

**Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt
Polskiej Akademii Nauk**

mgr Magdalena Śmiech

**Badanie wpływu wybranych mutacji genu *BRAF* na rozwój nowotworu wątroby
– badania modelowe z wykorzystaniem linii komórkowych ssaków**

**Evaluation of the impact of selected mutations of the *BRAF*-gene on the development
of liver cancer – model studies on genetically modified mammalian cell lines**

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Promotor:

Prof. dr hab. Mariusz Pierzchała

Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt
Polskiej Akademii Nauk

Promotor pomocniczy:

Dr Hiroaki Taniguchi

Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt
Polskiej Akademii Nauk

Recenzenci:

Dr hab. Monika Dragan

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr hab. Roman Paduch

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Praca została wykonana w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki **PRELUDIUM 13** o numerze: 2017/25/N/NZ5/01885 i współfinansowana przez Konsorcjum Naukowe „Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność” **Krajowy Naukowy Ośrodek Wiedzący (KNOW)** o numerze: KNOW/IGHZ/RPB/WEW/2017/03.

Oryginał rozprawy doktorskiej został przygotowany w języku angielskim.

STRESZCZENIE

Wzrastający poziom zachorowań na nowotwory wątroby, który można obecnie zaobserwować u ludzi, jak również u zwierząt towarzyszących takich jak psy, skłania do podjęcia szczegółowych badań wyjaśniających ich molekularne podłoże. Indukcja oraz rozwój procesów nowotworowych zależy od wystąpienia specyficznych mutacji w danej tkance. W tym względzie również patogeneza raka wątroby może być związana z mutacjami w genach supresji nowotworowej lub w proto-onkogenach.

Na podstawie analiz bazy danych przedstawionych przez Międzynarodowe Konsorcjum Genomu Raka, wykazano występowanie dużej liczby mutacji, których wpływ na rozwój raka nie został dotychczas dokładnie zbadany. Sekwencjonowanie DNA wyizolowanego z próbek wątroby objętych procesem nowotworowym, dostarczyło nowych informacji na temat występujących mutacji w różnych genach, w tym zidentyfikowanych w znacznej liczbie w proto-onkogenie *BRAF* (ang. *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*). Z danych literaturowych wiadomo, że mutacje somatyczne genu *BRAF* związane są dużej mierze z rozwojem wielu nowotworów różnych narządów i tkanek w tym m.in. raka tarczycy, jajnika, płuc, jelita grubego oraz czerniaka.

Białko kodowane przez ten gen jest jednym z kluczowych komponentów szlaku sygnałowego kinaz białkowych aktywowanych mitogenami/kinaz regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. *mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases*, MAPK/ERK). Ten szlak sygnałowy nadzoruje wiele różnych procesów komórkowych, w tym proliferację, różnicowanie, apoptozę oraz odpowiedź na stres. Najczęściej występującą mutacją, powodującą silną aktywację tej ścieżki, a w konsekwencji też rozregulowanie podstawowych funkcji w komórce, jest *BRAF V600E*. Ze względu na to, że mutacja ta została po raz pierwszy wykryta w próbkach pobranych od pacjentów z rakiem wątroby, zbadaliśmy wpływ *BRAF V600E* na zmiany w funkcjonowaniu hepatocytów z zastosowaniem modelu badań *in vitro*. W szczególności głównym celem pracy było określenie wpływu nowych mutacji genu *BRAF* na proces złośliwej transformacji komórek wątroby, oraz wskazanie genów deregulowanych i potencjalnych szlaków z nimi związanych. Ponadto, przeprowadziliśmy analizę funkcjonalną innych zidentyfikowanych mutacji *BRAF*, takich jak *D594A*, *L537M* i *E648G*, które są zlokalizowane w domenie białkowej o aktywności kinazy.

W uzyskanych wynikach wykazano, że podobnie jak w przypadku innych typów nowotworów, mutacja *BRAF V600E* silnie aktywuje ścieżkę MAPK/ERK, co znacząco wpływa na procesy związane z migracją, proliferacją komórek oraz na fazy cyklu komórkowego. Ponadto sekwencjonowanie transkryptomu komórek linii THLE-2 z wywołaną nadekspresją białka *BRAF* zawierającego mutację *V600E* pozwoliło zidentyfikować wiele genów (np. *BMP6*, *IL1B*, *TBX21*, *MMP10*, *SERPIND1*) o zmienionej ekspresji, jak również

scharakteryzować ich wpływ na główne szlaki molekularne. Natomiast w badaniach funkcjonalnych innych mutacji BRAF (D594A, L537M i E648G) nie stwierdzono patogenicznego wpływu na komórki wątroby w przyjętym modelu *in vitro*, w tym brak aktywacji ścieżki MAPK/ERK, jak również brak wpływu na proliferację i migrację komórek.

Badanie mutacji genomu i określenie ich wpływu na procesy i funkcje komórkowe ma kluczowe znaczenie dla odkrycia molekularnych mechanizmów rozwoju raka wątroby.

WSTĘP

Wieloletnie badania nad genomem raka i mechanizmem jego powstawania pozwoliły na zidentyfikowanie różnych mutacji w DNA, które są związane z procesem powstawania nowotworu. Bieżące dane wskazują, że nowotwory są obecnie drugą w kolejności przyczyną śmierci ludzi na świecie, co więcej liczba ta stale rośnie [131]. Dalsze kompleksowe badania nad fenotypem komórek nowotworowych powinny być uznane jako jeden z głównych celów współczesnych nauk biologicznych i medycznych [53]. Progresja nowotworu jest związana z nagromadzeniem się licznych zmian genetycznych i epigenetycznych powodujących dysfunkcję podstawowych procesów w komórkach [129]. Mutacje somatyczne pojawiające się w komórkach spontanicznie są między innymi wynikiem błędów w mechanizmach naprawy DNA w trakcie jego replikacji [2]. Ponadto występuje wiele różnych czynników zwiększających ich ryzyko w komórkach takich jak, zawarte w dymie tytoniowym nitrozoaminy, aflatoksyny, formaldehyd, chlorek winylu, promieniowanie jonizujące, ultrafioletowe, X, gamma, rodniki tlenowe, alkohol, czy też infekcje wirusowe oraz bakteryjne [15, 52, 60, 67, 103].

Mutacje w proto-onkogenach mogą powodować ich przekształcenie w formę onkogeny. Proto-onkogeny należą do grupy genów biorących udział w regulacji wielu procesów, w tym podziału komórkowego, kontrolowaniu proliferacji oraz apoptozy [18, 53]. Inną ważną grupą są geny supresji nowotworowej zaangażowane w regulację cyklu komórkowego oraz zapobieganie wzrostowi nowotworu [37, 41]. Mutacje w obrębie tych genów mogą powodować funkcjonalne zmiany na poziomie białek [65].

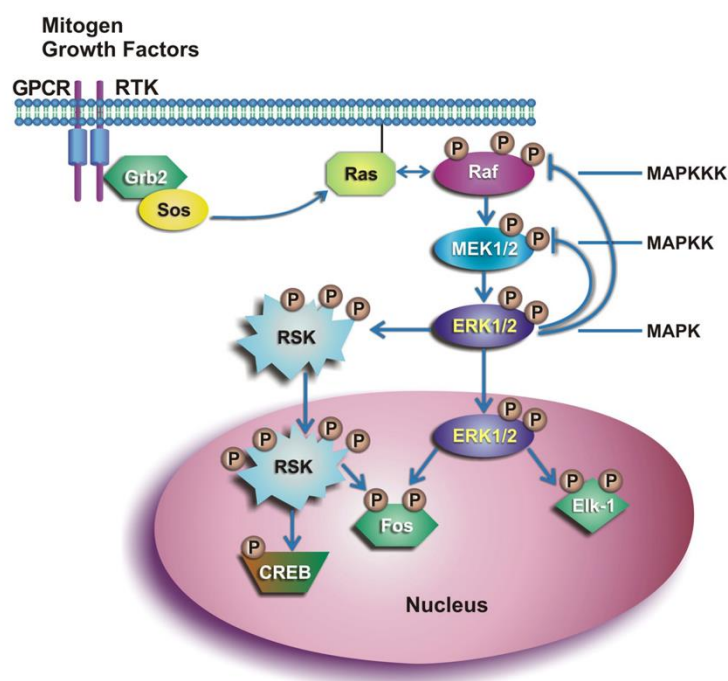
Wyniki badań przedstawione w bazach danych Międzynarodowego Konsorcjum Genomu Raka, Atlasu Genomu Raka (ang. *the Cancer Genome Atlas*) oraz w Projekcie Genomu Raka (ang. *the Cancer Genome Project*) wykazały liczne zmiany strukturalne i funkcjonalne w genomie komórek nowotworowych [34]. Przedstawione dane nie zawsze w pełni wyjaśniają znaczenie zidentyfikowanych mutacji, co jest przesłanką uzasadniającą dla dalszych badań, pozwalających opisać charakterystykę wpływu tych mutacji na rozwój choroby nowotworowej.

