

## Mechanizmy oporności na leczenie czerniaka inhibitorami BRAF i MEK

Ewa Bartnik<sup>1</sup>, Michał Fiedorowicz<sup>2</sup>, Anna M. Czarnecka<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Institut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

<sup>2</sup>Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa

<sup>3</sup>Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa

Dotychczas opisano kilka mechanizmów oporności na hamowanie aktywności *BRAF* w komórkach czerniaka. Badania genetyczne pozwoliły ustalić, że mutacje w kinazie MEK1 (kinaza kinazy MAP), które skutkują konstytutywną aktywacją kinazy ERK, powodują oporność na leczenie. Innym mechanizmem nabytej oporności na hamowanie *BRAF* jest gromadzenie mutacji aktywujących w onkogenie *NRAS*, który napędza aktywację CRAF. To z kolei prowadzi do trwałej aktywacji przekazywania sygnału do *MEK* i *ERK*. Innym ważnym mechanizmem oporności jest tworzenie wariantów składowania genu *BRAF* V600E, w tym wariantów, w których brakuje eksonów od 4 do 8 zawierających domenę wiążącą *RAS*. Obecność wariantu *p61 BRAF* V600E prowadzi do konstytutywnej sygnalizacji *ERK*, która jest oporna na hamowanie *RAF*. Ponadto wpływ na oporność na leczenie mają hiperaktywacja receptorów kinaz tyrozynowych, takich jak receptor czynnika wzrostu płytek krwi  $\beta$  (PDGFR $\beta$ ), receptor podobnego do insuliny czynnika wzrostu 1 (IGF-1R) i wytwarzające erytropoetynę receptory wątrobowokomórkowe (EPH) – prowadzące do indukcji szlaku kinazy 3-fosfoinozitolowej (PI3K) u pacjentów leczonych inhibitorami BRAF lub MEK. Inną interesującą ścieżką oporności na BRAFi/MEKi jest nadekspresja receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) poprzez ujemne sprzężenie zwrotne u pacjentów leczonych inhibitorami BRAF (BRAFi) – EGFR nie ulega normalnej ekspresji w nieleczonych czerniakach.

Biuletyn PTO NOWOTWORY 2019; 4, 3–4: 168–176

**Słowa kluczowe:** BRAF, MEK, czerniak, MAPK, lekooporność

### Wstęp

Przed odkryciem aktywujących mutacji w genie *BRAF* uważano czerniaka za nowotwór skóry o najgorszym rokowaniu. Klasyczne schematy chemioterapii oparte na dakarbazynie dawały niewielkie możliwości terapeutyczne. W 2002 roku w przełomowym badaniu przeprowadzonym przez Cancer Genome Project w Instytucie Sangera w ponad 60% czerniaków zidentyfikowano mutacje *BRAF* [1]. Obecnie czerniak odpowiada za ponad 80% zgonów z przyczyn nowotworów skóry, choć jego przypadki stanowią tylko 1% wszystkich przy-

padków nowotworów złośliwych skóry. Do 2011 roku, kiedy Food and Drug Administration (FDA) zatwierdziła wemurafenib (pierwszy lek działający selektywnie na konkretne zmutowane białko w szlaku sygnalizacji *BRAF/MEK*), w zasadzie nie było skutecznej terapii dla chorych na czerniaka z przerzutami. Grupę leków, do których należy wemurafenib (a także dabrafenib i enkorafenib) określamy jako inhibitory białka BRAF (BRAFi) [2].

Szlak RAS/MAPK (ryc. 1) jest jednym z najlepiej poznanych szlaków przekazywania sygnału ze środowiska komórki do jądra komórkowego, w którym – w efekcie działania tych

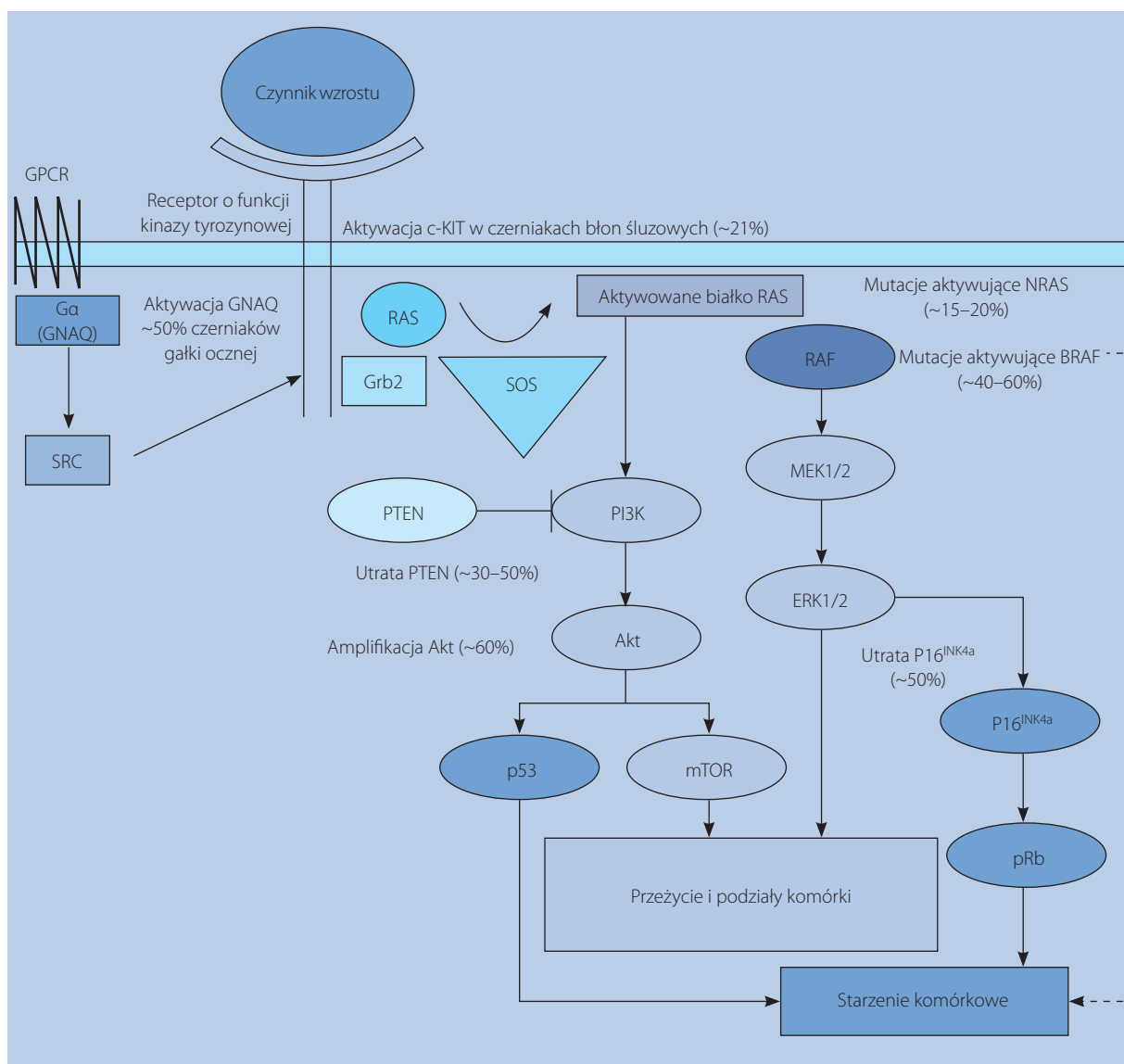
### Jak cytować:

