

Geny *BRAF*, *NRAS*, *HRAS* w liniach komórkowych czerniaka ludzkiego

BRAF, *NRAS*, *HRAS* genes profile in human melanoma cell lines

Rafał Czajkowski^{1,2}, Waldemar Placek³, Tadeusz Tadrowski³, Marta Pokrywczyńska², Barbara Zegarska^{1,4}, Tomasz Drewa²

¹Wojewódzka Przychodnia Dermatologiczna w Bydgoszczy

Dyrektor: dr med. Barbara Zegarska

²Zakład Inżynierii Tkankowej Katedry Biologii Medycznej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Kierownik: prof. dr hab. med. Gerard Drewa

³Katedra i Klinika Dermatologii, Chorób Przenoszonych Drogą Płciową i Immunodermatologii

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Kierownik: prof. dr hab. med. Waldemar Placek

⁴Zakład Kosmetyki Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Kierownik: prof. dr n. med. Barbara Zegarska

Przegl Dermatol 2009, 96, 265–270

STRESZCZENIE

SŁOWA KLUCZOWE:

czerniak złośliwy, patogeneza, *BRAF*, *RAS*.

KEY WORDS:

melanoma, pathogenesis, *BRAF*, *RAS*.

Wprowadzenie. Czerniak złośliwy jest nowotworem wywodzącym się z melanocytów. Wzrost liczby zachorowań na ten nowotwór skłania badaczy do szukania defektów w materiale genetycznym, które mogą prowadzić do inicjacji procesu nowotworowego. Geny kodujące białka drogi sygnałowej Ras/Raf/MEK/ERK są często uszkodzone w komórkach wielu różnych nowotworów.

Cel pracy. Analiza molekularna linii komórkowych czerniaka ludzkiego w zakresie wybranych eksonów genów *BRAF*, *NRAS* i *HRAS*.

Materiał i metodyka. Badaniu PCR poddano siedem linii komórkowych czerniaka ludzkiego. Grupę kontrolną stanowiły leukocyty krwi obwodowej zdrowych ochotników.

Wyniki. We wszystkich liniach komórkowych czerniaka stwierdzono uszkodzenia eksonów w zakresie badanych genów. Nie odnotowano mutacji w zakresie badanych eksonów w grupie kontrolnej.

Wnioski. Uzyskane wyniki sugerują możliwy udział genów *BRAF* i *RAS* w patogenezie czerniaka złośliwego.

ABSTRACT

Introduction. Malignant melanoma is a neoplasm arising from melanocytes. Researchers are still looking for genome mutations responsible for oncogenesis initiation, because of the increasing number of melanoma patients. Genes encoding proteins of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway are often defective in multiple different neoplasms.

Objective. Molecular analysis of selected exons of *BRAF*, *NRAS*, *HRAS* genes in human melanoma cell lines.

Material and methods. Seven human melanoma cell lines were tested with the PCR method. The blood leucocytes of healthy volunteers were used as a control.

Results. Defects of exons were observed in all melanoma cells lines. No mutations were found in exons of controls.

Conclusions. Results suggest a possible role of *BRAF* and *RAS* genes in malignant melanoma pathogenesis.

ADRES DO KORESPONDENCJI:

dr med. Rafał Czajkowski
Katedra Biologii Medycznej,
Zakład Inżynierii Tkankowej
Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika
w Toruniu, ul. Karłowicza 24
85-092 Bydgoszcz
tel./faks +48 52 585 37 37

WPROWADZENIE

Czerniak złośliwy wywodzi się z komórek barwnikowych (melanocytów). W życiu płodowym melanoblasty wędrują z cewy nerwowej do skóry, układu nerwowego, błon śluzowych, ucha wewnętrznego oraz naczyńwłókna oka i dlatego czerniak, który najczęściej lokalizuje się w skórze, może również powstawać w obrębie innych tkanek zawierających melanocyty, np. w naczyńwłókna oka [1].