Obecnie obserwowana jest wzrastająca liczba przypadków zaburzeń funkcjonowania wątroby, co jest również związane z wysoką śmiertelnością sięgającą 2 milionów zgonów rocznie na świecie [118]. Wśród nowotworów tego organu, najczęściej występującym jest pierwotny nowotwór wątroby, wywodzący się z hepatocytów rak wątrobowokomórkowy (HCC) oraz rak wewnątrzwątrobowych dróg żółciowych (iCCA), pochodzący z komórek nabłonka dróg żółciowych (cholangiocyty) [137]. Około 10% nowotworów wątroby dotyczy iCCA, natomiast 90% odnosi się do HCC [106]. Częstość występowania nowotworów wątroby jest czterokrotnie wyższa u mężczyzn niż u kobiet. Najwyższa zachorowalność występuje w Azji i Afryce, znacząco niższa jest w Europie i Ameryce Północnej, jednakże wykazuje intensywną tendencję wzrostową [32, 93]. Ponadto, HCC jest problemem klinicznym nie tylko wśród ludzi, ale również dotyczy psów, kotów, bydła, owiec i świń [7, 36, 79, 87].

Prowadzone badania nad genomem raka pozwoliły zidentyfikować mutacje w genach, które powodują rozwój choroby nowotworowej. Jednym z najczęściej występujących zmienionych genów w różnych typach raka jest *P53* (ang. *tumor protein p53*) [8, 9]. Białko to określane jest strażnik genomu i odgrywa kluczową rolę w regulacji wielu podstawowych procesów komórkowych, związanych z cyklem komórkowym, w tym transkrypcją, naprawą DNA i apoptozą [45]. Mutacje *P53* zidentyfikowano w około 50% HCC wywołanego aflatoksyną i w 28–42% HCC, które nie były wywołane jej działaniem. Ponadto zmiany w sekwencji *P53* stwierdzono w 45% HCC związanych z HBV i 13% HCC z HCV [78]. Mutacje promotora *TERT* (ang. *telomerase reverse transcriptase*) zidentyfikowano w około 90% HCC [78]. Prawie wszystkie mutacje (95%) *TERT* dotyczą miejsca 124G>A, przez co powstają nowe sekwencje konsensusowe dla wiązania czynników transkrypcyjnych. To z kolei silnie zwiększa aktywność promotora [102]. *TERT* reguluje długość życia komórek somatycznych, natomiast w komórkach nowotworowych wiąże się z nieograniczoną ich proliferacją [10, 78]. Ponadto, mutacje w *CTNNB1* (ang. *catenin beta 1*) oraz *ARID1A* i *ARID2* (ang. *AT-rich interaction domain 1A and 2*), *AXIN1* (ang. *axin 1*), *NFE2L2* (ang. *nuclear factor, erythroid 2 like 2*) *RB1* (ang. *RB transcriptional corepressor 1*) są często spotykane w HCC [105, 110, 138].

Właściwa regulacja procesów komórkowych ma kluczowe znaczenie dla utrzymania ich prawidłowych funkcji, homeostazy między sygnałami zewnątrzkomórkowymi a wewnętrzną odpowiedzią na bodźce. Jednym z głównych szlaków sygnałowych regulujących wiele procesów komórkowych jest ścieżka sygnalizacyjna MAPK/ERK (ang. *mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases*), odpowiedzialna za proliferację, różnicowanie, apoptozę komórek, czy też odpowiedź na stres [136]. Aktywatorami tej ścieżki mogą być zewnątrzkomórkowe sygnały takie jak czynniki wzrostu, cytokiny czy też hormony [66]. W skład szlaku wchodzi: RAS (HRAS, KRAS i NRAS) jako małe białko G oraz kinazy białkowe RAF (ARAF, BRAF, CRAF), MEK (MEK1 i MEK2) i ERK (ERK1 i ERK2)

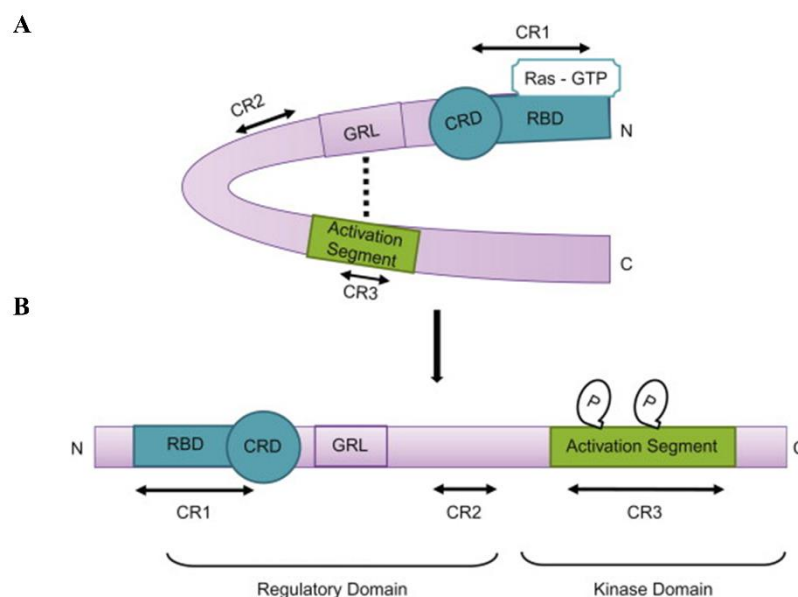
(rycina 1) [76]. Aktywacja ścieżki następuje poprzez interakcję między ligandem a transbłonowym receptorem np. RTK (ang. *receptor tyrosine kinase*), EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*), czy też GPCR (ang. *G protein-coupled receptor*). Takie oddziaływanie aktywuje RAS poprzez zastąpienie GDP na GTP [23]. Następnie, GTP związany z RAS rekrutuje i aktywuje BRAF, który z kolei aktywuje MEK1/2 poprzez fosforylację reszt seryny [76]. Aktywny MEK1/2 fosforyluje reszty treoniny i tyrozyny w strukturze ERK1/2, powodując jego aktywację oraz translokację do jądra komórkowego, gdzie następnie promuje ekspresję docelowych genów np. *Elk-1* (ang. *ETS transcription factor ELK1*) i *c-Fos* (ang. *Fos proto-oncogene*) [56].



Rycina 1. Schemat ścieżki sygnałowej MAPK/ERK. Wiązanie mitogenów lub czynników wzrostu do receptorów GPCR lub RTK aktywuje receptor i prowadzi do rekrutacji białka adaptorowego Grb2 (ang. *growth factor receptor-binding protein 2*) i SOS (ang. *son of sevenless*). RAS aktywuje kolejne białka szlaku sygnałowego, w efekcie czego następuje aktywacja przez ERK1/2 genów docelowych w jądrze komórkowym [56].