Bartnik E, Fiedorowicz M, Czarnecka AM. *Mechanisms of melanoma resistance to treatment with BRAF and MEK inhibitors*. NOWOTWORY J Oncol 2019; 69: 133–141.

sygnałów – uruchamia się transkrypcja genów związanych z procesami wzrostu, podziału i różnicowania się komórek. Można powiedzieć, że jest to kaskada fosforylacji kolejnych białek (Ras-Raf-MEK-ERK), gdzie zaktywowane białko fosforyluje kolejne białko i tak sygnał przekazywany jest aż do czynników transkrypcyjnych (m.in. c-Myc i CREB). Aktywowany Ras pobudza aktywność kinazy białkowej kinazy RAF, kinaza RAF fosforyluje i aktywuje MEK (MEK1 i MEK2), a MEK fosforyluje i aktywuje kinazę białkową aktywowaną mitogenem (MAPK). RAF i ERK (znane również jako MAPK) to kinazy białkowe serynowo-treoninowe, a MEK jest kinazą serynowo-tyrozynowo-treoninową. Ten szlak przekazywania sygnału jest aktywowany przez czynniki wzrostu, hormony i cytokiny, które oddziałują z błonowym receptorem o aktywności kinazy tyrozynowej (RTK). W wyniku tych oddziaływań receptor błonowy ulega fosforylacji i wiąże kilka różnych białek, które przekazują z kolei sygnał na białko z rodziny RAS (*rat sarcoma*). Białko RAS wiąże wówczas trifosforan guanozyny, co powoduje jego aktywa-

cję i z kolei przekazuje sygnał na całą kolejną kaskadę kinaz białkowych aktywowanych przez mitogeny (*mitogen activated protein kinases* – MAPK). Pierwsze białko w tym szlaku to białko z rodziny RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma protein*): BRAF lub CRAF. Białka RAF mają aktywność kinazy serynowo-treoninowej i fosforylują oraz aktywują kinazę MAPK, zwaną także MEK – MAPK/ERK, a ta z kolei fosforyluje kolejną kinazę ERK (*extracellular signal regulated kinase*), która po fosforylacji przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie poprzez fosforylację aktywuje docelowe czynniki transkrypcyjne. Zaburzenia w tym szlaku mogą z jednej strony prowadzić do nowotworów, a z drugiej, do szeregu ludzkich wad rozwojowych [3].

Zaburzenia w tym szlaku, także onkogenne, w wyniku mutacji genów mogą zachodzić na różnych poziomach – gen RAS jest jednym z najczęściej zmutowanych onkogenów w nowotworach ludzkich [4]. Zaburzenia w całym szlaku RAS/MAPK występują w 98% czerniaków [5]. W około 50% tych nowotworów (ale dla porównania tylko ogólnie w 7–10% wszystkich



Rycina 1. Szlak RAS w komórkach czerniaka

nowotworów) występuje mutacja w genie *BRAF*. Z kolei 80–90% tych mutacji to zmiana typu *missense* V600E, gdzie aminokwas numer 600 jest kwasem glutaminowym, a nie waliną występującą w białku typu dzikiego. Ta mutacja powoduje zmianę konformacji białka *BRAF*, zwiększając jego aktywność kinazową, czego efektem jest konstytutywna aktywacja szlaku MAPK/ERK. W tym samym miejscu, ale znacznie rzadziej, występują też inne podstawienia m.in. V600K (7,8%), V600R (1%) (odpowiednio: podstawienie lizyną i argininą). W komórkach czerniaka mają miejsce także mutacje w innych genach szlaku MAPK/ERK, najczęściej w genie *NRAS* (13–25%) [6, 7].

Warto wspomnieć, że mutacje w genie *BRAF* nie zależą od promieniowania UV, a także nie są wystarczające do powstania czerniaka. Proces nowotworzenia jest efektem wielu mutacji w różnych genach. W czerniaku występują też inne mutacje, m.in. w genach supresorów nowotworów *TP53*, *PTEN* i *CDKN2A*, a także w promotorze genu telomerazy [5]. Dla rozwoju czerniaka ważne są również mutacje indukowane przez promieniowanie UV, dla których charakterystyczne są tranzycje nukleotydów C→T na 3'. końcu dimerów pirymidynowych [8], takie mutacje występują w wyżej wymienionych genach supresorów nowotworowych, genie telomerazy oraz w *p16*. Jednak zagadnienie mutacji indukowanych przez UV jest skomplikowane, są one różne w różnych czerniakach i klasyfikacja molekularna bardziej opiera się na mutacjach, których nie powodują promienie UV [5]. Co więcej, ustalenie, czy dana mutacja była spowodowana przez UV, nie jest proste i nie zawsze jest pewne [9].

Czerniaki molekularnie mogą być klasyfikowane w 4 grupach, na podstawie mutacji, jakie w nich występują: w *RAS*, w *BRAF*, w *NF1*, a czwartą grupę stanowią tak zwane potrójnie negatywne czerniaki [5, 10, 11]. Ciekawe jest, że w pierwotnych czerniakach mutacje w genach *RAS* i *BRAF* nigdy nie występują równocześnie. Natomiast jeśli chodzi o mutacje w genach *MEK* (MAPK), nie ma tak dobrych danych jak dla mutacji w wielu innych genach, ale ponieważ inhibitory *MEK* są stosowane w terapii czerniaków także razem z inhibitorami *BRAF*, mutacje w *MAP2K1* występują u 5,38% pacjentów z czerniakiem natomiast w *MAPK1* – u 1,77%. Mutacje w konkretnych genach *MAPK* są często kryteriami włączenia do badań klinicznych z inhibitorami *MEK* (*MEKi*) [12].

Białko *BRAF* w normalnych warunkach działa jako dimer, jednak mutacja V600E powoduje, że działa on jako monomer. Na taki monomer właśnie działają inhibitory stosowane w terapii czerniaka, takie jak wemurafenib. Około 20% pacjentów z mutacją *BRAF* V600E nie odpowiada na ten lek [6]. Przyczyny tego są złożone i mogą wynikać między innymi z heterogenności nowotworu – np. nie we wszystkich jego komórkach jest obecna docelowa mutacja, albo też z utraty pewnych genów supresorów nowotworów, takich jak *PTEN* i *NF1*, które są przyczyną oporności pierwotnej na *BRAFi/MEKi* [6].

