

## Personalizowane postępowanie medyczne u pacjentów z czerniakiem (część 1.)

Justyna Gil<sup>1</sup>, Izabela Łączmańska<sup>1,2</sup>, Maria M. Sąsiadek<sup>1</sup>, Marcin Ziętek<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Genetyki, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wrocław

<sup>2</sup>Zakład Diagnostyki Molekularnej Nowotworów, Dolnośląskie Centrum Onkologii, Wrocław

<sup>3</sup>Zakład Chirurgii Onkologicznej, Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wrocław

<sup>4</sup>Oddział Chirurgii Onkologicznej, Dolnośląskie Centrum Onkologii, Wrocław

W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny wzrost zachorowań na czerniaki, szczególnie u osób młodych oraz w wieku średnim. Dlatego wyleczalność chorych staje się priorytetem również w odniesieniu do czynników ekonomicznych. Czerniaki pod względem zmian genetycznych należą do grupy nowotworów o bardzo dużej heterogenności. Najczęściej stwierdzane zmiany genetyczne dotyczą dwóch ścieżek przekazywania sygnałów, są to: ścieżka aktywowana mitogenami (MAPK) oraz ścieżka sygnałowa kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K). Identyfikacja charakterystycznych zmian molekularnych w tkance nowotworowej pozwala zoptymalizować i zindywidualizować terapię. Tym samym przyczynia się do ograniczenia skutków ubocznych leczenia oraz poprawy jakości życia chorych. Obecnie standardem postępowania w leczeniu pacjentów z czerniakiem skóry, obok postępowania chirurgicznego i klasycznej – coraz rzadziej stosowanej chemio-/radioterapii – jest wdrażanie leczenia ukierunkowanego na zmiany molekularne w tkance guza oraz immunoterapia, która polega na aktywowaniu układu immunologicznego.

**Słowa kluczowe:** czerniak, *BRAF*, *NRAS*, terapia celowana

### Wstęp

Zindywidualizowana terapia onkologiczna to postępowanie terapeutyczne, którego celem jest dobranie leczenia w taki sposób, by uzyskać maksymalne korzyści przy jednoczesnym zminimalizowaniu skutków ubocznych. Efektywność takiego leczenia zawsze wiąże się z oceną pacjenta przez wielospecjalistyczny zespół klinicystów. Celem tego jest ustalenie optymalnego podejścia terapeutycznego („leczenie szyte na miarę”). Wdrożenie takiego postępowania jest możliwe dzięki ogromnemu rozwojowi technologicznemu, który od kilkunastu lat obserwowany jest w genetyce oraz biologii molekularnej i wiąże się z:

- wprowadzaniem nowej klasyfikacji nowotworów,
- poszukiwaniem nowych celów terapeutycznych,

- oceną odpowiedzi pacjenta na leczenie (farmakogenomika),
- wykrywaniem oporności na leczenie,
- wykrywaniem wznowy na bardzo wczesnym etapie,
- oceną ryzyka wystąpienia nowotworu [1].

### Epidemiologia i czynniki ryzyka

Czerniak (*melanoma*) jest jednym z nowotworów, w którym już od kilku lat stosuje się leczenie ukierunkowane. Jest to złośliwy nowotwór wywodzący się z melanocytów, czyli komórek wytwarzających barwnik – melaninę. Są to komórki pochodzenia neuroektodermalnego [2]. Najczęstszą pierwotną lokalizacją czerniaka jest skóra (ponad 96% przypadków), szczególnie powierzchnie ekspozowane na promieniowanie słoneczne.

#### Jak cytować / How to cite:

Gil J, Łączmańska I, Sąsiadek MM, Ziętek M. *Personalised medical management of patients with melanoma (part 1)*. NOWOTWORY J Oncol 2021; 71: 169–175.

Inne lokalizacje, które występują znacznie rzadziej, to przede wszystkim: spojówka i błona naczyniowa oka, błony śluzowe jamy ustnej, gardła i narządów płciowych, opony mózgowie oraz odsiebne części ciała (w tym lokalizacja pod paznokcia) [2].

Najwięcej zachorowań obserwuje się w Australii, Nowej Zelandii i Ameryce Północnej. W Polsce czerniak występuje względnie rzadko, a jego standaryzowany współczynnik zachorowań wynosi około 6,5 na 100 tysięcy. Według danych Krajowego Rejestru Nowotworów z 2017 roku w Polsce odnotowano 3785 (1796 mężczyzn i 1989 kobiet) przypadków czerniaka oraz 1410 zgonów z jego powodu [3]. Pomimo że ten nowotwór należy do rzadko występujących (około 2% wszystkich nowotworów), to od kilkunastu lat dynamicznie rośnie liczba zachorowań, szczególnie wśród przedstawicieli rasy białej. Dzieje się tak również w Polsce (według danych Krajowego Rejestru Nowotworów wzrost o ponad 70% w ciągu 10 lat). Znamienny jest również względnie młody wiek, w którym dochodzi do zachorowania (30–50 lat), co istotnie przekłada się na poważne konsekwencje społeczno-ekonomiczne [4]. Niebagatelnym faktem jest, że umieralność na ten nowotwór w Polsce jest o 20% wyższa w porównaniu z innymi krajami zachodnimi, pomimo że w naszym kraju odnotowuje się niższy odsetek zachorowalności. Pokazują to bardzo dobrze statystyki dotyczące różnic efektywności leczenia w różnych krajach – spośród wszystkich nowotworów różnice te dla czerniaka są najwyższe (Polska 69,8% vs. Niemcy 93,1%) [3]. Związane jest to prawdopodobnie ze zbyt późnym wykrywaniem/rozpoznanie choroby oraz nieznaną przyczyną i/lub brakiem profilaktyki.

Szybkie tempo wzrostu i duży potencjał przerzutowania powodują, że czerniak należy do najtrudniejszych w leczeniu i najgorzej rokujących nowotworów w stadium uogólnienia [2]. Dlatego bardzo ważne jest szybkie i prawidłowe rozpoznanie choroby, gdyż rak wcześniej wykryty (ograniczony miejscowo do ogniska pierwotnego) jest niemal w 100% wyleczalny – usuwa się go chirurgicznie [2].

