61: 759-767
- [30] Flaherty K.T., Lee S.J., Schuchter L.M., Flaherty L.E., Wright J.J., Leming P.D., Kirkwood J.M.: Final results of E2603: a double-blind,

randomized phase III trial comparing carboplatin A ©/paclitaxel (P) with or without sorafenib (S) in metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2010; 28 (Suppl. 1): 15s(8511)

[31] Flaherty K.T., Puzanov I., Kim K.B., Ribas A., McArthur G.A., Sosman J.A., O'Dwyer P.J., Lee R.J., Grippo J.F., Nolop K., Chapman P.B.: Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2010; 363: 809-819

[32] Garnett M.J., Rana S., Paterson H., Barford D., Marais R.: Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Mol. Cell*, 2005; 20: 963-969

[33] Grady W.M., Pritchard C.C.: Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicol. Pathol.*, 2014; 42: 124-139

[34] Gray-Schopfer V.C., Cheong S.C., Chong H., Chow J., Moss T., Abdel-Malek Z.A., Marais R., Wynford-Thomas D., Bennett D.C.: Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br. J. Cancer*, 2006; 95: 496-505

[35] Hall R.D., Kudchadkar R.R.: BRAF mutations: signaling, epidemiology, and clinical experience in multiple malignancies. *Cancer Control*, 2014; 21: 221-230

[36] Haq R., Shoag J., Andreu-Perez P., Yokoyama S., Edelman H., Rowe G.C., Frederick D.T., Hurley A.D., Nellore A., Kung A.L., Wargo J.A., Song J.S., Fisher D.E., Arany Z., Widlund H.R.: Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell*, 2013; 23: 302-315

[37] Hartsough E.J., Basile K.J., Aplin A.E.: Beneficial effects of RAF inhibitor in mutant BRAF splice variant-expressing melanoma. *Mol. Cancer Res.*, 2014; 12: 795-802

[38] Hauschild A., Agarwala S.S., Trefzer U., Hogg D., Robert C., Hersey P., Eggermont A., Grabbe S., Gonzalez R., Gille J., Peschel C., Schadendorf D., Garbe C., O'Day S., Daud A. i wsp.: Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2009; 27: 2823-2830

[39] Hirata E., Girotti M.R., Viros A., Hooper S., Spencer-Dene B., Matsuda M., Larkin J., Marais R., Sahai E.: Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin β 1/FAK signaling. *Cancer Cell*, 2015; 27: 574-588

[40] Ho A.L., Grewal R.K., Leboeuf R., Sherman E.J., Pfister D.G., Andreis D., Pentlow K.S., Zanzonico P.B., Haque S., Gavane S., Ghossein R.A., Ricarte-Filho J.C., Domínguez J.M., Shen R., Tuttle R.M. i wsp.: Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2013; 368: 623-632

[41] Hodis E., Watson I.R., Kryukov G.V., Arold S.T., Imielinski M., Theurillat J.P., Nickerson E., Auclair D., Li L., Place C., Dicara D., Ramos A.H., Lawrence M.S., Cibulskis K., Sivachenko A. i wsp.: A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, 2012; 150: 251-263

[42] Hokazono K., Ueki T., Nagayoshi K., Nishioka Y., Hatae T., Koga Y., Hirahashi M., Oda Y., Tanaka M.: A CpG island methylator phenotype of colorectal cancer that is contiguous with conventional adenomas, but not serrated polyps. *Oncol. Lett.*, 2014; 8: 1937-1944

[43] Howell G.M., Nikiforova M.N., Carty S.E., Armstrong M.J., Hodak S.P., Stang M.T., McCoy K.L., Nikiforov Y.E., Yip L.: BRAF V600E mutation independently predicts central compartment lymph node metastasis in patients with papillary thyroid cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 2013; 20: 47-52

[44] Imko-Walczuk B., Piesiaków M.L., Okuniewska A., Jaśkiewicz J., Lizakowski S., Dębska-Ślizień A., Rutkowski B.: Czynniki ryzyka rozwoju nowotworów złośliwych skóry u chorych po przeszczepieniu narządów. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 818-827