Podobnie po kilku miesiącach stosowania *BRAFi* komórki czerniaka stają się odporne na terapię, co może mieć różne przy-

czyny. Na ogół mutacje, które powodują oporność, działają poprzez zwiększenie częstości dimeryzacji *RAF*, choć najczęściej u podłoża takiej oporności leży reaktywacja szlaku *BRAF/MEK* lub innego pro-proliferacyjnego szlaku transdukcji sygnału. Ta reaktywacja może przechodzić przez *ERK* lub inne białka. Reaktywacja może się także odbywać poprzez aktywację innych *RAF*, np. *ARAF* i *CRAF*. W procesie powstawania oporności na *BRAFi/MEKi* może też być aktywowany inny szlak transdukcji sygnału, taki jak *PI3K-AKT-mTOR*. W komórkach czerniaka z mutacją *BRAF* V600E opornych na inhibitory występuje m.in. nadekspresja receptora czynnika wzrostu płytek krwi typu  $\beta$  (*platelet-derived growth factor receptors*  $\beta$  – *PDGFR- $\beta$* ), jednak obecne są też inne zmiany w tych komórkach. Pojawia się też zwiększona aktywacja receptora *IGFR1* (receptor podobnego do insuliny czynnika wzrostu 1), co prowadzi do aktywacji szlaku *PI3K-AKT-mTOR*. W końcu, w niektórych opornych komórkach stwierdza się również podwyższony poziom receptorów naskórkowego czynnika wzrostu [2]. Z punktu widzenia fizjologii, ogólnie zawsze chodzi o reaktywację szlaku sygnału przekazującego informację o proliferacji. Nie we wszystkich przypadkach udaje się ustalić przyczynę oporności na lek.

Niektóre przyczyny lekooporności na *BRAFi/MEKi* dotyczą samego genu *BRAF*. Nie są to jednak typowe mutacje w samym genie, które zmieniają jego strukturę, lecz takie, które powodują zmiany w składaniu (*splicing*) transkryptu genu. Efektem tego jest produkt białkowy ponownie zdolny do tworzenia dimerów (co znosi aktywność inhibitorów działających na monomer) lub też nadekspresja tego genu, co powoduje większą ilość produktu białkowego, która może skutkować występowaniem dimerów. Pośrednio na dimeryzację mogą wpływać też mutacje genu *RAS* [6].

### Mechanizmy oporności pierwotnej czerniaków na leczenie inhibitorami *BRAF*

Złośliwe czerniaki są bardzo heterogonne pod względem genetycznym. Co więcej, zyskują nowe mutacje w trakcie procesu tworzenia przerzutów [13]. Znaczna część komórek nowotworowych czerniaka ma mutację *BRAF* V600E, a około 20% pacjentów z czerniakami będącymi nosicielami mutacji *BRAF* V600E nie odpowiada na leczenie inhibitorami *BRAF* [14]. Ponadto różne komórki nowotworowe u tego samego pacjenta mogą być nosicielami innych mutacji odpowiadających za oporność na inhibitory *BRAF* [6]. Główne proponowane mechanizmy oporności pierwotnej na inhibitory *BRAF*, takie jak: utrata *PTEN*, występowanie mutacji *RAC1*<sub>P222S</sub>, nadekspresja *MAP3K8*, wydzielanie czynnika wzrostu hepatocytów (*HGF*) przez komórki stromy, utrata genu supresorowego *NF1* oraz amplifikacja *CCND1*, podsumowano w tabeli I.

Przyszłe badania powinny przynieść dokładniejsze wyjaśnienie mechanizmów leżących u podłoża oporności na inhibitory *BRAF* i odkrycia wspólnych mechanizmów oporności na różne grupy chemioterapeutyków. Ważnym celem badań jest zidentyfikowanie biomarkerów pierwotnej oporności na

**Tabela I.** Najważniejsze mechanizmy oporności pierwotnej na inhibitory BRAF

Mutacja/ inna przyczyna oporności	Proponowany mechanizm	Piśmiennictwo
Amplifikacja <i>CCND1</i>	Gen <i>CCND1</i> koduje białko cyklinę D1 – kluczowy regulator cyklu komórkowego. Amplifikacja genu <i>CCND1</i> oraz zwiększenie poziomu białka cykliny D1 powoduje utrzymanie proliferacji komórki w obecności inhibitorów BRAF.	[22, 23]
Mutacja <i>RAC1</i> <sub>P292S</sub>	Mutacja <i>RAC1</i> <sub>P292S</sub> podtrzymuje przekaznictwo w szlaku sygnałowym MAPK w obecności inhibitorów BRAF, proliferacja utrzymuje się pomimo inhibicji BRAF.	[16, 51]
Nadekspresja <i>MAP3K8</i>	Gen <i>MAP3K8</i> koduje białko COT, które aktywuje szlak sygnałowy MAPK/ERK. Zwiększony poziom białka COT skutkuje utrzymaniem proliferacji pomimo inhibicji BRAF.	[18, 19]
Utrata genu supresorowego <i>NF1</i>	<i>NF1</i> jest negatywnym regulatorem szlaku sygnałowego RAS. Mutacja <i>NF1</i> skutkująca utratą funkcjonalnego białka neurofibrominy 1 (NF1) powoduje wzrost poziomu RAS, aktywację CRAF i w konsekwencji aktywację szlaku MAPK, co powoduje utrzymanie proliferacji w obecności inhibitorów BRAF.	[21, 52]
Utrata <i>PTEN</i>	<i>PTEN</i> jest supresorem szlaku PI3K/AKT. Utrata <i>PTEN</i> skutkuje konstytutywną aktywacją tego szlaku sygnałowego i umożliwia proliferację komórek nawet w przypadku inhibicji BRAF.	Paraiso, Xiang [15]
Wydzielanie czynnika wzrostu hepatocytów ( <i>hepatocyte growth factor</i> – HGF) przez komórki zrębu	Wydzielanie HGF prowadzi do aktywacji MET – receptora HGF i aktywacji szlaków MAPK/ERK oraz PI3K/AKT.	[25, 26]

inhibitory BRAF tak, aby możliwe było przewidzenie odpowiedzi na terapię przed jej rozpoczęciem.

### Utrata genu *PTEN*

Gen *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) jest genem supresorowym – białko kodowane przez ten gen (*phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase* – PTEN, MIM1) jest zaangażowane w regulację cyklu komórkowego. PTEN katalizuje defosforylację PIP3 w pozycji 3' pierścienia inozytolowego, co skutkuje zahamowaniem szlaku sygnałowego PI3K/AKT i zahamowaniem proliferacji komórki. Utrata funkcjonalnego genu *PTEN* występuje w ponad 10% przypadków czerniaka i jest jedną z najczęściej występujących mutacji odpowiedzialnych za oporność na inhibitory BRAF [15]. Utrata ekspresji białka PTEN prowadzi do konstytutywnej aktywacji szlaku sygnałowego PI3K/AKT, co skutkuje proliferacją komórek, ich wzrostem i zahamowaniem apoptozy. Mechanizm oporności na inhibitory BRAF polega na hamowaniu apoptozy indukowanej za pośrednictwem białka BIM (inaczej BCL2L11) [15].