Od kilkudziesięciu lat obserwuje się zwiększoną zachorowalność na ten nowotwór. Czynniki prowadzące do transformacji nowotworowej melanocytów nie są do końca poznane. Oparzenia słoneczne w dzieciństwie stanowią najpoważniejszy czynnik ryzyka zwiększający prawdopodobieństwo wystąpienia tego nowotworu [2]. Zwiększenie liczby zachorowań na czerniaka złośliwego obserwuje się również u pacjentów poddanych fototerapii [3]. Innymi czynnikami ryzyka są m.in.: zaawansowany wiek, I i II fototyp skóry według Fitzpatricka, zespół znamion atypowych i znamion wrodzonych olbrzymich, ekspozycja na promieniowanie jonizujące, immunosupresja oraz niektóre zaburzenia genetyczne, takie jak *xeroderma pigmentosum* [1]. Zwiększone ryzyko rozwoju czerniaka złośliwego zaobserwowano wśród pracowników narażonych na działanie chloru winylu, pracowników przemysłu naftowego oraz osób zakażonych wirusami brodawczaka ludzkiego (HPV 16, HPV 18, HPV 24, HPV 31, DL284, DL297, DL436) [4–6]. Rodzinne występowanie czerniaka stwierdza się w około 10% przypadków [7].

Mechanizm inicjacji nowotworowej oraz udział poszczególnych genów w progresji nowotworu są tematem wielu opracowań na temat jego patogenezy. W procesie inicjacji i progresji choroby znaczącą rolę odgrywa uszkodzenie genów kodujących białka regulatorowe cyklu komórkowego (zwłaszcza fazy G₁), apoptozy i melanogenezy. W ostatnich latach w badaniach nad patogenezą czerniaka coraz większą uwagę zwraca się na drogę sygnałową Ras/Raf/MEK/ERK, której poszczególne elementy są uszkodzone w komórkach czerniaka złośliwego o małym stopniu zaawansowania klinicznego. Obserwacje te sugerują udział genów *BRAF*, *NRAS*, *KRAS* i *HRAS* w mechanizmie inicjacji onkogenezy.

Homeostaza komórki barwnikowej zależy od równowagi między procesami proliferacji, nekrozy i apoptozy. Promieniowanie ultrafioletowe oraz inne czynniki ryzyka mogą prowadzić do zaburzeń regulacji cyklu komórkowego. Melanocyty, które „uwolniły się” spod kontroli proliferacji, ulegają szybkim podziałom. Liczba komórek z uszkodzonym aparatem genetycznym zwiększa się, a szybko przebiegający cykl komórkowy sprzyja powstawaniu nowych mutacji. Czas trwania cyklu komórkowego zależy głównie od fazy G₁, która podlega kontroli sprawowanej przez protoonkogeny i antyonkogeny wchodzące w skład dróg regulacyjnych z udziałem białek