[45] Jarzab B., Sporny S., Lange D., Włoch J., Lewiński A., Bąłdys-Waligórska A., Barczyński M., Bręborowicz D., Brzeziński J., Bruszewska E., Chmielik E., Chosia M., Czarniecka A., Czetwertyńska M., Dędcjus M. i wsp.: Diagnosis and treatment of thyroid cancer - Polish

guidelines. *Endokrynol. Pol.*, 2010; 61: 518-568

[46] Jass J.R., Baker K., Zlobec I., Higuchi T., Barker M., Buchanan D., Young J.: Advanced colorectal polyps with the molecular and morphological features of serrated polyps and adenomas: concept of a 'fusion' pathway to colorectal cancer. *Histopathology*, 2006; 49: 121-131

[47] Jensen N.F., Smith D.H., Nygard S.B., Rømer M.U., Nielsen K.V., Brünner N.: Predictive biomarkers with potential of converting conventional chemotherapy to targeted therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2012; 47: 340-355

[48] Johnson D.B., Flaherty K.T., Weber J.S., Infante J.R., Kim K.B., Kefford R.F., Hamid O., Schuchter L., Cebon J., Sharfman W.H., McWilliams R.R., Sznol M., Lawrence D.P., Gibney G.T., Burris H.A. 3rd i wsp.: Combined BRAF (Dabrafenib) and MEK inhibition (Trametinib) in patients with BRAFV600-mutant melanoma experiencing progression with single-agent BRAF inhibitor. *J. Clin. Oncol.*, 2014; 32: 3697-3704

[49] Kim K.B., Kefford R., Pavlick A.C., Infante J.R., Ribas A., Sosman J.A., Fecher L.A., Millward M., McArthur G.A., Hwu P., Gonzalez R., Ott P.A., Long G.V., Gardner O.S., Ouellet D. i wsp.: Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. *J. Clin. Oncol.*, 2013; 31: 482-489

[50] Kim T.H., Park Y.J., Lim J.A., Ahn H.Y., Lee E.K., Lee Y.J., Kim K.W., Hahn S.K., Youn Y.K., Kim K.H., Cho B.Y., Park do J.: The association of the BRAF^{V600E} mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer*, 2012; 118: 1764-1773

[51] Knauf J.A., Sartor M.A., Medvedovic M., Lundsmith E., Ryder M., Salzano M., Nikiforov Y.E., Giordano T.J., Ghossein R.A., Fagin J.A.: Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGF β signaling. *Oncogene*, 2011; 30: 3153-3162

[52] Knight D.A., Ngiew S.F., Li M., Parmenter T., Mok S., Cass A., Haynes N.M., Kinross K., Yagita H., Koya R.C., Graeber T.G., Ribas A., McArthur G.A., Smyth M.J.: Host immunity contributes to the anti-melanoma activity of BRAF inhibitors. *J. Clin. Invest.*, 2013; 123: 1371-1381

[53] Konieczkowski D.J., Johannessen C.M., Abudayyeh O., Kim J.W., Cooper Z.A., Piris A., Frederick D.T., Barzily-Rokni M., Straussman R., Haq R., Fisher D.E., Mesirov J.P., Hahn W.C., Flaherty K.T., Wargo J.A. i wsp.: A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov.*, 2014; 4: 816-827

[54] Kopetz S., Desai J., Chan E., Hecht J.R., O'Dwyer P.J., Lee R.J., Nolop K.B., Saltz L.: PLX4032 in metastatic colorectal cancer patients with mutant BRAF tumors. *J. Clin. Oncol.*, 2010; 28 (Suppl. 15s): abstr 3534

[55] Koprowska K., Czyż M.: Dakarbazyna jako lek przeciwczerwiniakowy i referencyjny dla nowych programów terapeutycznych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 734-751

[56] Lash R.H., Genta R.M., Schuler C.M.: Sessile serrated adenomas: prevalence of dysplasia and carcinoma in 2139 patients. *J. Clin. Pathol.*, 2010; 63: 681-686

[57] Lin J., Goto Y., Murata H., Sakaizawa K., Uchiyama A., Saida T., Takata M.: Polyclonality of BRAF mutations in primary melanoma and the selection of mutant alleles during progression. *Br. J. Cancer*, 2011; 104: 464-468

[58] Lin K.L., Wang O.C., Zhang X.H., Dai X.X., Hu X.Q., Qu J.M.: The BRAF mutation is predictive of aggressive clinicopathological characteristics in papillary thyroid microcarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.*, 2010; 17: 3294-3300