Mutacje białek, będących składowymi szlaku MAPK/ERK przyczyniają się do powstania wielu typów nowotworów [35]. Najczęściej aberracje w obrębie tej ścieżki dotyczą genów *KRAS* i *BRAF*. Około 30% wszystkich typów raka dotyczy genu *KRAS*, podczas gdy dla *BRAF* jest to 8% [136]. U ludzi białko BRAF składa się z 766 aminokwasów i jest kodowane przez gen zlokalizowany na chromosomie 7 (7q34). BRAF należy do rodziny serynowo-treoninowych kinaz białkowych RAF i jest kluczowym składnikiem szlaku sygnałowego MAPK/ERK [24, 68]. W strukturze BRAF wyróżniono trzy wysoce konserwatywne regiony: CR1, CR2 i CR3 (ang. *conserved regions 1, 2, and 3*) (rycina 2). CR1 (aminokwasy 120-280) zlokalizowana jest w rejonie N-końca i określana jest jako domena samoregulująca. CR1

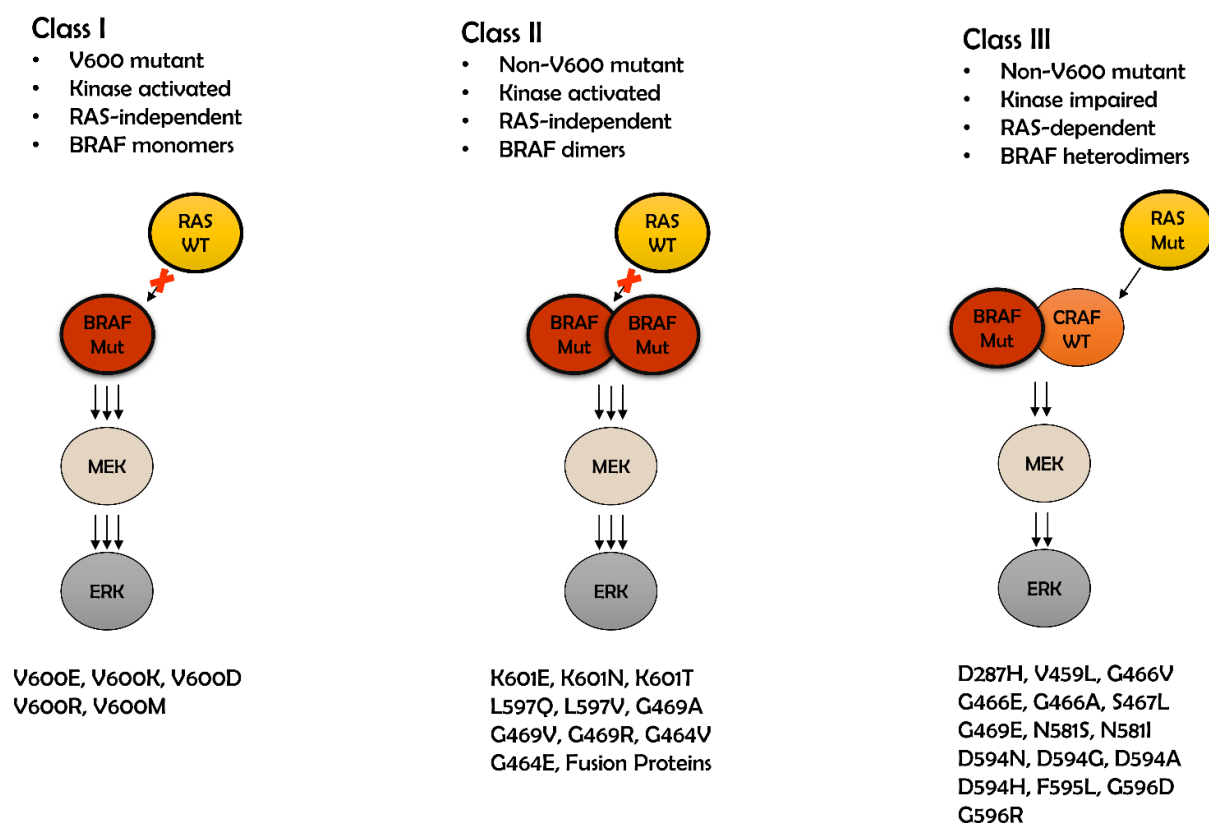
zawiera domenę wiążącą RAS – RBD (ang. *RAS-binding domain*), która oddziałuje z białkiem RAS oraz bogatą w cysteinę domenę CRD (ang. *cysteine-rich domain*), wiążącą dwa jony cynku [61, 130]. CR2 jest domeną bogatą w serynę/treoninę z miejscem wiązania białka regulatorowego 14-3-3, które stabilizuje nieaktywny stan BRAF [108]. Ponadto CR2 jest elastycznym łącznikiem między CR1 i CR3. Region CR3 (aminokwasy 457-717) znajduje się na C-końcu i jest domeną o aktywności kinazy, zawierającym segment aktywacyjny oraz miejsce wiązania ATP (pętla *P*) [130]. Segment aktywacyjny rozpoczyna się od konserwatywnej ewolucyjnie sekwencji aminokwasów takich jak kwas asparaginowy (D), fenyloalanina (F) i glicyna (G) [119, 128]. W nieaktywnej konformacji motyw DFG i bogata w glicynę pętla *P* są stabilizowane przez oddziaływania hydrofobowe, uniemożliwiając dostęp do miejsca katalitycznego. Aktywacja BRAF wywołana przez fosforylację segmentu aktywacyjnego, w której pośredniczy RAS, powoduje rozerwanie oddziaływań hydrofobowych, co z kolei otwiera dostęp dla ATP i MEK1/2 do miejsca katalitycznego [66].



Rycina 2. Struktura białka RAF. A) Aktywacja białka RAF przez wiązanie z RAS. Interakcja między pętlą GRL (ang. *glycine-rich loop*) a segmentem aktywacyjnym utrzymuje białko w nieaktywnej konformacji. B) Ufosforylowana (aktywna) struktura białka RAF. Białko to składa się z domeny regulatorowej, obejmującej CR1 i CR2 oraz domeny o aktywności kinazy, w skład której wchodzi CR3 [81].

Zmiany w sekwencji *BRAF* należą do jednych z najczęstszych mutacji występujących w obrębie białek ścieżki MAPK/ERK. Na podstawie mechanizmów sygnalizacyjnych i cech biochemicznych mutacje *BRAF* podzielono na trzy klasy (rycina 3) [109, 142]. W ludzkim genomie większość mutacji zlokalizowana jest w eksonie 15, w domenie o aktywności katalitycznej [113]. Około 90% wszystkich mutacji *BRAF* dotyczy substytucji tyminy (T) na

adenozynę (A) w 1799 nukleotydzie. Powoduje to zastąpienie waliny (V) kwasem glutaminowym (E) w kodonie 600 (V600E) [66]. Występuje również zamiana waliny przez inne aminokwasy takie jak lizyna (K), kwas asparaginowy (D), arginina (R) i metionina (M) [142]. W trakcie przenoszenia sygnału BRAF WT (ang. *wild type*) działa jako dimer, podczas gdy mutacje klasy I powodują, iż działa aktywnie jako monomer. Mutacja V600E powoduje zmianę położenia helisy α C i destabilizację regionu aktywacji [82, 125]. Co ważne, mutacja BRAF V600E powoduje wysoką aktywację kinazy i konstytutywną transdukcję sygnału w sposób niezależny od RAS [88]. W konsekwencji prowadzi to do intensywnej proliferacji komórkowej i zaburzeniem mechanizmów apoptozy [48].



Rycina 3. Transdukcja sygnału w obrębie ścieżki sygnałowej MAPK/ERK w zależności od klasy mutacji BRAF. Mutacje BRAF klasy I dotyczą kodonu 600. Białko BRAF działa jako monomer w sposób niezależny od RAS, powodując wysoką aktywację kinazy. BRAF z mutacjami klasy II tworzy konstytutywny dimer i informacja jest przekazywana niezależnie od RAS. Mutacje BRAF klasy III zaburzają lub wyłączają zdolność do fosforylacji. Wówczas BRAF tworzy heterodimer z CRAF i sygnał jest przekazywany zależnie od RAS [142].