Podstawowym czynnikiem ryzyka rozwoju czerniaka jest jasna karnacja i ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe (UV) zarówno naturalne (szczególnie UV-B), jak i sztuczne (solarium, szczególnie UV-A). Na zwiększone ryzyko rozwoju tej choroby narażone są osoby, które intensywnie i z przerwami ekspozycją się na promieniowanie UV oraz doznały poparzeń słonecznych w okresie dzieciństwa i/lub młodości – w porównaniu z osobami wystawionymi na wieloletnią i regularną ekspozycję UV. Osoby, które doświadczyły więcej niż 5 poważnych epizodów poparzenia słonecznego, są około 2-krotnie bardziej narażone na ryzyko rozwoju czerniaka [5].

W Europie obserwuje się gradient zachorowań na czerniaka – na północy kontynentu odnotowuje się najwyższy odsetek chorych, natomiast na południu obserwowanych jest znacznie mniej przypadków. Mniejsza liczba chorych na czerniaka w populacjach zamieszkujących południe Europy jest prawdopodobnie związana z chroniczną ekspozycją na

słońce (w porównaniu z okresową/sporadyczną na północy) oraz z charakterystycznym, ciemniejszym, fototypem skóry, który naturalnie chroni przed promieniowaniem UV [6].

## Diagnostyka

Większość czerniaków powstaje *de novo* – około 50–60% na skórze bez zmian barwnikowych, a około 40% powstaje na podłożu istniejącej zmiany barwnikowej [4]. Samoobserwacja zmian skórnych, szczególnie atypowych znamion barwnikowych, jest niezwykle istotna, a każda niepokojąca zmiana powinna być skonsultowana ze specjalistą. Do oceny znamion przez pacjenta oraz wstępnej identyfikacji części czerniaków może być wykorzystana skala ABCDE, gdzie poszczególne litery odpowiadają cechom zmian:

- A (*assymetry* – asymetria znamienia),
- B (*border*, granica – postrzępione brzegi),
- C (*color*, kolor – różnobarwny),
- D (*diameter*, średnica – większa niż 5 mm),
- E (*evolution/elevation*, uwypuklenie zmiany lub jej ewolucja w czasie) [7].

Zmianom może towarzyszyć owrzodzenie i/lub krwawienie. Badanie dermatoskopowe przeprowadzone przez specjalistę jest podstawą do postawienia rozpoznania klinicznego choroby. Następnie podejrzana zmiana powinna zostać usunięta chirurgicznie z minimalnym 1–2 mm marginesem skóry zdrowej i poddana analizie histopatologicznej w celu ustalenia rozpoznania. Wyróżnia się 4 główne podtypy histologiczne czerniaka:

- czerniak szerzący/rozprzestrzeniający się powierzchownie (*superficial spreading melanoma* – SSM) (41%),
- czerniak guzkowy (*nodular melanoma* – NM) (16%),
- czerniak wywodzący się z plamy soczewicowatej czyli czerniak lentiginalny (*lentigo maligna melanoma* – LMM) (2,7–14%) oraz
- czerniak pod paznokciowo-kończynowy (*acral lentiginous melanoma* – ALM) (7–10%).

Inne radsze typy to czerniak desmoplastyczny, czy czerniak wywodzący się ze znamienia błękitnego [7, 8]. Ważne cechy czerniaka, poza rozpoznaniem podtypu, które powinny znaleźć się w raporcie histologicznym, to:

- cechy oceniane makroskopowo, czyli wielkość wyciętego fragmentu skóry ze zmianą, lokalizacja zmiany na skórze, wymiary guzka i opis zmiany (w tym zabarwienie, brzeg, obecność lub brak guzka, ogniska satelitarne),
- cechy oceniane mikroskopowo, czyli grubość guza w milimetrach (według Breslowa), obecność lub brak owrzodzenia, liczba mitoz na mm<sup>2</sup>, obecność lub brak mikrosatelit i dodatkowo fazy wzrostu (radialne vs. wertykalne), obecność lub brak nacieków limfocytarnych, obecność lub brak naciekania naczyń chłonnych, obecność lub brak naciekania pni nerwowych [7, 8].

Kolejne badania diagnostyczne (RTG klatki piersiowej, USG brzucha, USG węzłów chłonnych, TK czy PET) pozwalają

ocenić stopień zaawansowania choroby. Taka kompleksowa diagnostyka pomaga przewidzieć dalszy naturalny przebieg choroby (czynnik rokowniczy). Natomiast badania molekularne w kierunku obecności mutacji w obrębie guzów w wysokich stopniach zaawansowania klinicznego pozwalają zaplanować najbardziej efektywne leczenie (czynnik predykcyjny). Wyróżnia się pięć stopni klinicznego zaawansowania nowotworu [7]:

- Stopień 0 – to tak zwany *melanoma in situ* – postać nieprzekraczająca naskórka i nienaciekająca.
- Stopień I – jeśli czerniak jest owrzodziały i nie przekracza 1 mm grubości lub jeśli nie jest owrzodziały i nie przekracza 2 mm, węzły chłonne nie są zajęte (N0) i nie ma przerzutów odległych (M0).
- Stopień II – wyróżnia się trzy podstopnie, w których cechą decydującą jest grubość zmiany pierwotnej:
  - IIA – jeśli czerniak jest owrzodziały i nie przekracza 2 mm grubości lub jeśli nie jest owrzodziały i nie przekracza 4 mm,
  - IIB – jeśli czerniak jest owrzodziały i nie przekracza 4 mm grubości lub jeśli nie jest owrzodziały i przekracza 4 mm,
  - IIC – jeśli czerniak jest owrzodziały i przekracza 4 mm. W stopniu II węzły chłonne nie są zajęte (N0) i nie ma przerzutów odległych (M0).
- Stopień III – obecność przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych. Wyróżnia się cztery podstopnie (IIIA–IIID) w zależności od liczby zajętych węzłów chłonnych oraz rodzaju przerzutu (mikroprzerzuty stwierdzone w badaniu mikroskopowym vs. makroprzerzuty stwierdzone w badaniu klinicznym). Nie ma przerzutów odległych (M0). W tym stopniu możliwe jest występowanie przerzutów do skóry w formie ognisk satelitarnych lub *in-transit*, które współwystępują z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych lub mogą być izolowane.
- Stopień IV – najbardziej zaawansowane stadium choroby, charakteryzuje się przerzutami do:
  - pozaregionalnych węzłów chłonnych, skóry lub tkanki podskórnej,
  - narządów trzewnych, takich jak płuca czy wątroba,
  - ośrodkowego układu nerwowego – najgorzej rokująca grupa pacjentów.