[59] Lito P., Pratilas C.A., Joseph E.W., Tadi M., Halilovic E., Zubrowski M., Huang A., Wong W.L., Callahan M.K., Merghoub T., Wolchok J.D., de Stanchina E., Chandarlapaty S., Poulikakos P.I., Fagin J.A., Rosen N.: Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas. *Cancer Cell*, 2012; 22: 668-682

- [60] Liu D., Liu Z., Condouris S., Xing M.: BRAF V600E maintains proliferation, transformation, and tumorigenicity of BRAF-mutant papillary thyroid cancer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2007; 92: 2264-2271
- [61] Liu D., Xing M.: Potent inhibition of thyroid cancer cells by the MEK inhibitor PD0325901 and its potentiation by suppression of the PI3K and NF- κ B pathways. *Thyroid*, 2008; 18: 853-864
- [62] Mandalà M., Voit C.: Targeting BRAF in melanoma: biological and clinical challenges. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2013; 87: 239-255
- [63] Mann G.J., Pupo G.M., Campain A.E., Carter C.D., Schramm S.J., Pianova S., Gerega S.K., De Silva C., Lai K., Wilmott J.S., Synnott M., Hersey P., Kefford R.F., Thompson J.F., Yang Y.H., Scolyer R.A.: BRAF mutation, NRAS mutation, and the absence of an immune-related expressed gene profile predict poor outcome in patients with stage III melanoma. *J. Invest. Dermatol.*, 2013; 133: 509-517
- [64] Mao M., Tian F., Mariadason J.M., Tsao C.C., Lemos R. Jr., Dayyani F., Gopal Y.N., Jiang Z.Q., Wistuba I.I., Tang X.M., Bornman W.G., Bollag G., Mills G.B., Powis G., Desai J. i wsp.: Resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutant colon cancer can be overcome with PI3K inhibition or demethylating agents. *Clin. Cancer Res.*, 2013; 19: 657-667
- [65] McArthur G.A.: Combination therapies to inhibit the RAF/MEK/ERK pathway in melanoma: We are not done yet. *Front. Oncol.*, 2015; 5: 161
- [66] Meckbach D., Bauer J., Pflugfelder A., Meier F., Busch C., Eigentler T.K., Capper D., von Deimling A., Mittelbronn M., Perner S., Ikenberg K., Hantschke M., Büttner P., Garbe C., Weide B.: Survival according to BRAF-V600 tumor mutations - an analysis of 437 patients with primary melanoma. *PLoS One*, 2014; 9: e86194
- [67] Menzies A.M., Haydu L.E., Visintin L., Carlino M.S., Howle J.R., Thompson J.F., Kefford R.F., Scolyer R.A., Long G.V.: Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 2012; 18: 3242-3249
- [68] Mitsutake N., Knauf J.A., Mitsutake S., Mesa C. Jr., Zhang L., Fagin J.A.: Conditional BRAF^{V600E} expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Res.*, 2005; 65: 2465-2473
- [69] Nyström-Lahti M., Parsons R., Sistonen P., Pylkkänen L., Aaltonen L.A., Leach F.S., Hamilton S.R., Watson P., Bronson E., Fusaro R., Cavalieri J., Lynch J., Lanspa S., Smyrk T., Lynch P. i wsp.: Mismatch repair genes on chromosomes 2p and 3p account for a major share of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families evaluable by linkage. *Am. J. Hum. Genet.*, 1994; 55: 659-665
- [70] Ogino S., Kawasaki T., Kirkner G.J., Kraft P., Loda M., Fuchs C.S.: Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J. Mol. Diagn.*, 2007; 9: 305-314
- [71] Ogino S., Shima K., Meyerhardt J.A., McCleary N.J., Ng K., Hollis D., Saltz L.B., Mayer R.J., Schaefer P., Whittom R., Hantel A., Benson A.B. 3rd, Spiegelman D., Goldberg R.M., Bertagnolli M.M., Fuchs C.S.: Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in stage III colon cancer: results from intergroup trial CALGB 89803. *Clin. Cancer Res.*, 2012; 18: 890-900
- [72] Oler G., Cerutti J.M.: High prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas: correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes. *Cancer*, 2009; 115: 972-980
- [73] Omberg L., Ellrott K., Yuan Y., Kandath C., Wong C., Kellen M.R., Friend S.H., Stuart J., Liang H., Margolin A.A.: Enabling transparent and collaborative computational analysis of 12 tumor types within The Cancer Genome Atlas. *Nat. Genet.*, 2013; 45: 1121-1126