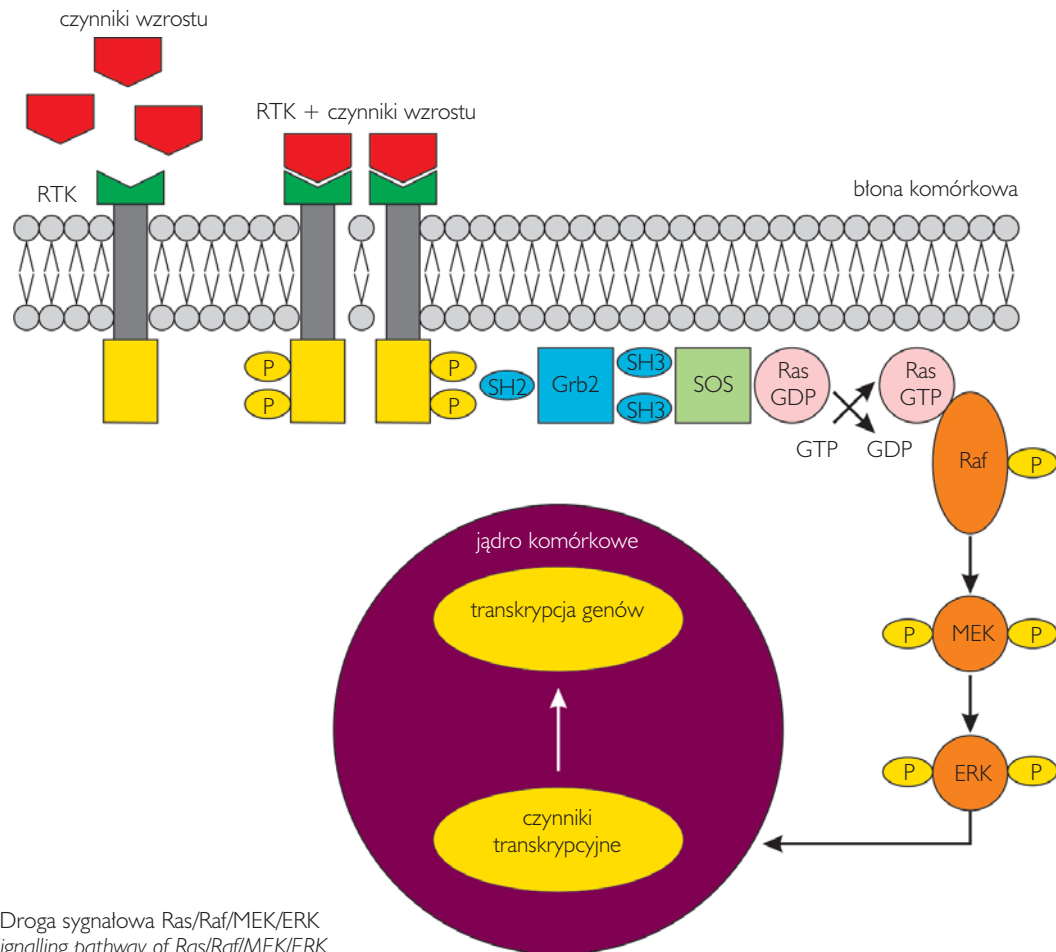
pRb oraz p53. Nieprawidłowe funkcjonowanie białek regulatorowych cyklu komórkowego jest istotnym elementem w inicjacji i progresji nowotworu, dlatego niektórzy autorzy uważają chorobę nowotworową za chorobę zaburzonego cyklu komórkowego [8].

Droga sygnałowa Ras/Raf/MEK/ERK

Droga sygnałowa ERK występuje we wszystkich komórkach eukariotycznych i kontroluje procesy proliferacji, migracji, różnicowania oraz apoptozy (ryc. 1.). Aktywacja jej odbywa się z udziałem wielu czynników wzrostu, hormonów, czynników odpowiedzialnych za różnicowanie komórek oraz czynników onkogennych. Czynniki zewnątrzkomórkowe przyłączają się do odpowiednich receptorów RTK (ang. *receptor tyrosin kinase*), powodując dimeryzację receptorów i autofosforylację reszt tyrozynowych. Ufosforylowane reszty tyrozynowe wiążą się z białkiem Grb2 (ang. *growth-factor-receptor-bound protein 2*). Białko Grb2 łączy się w kompleks z czynnikiem wymiany GDP/GTP, tzw. SOS (ang. *son of sevenless*), i przenosi go do błony komórkowej [9].

Białka Ras (należące do białek G) są produktem ekspresji trzech genów (*N-Ras*, *K-Ras*, *H-Ras*) i licznych modyfikacji potranslacyjnych, takich jak: prenylacja, proteoliza, metylacja i palmitylacja. Białka Ras związane z guanozynodwufosforanem (GDP) są nieaktywne. Ich aktywacja następuje po uwolnieniu GDP i przyłączeniu guanozynotrójfosforanu (GTP). Proces ten zachodzi z udziałem czynnika wymiany SOS. Jedną z dróg sygnałowych związanych z białkiem Ras jest rodzina białek o aktywności kinaz serynowo/treoninowych, tzw. MAPKs (ang. *mitogen activated protein kinases*). Aktywne białko Ras przyłącza się do białek Raf (A-Raf, B-Raf, C-Raf/Raf1) i przenosi je do błony komórkowej. Do aktywacji białka B-Raf wystarczy utworzenie kompleksu z białkiem Ras, podczas gdy do aktywacji innych białek Ras konieczne są dodatkowe czynniki. Białko B-Raf inicjuje kaskadę fosforylacji, która dotyczy białek MEK1 i MEK2, a następnie ERK1 i ERK2. W cząsteczkach ERK1 fosforylacji ulegają dwie reszty serynowe, a w cząsteczkach ERK2 motyw Thr-Glu-Tyr znajdujący się w pętli aktywacyjnej. Białka ERK stanowią ostatni punkt drogi sygnałowej Ras/Raf/MEK/ERK. W postaci ufosforylowanej kontrolują wiele procesów w obrębie cytozolu, a także przenikają do jądra komórkowego, gdzie regulują ekspresję genów przez fosforylację i aktywację wielu czynników transkrypcyjnych. Wśród genów kontrolowanych przez drogę sygnałową Ras/Raf/MEK/ERK znajdują się geny kodujące białka odpowiedzialne za regulację fazy G₁ cyklu komórkowego. Zaburzenia regulacji cyklu komórkowego są jednym z mechanizmów inicjujących przekształcenie prawidłowego melanocytu w komórkę czerniaka złośliwego [10].