### Mutacja genu *RAC1*<sub>P295</sub>

Białko *RAC1* (*rac family small GTPase 1* in. *cell migration-inducing gene 5 protein*) jest GTP-azą, regulatorem cyklu komórkowego, adhezji komórkowej, ruchliwości komórki (poprzez oddziaływanie na cytoszkielet) oraz różnicowania komórki. Mutacja P29S w genie *RAC1*, zgodnie z wynikami badania Watsona i Li [16] występuje w 3,3% przypadków czerniaków, a więc niezbyt często. Obecność tej mutacji koreluje pozytywnie z indeksem mitotycznym, rozmiarem zmiany, a także występowaniem przerzutów [16]. Mutacja P29S występuje jednak aż u około 20% pacjentów, którzy nie odpowiadają na leczenie inhibitorami BRAF [17]. Co więcej, obecność tej mutacji w liniach komórkowych czerniaka powoduje oporność na inhibitory BRAF [16].

### Nadekspresja genu *MAP3K8*

Gen *MAP3K8* koduje białko *MAP3K8* (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8*, inaczej COT, EST, ESTF, MEKK8, TPL2, Tpl-2, c-COT, AURA2). Białko *MAP3K8* może aktywować szlak sygnałowy MAPK/ERK. Zwiększony poziom białka COT skutkuje utrzymaniem proliferacji pomimo inhibicji BRAF. W przypadku pierwotnej nadekspresji *MAP3K8* podawanie inhibitorów BRAF prowadzi do jeszcze większej produkcji COT i w rezultacie powoduje dalsze nasilenie proliferacji [18, 19]. Zmiany genu *MAP3K8* pojawiają się u około 1,5% wszystkich pacjentów z czerniakiem, często (w przypadku ok. 33% zmian) są obecne w znamionach Spitz [20].

### Utrata funkcji białka *NF1*

Gen *NF1* koduje białko neurofibrominę (*neurofibromin* inaczej *neurofibromatosis-related protein* – NF-1), należąca do grupy białek aktywujących GTP-azy. Neurofibromina jest negatywnym regulatorem RAS, pierwszego białka szlaku sygnałowego MAPK. Utrata funkcjonalnego produktu genu *NF1* oznacza wzrost poziomu białka RAS i aktywację szlaku MAPK, również w obecności inhibitorów BRAF. Utrata *NF1* powoduje więc oporność na inhibitory RAF, MAPK i BRAF poprzez konstytutywną aktywację szlaku przekazywania sygnału kinaz MAPK [21].

### Amplifikacja genu *CCND1*

Gen *CCND1* (*BCL1*) koduje cyklinę D1 (*cyclin D1* lub inaczej *B-cell lymphoma 1 protein*), kluczowe białko odpowiedzialne za regulację cyklu komórkowego (przejście faz G1/S). Oporność na BRAFi w wyniku amplifikacji *CCND1* jest przykładem oporności na inhibitory BRAF związanej ze zmianą liczby kopii genu. W komórkach, w których amplifikacji uległ gen *CCND1*, dochodzi do zwiększonej produkcji cykliny D1 i w efekcie inhibicja BRAF nie jest wystarczająca do zahamowania proliferacji [22]. Amplifikację *CCND1* obserwuje się w ponad 38%

próbek czerniaków, co wskazuje, że duża grupa chorych jest potencjalnie oporna na BRAFi i dla niej korzystna mogłaby być terapia inhibitorem CDK4/6 [23, 24].

### Wydzielanie czynnika wzrostu hepatocytów przez komórki zrębu

Czynnik wzrostu hepatocytów (*hepatocyte growth factor* – HGF) jest czynnikiem wzrostu komórek, mobilności i czynnikiem morfogenowym. Plejotropowe aktywności HGF zachodzą przez jego receptor, transbłonową kinazę tyrozynową, kodowaną przez proto-onkogen *cMet*. Przykładem mechanizmu pierwotnej oporności na inhibitory BRAF, która jest związana z oddziaływaniem mikrośrodowiska guza, jest wydzielanie HGF przez komórki zrębu (m.in. fibroblasty). Wydzielanie HGF prowadzi do aktywacji receptora HGF – białka MET – i aktywacji szlaków MAPK/ERK oraz PI3K/AKT (ryc. 2). Ich aktywacja skutkuje utrzymaniem proliferacji w obecności inhibitorów BRAF [25, 26].

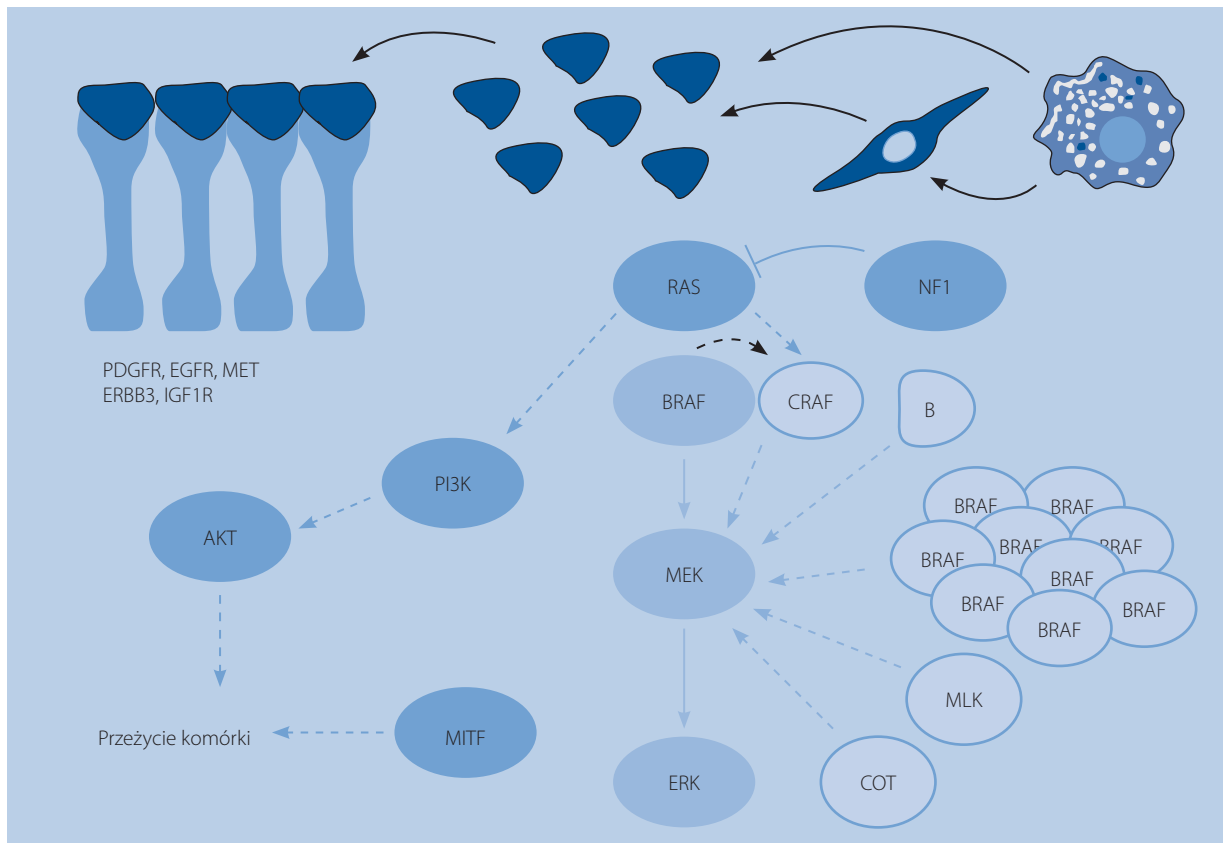
### Mechanizmy oporności wtórnej czerniaków na leczenie inhibitorami BRAF