- [74] Omholt K., Platz A., Kanter L., Ringborg U., Hansson J.: NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 6483-6488
- [75] Pelizzo M.R., Boschin I.M., Barollo S., Pennelli G., Toniato A., Zamboni L., Vianello F., Piotto A., Ide E.C., Pagetta C., Sorgato N., Torresan F., Girelli M.E., Nacamulli D., Mantero F. i wsp.: BRAF analysis by fine needle aspiration biopsy of thyroid nodules improves preoperative identification of papillary thyroid carcinoma and represents a prognostic factor. A mono-institutional experience. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2011; 49: 325-329
- [76] Picard M., Pham Dang N., D'Incan M., Mansard S., Dechelotte P., Pereira B., Mondie J.M., Barthelemy I.: Is BRAF a prognostic factor in stage III skin melanoma? A retrospective study of 72 patients after positive sentinel lymph node dissection. *Br. J. Dermatol.*, 2014; 171: 108-114
- [77] Pietrantonio F., Petrelli F., Coinu A., Di Bartolomeo M., Borgonovo K., Maggi C., Cabiddu M., Iacovelli R., Bossi I., Lonati V., Ghilardi M., de Braud F., Barni S.: Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur. J. Cancer*, 2015; 51: 587-594
- [78] Poynter J.N., Elder J.T., Fullen D.R., Nair R.P., Soengas M.S., Johnson T.M., Redman B., Thomas N.E., Gruber S.B.: BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Res.*, 2006; 16: 267-273
- [79] Prahallad A., Sun C., Huang S., Di Nicolantonio F., Salazar R., Zechin D., Beijersbergen R.L., Bardelli A., Bernards R.: Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature*, 2012; 483: 100-103
- [80] Queirolo P., Picasso V., Spagnolo F.: Combined BRAF and MEK inhibition for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. *Cancer Treat. Rev.*, 2015; 41: 519-526
- [81] Rahman M.A., Salajegheh A., Smith R.A., Lam A.K.: B-Raf mutation: a key player in molecular biology of cancer. *Exp. Mol. Pathol.*, 2013; 95: 336-342
- [82] Regulska K., Stanisław B., Regulski M.: Indywidualizacja terapii przeciwnowotworowej; molekularne uwarunkowania mechanizmów działania nowoczesnych leków onkologicznych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 855-867
- [83] Reimers M.S., Kuppen P.J., Lee M., Lopatin M., Tezcan H., Putter H., Clark-Langone K., Liefers G.J., Shak S., van de Velde C.J.: Validation of the 12-gene colon cancer recurrence score as a predictor of recurrence risk in stage II and III rectal cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2014; 106: 11
- [84] Richter A., Grieco F., Carrello A., Amanuel B., Namdarian K., Rynska A., Lucas A., Michael V., Bell A., Fox S.B., Hewitt C.A., Do H., McArthur G.A., Wong S.Q., Dobrovic A., Iacopetta B.: A multisite blinded study for the detection of BRAF mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded malignant melanoma. *Sci. Rep.*, 2013; 3: 1659
- [85] Roesch A., Vultur A., Bokesi I., Wang H., Zimmermann K.M., Speicher D., Körbel C., Laschke M.W., Gimotty P.A., Philipp S.E., Krause E., Pätzold S., Villanueva J., Krepler C., Fukunaga-Kalabis M. i wsp.: Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B^{high} cells. *Cancer Cell*, 2013; 23: 811-825
- [86] Romano E., Pradervand S., Paillusson A., Weber J., Harshman K., Muehlethaler K., Speiser D., Peters S., Rimoldi D., Michielin O.: Identification of multiple mechanisms of resistance to vemurafenib in a patient with BRAFV600E-mutated cutaneous melanoma successfully rechallenged after progression. *Clin. Cancer Res.*, 2013; 19: 5749-5757
- [87] Rossi M., Buratto M., Bruni S., Filieri C., Tagliati F., Trasforini G., Rossi R., Beccati M.D., Degli Uberti E.C., Zatelli M.C.: Role of ultrasonographic/clinical profile, cytology, and BRAF V600E mutation evaluation in thyroid nodule screening for malignancy: a prospective study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2012; 97: 2354-2361
- [88] Routhier C.A., Mochel M.C., Lynch K., Dias-Santagata D., Louis D.N., Hoang M.P.: Comparison of 2 monoclonal antibodies for immunohistochemical detection of BRAF V600E mutation in malig-