Białka Ras odpowiadają również za aktywację innych dróg sygnałowych, takich jak MEKK/SEK/JNK (ang. *jun N-terminal kinases*), PI3K (ang. *phosphatidy-*



Ryc. 1. Droga sygnałowa Ras/Raf/MEK/ERK
Fig. 1. Signalling pathway of Ras/Raf/MEK/ERK

inositol 3-kinase)/Akt/NF-KappaB (ang. *nuclear factor-kappa B*), p120-GAP/p190-B/Rac/NF-KappaB, Raf/MEKK1/IKK (ang. *I-kappaB kinase*)/I-KappaB/NF-KappaB. Budowa liganda aktywującego białko Ras oraz typ drogi przekazującej sygnał do wnętrza komórki decyduje o rodzaju odpowiedzi na działający bodziec. Aktywacja drogi Ras/Raf/MEK/ERK odgrywa zasadniczą rolę w regulacji proliferacji i w procesie apoptozy, podczas gdy przekazywanie sygnału drogą PI3K/Akt/NF-KappaB chroni komórkę przed śmiercią [11] (ryc. 1).

CEL PRACY

Analiza molekularna w zakresie eksonu 2 i 3 (geny *NRAS*, *HRAS*) oraz eksonu 11 i 15 (gen *BRAF*) w liniach komórkowych czerniaka ludzkiego.

MATERIAŁ I METODYKA

W wybranych liniach komórkowych czerniaka ludzkiego przeprowadzono analizę molekularną w zakresie eksonu 2 i 3 (geny *NRAS*, *HRAS*) oraz eksonu 11 i 15 (gen *BRAF*). Grupę kontrolną stanowiły leukocyty krwi

obwodowej 10 ochotników. Opis analizowanych siedmiu linii komórkowych czerniaka ludzkiego przedstawiono w tabeli I.

Reakcja PCR

Materiał genetyczny izolowano za pomocą zestawu do izolacji genomowego DNA GENOMIC MINI według załączonego protokołu.

Ocenę stężenia i czystości uzyskanego materiału wykonano, wykorzystując właściwości spektrofotometryczne DNA. Analizę czystości i stężenia DNA przeprowadzono za pomocą aparatu Gene Ray UV Photometr (Biometria). Stosunek absorbancji fal o długości od 260 do 280 nm był miarą czystości uzyskanego roztworu DNA (A_{260}/A_{280}). Wartość współczynnika A_{260}/A_{280} mieszcząca się w przedziale 1,7–2 świadczyła o prawidłowej czystości roztworu DNA.

Stężenie DNA dwuniciowego obliczano, wykorzystując wzór:

$$C [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 50 \times R \text{ (rozcieńczenie)}$$

1 OD (jednostka optyczna) dla dwuniciowego DNA = 50.

Stopień degradacji DNA oceniano za pomocą elektroforyzy w żelu agarozowym.

Tabela I. Linie komórkowe czerniaka ludzkiego**Table I.** Human melanoma cell lines

Linia komórkowa	Płeć	Wiek [lata]	Tkanka	Morfologia
WM1552C	M	72	skóra	wrzecionowata
WM278	K	62	skóra	epitelialna
WM39	M	brak danych	skóra	wrzecionowata
SK-MEL-28	M	51	skóra	poligonalna
SK-MEL-31	K	brak danych	skóra	epitelialna
A-375	K	54	skóra	epitelialna
A375.S2	K	54	skóra	epitelialna

Etapy reakcji PCR – SSCP

Reakcja PCR

Skład mieszaniny na jedną próbę (V = 20 µl):

- polimeraza Taq – 0,16 µl,
- startery – 0,5 µl (każdy),
- dNTP's – 1,6 µl,
- bufor zawierający jony Mg²⁺ – 2 µl,
- woda – 6,24 µl,
- matryca DNA – 9 µl.