Mutacje BRAF należące do klasy II zlokalizowane są w pętli P: G464, G469 oraz w segmencie aktywacyjnym: L597, K601 (rycina 3) [142]. Podobnie jak w przypadku mutacji klasy I, szlak sygnałowy MAPK/ERK jest aktywowany niezależnie od stymulacji zewnętrznej (bez udziału RAS), jednakże w tym przypadku BRAF tworzy formę dimeru i wzmacnia aktywność kinazy, która jest niższa niż w przypadku mutacji klasy I [120].

Główną cechą odróżniającą mutacje klasy I i II od tych należących do klasy III jest to, iż te ostatnie powodują wyłączenie aktywności kinazy lub jej znaczne osłabienie. Sygnał jest przekazywany przez działanie heterodimeru BRAF/CRAF w sposób zależny od RAS (rycina 3) [39]. Mutacje klasy III są zlokalizowane w kodonie G466 (pętla P), N581 (pętla katalityczna) oraz w motywie DFG: D594 i G596 [142]. Badania z zastosowaniem mysiego modelu czerniaka wykazały, iż wzmożona aktywacja szlaku następuje w przypadku BRAF D594 i przy jednoczesnej obecności mutacji RAS [59].

Zmiany w obrębie genu BRAF powodują progresję wielu różnych nowotworów. Zgodnie z danymi przedstawionymi przez ICGC dotychczas zidentyfikowano 155 mutacji o potencjalnie wysokim wpływie pro-nowotworowym oraz 37 mutacji istotnych klinicznie. Większość z nich zlokalizowana jest w domenie o aktywności kinazy [5]. Mutacje somatyczne BRAF występują w 60% czerniaków i nowotworów tarczycy, raku jajnika (27%), w raku jelita grubego (15%) oraz w 5–8% przypadkach niedrobnokomórkowego raka płuc [21, 25, 72]. Sekwencjonowanie DNA z wyizolowanego z 300 tkanek raka wątroby: 268 HCC, 24 ICC i 8 obu typów (HCC/ICC), pozwoliło zidentyfikować nowe mutacje genu BRAF. BRAF V600E i BRAF D594A są znanymi mutacjami w różnych typach raka, jednakże po raz pierwszy zostały zidentyfikowane w przypadku pierwotnego raka wątroby. Mutacje BRAF E648G i BRAF L537M są zmianami nowoodkrytymi.

HIPOTEZY BADAWCZE

W badaniach przyjęto następujące hipotezy badawcze:

- Mutacje w genie *BRAF* (D594A, V600E, L537M i E648G) są czynnikiem stymulującym złośliwą transformację hepatocytów oraz progresję raka wątroby.
- Mutacje w genie *BRAF* (D594A, V600E, L537M i E648G) indukują zaburzenia w obrębie szlaku sygnałowego MAPK/ERK.
- Zaburzone funkcjonowanie szlaku sygnałowego MAPK/ERK indukuje znaczące rozregulowanie procesów biologicznych w hepatocytach co jest związane ze zmianą profilu ekspresji genów.

CELE BADAWCZE

Postawiono następujące cele badawcze:

- Określenie wpływu wybranych mutacji BRAF (D594A, V600E, L537M i E648G) na proces złośliwej transformacji hepatocytów oraz ich funkcjonalnej charakterystyki.
- Zbadanie wpływu ścieżki sygnałowej MAPK/ERK z mutacjami BRAF na zmiany w ekspresji genów komórek linii THLE-2.

MATERIAŁY I METODY

Linie komórkowe

Komórki linii THLE-2 (CRL-2706™; linia komórek pochodząca z pierwotnych, normalnych, ludzkich komórek wątroby) zostały zakupione z ATCC (American Type Culture Collection Manassas, VA, USA). Komórki hodowano w pożywce LHC-8 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) suplementowanej w 10% FBS (EURx, Gdańsk, Polska), 5 ng/ml EGF (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 70 ng/ml fosfoetanolaminy (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) i 100 jednostek/ml penicyliny/streptomycyny (Lonza, Bazylea, Szwajcaria). Komórki utrzymywano w standardowych warunkach: 37°C z 5% zawartością CO₂, w wilgotnej atmosferze w inkubatorze Heracell 150i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Komórki linii HEK293 (ang. *human embryonic kidney 293 cell line*) zakupiono z ATCC (CRL-1573™) i hodowano w pożywce DMEM z dodatkiem 4,5 g/l glukozy (Lonza, Bazylea, Szwajcaria), 10% FBS i 100 jednostek/ml penicyliny/streptomycyny (Lonza, Bazylea, Szwajcaria). Komórki HEK293 utrzymywano w standardowych warunkach hodowlanych.

Przygotowanie plazmidu ekspresyjnego zawierającego FLAG-tagged BRAF

W celu określenia wpływu wybranych mutacji BRAF na rozwój raka wątroby stworzono plazmid zawierający sekwencję kodującą BRAF, znakowaną FLAG. Protokół obejmował kilka etapów. Sekwencja kodująca BRAF (NCBI: NM_004333.5) była amplifikowana poprzez RT-PCR. Następnie została zwielokrotniona z wykorzystaniem polimerazy o wysokiej wierności amplifikacji (PrimeSTAR Max DNA Polymerase; TaKaRa, Shiga, Japonia). Do reakcji użyto specjalnych starterów, które umożliwiły syntezę docelowego produktu wraz z sekwencjami flankującymi, które zawierały miejsca cięcia enzymami restrykcyjnymi. Przygotowana i oczyszczona wstawka oraz plazmid *N-Terminal p3XFLAG-CMV* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) zostały poddane cięciu przez enzymy restrykcyjne: HindIII i XbaI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) w celu otrzymania lepkich końców. W dalszym etapie przeprowadzono ligację z wykorzystaniem zestawu Anza™ T4 DNA Ligase Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Kompetentne komórki 5-alpha *Escherichia*

coli (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) transformowano poprzez technikę szoku termicznego w celu namnożenia uzyskanego plazmidu. Komórki bakteryjne z pojedynczych kolonii zebranych z płytek agarowych z dodatkiem ampicyliny (100 µg/mL; A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) namnożono w płynnej pożywce LB z dodatkiem antybiotyku. Następnie plazmidy zostały wyizolowane oraz poddane sekwencjonowaniu metodą Sangera (Genomed, Warszawa, Polska) w celu weryfikacji wklonowanej sekwencji kodującej białko BRAF. Mutacje BRAF (D594A, V600E, L537M i E648G) zostały wygenerowane w kolejnym etapie za pomocą ukierunkowanej mutagenezy z użyciem zestawu QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Plazmidy poddano sekwencjonowaniu Sangera w celu potwierdzenia czy wybrane mutacje BRAF zostały prawidłowo wprowadzone.

Transfekcja komórek

W celu określenia roli wybranych mutacji *BRAF*, komórki linii THLE-2 i HEK293 były transfekowane plazmidem ekspresyjnym *N*-Terminal p3XFLAG-CMV zawierającym sekwencję kodującą białko BRAF z następującymi wariantami: BRAF WT, BRAF V600E, BRAF D594A, BRAF L537M, and BRAF E648G. Ponadto komórki transfekowano plazmidem bez sekwencji kodującej BRAF (EM) w celu sprawdzenia czy nie ma on cytotoksycznego wpływu na funkcjonowanie badanych komórek. Do transfekcji zastosowano odczynnik XtremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent (Roche, Mannheim, Niemcy). Komórki w zależności od dalszej analizy były transfekowane na płytkach 6- lub 24-dółkowych zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta.