nant melanoma, pulmonary carcinoma, gastrointestinal carcinoma, thyroid carcinoma, and gliomas. *Hum. Pathol.*, 2013; 44: 2563-2570

[89] Rusinek D., Szpak-Ulczo S., Jarzab B.: Gene expression profile of human thyroid cancer in relation to its mutational status. *J. Mol. Endocrinol.*, 2011; 47: R91-R103

[90] Rutkowski P., Gos A., Jurkowska M., Switaj T., Dziewirski W., Zdzenicki M., Ptasiński K., Michej W., Tysarowski A., Siedlecki J.A.: Molecular alterations in clinical stage III cutaneous melanoma: Correlation with clinicopathological features and patient outcome. *Oncol. Lett.*, 2014; 8: 47-54

[91] Safaee Ardekani G., Jafarnejad S.M., Tan L., Saeedi A., Li G.: The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2012; 7: e47054

[92] Sala E., Mologni L., Truffa S., Gaetano C., Bollag G.E., Gambacorti-Passerini C.: BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Mol. Cancer Res.*, 2008; 6: 751-759

[93] Samadder N.J., Curtin K., Tuohy T.M., Pappas L., Boucher K., Provenzale D., Rowe K.G., Mineau G.P., Smith K., Pimentel R., Kirchhoff A.C., Burt R.W.: Characteristics of missed or interval colorectal cancer and patient survival: a population-based study. *Gastroenterology*, 2014; 146: 950-960

[94] Shao Y., Aplin A.E.: BH3-only protein silencing contributes to acquired resistance to PLX4720 in human melanoma. *Cell Death Differ.*, 2012; 19: 2029-2039

[95] Shi H., Hugo W., Kong X., Hong A., Koya R.C., Moriceau G., Chodon T., Guo R., Johnson D.B., Dahlman K.B., Kelley M.C., Kefford R.F., Chmielowski B., Glaspy J.A., Sosman J.A., van Baren N., Long G.V., Ribas A., Lo R.S.: Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov.*, 2014; 4: 80-93

[96] Sigalotti L., Fratta E., Parisi G., Coral S., Maio M.: Stability of BRAF V600E mutation in metastatic melanoma: new insights for therapeutic success? *Br. J. Cancer*, 2011; 105: 327-328

[97] Snover D.C.: Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum. Pathol.*, 2011; 42: 1-10

[98] Straussman R., Morikawa T., Shee K., Barzily-Rokni M., Qian Z.R., Du J., Davis A., Mongare M.M., Gould J., Frederick D.T., Cooper Z.A., Chapman P.B., Solit D.B., Ribas A., Lo R.S. i wsp.: Tumour microenvironment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, 2012; 487: 500-504

[99] Sun C., Wang L., Huang S., Heynen G.J., Prahallad A., Robert C., Haanen J., Blank C., Wesselung J., Willems S.M., Zecchin D., Hobor S., Bajpe P.K., Lieftink C., Mateus C. i wsp.: Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature*, 2014; 508: 118-122

[100] Temraz S., Alameddine R., Shamseddine A.: B-type proto-oncogene-mutated tumors of colon cancer: promising therapeutic approaches. *Curr. Opin. Oncol.*, 2015; 27: 276-281

[101] Thiel A., Ristimäki A.: Toward a molecular classification of colorectal cancer: the role of BRAF. *Front. Oncol.*, 2013; 3: 281

[102] Uehling D.E., Harris P.A.: Recent progress on MAP kinase pathway inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015; 25: 4047-4056

[103] Ugolini C., Giannini R., Lupi C., Salvatore G., Miccoli P., Proietti A., Elisei R., Santoro M., Basolo F.: Presence of BRAF V600E in very early stages of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*, 2007; 17: 381-388