Warunki reakcji PCR:

- 1) wstępna denaturacja 95°C – 5 minut,
- 2) denaturacja 95°C – 1 minuta,
- 3) przyłączanie starterów 53°C – 30 sekund,
- 4) elongacja 72°C – 2 minuty,
- 5) cykl powtarzany 40× od etapu 2.,
- 6) końcowe wydłużanie 72°C – 10 minut,
- 7) inkubacja w 4°C do wyciągnięcia prób.

Reakcje przeprowadzono z użyciem termocyklera Eppendorf Master-Personal.

Reakcja SSCP

Po zakończonej reakcji PCR do produktu dodawano 5 µl buforu denaturującego firmy BioRad. Całość inkubowano w temperaturze 98°C przez 10 minut, a następnie przenoszono na lód do momentu naniesienia na żel. Następnie dokonywano rozdzielania elektroforetycznego.

Analiza produktów PCR – SSCP

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w 10-procentowym żelu PAA (29 : 1) w buforze 1XTAE. Czas rozdzielania wynosił 4 godziny, a moc 10 W. Przez cały proces utrzymywano temperaturę nieprzekraczającą 10°C.

Do uwidocznienia produktów na żelu wykorzystano ich zdolność do wiązania się ze srebrem. Wyniki oceniały i archiwizowano za pomocą zestawu UVP.

WYNIKI

Wyniki badania molekularnego linii komórkowych czerniaka ludzkiego metodą PCR przedstawiono w tabeli II. We wszystkich siedmiu liniach komórkowych stwierdzono uszkodzenia eksonów w zakresie badanych genów. Nie odnotowano mutacji w zakresie badanych eksonów w grupie kontrolnej.

OMÓWIENIE

Podłoże genetyczne czerniaka jest przedmiotem intensywnych badań prowadzonych przez liczne ośrodki naukowe. Zidentyfikowano wiele genów zaangażowanych w proces transformacji nowotworowej oraz predisponujących do zachorowania na czerniaka.

Istotne znaczenie w inicjacji i progresji czerniaka mają protoonkogeny – *NRAS*, *BRAF*, *KIT*, *CDK4*,

Tabela II. Wyniki badania metodą PCR linii komórkowych czerniaka ludzkiego**Table II.** Results of PCR on human melanoma cell lines

Linia komórkowa	BRAF		NRAS		HRAS	
	ekson 11	ekson 15	ekson 2	ekson 3	ekson 2	ekson 3
WM1552C	+	+	+	+	+	+
WM278	+	+	+	+	+	+
WM39	+	+	+	+	+	+
SK-MEL-28	+	+	+	+	+	+
SK-MEL-31	+	+	+	+	+	+
A-375	-	-	+	+	+	+
A375.S2	-	-	+	-	+	+

CTN NB1, MITF, CCND1, PIK3CA, AKT – oraz geny supresorowe *INK4A, ARF, PTEN i TP53*. Uszkodzenia protoonkogenów oraz genów supresorowych prowadzą do zaburzeń sygnałowych kontrolujących procesy wzrostu, różnicowania i apoptozy [12, 13].

Najczęściej występującą w komórkach czerniaka zmianą genetyczną skutkującą zaburzeniami w drodze sygnałowej Ras/Raf/MEK/ERK jest mutacja w genie *BRAF*, którą stwierdza się w 10–80% przypadków czerniaka [14, 15]. Mutacje w genie *BRAF* występują częściej w czerniakach w fazie wzrostu wertykalnego i w czerniakach przerzutowych (62–80%) w porównaniu z czerniakami w fazie wzrostu powierzchniowego (10–33%) [14–16]. Dużą (70–88%) częstość mutacji genu *BRAF* stwierdza się w znamionach barwnikowych, co może wskazywać na udział onkogenu *BRAF* w inicjacji czerniaka [17]. Mutacje w genie *BRAF* mają charakter substytucji i występują w egzonie 11 lub 15. Najczęściej spotykanym defektem genu *BRAF* jest mutacja w eksonie 15 (zamiana waliny na kwas glutaminowy, lizynę, argininę lub kwas asparaginowy w kodonie 599 lub 600) [14, 17].