Western blotting

Analiza ekspresji białek wyizolowanych z transfekowanych komórek była określona za pomocą techniki western blotting. Białko ekstrahowano z komórek THLE-2 i HEK293 za pomocą buforu do lizy T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA Scientific) z dodatkiem inhibitora proteaz cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Germany). Następnie oszacowano stężenie białka za pomocą zestawu Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Absorbancja była mierzona przy długości fali $\lambda=562$ nm przy użyciu czytnika Synergy LX multi-mode reader (BioTek, Winooski, VT, USA). Elektroforezę przeprowadzono w żelu 4-15% Mini-PROTEAN TGX Gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) przy stałym napięciu wynoszącym 120V przez około 1 godz. Rozdzielone białka przeniesiono na membranę PVDF (Millipore, Burlington, MA, USA) przy użyciu transferu mokrego, stosując stałe natężenie prądu wynoszące 150 mA przez 1,5 godz. dla jednego żelu lub 200 mA przez 2 godz. dla dwóch żeli. Następnie membrana była blokowana z wykorzystaniem 5% roztworu odtłuszczonego

mleka w TBST (ang. *Tris-buffered saline with Tween 20*, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) oraz poddana całonocnej inkubacji w temp. 4°C z następującymi przeciwciałami pierwszorzędowymi: Anti-Flag M2 (BRAF), ERK1/2 (C-9) lub phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2). W kolejnym etapie membrana była inkubowana z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z HRP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Białka wizualizowano stosując odczynniki do detekcji chemiluminescencji (Amersham ECL Western Blotting Analysis System; GE Healthcare, Chicago, IL, USA) za pomocą czytnika ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Gęstość prążków oceniono za pomocą oprogramowania ImageJ [4] i zaprezentowano jako wykres słupkowy określający względny poziom białka (krotność zmiany) względem gęstości prążków FLAG (BRAF).

Test gojenia rany (*wound healing assay*)

Do oceny zmian migracji komórek THLE-2 po transfekcji plazmidami zawierającymi mutacje *BRAF* zastosowano test gojenia ran. Po 6 godz. od transfekcji na pojedynczej warstwie komórek rosnących na płycie 6-dołkowej wykonano rysę. Komórki zostały utrwalone po 72 godz. za pomocą 4% roztworu PFA (ang. *paraformaldehyde*, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) w PBS przez 15 min. Następnie komórki poddano barwieniu kontrastowemu z wykorzystaniem roztworu eozyny Y (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. Komórki były fotografowane z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego i liczone przy użyciu oprogramowania ImageJ [4].

Test proliferacji komórkowej (*WTS-1 test*)

Wpływ wybranych mutacji *BRAF* na proliferację komórek badano przy użyciu odczynnika Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, Mannheim, Niemcy) zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Komórki, transfekowane plazmidem ekspresyjnym zawierającym *BRAF* z badanymi mutacjami, były poddane testowi po 24 godz. od transfekcji. Komórki THLE-2 inkubowano z odczynnikiem WST-1 przez 0,5 godz., a następnie mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda=440$ nm za pomocą czytnika Synergy LX (BioTek, Winooski, VT, USA).

Analiza cyklu komórkowego

Komórki linii THLE-2 poddano analizie zmian cyklu komórkowego po 48 godz. od transfekcji. Komórki zebrano i utrwalono w 70% metanolu, a następnie zawieszono w PBS zawierającym 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNazy A (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ jodku propidyny (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) oraz 1% BSA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Następnie komórki inkubowano przez 30 min. w ciemności i poddano analizie przy

użyciu cytometru CytoFLEX (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) z oprogramowaniem CellQuest. Dalsza analiza była przeprowadzona z wykorzystaniem programu ModFit LT 4.1 (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

Sekwencjonowanie nowej generacji

Sekwencjonowaniu poddano RNA wyizolowane za pomocą RNA extraction kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany) z komórek THLE-2 transfekowanych plazmidami: 1) p3XFLAG-CMV (plazmid bez wstawki), 2) p3XFLAG-CMV + BRAF WT, 3) p3XFLAG-CMV + BRAF V600E. Sekwencjonowanie zostało wykonane przez BGI Genomics (Shenzhen, Chiny). Otrzymane wyniki były walidowane poprzez przeprowadzenie reakcji odwrotnej transkrypcji na tym samym materiale RNA, który został użyty do reakcji sekwencjonowania. Do RT-PCR zastosowano zestaw NG dART RT kit (EURx, Gdańsk, Poland). Następnie, w celu określenia ekspresji genów przeprowadzono real-time PCR (qPCR) z użyciem RT HS-PCR Mix SYBR® C (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) dla dziesięciu wybranych genów. Wyniki były normalizowane do najbardziej stabilnego genu referencyjnego, jakim był *B2M* (ang. *beta-2-microglobulin*).

Analiza sekwencji

Fragment regionu o aktywności kinazy BRAF został porównany w celu określenia zachowania ewolucyjnego sekwencji pomiędzy różnymi gatunkami. Do analizy zastosowano sekwencje aminokwasową BRAF następujących organizmów: *Homo sapiens* (NP_004324.2), *Mus musculus* (XP_011239439.2), *Bos taurus* (XP_024846960.1), *Danio rerio* (NP_001311445.1) i *Xenopus tropicalis* (XP_031754392.1). W nawiasach podano sekwencje referencyjne bazy danych NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*). Porównanie zostało wykonane przy użyciu programu PRALINE [64].

Analiza ścieżek molekularnych

Wyniki uzyskane z sekwencjonowania BGI RNA-Seq poddano dalszej analizie za pomocą oprogramowania QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN IPA) dostarczonego przez Ingenuity Systems [6]. Analiza wyników była wykonana przy zastosowaniu korekty Benjamini-Hochberg oraz z użyciem oprogramowania Cytoscape 3.1.0 z rozszerzeniem ClueGO 2.5.7 [31].

In silico analiza regionu promotora

Miejsca wiązania potencjalnych czynników transkrypcyjnych w promotorach wybranych genów analizowano przy użyciu oprogramowania AliBaba2.1 [1, 12] i Eukaryotic Promoter Database [2].

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną otrzymanych danych przeprowadzono za pomocą oprogramowania GraphPad PRISM w wersji 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Wpływ pojedynczych mutacji analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), z zastosowaniem korekty Bonferroniego. Przyjęto następujący poziom istotności statystycznej: *p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001. Dane przedstawiono w postaci wykresów słupkowych opartych na średnich \pm SEM lub \pm SD. Wykresy zostały wykonane za pomocą oprogramowania GraphPad PRISM 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Mapowanie odczytów wykonano do genomu z adnotacjami do genów i transkryptów *Homo sapiens* hg38 (GRCh38). Wartość ekspresji obliczono w odniesieniu do unikalnych zaliczeń, transkryptów przez milion odczytów ang. *reads per kilobase of transcript per milion of map per reads* (RPKM) - normalizacja wyników ekspresji. Porównanie statystyczne opierały się na wieloczynnikowej analizie wariancji opartej na ujemnym dwumianowym uogólnionym modelu liniowym. Do porównania między grupami zastosowano test Walda. Geny wykazujące zmienioną ekspresję z p <0,05 i ponad 1,5-krotnymi zmianami uznano za geny wykazujące istotną różnicę. Ponadto jako kryteria różnicujące geny o istotnie zmienionej ekspresji przyjęto wartość współczynnika oczekiwanej proporcji błędów I rodzaju wśród wyników istotnych statystycznie (FDR) <0,05, krotność zmiany (FC) > 1,5 (zarówno podwyższona, jak i obniżona ekspresja).

WYNIKI

Ewolucyjna analiza sekwencji BRAF

Analiza sekwencji aminokwasów części segmentu aktywacyjnego zlokalizowanego w domenie kinazy BRAF wykazała wysoki wynik zachowania ewolucyjnego wśród badanych gatunków. Ponadto porównanie schematu kolorów przedstawione na rycinie 4 potwierdziło najbardziej konserwatywną ewolucyjnie sekwencję w miejscach mutacji BRAF (D594A, V600E, L537M, E648G) u wybranych organizmów.