### **Dziedziczna/ genetyczna predyspozycja do czerniaka**

Poza najczęstszą, sporadyczną formą czerniaka znane są również formy dziedziczne. W odniesieniu do czynników genetycznych, które warunkują predyspozycję do zachorowania, nie wykazano jednego sposobu dziedziczenia, a rodzinne przypadki występowania czerniaka mają podłoże wielogenowe i są często powiązane z konkretnym typem karnacji (jasna skóra z piegami oraz rude włosy wiążą się z wyższym ryzykiem) oraz zwyczajami rodzinnymi (np. nadmierna ekspozycja na promieniowanie słoneczne) [9]. Jednym z wiodących i najlepiej pozna-

nych genów predyspozycji do zachorowania jest dobrze przebadany w populacji polskiej *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*). Koduje on białko kontroli cyklu komórkowego p16 (INK4A) oraz izoformę p14 (ARF) [10]. Gen ten jest zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 9 (9p21). Najczęściej spotykanym wariantem konstytucyjnym, czyli występującym we wszystkich komórkach ciała, jest c.442G>A (p.A148T, zmiana typu zmiany sensu – *missense*, podstawienie alaniny przez treoninę), który zwiększa 2–2,5-krotnie ryzyko wystąpienia czerniaka, jak również raka trzustki, płuc, piersi jelita grubego oraz nowotworów złośliwych mózgu [10–12]. Chociaż sama zmiana nie powoduje dysfunkcji białka kodowanego przez ten gen, sugeruje się, że może ona być dziedziczona razem z innym wariantem, który wpływa negatywnie na białko, a tym samym moduluje ryzyko zachorowania [10]. Interesujące jest to, że dane w bazie ClinVar nie potwierdzają patogenności tej zmiany i klasyfikują ją jako wariant łagodny (*benign*), który nie ma związku z chorobą. Zatem wynik diagnostyczny uzyskany dla danego pacjenta należy interpretować w odniesieniu do danych klinicznych (w tym danych dotyczących etnicznego pochodzenia pacjenta), danych literaturowych oraz pojawiających się nowych wytycznych.

### **Wybrane zespoły genetyczne ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia czerniaka**

Zwiększone ryzyko rozwoju nowotworów skóry, w tym czerniaka, związane jest również z różnymi zespołami genetycznymi. Największe ryzyko obserwuje się w skórze pergaminowej (*xeroderma pigmentosum* – XP) oraz zespole znamion dysplastycznych. W mniejszym stopniu do rozwoju tego raka predysponuje zespół Li i Fraumeniego.

Skóra pergaminowa jest bardzo rzadkim heterogennym schorzeniem genetycznym dziedziczonym autosomalnie recesywnie. W tej chorobie skóra charakteryzuje się zwiększoną wrażliwością na promieniowanie ultrafioletowe – co wiąże się z wysokim ryzykiem rozwoju nowotworów skóry w młodym wieku. Podstawę genetyczną XP stanowią mutacje w genach kodujących enzymy ze szlaku NER (*nucleotide excision repair*), odpowiedzialne za naprawę uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem UV. Wyjątkiem jest podtyp XPV, w którym chorobę powodują mutacje polimerazy  $\eta$ . Wyróżnia się kilka podtypów XP w zależności od genu, w którym jest obecna mutacja (*XPA, XPB, XCP, XPD, XPE, XPG, ERCC4, DDB2* i *POLH*). Profilaktyka XP wiąże się z unikaniem ekspozycji na promieniowanie UV, częstymi kontrolami dermatologicznymi oraz usuwaniem zmian przedrakowych [13].

Zespół znamion dysplastycznych (rodzinny zespół zmian atypowych związanych z czerniakiem [*familial atypical multi mole melanoma syndrome* – FAMMM) jest dziedziczony w sposób autosomalnie dominujący ze zmienną ekspresją oraz niepełną penetracją [14]. Poza czerniakiem stwierdza się zwiększone ryzyko innych nowotworów złośliwych, głównie trzustki. Ryzyko rozwoju czerniaka u pacjentów ze znamionami

dysplastycznymi jest przede wszystkim związane z całkowitą liczbą znamion oraz czerniakiem w wywiadzie rodzinnym [15]. Zespół spowodowany jest obecnością mutacji w genach kodujących białka regulujące cykl komórkowy, m.in. *CDKN2A* i *CDK4* (*cyclin-dependent kinase 4*) [15].

U podłoża zespołu Li i Fraumeniego, odpowiedzialnego za dziedziczną predyspozycję do szerokiego spektrum nowotworów, leży mutacja w genie supresorowym (antyonkogen) *TP53* (*tumor protein p53*). Zespół ten dziedziczony jest w sposób autosomalnie dominujący. U około 50% nosicieli mutacji nowotwory rozwijają się przed 30. rokiem życia, często wieloogniskowo lub obustronnie. Najczęstszymi nowotworami związanymi z zespołem Li i Fraumeniego są mięsaki i kostniakomięsaki, ponadto rak piersi, rak kory nadnerczy oraz nowotwory złośliwe mózgu. Czerniak nie należy do głównego spektrum stwierdzanych w tym zespole nowotworów, jednak ryzyko jego rozwoju jest zwiększone. Dlatego profilaktyka powinna obejmować analizę każdej nowej zmiany skórnej/znamięnia przez dermatologa oraz ograniczenie ekspozycji na promieniowanie UV [16].