W przeprowadzonym badaniu mutację genu *BRAF* stwierdzono w 5 (71%) z 7 analizowanych linii komórkowych. Wyniki te są porównywalne z wynikami badań Daviesa i wsp., w których mutację genu *BRAF* zidentyfikowano w 6 (67%) z 9 linii komórkowych czerniaka [14].

Istotne znaczenie w transformacji nowotworowej czerniaka mają geny należące do rodziny genów *RAS*. Onkogenne mutacje w genach *RAS* stwierdzono również w wielu innych nowotworach, m.in. w raku trzustki, okrężnicy, tarczycy, płuc, gruczolakoraku żołądka oraz w ostrej białaczce szpikowej [18]. Mutacje w genach *NRAS* dotyczą kodonów 11, 12, 13 i 18 w eksonie 1 oraz 59 i 61 w eksonie 2. Najczęściej stwierdzaną mutacją jest substytucja glutaminy przez lizynę bądź argininę w kodonie 61 [19]. Mutacje genu *NRAS* stwierdza się w 5–37% przypadków czerniaka sporadycznego [20–31]. Wykazano, że mutacje w genie *NRAS* występują częściej w rodzinnych niż w sporadycznych czerniakach. Mutacje w kodonie 61 genu *NRAS* wykryto w 95% przypadków czerniaka z mutacją germinálną genu *CDKN2A* [32]. Mutacje w genie *NRAS* zidentyfikowano w różnych stadiach rozwoju czerniaka: w czerniaku przedinwazyjnym (*melanoma in situ*), czerniaku pierwotnym o wzroście obwodowym oraz w fazie przerzutowej czerniaka. Zaobserwowano, że mutacje w eksonie 1 genu *NRAS* występują częściej w fazie inicjacji nowotworowej, natomiast mutacje w eksonie 2 w późniejszych fazach rozwoju czerniaka [33]. Ugurel i wsp. zidentyfikowali mutacje genu *NRAS* w 26 (24,8%) ze 105, natomiast Reifnberger i wsp. w 2 (33%) z 6 analizowanych linii komórkowych czerniaka [34, 35]. We wszystkich 7 badanych przez autorów niniejszego opracowania liniach komórkowych czerniaka stwierdzono obecność mutacji w genie *NRAS*. Porównywalnie dużą

(80%) częstość mutacji w genie *NRAS* odnotowano we wrodzonych znamionach melanocytowych [36].

Mutacje w genach *HRAS* i *KRAS* w czerniakach stwierdza się bardzo rzadko. Demunter i wsp. [33] przeprowadzili badanie mające na celu ocenę częstości występowania mutacji genu *KRAS* w czerniaku. Badaniu poddano 69 pierwotnych czerniaków złośliwych, 35 czerniaków przerzutowych oraz 7 melanocytowych znamion komórkowych. W żadnym ze 111 analizowanych przypadków nie odnotowano mutacji w genie *KRAS* [33].

Reifnberger i wsp. [35] w 1 z 37 analizowanych przypadków czerniaka zidentyfikowali mutację w eksonie 1 genu *KRAS* o charakterze substytucji glicyny przez kwas asparaginowy w kodonie 12. Mutację genu *KRAS* wykryto u pacjenta z czerniakiem i przerzutami do mózgu. W żadnym z 37 analizowanych przypadków nie stwierdzono mutacji genu *HRAS* [35]. Shukla i wsp. [24] zidentyfikowali w 3 z 22 analizowanych przypadków czerniaka pierwotnego mutację w eksonie 1 genu *KRAS*. W jednym przypadku zidentyfikowano również mutację w eksonie 1 genu *HRAS* [24]. Znacząco większą w porównaniu z czerniakiem częstość mutacji genu *HRAS* równą 29% zaobserwowano w znamionach Spitz [37].

Większość autorów jest zgodna co do tego, że mutacje *NRAS* i *BRAF* wzajemnie się wykluczają [14, 38]. W badaniu przeprowadzonym przez Goel i wsp. jednoczesne występowanie mutacji *BRAF* i *NRAS* stwierdzono w 2 z 69 analizowanych przypadków czerniaka [39]. W przeprowadzonym przez autorów badaniu w 5 z 7 analizowanych linii komórkowych czerniaka odnotowano jednoczesne występowanie mutacji w genach *BRAF*, *NRAS* i *HRAS*. Wyniki te nie potwierdzają teorii wzajemnego wykluczenia się mutacji w zakresie badanych genów.