Unconserved 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Conserved

	10	20	30	40	50
<i>Homo sapiens</i>	FKNEVGVL	TRHVNILL	GYSTKPQL	VTQWCEGSS	YHHLHIIE
<i>Danio rerio</i>	FKNEVGVL	TRHVNILL	GYSTKPQL	VTQWCEGSS	YHHLHIIE
<i>Xenopus tropic</i>	FKNEVGVL	TRHVNILL	GYSTKPQL	VTQWCEGSS	YHHLHIIE
<i>Mus musculus</i>	FKNEVGVL	TRHVNILL	GYSTKPQL	VTQWCEGSS	YHHLHIIE
<i>Bos taurus</i>	FKNEVGVL	TRHVNILL	GYSTKPQL	VTQWCEGSS	YHHLHIIE
Consistency	*****	*****	**8*****	79*****	*****

	60	70	80	90	100
<i>Homo sapiens</i>	FEMIKLIDIA	RQTAQGMDYL	HAKSIIHRDL	KSNNIFLHED	LTVKIGDFGL
<i>Danio rerio</i>	FEMIKLIDIA	RQTAQGMDYL	HAKSIIHRDL	KSNNIFLHED	LTVKIGDFGL
<i>Xenopus tropic</i>	FEMIKLIDIA	RQTAQGMDYL	HAKSIIHRDL	KSNNIFLHED	LTVKIGDFGL
<i>Mus musculus</i>	FEMIKLIDIA	RQTAQGMDYL	HAKSIIHRDL	KSNNIFLHED	LTVKIGDFGL
<i>Bos taurus</i>	FEMIKLIDIA	RQTAQGMDYL	HAKSIIHRDL	KSNNIFLHED	LTVKIGDFGL
Consistency	*****	*****	*****	*****	*****

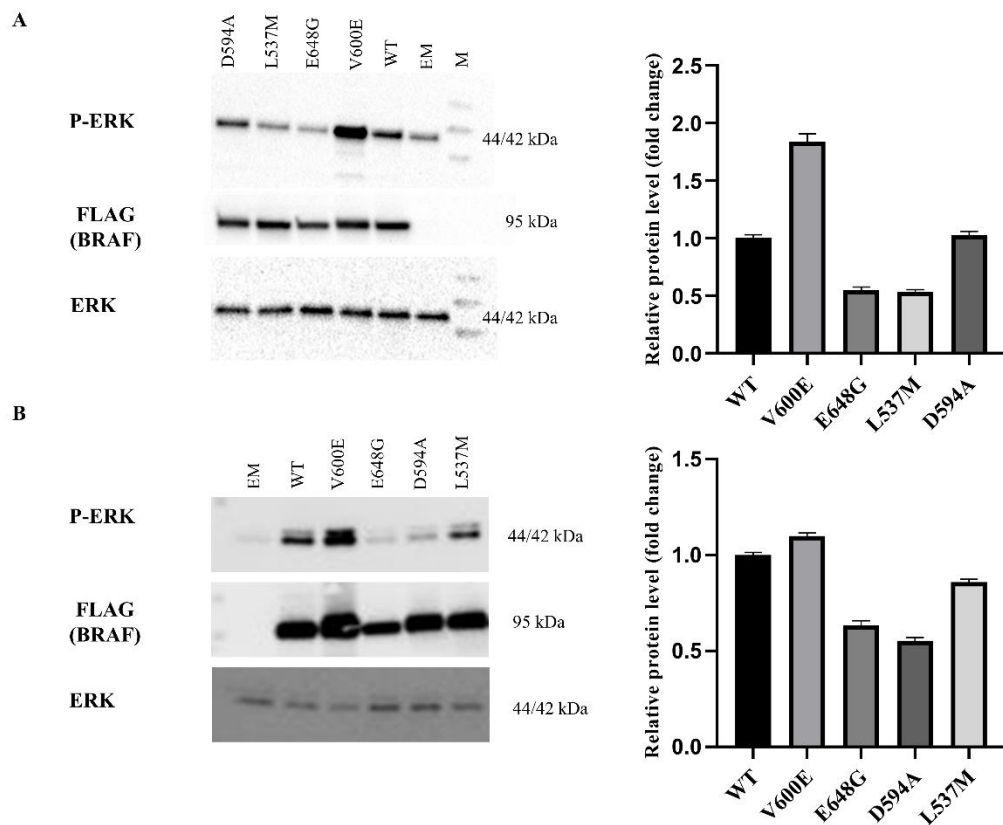
	110	120	130	140	150
<i>Homo sapiens</i>	ATVKS	RWSGS	HQFEQLSGSI	LWMAPEVIRM	QDKNPYSFQS
<i>Danio rerio</i>	ATVKS	RWSGS	HQFEQLSGSI	LWMAPEVIRL	QDKNPYSFQS
<i>Xenopus tropic</i>	ATVKS	RWSGS	HQFEQLSGSI	LWMAPEVIRM	QDNNPYSFQS
<i>Mus musculus</i>	ATVKS	RWSGS	HQFEQLSGSI	LWMAPEVIRM	QDKNPYSFQS
<i>Bos taurus</i>	ATVKS	RWSGS	HQFEQLSGSI	LWMAPEVIRM	QDKNPYSFQS
Consistency	*****	*****	*****	**7*****	*****

	160	170	180	190	200
<i>Homo sapiens</i>	ELMTGQLPYS	NINNRDQIIF	MVGRGYLSPD	LSKVRSNCPK	AMKRLMAECL
<i>Danio rerio</i>	ELMSGALPYS	NINNRDQIIF	MVGRGYLSPD	LSKVRSNCPK	AMKRLMADCL
<i>Xenopus tropic</i>	ELMTGQLPYS	NINNRDQIIF	MVGRGYLSPD	FSKVRSNCPK	AMKRLMADCL
<i>Mus musculus</i>	ELMTGQLPYS	NINNRDQIIF	MVGRGYLSPD	LSKVRSNCPK	AMKRLMAECL
<i>Bos taurus</i>	ELMTGQLPYS	NINNRDQIIF	MVGRGYLSPD	LSKVRSNCPK	AMKRLMAECL
Consistency	**8*7***	*****	*****	7*****	*****7**

Rycina 4. Porównanie sekwencji aminokwasów BRAF pomiędzy kilkoma gatunkami ze wskazaniem miejsc występowania badanych mutacji. Analiza została wykonana dla gatunków: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, *Danio rerio* i *Xenopus tropicalis* za pomocą oprogramowania PRALINE. Wyniki są przedstawione zgodnie ze schematem kolorów. Najbardziej zachowane ewolucyjnie są przedstawione kolorem czerwonym.