Podczas leczenia większość pacjentów rozwija wtórną oporność na stosowane BRAFi/MEKi. Najczęstszy mechanizm oporności wtórnej na leczenie BRAFi/MEKi wiąże się z reaktywacją przekazywania sygnału przez ścieżkę MAPK/ERK. Aktywacja tej ścieżki może być wynikiem zarówno działania białek aktywujących białko BRAF, aktywowanych przez białko BRAF, jak i wtórnej aktywacji samego *BRAF*.

### Reaktywacja przekazywania sygnału przez MAPK/ERK

Reaktywacja przekazywania sygnału od błony komórkowej do kinaz MAPK/ERK (*upstream reactivation*) zachodzi w efekcie nadekspresji receptorów kinaz tyrozynowych, która prowadzi do podziałów komórkowych poprzez aktywację kinaz ARAF i CRAF w miejsce BRAF. Komórki czerniaka z mutacją *BRAF* V600E podczas leczenia BRAFi/MEKi mogą uzyskać oporność na leczenie poprzez przełączanie przekazywania sygnału na różne izoformy RAF (ARAF, BRAF lub CRAF) i wynikającą z tego reaktywację przekazywania w obrębie ścieżki ERK [14]. W komórkach czerniaka może dochodzić do nadekspresji białek ARAF lub CRAF podczas gdy BRAF ulega zablokowaniu. Białko ERK jest negatywnym regulatorem białka RAS. Podaż inhibitora BRAF hamuje wzrost komórek nowotworowych poprzez zahamowanie ścieżki ERK. Blokada przekazywania sygnału przez ścieżkę ERK zatrzymuje regulację RAS, indukując częściową aktywność RAS. Aktywacja RAS prowadzi do powstawania dimerów *BRAF* V600E. Inhibitory BRAF wiążą się z jednym z monomerów, co prowadzi do transaktywacji drugiego monomeru, niezwiązanego przez lek. Taka aktywacja BRAF powoduje częściową aktywację przekazywania sygnału przez ERK i przyczynia się do ograniczenia skuteczności leczenia [27, 28].

Ścieżka sygnałowa MAPK/ERK może także ulegać aktywacji w skutek akumulacji mutacji aktywujących w genie *RAS*, gdyż *RAS* promuje podziały komórkowe, fosforylując białka ARAF i CRAF, co kompensuje inhibicję BRAF. Zmutowane białko



Rycina 2. Aktywacja ścieżek przekazywania sygnału w rozwoju lekooporności na BRAFi/MEKi

RAS po związaniu GTP nie dysocjuje do formy nieaktywnej – związanej z GDP, i ulega stałej aktywacji. Zmutowane białko RAS związane z GTP promuje także dimeryzację *BRAF* V600E, reaktywację ścieżki sygnałowej ERK i finalnie wpływa na powstanie oporności na inhibitory *BRAF*, gdyż leki te wiążą się wyłącznie z monomerami *BRAF* V600E [29–31].

### Aktywacja przekazywania sygnału poniżej białek MAPK/ERK

Aktywacja przekazywania sygnału do genów docelowych przez ścieżkę sygnałową RAS-RAF-MEK-ERK może zachodzić wskutek mutacji aktywujących w genach dla białek MEK1/MEK2 (*mitogen-activated protein kinase 1/2*). W efekcie aktywacji białek MEK (*downstream reactivation*) inicjacja przekazywania sygnału na poziomie *BRAF* przestaje być konieczna dla aktywacji genów docelowych, co znosi efekt inhibicji *BRAF* [6].

### Reaktywacja białka BRAF

Do reaktywacji funkcji białka *BRAF* może dochodzić w wielu mechanizmach, spośród których częsta jest amplifikacja zmutowanego allelu *BRAF*. Z powodu zwiększenia liczby kopii genu dochodzi do nadekspresji białka *BRAF*. W efekcie obecności w komórce bardzo wielu kopii białka *BRAF* podawana dawka inhibitora (liczba cząsteczek inhibitora w komórce) przestaje być (w proporcji) wystarczająca do zahamowania ich aktywności. Zwiększenie ilości zmutowanego białka *BRAF* V600E powstaje w wyniku zwiększenia liczby kopii genu i może prowadzić do spontanicznej dimeryzacji tego białka, reaktywacji ścieżki sygnałowej ERK i stać się przyczyną oporności lekowej. Taki rodzaj oporności określono jako zależny od dawki. W badaniach *in vitro* podanie większych dawek wemurafenibu prowadzi do przełamania oporności na lek [32].

Dodatkowo wariant *BRAF* V600E, który powstaje na drodze alternatywnego składania p61*BRAF*V600E, został opisany u chorych z opornością wtórną na wemurafenib. Ten wariant tworzy dimery w sposób niezależny od aktywacji przez kinazę RAS, co czyni hamowanie *BRAF* nieefektywnym, z uwagi na wyżej wspomnianą aktywność *BRAF*i tylko wobec monomerów *BRAF* V600E. Wydaje się, iż alternatywne izoformy splicingowe *BRAF* powstają w efekcie mutacji lub zmian epigenetycznych [33, 34].

### Aktywacja ścieżki sygnałowej PI3K/AKT

Ścieżka sygnałowa PI3K/AKT komunikuje się z ścieżką ERK, a hamowanie jednej ścieżki może powodować zwiększenie aktywności drugiej (ryc. 2). Zablockowanie sygnalizacji ERK może prowadzić do adaptacyjnej nadaktywności PI3K/AKT, która kompensuje hamowanie *BRAF* i napędza oporność. Nieprawidłowa sygnalizacja PI3K/AKT jest częstą cechą czerniaków i daje oporność poprzez stymulowanie alternatywnych szlaków, które zmniejszają zależność od sygnalizacji ERK. Mutacje, które prowadzą do podwyższenia aktywności szlaku PI3K/AKT, zidentyfikowano w 22% czerniaków z nabytą opornością na

hamowanie *BRAF*. Wykazano, że w ciągu kilku dni od podania inhibitorów *BRAF* dochodzi do podwyższenia ekspresji białka AKT [35–37].