Analiza udziału drogi sygnałowej Ras/Raf/MEK/ERK w patogenezie czerniaka wymaga dalszych badań, których wyniki mogą przyczynić się do opracowania metod skutecznego leczenia tego nowotworu.

Piśmiennictwo

1. **Negrier S., Fervers B., Bailly C., Beckendorf V., Cupissol D., Dalac S. i inni:** Cutaneous melanoma. *Br J Cancer* 2001, 84 (Supl. 2), 81-85.
2. **Gilcrest B.A., Eller M.S., Geller A.C., Yaar M.:** The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 1999, 340, 1341-1348.
3. **Stern R.S.:** PUVA follow up study. The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *J Am Acad Dermatol* 2001, 44, 755-761.
4. **Langård S., Rosenberg J., Andersen A., Heldaas S.S.:** Incidence of cancer among workers exposed to vinyl chloride in polyvinyl chloride manufacture. *Occup Environ Med* 2000, 57, 65-68.
5. **Wong O., Raabe G.K.:** A critical review of cancer epidemiology in the petroleum industry, with a meta-analysis of a combined database of more than 350,000 workers. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000, 32, 78-98.
6. **Miracco C., Palumbo N., Laverne D., Nyongo A., Tosi P., de Villiers E.M.:** Malignant melanomas: search for human papillomaviruses. *Arch Dermatol* 2001, 137, 826-827.