Poziom ekspresji białek

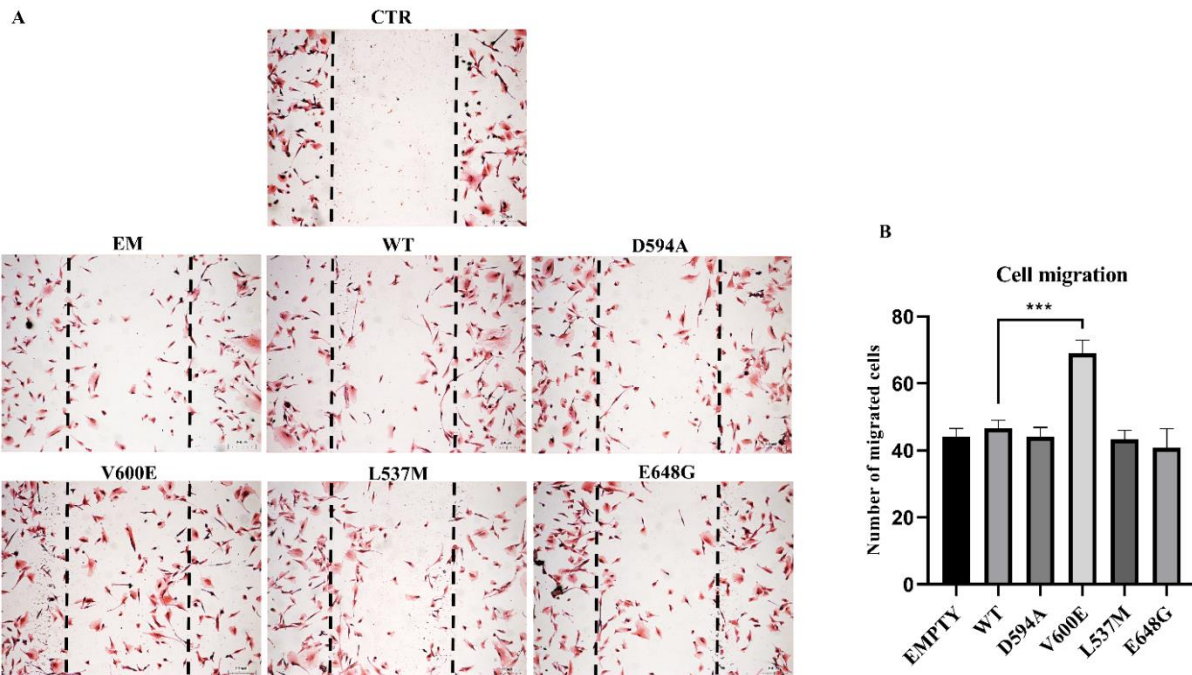
Analiza ekspresji białek wykazała różnice w przewodzeniu sygnału w obrębie ścieżki sygnałowej MAPK/ERK w zależności od mutacji BRAF. W badaniu oceniano wpływ wybranej mutacji BRAF na aktywność kinazy (rycina 5). Poziom fosforylowanego białka ERK (P-ERK) w komórkach THLE-2 i HEK239 z nadekspresją BRAF V600E był podwyższony w porównaniu z kontrolą (BRAF WT), jednak wzrost P-ERK był wyższy w komórkach THLE-2. Ponadto obserwowano obniżenie poziomu P-ERK w komórkach THLE-2 i HEK239 z nadekspresją BRAF E648G i BRAF L537M. Poziom P-ERK dla komórek transfekowanych BRAF D594A był równy w porównaniu z BRAF WT w linii komórkowej THLE-2, podczas gdy w komórkach HEK293 był obserwowany na obniżonym poziomie. Ekspresja nieufosforylowanej formy ERK była równa we wszystkich badanych wariantach.



Rycina 5. Poziom ekspresji białek z wykorzystaniem techniki western blotting. Ekspresja białek P-ERK, FLAG (BRAF) i ERK w komórkach THLE-2 (A) i HEK293 (B) z nadekspresją plazmidów: p3XFLAG-CMV (EM), oraz zawierający wstawki: BRAF WT, V600E, E648G, L537M i D594A. Gęstość prążków określono za pomocą programu ImageJ [4]. Poziom ekspresji białka znormalizowano do FLAG (BRAF) i przedstawiono jako krotność zmiany (\pm SD). M - marker białkowy 10-245 kDa.

Analiza migracji komórek

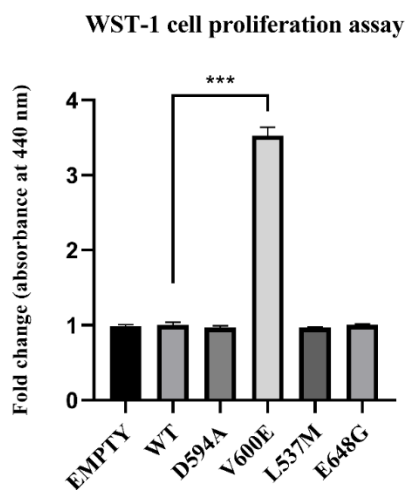
Celem eksperymentu była ocena zdolności migracji komórek THLE-2 z nadekspresją mutantów BRAF. Wyniki pokazują, że migracja komórek była znacznie zwiększona w komórkach THLE-2 z nadekspresją BRAF V600E w porównaniu z kontrolą (BRAF WT). Poziom migracji komórek THLE-2 z nadekspresją BRAF D594A, BRAF L537M i BRAF E648G były porównywalny z kontrolą. Ponadto, nie zaobserwowano wpływu plazmidu EM (bez sekwencji kodującej BRAF) na zdolność do migracji komórek. Przerwane kreski wskazują obszar w którym wykonana była rysa. Wyniki przedstawiono jako zdjęcia wykonane mikroskopem świetlnym (rycina 6A) oraz w formie wykresu słupkowego (rycina 6B) przedstawiającego liczbę migrujących komórek.



Rycina 6. Test migracji komórek linii THLE-2 z nadekspresją mutacji BRAF. A) Zdjęcia migracji komórek transfekowanych: BRAF WT, D594A, V600E, L537M, E648G oraz pustym plazmidem (EM). Skala: 200 μ m. B) Wykres słupkowy przedstawiający liczbę migrujących komórek (\pm SEM) dla wszystkich eksperymentalnych grup, n = 3, *** p < 0,001.

Ocena proliferacji komórkowej

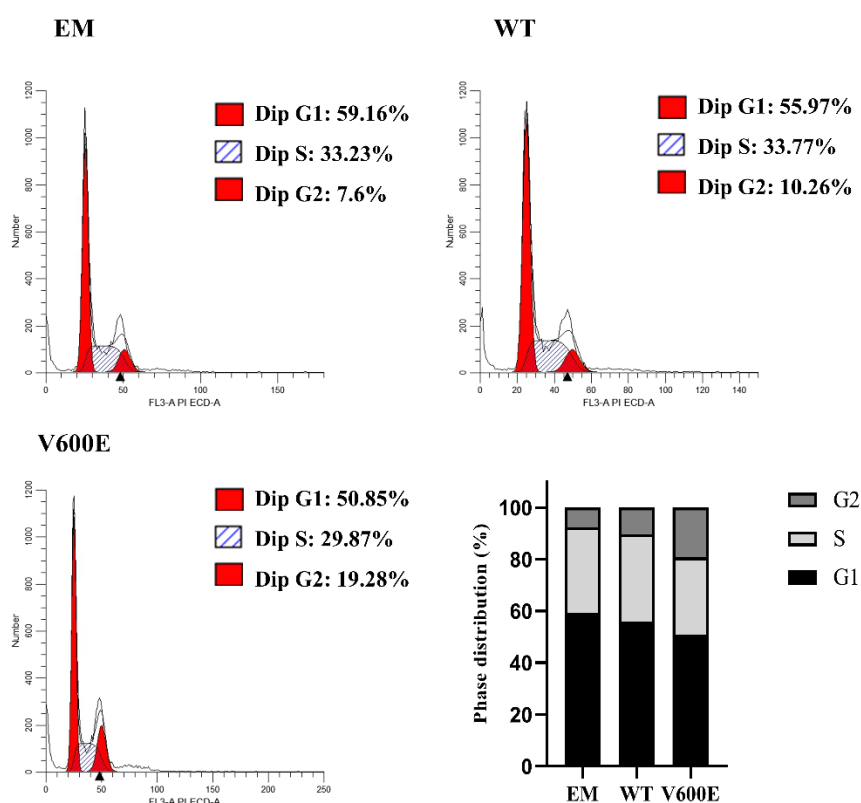
W badaniu określono rolę mutacji BRAF w procesie proliferacji komórkowej. Wyniki wskazują, że mutacja BRAF V600E znacząco zwiększyła proliferację hepatocytów w porównaniu z proliferacją komórek kontrolnych (BRAF WT). Nie zaobserwowano istotnego efektu w przypadku komórek z nadekspresją BRAF L537M, BRAF D594A i BRAF E648G. Podobnie, nadekspresja pustego plazmidu (EM) nie wpływała znacząco na zmiany w proliferacji komórek linii THLE-2 (rycina 7).



Rycina 7. Wpływ nadekspresji mutacji BRAF na proliferację komórek THLE-2. Zaobserwowano istotny wzrost proliferacji komórek THLE-2 z nadekspresją BRAF V600E. Wyniki przedstawiono jako krotność zmian znormalizowanych względem proliferacji komórek kontrolnych (BRAF WT). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą ANOVA z korekcją Bonferroniego, n = 3, *** p < 0,001.