W badaniach przedklinicznych wyjściowo postawiono hipotezę, iż podczas leczenia *BRAF*i/MEKi istnieje silna presja selekcyjna wobec komórek z mutacjami nabycia funkcji, prowadząca do zwiększonej aktywności szlaku PI3K/AKT w obecności hamowania szlaku MAPK. Zakładano, że komórki czerniaka z takimi mutacjami, będą się dzielić, ponieważ mają przewagę w zakresie przeżycia i proliferacji, kiedy na ich metabolizm nie wpływa hamowanie *BRAF*. W obserwacjach klinicznych to właśnie ta nasilona proliferacja komórek z aktywowanym szlakiem AKT może tłumaczyć występowanie dużej masy guza i szybką progresję u pacjentów, którzy odpowiedzieli na hamowanie *BRAF*, a następnie rozwinęli wtórną oporność w tym mechanizmie. Dodatkowo szlak PI3K/AKT jest aktywowany przez czynniki wzrostu, które wiążą się z RTK, takie jak PDGFR- $\beta$  i IGF-1R. Gdy *BRAF* jest zablockowany inhibitorem, komórki nowotworowe mogą kompensacyjnie zwiększać ekspresję PDGFR- $\beta$  i IGF-1R. A to prowadzi do przetrwałej sygnalizacji PI3K/AKT, która zapobiega apoptozie i sprzyja przeżyciu komórek. Aktywowana AKT fosforyluje aż 9000 białek substratowych, regulując w ten sposób różnorodne procesy, takie jak przeżycie komórek, proliferacja i migracja, oraz wpływając na lekooporność.

Do białek substratowych AKT należą takie cząsteczki jak: ASK1 (*apoptotic signal kinase 1*), Bim (*B cell leukemia/lymphoma-2 interacting mediator of cell death*), Bad (*B cell leukemia/lymphoma-2 associated death agonist*), MDM-2 (*murine double minute-2*), p21 (*p21 cyclin dependent kinase inhibitory protein, Cip1*), XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*), Foxo3a (*forkhead box O3*) i wiele innych [38]. Wysoka ekspresja wyżej wymienionych receptorów RTK na powierzchni komórek czerniaka wiąże się z nabytą opornością na wemurafenib zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Ponadto mutacje aktywujące PI3K i AKT mogą zwiększać sygnalizację w ścieżce sygnałowej AKT. To z kolei intensyfikuje sygnały antyapoptotyczne i regulację ekspresji najważniejszych genów proliferacyjnych opisanych powyżej. Zmiany te pozwalają komórkom czerniaka na przeżycie i replikację niezależnie od zahamowania *BRAF*, co klinicznie powoduje nabytą oporność [6, 37, 39].

### Zwiększona aktywacja ścieżki sygnałowej EGFR

Zwiększenie ekspresji i aktywacja receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) może być również związane z opornością na hamowanie *BRAF* lub MEK. Po aktywacji EGFR kompleks utworzony przez białka Grb2 i Sos wiąże się bezpośrednio lub poprzez połączenie białka adaptorowego Shc z określonymi resztami tyrozyny na receptorze. Prowadzi to do zmian konformacyjnych w białku Sos, które może rekrutować i aktywować Ras-GDP. Następnie aktywowane przez ERK kinazy MAPK ostatecznie przemieszczają się do jądra, aby w celu indukcji proliferacji komórek fosforylować

specyficzne czynniki transkrypcyjne, takie jak Elk1 i C-myc, [40]. Obniżenie aktywności *SOX10* (*sex determining region Y-box 10*) opisane w części czerniaków może prowadzić do sygnalizacji poprzez TGF- $\beta$ , a w konsekwencji do zwiększenia ekspresji genu receptora EGFR i receptora czynnika wzrostu płytek krwi (PDGFRB) [6, 41].

### Aktywacja mikrośrodowiskowa guza

Badania nad lekoopornością koncentrują się głównie na mechanizmach oporności na leki, które powstają w efekcie zmian właściwości komórek nowotworowych. Obecnie wiadomo jednak, że progresja choroby i oporność na terapię celowane BRAFi/MEKi nie są wyłączną pochodną modyfikacji genomowych i epigenetycznych komórek nowotworowych.

Istotne znaczenie ma mikrośrodowisko guza promujące oporność na hamowanie MAPK – a zależność ta jest złożona i obejmuje między innymi interakcje pomiędzy komórkami guza i zrębu [42]. Ostatnie badania wykazały wyraźny udział makrofagów i czynników pochodzących z fibroblastów w rozwoju oporności na inhibitory szlaku MAPK. W obecności fibroblastów sąsiednie komórki czerniaka uzyskują odróżnicowany agresywny fenotyp mezenchymalny. Po leczeniu BRAFi takie komórki czerniaka utrzymują wysoki poziom ufosforylowanego rybosomalnego białka S6 (pS6), a co za tym idzie aktywną sygnalizację przez mTOR, która jest tłumiona w komórkach wrażliwych na BRAFi bez kontaktu z komórkami zrębu [[43]. Aktywacja mTOR prowadzi do fosforylacji i aktywacji kinazy rybosomalnej S6 p70 i eukariotycznego białka wiążącego czynnik 4E 1E, promując w ten sposób zwiększoną translację białka i wzrost komórek. mTOR jest kinazą, która łączy stymulację komórek czynnikami wzrostu i dostępność składników odżywczych z syntezą białka i wzrostem komórek [44].

W ostatnich latach oceniono, że fibroblasty ułatwiają progresję czerniaka i istnieje dwukierunkowa komunikacja poprzez bezpośredni kontakt między komórkami czerniaka i fibroblastami. Dodatkowo dochodzi do odpowiedzi komórek czerniaka na wydzielanie przez fibroblasty czynniki wzrostu i cytokiny promujące przeżycie i wzrost komórek, w tym TGF- $\beta$  czy VEGF. Fibroblasty w kontakcie z komórkami czerniaka wydzielają także komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej (m.in. lamininę IV), które wtórnie ułatwiają migrację (przerzutowanie) komórek czerniaka [45, 46]. W obrębie guza fibroblasty wykazują hiperaktywację ścieżki MAPK, co powoduje jakościową zmianę w macierzy zewnątrzkomórkowej guza przez integrynę  $\beta$ 1 i kinazę FAK, które indukują ERK, zapewniając komórkom czerniaka możliwość uniknięcia skutecznego leczenia [47].