7. **Piepkorn M.:** Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *J Am Acad Dermatol* 2000, 42, 705-722.
8. **Bartek J., Lukas J., Bartkova J.:** Perspective: defects in cell cycle control and cancer. *J Pathol* 1999, 187, 95-99.
9. **Aoki Y., Niihori T., Narumi Y., Kure S., Matsubara Y.:** The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat* 2008, 29, 992-1006.
10. **Haluska F., Pemberton T., Ibrahim N., Kalinsky K.:** The RTK/RAS/BRAF/PI3K pathways in melanoma: biology, small molecule inhibitors, and potential applications. *Semin Oncol* 2007, 34, 546-554.
11. **Haluska F.G., Tsao H., Wu H., Haluska F.S., Lazar A., Goel V.:** Genetic alterations in signaling pathways in melanoma. *Clin Cancer Res* 2006, 12, 2301S-2307S.
12. **Dahl C., Guldborg P.:** The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS* 2007, 115, 1161-1176.
13. **Takata M., Saida T.:** Genetic alterations in melanocytic tumors. *J Dermatol Sci* 2006, 43, 1-10.
14. **Davies H., Bignell G.R., Cox C.:** Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002, 417, 949-954.
15. **Dong J., Phelps R.G., Qiao R., Yao S., Benard O., Ronai Z. i inni:** BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. *Cancer Res* 2003, 63, 3883-3885.
16. **Sasaki Y., Niu C., Makino R., Kudo C., Sun C., Watanabe H. i inni:** BRAF point mutations in primary melanoma show different prevalences by subtype. *J Invest Dermatol* 2004, 123, 177-183.
17. **Pollock P.M., Harper U.L., Hansen K.S., Yudt L.M., Stark M., Robbins C.M. i inni:** High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2002, 33, 19-20.
18. **O'Hara B.M., Oskarsson M., Tainsky M.A., Blair D.G.:** Mechanism of activation of human ras genes cloned from a gastric adenocarcinoma and a pancreatic carcinoma cell line. *Cancer Res* 1986, 46, 4695-4700.
19. **Omholt K., Karsberg S., Platz A., Kanter L., Ringborg U., Hansson J.:** Screening of N-ras codon 61 mutations in paired primary and metastatic cutaneous melanomas: mutations occur early and persist throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* 2002, 8, 3468-3474.
20. **van Elsas A., Zerp S.F., van der Flier S., Krüse K.M., Aarnoudse C., Hayward N.K. i inni:** Relevance of ultraviolet-induced N-ras oncogene point mutations in development of primary human cutaneous melanoma. *Am J Pathol* 1996, 149, 883-893.
21. **Raybaud F., Noguchi T., Marics I., Adelaide J., Planche J., Batoz M. i inni:** Detection of a low frequency of activated ras genes in human melanomas using a tumorigenicity assay. *Cancer Res* 1988, 48, 950-953.
22. **Van't Veer L.J., Burgering B.M., Versteeg R., Boot A.J., Ruiter D.J., Osanto S. i inni:** N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *Mol Cell Biol* 1989, 9, 3114-3116.
23. **Albino A.P., Nanus D.M., Mentle I.R., Cordon-Cardo C., McNutt N.S., Bressler J. i inni:** Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene* 1989, 4, 1363-1374.
24. **Shukla V.K., Hughes D.C., Hughes L.E., McCormick F., Padua R.:** Ras mutations in human melanotic lesions: K-ras activation is a frequent and early event in melanoma development. *Oncogene Res* 1989, 5, 121-127.
25. **Ball N.J., Yohn J.J., Morelli J.G., Norris D.A., Golitz L.E., Hoeffler J.P.:** RAS mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *J Invest Dermatol* 1994, 102, 285-290.
26. **Carr J., Mackie R.M.:** Point mutations in the N-ras oncogene in malignant melanoma and congenital naevi. *Br J Dermatol* 1994, 131, 72-77.
27. **Platz A., Ringborg U., Månsson Brahme E., Lagerlöf B.:** Melanoma metastases from patients with hereditary cutaneous malignant melanoma contain a high frequency of N-ras activating mutations. *Melanoma Res* 1994, 4, 169-177.
28. **Jafari M., Papp T., Kirchner S., Diener U., Henschler D., Burg G. i inni:** Analysis of ras mutations in human melanocytic lesions: activation of the ras gene seems to be associated with the nodular type of human malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995, 121, 23-30.
29. **Platz A., Sevigny P., Norberg T., Ring P., Lagerlöf B., Ringborg U.:** Genes involved in cell cycle G1 checkpoint control are frequently mutated in human melanoma metastases. *Br J Cancer* 1996, 74, 936-941.
30. **Jiveskog S., Ragnarsson-Olding B., Platz A., Ringborg U.:** N-ras mutations are common in melanomas from sun-exposed skin of humans but rare in mucosal membranes or unexposed skin. *J Invest Dermatol* 1998, 111, 757-761.
31. **Demunter A., Ahmadian M.R., Libbrecht L., Stas M., Baens M., Scheffzek K. i inni:** A novel N-ras mutation in malignant melanoma is associated with excellent prognosis. *Cancer Res* 2001, 61, 4916-4922.
32. **Eskandarpour M., Hashemi J., Kanter L., Ringborg U., Platz A., Hansson J.:** Frequency of UV-inducible NRAS mutations in melanomas of patients with germline CDKN2A mutations. *J Natl Cancer Inst* 2003, 95, 790-798.
33. **Demunter A., Stas M., Degreef H., De Wolf-Peters C., van den Oord J.J.:** Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *J Invest Dermatol* 2001, 117, 1483-1489.
34. **Ugurel S., Thirumaran R.K., Bloethner S., Gast A., Sucker A., Mueller-Berghaus J. i inni:** B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. *PLoS ONE* 2007, 2: e236.
35. **Reifenberger J., Knobbe C.B., Sterzinger A.A., Blaschke B., Schulte K.W., Ruzicka T. i inni:** Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas. *Int J Cancer* 2004, 109, 377-384.
36. **Bauer J., Curtin J.A., Pinkel D., Bastian B.C.:** Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. *J Invest Dermatol* 2007, 127, 179-182.
37. **van Dijk M.C., Bernsen M.R., Ruiter D.J.:** Analysis of mutations in B-RAF, N-RAS, and H-RAS genes in the differential diagnosis of Spitz nevus and spitzoid melanoma. *Am J Surg Pathol* 2005, 29, 1145-1151.
38. **Tsao H., Zhang X., Fowlkes K., Haluska F.G.:** Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res* 2000, 60, 1800-1804.
39. **Goel V.K., Lazar A.J., Warneke C.L., Redston M.S., Haluska F.G.:** Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2006, 126, 154-160.

Otrzymano: 29 V 2009 r.

Zaakceptowano: 9 VI 2009 r.