[104] Van Allen E.M., Wagle N., Sucker A., Treacy D.J., Johannessen C.M., Goetz E.M., Place C.S., Taylor-Weiner A., Whittaker S., Kryukov G.V., Hodis E., Rosenberg M., McKenna A., Cibulskis K., Farlow D. i wsp.: The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov.*, 2014; 4: 94-109

[105] Viros A., Fridlyand J., Bauer J., Lasithiotakis K., Garbe C., Pinkel D., Bastian B.C.: Improving melanoma classification by integrating

genetic and morphologic features. *PLoS Med.*, 2008; 5: e120

[106] Viros A., Sanchez-Laorden B., Pedersen M., Furney S.J., Rae J., Hogan K., Ejima S., Girotti M.R., Cook M., Dhomen N., Marais R.: Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature*, 2014; 511: 478-482

[107] Wan P.T., Garnett M.J., Roe S.M., Lee S., Niculescu-Duvaz D., Good V.M., Jones C.M., Marshall C.J., Springer C.J., Barford D., Marais R., Cancer Genome Project: Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 2004; 116: 855-867

[108] Webster D.E., Barajas B., Bussat R.T., Yan K.J., Neela P.H., Flockhart R.J., Kovalski J., Zehnder A., Khavari P.A.: Enhancer-targeted genome editing selectively blocks innate resistance to oncoprotein inhibition. *Genome Res.*, 2014; 24: 751-760

[109] Weisenberger D.J., Siegmund K.D., Campan M., Young J., Long T.I., Faasse M.A., Kang G.H., Widschwendter M., Weener D., Buchanan D., Koh H., Simms L., Barker M., Leggett B., Levine J. i wsp.: CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.*, 2006; 38: 787-793

[110] Widel M.: Efekt sąsiedztwa indukowany promieniowaniem UV; dlaczego powinniśmy się zainteresować? *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 828-837

[111] Wilson T.R., Fridlyand J., Yan Y., Penuel E., Burton L., Chan E., Peng J., Lin E., Wang Y., Sosman J., Ribas A., Li J., Moffat J., Sutherland D.P., Koeppe H. i wsp.: Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature*, 2012; 487: 505-509

[112] Xing M., Alzahrani A.S., Carson K.A., Shong Y.K., Kim T.Y., Viola D., Elisei R., Bendlová B., Yip L., Mian C., Vianello F., Tuttle R.M., Robenshtok E., Fagin J.A., Puxeddu E. i wsp.: Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2015; 33: 42-50

[113] Xing M., Haugen B.R., Schlumberger M.: Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *Lancet*, 2013; 381: 1058-1069

[114] Xing M., Westra W.H., Tufano R.P., Cohen Y., Rosenbaum E., Rhoden K.J., Carson K.A., Vasko V., Larin A., Tallini G., Tolaney S., Holt E.H., Hui P., Umbricht C.B., Basaria S. i wsp.: BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005; 90: 6373-6379

[115] Yang H., Higgins B., Kolinsky K., Packman K., Go Z., Iyer R., Kolis S., Zhao S., Lee R., Grippo J.F., Schostack K., Simcox M.E., Heimbros D., Bollag G., Su F.: RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Res.*, 2010; 70: 5518-5527

[116] Yuan P., Ito K., Perez-Lorenzo R., Del Guzzo C., Lee J.H., Shen C.H., Bosenberg M.W., McMahon M., Cantley L.C., Zheng B.: Phenformin enhances the therapeutic benefit of BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: 18226-18231

[117] Zaman M.U., Fatima N., Padhy A.K., Zaman U.: Controversies about radioactive iodine-131 remnant ablation in low risk thyroid cancers: are we near a consensus? *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2013; 14: 6209-6213

[118] Zhou Y.L., Zhang W., Gao E.L., Dai X.X., Yang H., Zhang X.H., Wang O.C.: Preoperative BRAF mutation is predictive of occult contralateral carcinoma in patients with unilateral papillary thyroid microcarcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2012; 13: 1267-1272

[119] Zhu Z., Gandhi M., Nikiforova M.N., Fischer A.H., Nikiforov Y.E.: Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2003; 120: 71-77

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.