### **Poradnictwo genetyczne u pacjentów z dziedziczną predyspozycją do zachorowania na czerniaka**

Pacjenci z chorobami onkologicznymi powinni być konsultowani przez lekarza genetyka klinicznego. Ocenia on, czy dane zachorowanie spełnia kryteria dziedzicznej predyspozycji do nowotworów. Istnieją cechy, na podstawie których można postawić takie rozpoznanie nawet bez stwierdzenia istnienia mutacji germinalnej, np. rozpoznanie dziedzicznej predyspozycji do zachorowania na raka piersi (*hereditary breast cancer syndrome* – *HBC-syndrome*).

Podobnie jest w przypadku osób obciążonych wywiadem klinicznym w kierunku czerniaka. W rodzinach z genetyczną predyspozycją rozpoznaje się zachorowania w młodym wieku (poniżej 40. r.ż.) oraz u kilku członków najbliższej rodziny chorego. W odniesieniu do czerniaka należy pamiętać, że nowotwór ten może również wynikać ze wspólnego ryzyka środowiskowego.

Jak już wspomniano komponenta genetyczna w rodzinach z akumulacją czerniaków nie jest łatwa do znalezienia. Poza wymienionymi już genami *CDKN2A* oraz *CDK4* sugeruje się udział także innych genów, np. *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*), *MITF* (*microphthalmia-associated transcription factor gene*), *POT1* (*protection of telomeres 1*) czy *BAP1* (*BRCA1 associated protein 1*) [17]. Ponadto w poradnictwie genetycznym powinno się brać pod uwagę zwiększone ryzyko zachorowania na raka trzustki (u nosicieli mutacji *CDKN2A*). Trzeba też zwracać uwagę na fenotyp skóry pacjenta i jego pochodzenie geograficzne, gdyż w każdej populacji ryzyko choroby – nawet przy nosicielstwie określonego wariantu genetycznego – może być inne. Testy genetyczne, które można wykonać, aby przeanalizować obciążenie genetyczne, mogą dotyczyć tylko wariantu c.442G>A

(p.A148T) w genie *CDKN2A* (szczególnie dla populacji polskiej). Złotym standardem w tego typu testach jest sekwencjonowanie metodą Sangera. Zwłaszcza, że jest to stosunkowo niedroga metoda o bardzo wysokiej czułości. Fragment genu, który zawiera zmianę, zostaje zamplifikowany w reakcji PCR (*polymerase chain reaction*), a następnie każdy nukleotyd w sekwencji jest odczytany w reakcji sekwencjonowania. W rodzinach z dziedzicznym obciążeniem, jeśli nie zostanie wykryty wariant p.A148T, sekwencjonowaniu powinien zostać poddany cały gen *CDKN2A* wraz z sekwencją promotorową. Jeśli nie stwierdzi się występowania wariantów w genie *CDKN2A*, to zazwyczaj wykonywany jest test w kierunku mutacji w genie *CDK4* oraz innych genach o potencjalnym znaczeniu w czerniaku. Są to jednak zalecenia nieformalne, gdyż żadne wytyczne dotyczące analizy genów innych niż *CDKN2A* nie zostały dotychczas opublikowane [18, 19]. Również w pozostałych zespołach predyspozycji do nowotworów, jak np. zespół Lynch'a typu II, zespół Cowden, rodzinny siatkówczak (*retinoblastoma*), należy pamiętać o zwiększonym ryzyku czerniaka [18].

### **Najczęstsze zmiany molekularne w czerniakach**

Czerniaki są bardzo niejednorodną grupą nowotworów pod względem zmian molekularnych, które pojawiają się podczas ich rozwoju, i w porównaniu z innymi nowotworami złośliwymi, charakteryzują się wysokim odsetkiem mutacji somatycznych [20]. W związku z tym charakterystyka zmian molekularnych umożliwia wdrożenie zindywidualizowanego podejścia klinicznego, jak również może mieć znaczenie rokownicze.

W komórce można wyróżnić 3 poziomy, w obrębie których występują zdefiniowane zmiany genetyczne. Pierwszy poziom to tzw. warstwa wejściowa (*input layer*) zintegrowana z błoną cytoplazmatyczną, która składa się z ligandów i receptorów powierzchniowych. Przykładem są receptorowe kinazy tyrozynowe (*receptor tyrosine kinases* – RTKs), m.in. KIT i ALK. Po zaktywowaniu receptorów dochodzi do uruchamiania kolejnego poziomu, czyli ścieżek przekazywania sygnałów. Składa się on z dwóch głównych szlaków: MAPK (kinazy aktywowane mitogenami [*mitogen-activated protein kinase*]) oraz PI3K/AKT/mTOR (ścieżka kinazy 3-fosfatydyloinozytolu). Kaskada sygnałowa kończy się na ostatnim poziomie efektorowym w jądrze komórkowym (np. gen *TERT*) wraz z aktywacją lub inhibicją czynników transkrypcyjnych [20].

Jednym z najczęściej obserwowanych i charakterystycznych patomechanizmów w czerniakach jest aktywacja ścieżki MAPK, której główne elementy to kinazy RAS/RAF/MEK/ERK. Aktywacja ta następuje na skutek mutacji w genach, które kodują białka biorące udział w szlaku przekazywania sygnałów. Najczęściej zmutowanymi protoonkogenami są *BRAF* oraz *NRAS*.

### **BRAF**

Gen *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*) zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 7 (7q34).