W czerniaku na skutek wydzielania HGF przez komórki zrębu może dochodzić do rozwoju oporności na BRAFi/MEKi. HGF może się wiązać z RTK na powierzchni komórek czerniaka, które zwiększą sygnalizację wewnątrzkomórkową promującą ekspresję *RAS*, która finalnie prowadzi do aktywacji szlaku MAPK. Ponadto wiadomo, że HGF przyczynia się do rozwoju oporności

na leczenie inhibitorem BRAF poprzez obniżenie ekspresji genów kodujących czynniki pro-apoptotyczne [25, 26].

Co szczególnie istotne z uwagi na epidemiologię czerniaka, wpływ fibroblastów na komórki czerniaka może się istotnie różnić u pacjentów w podeszłym wieku, ponieważ starzejące się fibroblasty są bardziej inwazyjne. Ostatnie badania wykazały, iż starzejące się fibroblasty zwiększają wydzielanie czynnika sFRP2 – inhibitora  $\beta$ -kateniny – co zmniejsza ekspresję MITF, prowadzącą do zmniejszenia ekspresji regulatora redoks APE1 i czyni komórki czerniaka bardziej wrażliwymi na stres oksydacyjny, co wtórnie promuje oporność na hamowanie BRAF [48].

Makrofagi zrębu nowotworu wydzielają czynnik TNF- $\alpha$ , który promuje w sposób zależny od NF- $\beta$  ekspresję MITF, co prowadzi do oporności na BRAFi/MEKi. Dodatkowo udowodniono, iż TNF- $\alpha$  blokuje apoptozę w komórkach, w których hamowany jest *BRAF* oraz przyczynia się do inwazji czerniaka i angiogenezy [49, 50].

### Posumowanie

Główne mechanizmy oporności na inhibitory BRAF to:

1. Utrata funkcji hamującej kinazy ERK – inhibitor BRAF hamuje wzrost guza poprzez hamowanie szlaku ERK. Wtórnie hamuje to ujemne sprzężenie zwrotne ERK na RAS, co częściowo przywraca aktywność RAS. Prowadzi to do powstawania dimerów *BRAF* V600E indukowanych przez RAS. Inhibitory BRAF wiążą jeden i transaktywują drugi *BRAF*, zmniejszając efektywność leczenia inhibitorem BRAF.
2. Mutacje aktywujące gen *RAS* – zmutowany *RAS-GTP* staje się konstytutywnie aktywny, zwiększa dimeryzację *BRAF* V600E, reaktywuje szlak ERK i wtórnie promuje odporność na inhibitory BRAF, które blokują tylko monomeryczny *BRAF* V600E.
3. Alternatywne składanie (*splicing*) *BRAF* V600E – wariant składania *BRAF* V600E p61BRAFV600E z powodu mutacji lub zmian epigenetycznych może tworzyć dimery w sposób niezależny od RAS. Przez to inhibitor BRAF jest nieskuteczny, ponieważ blokuje tylko monomeryczne *BRAF* V600E.
4. Nadekspresja zmutowanego białka *BRAF* V600E – zwiększona liczba kopii *BRAF* V600E w komórce (powstająca z powodu przyrostu liczby kopii genów) może również spontanicznie sprzyjać dimeryzacji *BRAF* V600E, reaktywując szlak ERK i powodując niepowodzenie leczenia u niektórych pacjentów.
5. Aktywacja alternatywnych izoform białka RAF – czerniak *BRAF* V600E leczony inhibitorami BRAF może uzyskać oporność poprzez elastyczne przełączanie między różnymi izoformami *RAF* zdolnymi do reaktywacji szlaku ERK, podwyższając ekspresję ARAF lub CRAF.
6. Nadekspresja białka COT – COT, prawdopodobnie z powodu amplifikacji genu lub jeszcze niezidentyfikowanych mechanizmów, może reaktywować MEK w obecności hamowania *BRAF*, stymulując sygnalizację ERK i rozwój lekooporności na BRAFi.

7. Mutacje aktywujące gen *MEK* – mutacje aktywujące w *MEK1/MEK2* powodują, że blokowanie *BRAF* jest nieskuteczne, ponieważ reaktywacja *MEK* oznacza, że szlak MAPK/ERK może nadal przekazywać sygnał poniżej *BRAF*, niezależnie od jego hamowania.
8. Aktywacja ścieżki sygnałowej PI3K/AKT – nieprawidłowa sygnalizacja PI3K/AKT jest częstą cechą czerniaków. Zablockowanie sygnalizacji ERK może prowadzić do adaptacyjnej nadaktywności PI3K/AKT, która kompensuje hamowanie *BRAF* i promuje oporność.
9. Aktywacja receptorów kinaz tyrozynowych (RTK) – szlak PI3K/AKT jest aktywowany przez czynniki wzrostu, które wiążą się z RTK, takie jak PDGFR- $\beta$  i IGF-1R. Z blokadą *BRAF* komórki nowotworowe mogą nadekspymować RTK, prowadząc do trwałej sygnalizacji PI3K/AKT.
10. Mutacje aktywujące w genach *PI3K/AKT* – mutacje aktywujące *PI3K* i *AKT* wzmacniają sygnalizację AKT, która zwiększa sygnały antyapoptotyczne i zwiększa ekspresję kluczowych genów proliferacyjnych, zapewniając komórce sygnały przeżycia niezależnie od *BRAF*.
11. Aktywacja ścieżki sygnałowej EGFR – aktywacja EGFR indukowana przez supresję *SOX10* i zwiększoną aktywność szlaku TGF- $\beta$ , która powoduje starzenie się komórek, jest odwracana poprzez hamowanie *BRAF/MEK*.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

**Anna M. Czarnecka**

Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie  
Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków  
ul. Roentgena 5  
02–781 Warszawa  
e-mail: am.czarnecka@coi.pl

Otrzymano i przyjęto do druku: 3 września 2019 r.

## Piśmiennictwo

1. Davies H, Bignell GR, Cox C i wsp. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417: 949–954.
2. Chan XY, Singh A, Osman N i wsp. Role played by signalling pathways in overcoming *BRAF* inhibitor resistance in melanoma. *Int J Mol Sci*. 2017; 18.
3. Bezniaikow N, Gos M, Obersztyn E. The RASopathies as an example of RAS/MAPK pathway disturbances – clinical presentation and molecular pathogenesis of selected syndromes. *Dev Period Med*. 2014; 18: 285–296.
4. Molina JR, Adjei AA. The Ras/Raf/MAPK pathway. *J Thorac Oncol*. 2006; 1: 7–9.
5. Craig S, Earnshaw CH, Viros A. Ultraviolet light and melanoma. *J Pathol*. 2018; 244: 578–585.
6. Griffin M, Scotto D, Josephs DH i wsp. *BRAF* inhibitors: resistance and the promise of combination treatments for melanoma. *Oncotarget*. 2017; 8: 78174–78192.
7. Mackiewicz J, Mackiewicz A. *BRAF* and *MEK* inhibitors in the era of immunotherapy in melanoma patients. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2018; 22: 68–72.
8. Winder M, Viros A. Mechanisms of drug resistance in melanoma. *Handbook of experimental pharmacology*. 2018; 249: 91–108.
9. Brash DE. UV signature mutations. *Photochem Photobiol*. 2015; 91: 15–26.
10. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T i wsp. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005; 353: 2135–2147.
11. Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N i wsp. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature*. 2017; 545: 175–180.
12. Consortium APG. AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discov*. 2017; 7: 818–831.
13. Swick JM, Maize JC, Sr. Molecular biology of melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2012; 67: 1049–1054.
14. Fedorenko IV, Paraiso KH, Smalley KS. Acquired and intrinsic *BRAF* inhibitor resistance in *BRAF* V600E mutant melanoma. *Biochem Pharmacol*. 2011; 82: 201–209.
15. Paraiso KH, Xiang Y, Rebecca VW i wsp. PTEN loss confers *BRAF* inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer research*. 2011; 71: 2750–2760.
16. Watson IR, Li L, Cabeceiras PK i wsp. The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF. *Cancer research*. 2014; 74: 4845–4852.
17. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A i wsp. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer discovery*. 2014; 4: 94–109.
18. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY i wsp. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*. 2010; 468: 968–972.
19. Sharma V, Young L, Cavadas M i wsp. Registered Report: COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *eLife*. 2016; 5.
20. Potentially Actionable MAP3K8 Alterations Are Common in Spitzoid Melanoma. *Cancer discovery*. 2019; 9: 574.
21. Whittaker SR, Theurillat JP, Van Allen E i wsp. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer discovery*. 2013; 3: 350–362.
22. Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M i wsp. Increased cyclin D1 expression can mediate *BRAF* inhibitor resistance in *BRAF* V600E-mutated melanomas. *Molecular cancer therapeutics*. 2008; 7: 2876–2883.
23. Wilson MA, Zhao F, Khare S i wsp. Copy number changes are associated with response to treatment with carboplatin, paclitaxel, and sorafenib in melanoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016; 22: 374–382.
24. Harris AL, Lee SE, Dawson LK i wsp. Targeting the cyclin dependent kinase and retinoblastoma axis overcomes standard of care resistance in *BRAF* (V600E) – mutant melanoma. *Oncotarget*. 2018; 9: 10905–10919.
25. Blum D, LaBarge S. Reproducibility project: Cancer B. Registered report: Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *eLife*. 2014; 3.
26. Straussman R, Morikawa T, Shee K i wsp. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*. 2012; 487: 500–504.
27. Villanueva J, Vultur A, Lee JT i wsp. Acquired resistance to *BRAF* inhibitors mediated by a *RAF* kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting *MEK* and IGF-1R/*PI3K*. *Cancer cell*. 2010; 18: 683–695.
28. Spagnolo F, Ghiorzo P, Orgiano L i wsp. *BRAF*-mutant melanoma: treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. *Onco Targets Ther*. 2015; 8: 157–168.
29. Corcoran RB, Settleman J, Engelman JA. Potential therapeutic strategies to overcome acquired resistance to *BRAF* or *MEK* inhibitors in *BRAF* mutant cancers. *Oncotarget*. 2011; 2: 336–346.
30. Nazarian R, Shi H, Wang Q i wsp. Melanomas acquire resistance to B-*RAF*(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 2010; 468: 973–977.
31. Romano E, Pradervand S, Paillusson A i wsp. Identification of multiple mechanisms of resistance to vemurafenib in a patient with *BRAF*V600E-mutated cutaneous melanoma successfully rechallenged after progression. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013; 19: 5749–5757.
32. Shi H, Moriceau G, Kong X i wsp. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E) B-*RAF* amplification-mediated acquired B-*RAF* inhibitor resistance. *Nat Commun*. 2012; 3: 724.
33. Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M i wsp. *RAF* inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced *BRAF*(V600E). *Nature*. 2011; 480: 387–390.
34. Luco RF, Allo M, Schor IE i wsp. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell*. 2011; 144: 16–26.
35. Shi H, Hugo W, Kong X i wsp. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during *BRAF* inhibitor therapy. *Cancer discovery*. 2014; 4: 80–93.
36. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci*. 2011; 36: 320–328.
37. Shi H, Hong A, Kong X i wsp. A novel *AKT1* mutant amplifies an adaptive melanoma response to *BRAF* inhibition. *Cancer Discov*. 2014; 4: 69–79.



38. Madhunapantula SV, Mosca PJ, Robertson GP. The Akt signaling pathway: an emerging therapeutic target in malignant melanoma. *Cancer Biol Ther.* 2011; 12: 1032–1049.
39. Das Thakur M, Stuart DD. Molecular pathways: response and resistance to BRAF and MEK inhibitors in BRAF(V600E) tumors. *Clin Cancer Res.* 2014; 20: 1074–1080.
40. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D i wsp. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012; 16: 15–31.
41. Sun C, Wang L, Huang S i wsp. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature.* 2014; 508: 118–122.
42. Tape CJ, Ling S, Dimitriadi M i wsp. Oncogenic KRAS Regulates Tumor Cell Signaling via Stromal Reciprocation. *Cell.* 2016; 165: 910–920.
43. Seip K, Fleten KG, Barkovskaya A i wsp. Fibroblast-induced switching to the mesenchymal-like phenotype and PI3K/mTOR signaling protects melanoma cells from BRAF inhibitors. *Oncotarget.* 2016; 7: 19997–20015.
44. Karbowniczek M, Spittle CS, Morrison T i wsp. mTOR is activated in the majority of malignant melanomas. *J Invest Dermatol.* 2008; 128: 980–987.
45. Li G, Satyamoorthy K, Meier F i wsp. Function and regulation of melanoma-stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil. *Oncogene.* 2003; 22: 3162–3171.
46. Flach EH, Rebecca VW, Herlyn M i wsp. Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance. *Mol Pharm.* 2011; 8: 2039–2049.
47. Hirata E, Girotti MR, Viros A i wsp. Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling. *Cancer Cell.* 2015; 27: 574–588.
48. Kaur A, Webster MR, Marchbank K i wsp. sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. *Nature.* 2016; 532: 250–254.
49. Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell.* 2015; 27: 462–472.
50. Gray-Schopfer VC, Karasarides M, Hayward R i wsp. Tumor necrosis factor-alpha blocks apoptosis in melanoma cells when BRAF signaling is inhibited. *Cancer Res.* 2007; 67: 122–129.
51. Mar VJ, Wong SQ, Logan A i wsp. Clinical and pathological associations of the activating RAC1 P29S mutation in primary cutaneous melanoma. *Pigment cell & melanoma research.* 2014; 27: 1117–1125.
52. Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM i wsp. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer research.* 2014; 74: 2340–2350.