Koduje kinazę serynowo-treoninową aktywującą ścieżkę ERK. Mutacje *BRAF* obserwowane są w około 50% przypadków zaawansowanego czerniaka i są często spotykane u pacjentów, którzy w wywiadzie chorobowym nie mają historii dotyczącej uszkodzenia skóry przez promieniowanie słoneczne. Mutacje te są bardzo rzadko spotykane w czerniakach błon śluzowych czy jamy ustnej [21]. Pomimo identyfikacji wielu różnych mutacji w dwóch segmentach domeny kinazowej, najczęściej występuje substytucja waliny przez inny aminokwas w pozycji 600 łańcucha aminokwasowego (ponad 97% mutacji) [22]. Najczęstszą zmianą jest podstawienie kwasu glutaminowego (V600E, 70–80%). To z kolei aktywuje *BRAF* i ponad 800-krotnie zwiększa zdolność do fosforylacji substratu, jakim jest MEK [23].

Kolejną, co do częstości występowania, jest zmiana V600K (podstawienie lizyny, 10–20%). Rzadsze zmiany to V600R, V600D i V600M (podstawienie odpowiednio: argininy, kwasu asparaginowego i metioniny) [21]. Efektem mutacji *BRAF* jest zwiększenie indeksu proliferacyjnego komórki, niezależnego od sygnałów zewnętrznych (aktywacja szlaku MAPK/ERK).

Czerniaki z mutacją *BRAF* źle rokują. Choroba ma agresywny przebieg powiązany z krótszym czasem przeżycia pacjentów z rakiem w wysokim stopniu zaawansowania (IV) w porównaniu z pacjentami bez mutacji *BRAF* (*wild type* – WT). Ponadto na czerniaki *BRAF*+ częściej zapadają osoby młodsze i w przeciwieństwie do czerniaków typu dzikiego, charakteryzują się one powierzchownym szerzeniem guza lub typem guzkowym [22]. Mutacje genu *BRAF* w czerniaku zawsze współwystępują z inaktywacją genu supresorowego, np. *PTEN* czy *TP53* (efekt onkogen/gen supresorowy nowotworów) [24].

## **NRAS**

Gen *NRAS* (*NRAS proto-oncogene, GTPase*) kodujący drobnocząsteczkową GTPazę zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 1 (1p13.2). *NRAS* jest kolejnym co do częstości zmutowanym białkiem w czerniakach, a ścieżka MAPK jest jedną z kilku jego ścieżek efektorowych. Szacuje się, że w około 15–25% przypadków czerniaka występują mutacje aktywujące w *NRAS* [25]. Najczęstszą mutacją *NRAS* w czerniaku jest substytucja glutaminy innymi aminokwasami w kodonie 61 (Q61). Zwykle są to arginina (R), leucyna (L), lizyna (K) i histydyna (H) [26]. Mutacje *NRAS* oraz *BRAF* V600 wykluczają się wzajemnie. Inaktywacja p53 lub p16 oraz współistnienie mutacji *NRAS* to czynniki, które wyzwalają proces transformacji nowotworowej [24]. Białko *NRAS* jest GTPazą odpowiadającą za hydrolizę GTP do GDP. Mutacje powszechnie spotykane w czerniaku zaburzają proces hydrolizy i *NRAS* jest stale związany z GTP, co powoduje jego ciągłą aktywność niezależną od sygnałów płynących z zewnątrz. *NRAS* aktywuje szlak MAPK przez kinazę CRAF (aktywowanie szlaku niezależne od *BRAF*), co przekłada się na wzmożoną proliferację. Ponadto aktywuje również szlak PI3K/AKT. To z kolei wiąże się z modulowaniem wzrostu oraz przeżycia komórek nowotworowych [27].

Mutacje *NRAS* najczęściej występują u pacjentów starszych narażonych na chroniczną ekspozycję na promieniowanie UV [28]. Obecność mutacji *NRAS* jest niezależnym złym markerem rokowniczym związanym z wyższym ryzykiem przerzutów do węzłów chłonnych oraz niższą medianą przeżycia w porównaniu z pacjentami bez tej zmiany [29].

## **NF1**

W 2015 roku opublikowano w The Cancer Genome Atlas (TCGA) analizę sekwencji eksomu 333 pacjentów z czerniakiem pierwotnym i/lub przerzutowym. Dane wykazały, że czerniaki skóry można podzielić na 4 podgrupy genomowe, które obejmują nowotwory:

- z mutacją *BRAF*,
- z mutacją *NRAS*,
- z mutacją *NF1* (neurofibromina 1),
- „potrójnie typ dziki”, czyli nowotwory bez mutacji w w/w genach [30].

Jednak kliniczne implikacje dotyczące prognozowania oraz przewidywania odpowiedzi na leczenie wciąż są niejednoznaczne w odniesieniu do grupy z mutacjami genu *NF1*. Dlatego konieczne są dalsze badania, aby wprowadzić wytyczne dotyczące postępowania u chorych z tą mutacją [8].

## **PTEN**

Gen *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 10 (10q23.31) koduje fosfatazę, która pełni funkcję supresora nowotworów – blokuje szlak sygnałowy PI3K poprzez aktywność fosfatazy lipidowej oraz negatywnie reguluje szlak MAPK poprzez aktywność fosfatazy białkowej (podwójna specyficzność).

W około połowie przypadków czerniaków z mutacją *BRAF* stwierdza się utratę ekspresji białka *PTEN* (*loss of expression*). Utrata ta jest wyrazem homozygotycznej delecji genu lub innych zmian genetycznych i epigenetycznych prowadzących do obniżenia/utraty ekspresji białka. Dodatkowo można wyróżnić podgrupę czerniaków z amplifikacją *AKT3* (*AKT serine/threonine kinase 3*) – efektem ścieżki PI3K. Ta amplifikacja jest niezależnym mechanizmem, który prowadzi do aktywacji ścieżki PI3K w nowotworach z obecnymi mutacjami aktywującymi *BRAF* [31]. Konsekwencje utraty funkcji *PTEN* w połączeniu z amplifikacją *AKT3* wciąż wymagają wyjaśnienia. Jednak sugeruje się, że aktywacja ścieżki PI3K wpływa na ekspresję proapoptycznego białka BCL2L11. Brak aktywności *PTEN* hamuje ekspresję BCL2L11, co przekłada się na zwiększenie oporności komórek na apoptozę. Wciąż nierozstrzygniętą kwestią pozostaje moment utraty aktywności *PTEN* – czy dzieje się to w początkowych, czy też w późniejszych etapach karcynogenezy [31].

## **KIT**

Mutacje prowadzące do aktywacji i/lub amplifikacji receptornej kinazy tyrozynowej kodowanej przez *KIT* (*KIT proto-on-*

*cogene, receptor tyrosine kinase*), są relatywnie częste w rzadko występujących czerniakach (1–3% wszystkich czerniaków) błon śluzowych i podpaźnokciowych (10%–40%). Ponadto w odróżnieniu od mutacji *BRAF* występują u osób przewlekle narażonych na uszkodzenia skóry wywołane przez promieniowanie słoneczne [32, 33]. Mutacje/amplifikacje białka KIT prowadzą do konstytutywnej aktywacji różnych szlaków wewnątrzkomórkowych, m.in. MAPK/ERK oraz PI3K/AKT, które pełnią kluczowe funkcje w rozwoju czerniaka. Najwięcej mutacji genu *KIT* w czerniaku (około 70%) jest zlokalizowanych w:

- eksonie 11 – najczęściej dochodzi do podstawienia proliny w miejsce leucyny w kodonie 576 (L576P) oraz
- eksonie 13 – najczęściej dochodzi do podstawienia kwasu glutaminowego w miejsce lizyny w kodonie 642 (K642E) [33].

Mutacje te skutkują wzmożoną proliferacją, co przekłada się na zwiększenie ekspresji białka Ki-67 (biomarker proliferacji) obserwowanej w badaniach immunohistochemicznych u chorych z mutacją w porównaniu z chorymi z niezmienioną formą genu. Stwierdzenie obecności mutacji w genie *KIT* jest markerem prognostycznym związanym z gorszym rokowaniem w odniesieniu do czerniaków bez tej zmiany [34].

### **GNAQ/GNA11 i BAP1**

Profil genetyczny czerniaków błony naczyniowej gałki ocznej okazał się zupełnie odmienny od czerniaków skóry czy błon śluzowych, ponieważ nie stwierdza się w tych nowotworach mutacji protoonkogenów i genów supresorowych kluczowych dla rozwoju czerniaków skóry. Charakterystyczne są natomiast mutacje w dwóch protoonkogenach *GANQ* (*G protein subunit alpha q*) oraz *GNA11* (*G protein subunit alpha 11*), których obecność wzajemnie się wyklucza. Oba geny kodują podjednostkę  $\alpha$  białka G posiadającego aktywność GTPazy zaangażowanego w aktywację różnych ścieżek przekazywania sygnału [35]. Mutacje tych genów prowadzą do dezaktywacji funkcji GTPazy. Wiąże się to z konstytutywnym związaniem białka z GTP i – podobnie jak w przypadku *NRAS* – prowadzi do jego stałej aktywności.

Dodatkowo, poza mutacjami w wymienionych protoonkogenach, w czerniakach błony naczyniowej oka stwierdzono mutacje punktowe w genie kodującym białko supresorowe BAP1. Najwięcej mutacji jest obecnych w domenach wiążących BAP1 z białkami BRCA1 oraz BARD1 [19, 35, 36].

### **Analiza genetyczna zmian somatycznych**

Zmiany somatyczne są charakterystyczne i obecne tylko w komórkach nowotworowych chorego. Ich identyfikacja pozwala wprowadzić leczenie ukierunkowane na te zmiany. Dzięki temu efektywność zastosowanej terapii może być znacznie większa niż klasycznej chemioterapii.

Najczęściej analizowane jest DNA wyizolowane z blozków parafinowych. Kluczowym krokiem przed izolacją materiału genetycznego jest ocena odsetka komórek nowotworowych

(który powinien być wyższy niż 50%). Warunkuje to wybór fragmentu tkanki do badania. Jedynym biomarkerem, który ma obecnie znaczenie w terapii zaawansowanego przerzutowego czerniaka skóry, jest status mutacji *BRAF* V600. Dlatego ocena tego statusu stała się priorytetem w określaniu wyboru terapii i znalazła się w wytycznych zarówno Europejskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej (European Society for Medical Oncology – ESMO) jak i amerykańskiej National Comprehensive Cancer Network (NCCN) [17, 37, 38].

Dotychczas opracowano kilka metod, które mogą być stosowane do wykrywania mutacji *BRAF*. Są to:

- sekwencjonowanie metodą Sanger, immunohistochemia (IHC),
- pirosekwencjonowanie,
- PCR specyficzny wobec mutacji (*mutation-specific PCR*),
- PCR w czasie rzeczywistym specyficzny wobec mutacji (*mutation specific real-time PCR/qPCR*),
- cyfrowy PCR (*digital PCR*),
- analiza krzywej topnienia w wysokiej rozdzielczości (*high-resolution melting curve analysis – HRM*),
- sekwencjonowanie następnej generacji (*next-generation sequencing – NGS*) [39].

Rekomendacje dotyczące identyfikacji mutacji *BRAF* w praktyce klinicznej wskazują na sekwencyjną analizę z użyciem dwóch metod. Jako pierwszy należy wykonać skryning metodą IHC z użyciem przeciwciał monoklonalnych VE1 (specyficznych wobec zmutowanej wersji białka *BRAF* z mutacją V600E). W drugiej kolejności trzeba potwierdzić obecność mutacji jedną z metod biologii molekularnej. Zalecenia te wynikają z faktu, że sama IHC niesie ze sobą ryzyko fałszywie ujemnych wyników i/lub niewykrycia obecności innej mutacji niż V600E. Jeśli materiału do badania genetycznego jest za mało, wtedy IHC pozostaje metodą z wyboru.

Należy jednak pamiętać, że czułe metody molekularne, np. *real-time PCR* mogą wykryć mutacje *BRAF*, które są obecne w niewielkim odsetku komórek w guzie (już >5%) przeważnie typu dzikiego. Jednak w rzeczywistości nie ma to znaczenia klinicznego w odpowiedzi na terapię celowaną. Z tego względu wydaje się, że metoda NGS jest aktualnie najlepszą metodą molekularną [39]. Dzięki niej jednocześnie można analizować wszystkie geny istotne w czerniaku (komercyjnie dostępne panele), ponadto oprócz wysokiej czułości wskazuje odsetek zmutowanych alleli.

Aktualnie w Polsce i na świecie dostępnych jest wiele komercyjnych testów, które pozwalają szybko i jednoznacznie określić status mutacyjny *BRAF*. Najczęściej są to testy oparte na technice *real-time PCR* i – co ważne – zoptymalizowane dla DNA pochodzącego z blozków parafinowych. W laboratoriach referencyjnych powinny być używane testy posiadające certyfikaty dopuszczające je do badań diagnostycznych (np. certyfikat CE IVD, czy rekomendacje amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków [Food and Drug Administration – FDA]). Ponadto laboratorium, które wykonuje taką diagnostykę – aby

utrzymać wysoki poziom wykonywanych badań – powinno regularnie poddawać się międzynarodowym testom zewnętrznej kontroli jakości. Ponadto najnowsze zalecenia powinny wprowadzać możliwie jak najszybciej.

Inną drogą pozyskania materiału do badań jest płynna biopsja (*liquid biopsy*). Jej znaczenie kliniczne w odniesieniu do analizy mutacji w guzach nowotworowych (szczególnie nieoperacyjnych), monitorowania leczenia i pojawiania się oporności, zyskuje coraz większą wartość. Metoda ta polega na identyfikacji w krwi pacjenta wolnokrążących komórek nowotworowych (*circulating tumor cells* – CTCs), wolnokrążącego nowotworowego DNA (*circulating tumor DNA* – ctDNA) lub RNA (*circulating tumor RNA* – ctRNA), które posiadają charakterystyczne mutacje o znaczeniu rokowniczym [40].

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

**Justyna Gil**

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Katedra i Zakład Genetyki

ul. Marcinkowskiego 1

50-368 Wrocław

e-mail: justyna.gil@umed.wroc.pl

Otrzymano: 24 Mar 2021

Zaakceptowano: 25 Mar 2021

## Piśmiennictwo

1. Szaśniadek M, Łączmańska I, Maciejczyk A, et al. Fundamentals of personalised medicine in genetic testing-based oncology. *Nowotwory. Journal of Oncology*. 2020; 70(4): 144–149, doi: 10.5603/njo.2020.0029.
2. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16(6): 345–358, doi: 10.1038/nrc.2016.37, indexed in Pubmed: 27125352.
3. [http://onkologia.org.pl/wp-content/uploads/Nowotwory\\_2017.pdf](http://onkologia.org.pl/wp-content/uploads/Nowotwory_2017.pdf) (28.01.2021).
4. Michalska-Jakubus M. Malignant melanoma – epidemiology, etiopathogenesis and prognosis. *Med Rodz*. 2006(May 15).
5. Elwood J, Jopson J. Melanoma and sun exposure: An overview of published studies. *International Journal of Cancer*. 1997; 73(2): 198–203, doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19971009)73:2<198::aid-ijc6>3.0.co;2-r.
6. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, et al. Melanoma: Epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. In *Vivo*. International Institute of Anticancer Research. 2014; 28. <https://moh-it.pure.elsevier.com/en/publications/melanoma-epidemiology-risk-factors-pathogenesis-diagnosis-and-cla> (1.03.2021).
7. Rutkowski P, Wysocki PJ, Nasierowska-Guttmejer A, et al. Cutaneous melanomas. *Oncol Clin Pract*. 2020; 16(4): 163–182, doi: 10.5603/OCP.2020.0021.
8. Garbe C, Amaral T, Peris K, et al. European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics – Update 2019. *European Journal of Cancer*. 2020; 126: 141–158, doi: 10.1016/j.ejca.2019.11.014.
9. Soua E, Eliades P, Shannon K, et al. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management. *J Am Acad Dermatol*. 2016; 74(3): 395–407, doi: 10.1016/j.jaad.2015.08.038.
10. Gapska P, Scott RJ, Serrano-Fernandez P, et al. CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. *Cancer Res*. 2005; 65(3): 835–839, indexed in Pubmed: 15705881.
11. Debniak T, Górski B, Huzarski T, et al. A common variant of CDKN2A (p16) predisposes to breast cancer. *J Med Genet*. 2005; 42(10): 763–765, doi: 10.1136/jmg.2005.031476, indexed in Pubmed: 15879498.
12. Debniak T, Scott RJ, Huzarski T, et al. CDKN2A common variant and multi-organ cancer risk—a population-based study. *Int J Cancer*. 2006; 118(12): 3180–3182, doi: 10.1002/ijc.21760, indexed in Pubmed: 16395703.
13. Takebe H, Nishigori C, Tatsumi K. Melanoma and Other Skin Cancers in Xeroderma Pigmentosum Patients and Mutation in Their Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 1989; 92(5): S236–S238, doi: 10.1038/jid.1989.73.
14. Góralaska A, Błaszczak J. Znamię atypowe, znamię dysplastyczne, zespół znamion atypowych-kontrowersje nomenklaturowe, trudności diagnostyczne i znaczenie prognostyczne Atypical naevus, dysplastic naevus, dysplastic naevus syndrome-nomenclature controversy, diagnostic difficulties and prognostic perspectives. *Dermatology Review*. 2013; 100.
15. Lynch HT, Shaw TG. Familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM) syndrome: history, genetics, and heterogeneity. *Fam Cancer*. 2016; 15(3): 487–491, doi: 10.1007/s10689-016-9888-2, indexed in Pubmed: 26892865.
16. Nieuwenburg SA, Adan F, Ruijs MWG, et al. Cumulative risk of skin cancer in patients with Li-Fraumeni syndrome. *Fam Cancer*. 2020; 19(4): 347–351, doi: 10.1007/s10689-020-00178-1, indexed in Pubmed: 32356166.
17. Swetter SM, Tsao H, Bichakjian CK, et al. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2019; 80(1): 208–250, doi: 10.1016/j.jaad.2018.08.055, indexed in Pubmed: 30392755.
18. Leachman SA, Lucero OM, Sampson JE, et al. Identification, genetic testing, and management of hereditary melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2017; 36(1): 77–90, doi: 10.1007/s10555-017-9661-5, indexed in Pubmed: 28283772.
19. Casula M, Paliogiannis P, Ayala F, et al. Melanoma Unit of Sassari (MUS), Italian Melanoma Intergroup (IMI). Germline and somatic mutations in patients with multiple primary melanomas: a next generation sequencing study. *BMC Cancer*. 2019; 19(1): 772, doi: 10.1186/s12885-019-5984-7, indexed in Pubmed: 31382929.
20. Helgadottir H, Rocha Troccoli Drakensjö I, Girnita A. Personalized Medicine in Malignant Melanoma: Towards Patient Tailored Treatment. *Front Oncol*. 2018; 8: 202, doi: 10.3389/fonc.2018.00202, indexed in Pubmed: 29946532.
21. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med*. 2012; 10: 85, doi: 10.1186/1479-5876-10-85, indexed in Pubmed: 22554099.
22. Cheng L, Lopez-Beltran A, Massari F, et al. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. *Mod Pathol*. 2018; 31(1): 24–38, doi: 10.1038/modpathol.2017.104, indexed in Pubmed: 29148538.
23. Mikula H, Stapleton S, Kohler RH, et al. Design and Development of Fluorescent Vemurafenib Analogs for Imaging. *Theranostics*. 2017; 7(5): 1257–1265, doi: 10.7150/thno.18238, indexed in Pubmed: 28435463.
24. Palmieri G, Colombino M, Casula M, et al. Italian Melanoma Intergroup (IMI). Molecular Pathways in Melanomagenesis: What We Learned from Next-Generation Sequencing Approaches. *Curr Oncol Rep*. 2018; 20(11): 86, doi: 10.1007/s11912-018-0733-7, indexed in Pubmed: 30218391.
25. Gutiérrez-Castañeda LD, Nova JA, Tovar-Parra JD. Frequency of mutations in BRAF, NRAS, and KIT in different populations and histological subtypes of melanoma: a systemic review. *Melanoma Res*. 2020; 30(1): 62–70, doi: 10.1097/CMR.0000000000000628, indexed in Pubmed: 31274706.
26. Hélias-Rodzewicz Z, Funck-Brentano E, Terrones N, et al. Variation of mutant allele frequency in NRAS Q61 mutated melanomas. *BMC Dermatol*. 2017; 17(1): 9, doi: 10.1186/s12895-017-0061-x, indexed in Pubmed: 28668077.
27. Fedorenko IV, Gibney GT, Smalley KSM. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene*. 2013; 32(25): 3009–3018, doi: 10.1038/onc.2012.453, indexed in Pubmed: 23069660.
28. Muñoz-Couselo E, Adelantado EZ, Vélez CO, et al. NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. *OncoTargets and Therapy*. 2017; Volume 10: 3941–3947, doi: 10.2147/ott.s117121.
29. Jakob JA, Bassett RL, Ng CS, et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer*. 2012; 118(16): 4014–4023, doi: 10.1002/ncr.26724, indexed in Pubmed: 22180178.
30. Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015; 161(7): 1681–1696.
31. Aguiusa-Touré AH, Li G. Genetic alterations of PTEN in human melanoma. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69(9): 1475–1491, doi: 10.1007/s00018-011-0878-0, indexed in Pubmed: 22076652.
32. Ma X, Wu Y, Zhang T, et al. The clinical significance of mutations in metastatic oral mucosal melanoma in China. *Oncotarget*. 2017; 8(47): 82661–82673, doi: 10.18632/oncotarget.19746, indexed in Pubmed: 29137292.

33. Pham DD, Guhan S, Tsao H. KIT and Melanoma: Biological Insights and Clinical Implications. *Yonsei Med J.* 2020; 61(7): 562–571, doi: 10.3349/ymj.2020.61.7.562, indexed in Pubmed: 32608199.
34. Pracht M, Mogha A, Lespagnol A, et al. Prognostic and predictive values of oncogenic BRAF, NRAS, c-KIT and MITF in cutaneous and mucous melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015; 29(8): 1530–1538, doi: 10.1111/jdv.12910, indexed in Pubmed: 25623140.
35. Sheng X, Kong Y, Li Y, et al. GNAQ and GNA11 mutations occur in 9.5% of mucosal melanoma and are associated with poor prognosis. *Eur J Cancer.* 2016; 65: 156–163, doi: 10.1016/j.ejca.2016.06.019, indexed in Pubmed: 27498141.
36. Livingstone E, Zarella A, Horn S, et al. GNAQ and GNA11 mutant non-ocular melanoma: a subtype distinct from both cutaneous and uveal melanoma. *Br J Dermatol.* 2020; 183(5): 928–939, doi: 10.1111/bjd.18947, indexed in Pubmed: 32064597.
37. Michielin O, van Akkooi A, Lorigan P, et al. ESMO consensus conference recommendations on the management of locoregional melanoma: under the auspices of the ESMO Guidelines Committee. *Ann Oncol.* 2020; 31(11): 1449–1461, doi: 10.1016/j.annonc.2020.07.005, indexed in Pubmed: 32763452.
38. Coit DG, Thompson JA, Albertini MR, et al. Cutaneous melanoma, version 2. *JNCCN.* 2019; 17: 367–402.
39. Vanni I, Tanda ET, Spagnolo F, et al. The Current State of Molecular Testing in the BRAF-Mutated Melanoma Landscape. *Front Mol Biosci.* 2020; 7: 113, doi: 10.3389/fmolb.2020.00113, indexed in Pubmed: 32695793.
40. Marczyński GT, Laus AC, Dos Reis MB, et al. Circulating tumor DNA (ctDNA) detection is associated with shorter progression-free survival in advanced melanoma patients. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 18682, doi: 10.1038/s41598-020-75792-1, indexed in Pubmed: 33122747.