Wpływ wybranych mutacji BRAF na zmiany w cyklu komórkowym

Analiza cyklu komórkowego wykazała różnice w rozkładzie poszczególnych faz cyklu komórkowego (rycina 8). Uzyskano następujący procentowy rozkład faz: G1: 59,16%; S: 33,23%, G2: 7,6% dla komórek THLE-2 z nadekspresją plazmidu bez wstawki (EM); G1: 55,97%, S: 33,77%, G2: 10,26% dla komórek THLE-2 transfekowanych BRAF WT; G1: 50,85%, S: 29,87%, G2: 19,28% dla komórek THLE-2 z nadekspresją BRAF V600E. Wykazano wzrost populacji G2 w komórkach z nadekspresją BRAF V600E (19,28%) w porównaniu z BRAF WT (10,26%). Doświadczenie było przeprowadzone w dwóch niezależnych powtórzeniach.

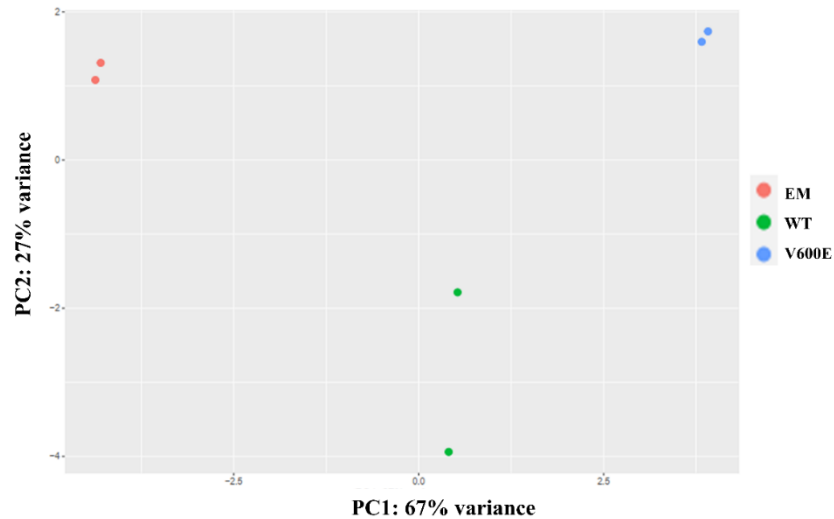


Rycina 8. Rozkład faz cyklu komórkowego. Analiza FACS komórek THLE-2 z nadekspresją pustego plazmidu oraz plazmidu z sekwencją BRAF WT i BRAF V600E wykazała różnice w rozłożeniu faz cyklu komórkowego. Wykres słupkowy przedstawia procentowy rozkład faz dla poszczególnych grup. Wyniki eksperymentu wykonanego w dwóch powtórzeniach nie wykazały istotności statystycznej.

Analiza sekwencjonowania transkryptomu (BGI RNA-Seq)

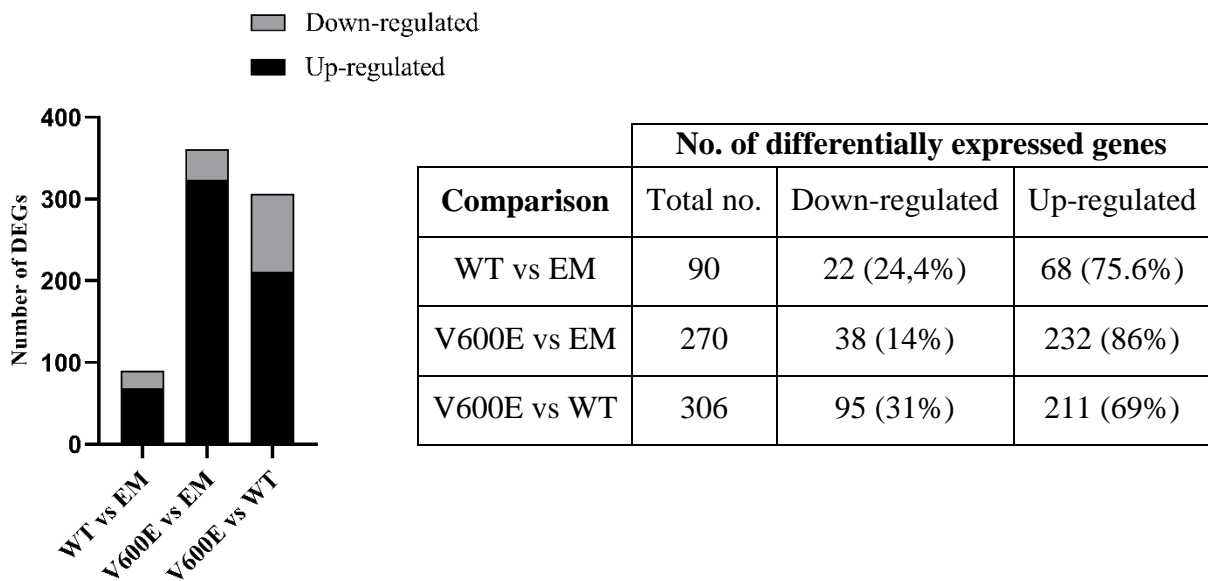
Analiza genów o różnej ekspresji

W wyniku analizy transkryptomu uzyskano grupę genów, których zmieniona ekspresja może być zależna od ścieżki MAPK/ERK zależnej od BRAF V600E. Na rycinie 9 przedstawiono rozkład analizowanych próbek. Analiza głównych składowych (ang. *principal component analysis*, PCA) wskazuje na dużą powtarzalność między duplikatami.



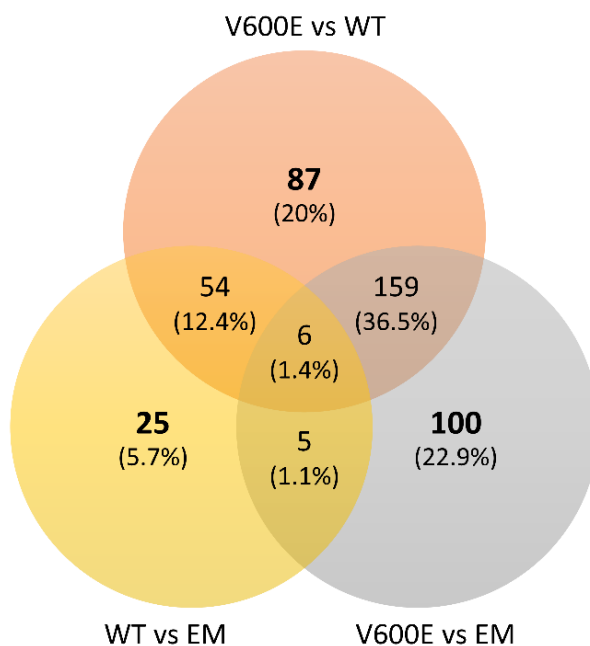
Rycina 9. Analiza głównych składowych (PCA). Rozłożenie punktów wskazuje na wysoką powtarzalność analizowanych próbek RNA. Punkty odnoszą się do próbek RNA wyizolowanych z 1) komórek THLE-2 transfekowanych plazmidem bez wstawki (czerwony), 2) komórek THLE-2 z nadekspresją BRAF WT (zielony), 3) komórek THLE-2 transfekowanych BRAF V600E (niebieski).

Analiza transkryptomu wykazała wiele genów o zmienionej ekspresji (ang. *differentially expressed genes*, DEGs). W zestawieniu BRAF WT vs EM uzyskano 90 DEGs (22 z obniżoną ekspresją i 68 z podwyższoną ekspresją); w zestawieniu BRAF V600E vs EM uzyskano 270 DEGs (38 z obniżoną ekspresją i 232 z podwyższoną ekspresją); w zestawieniu BRAF V600E vs BRAF WT uzyskano 306 DEGs (95 z obniżoną ekspresją i 211 z podwyższoną ekspresją). Wyniki przedstawiono w postaci wykresu oraz tabeli (rycina 10).



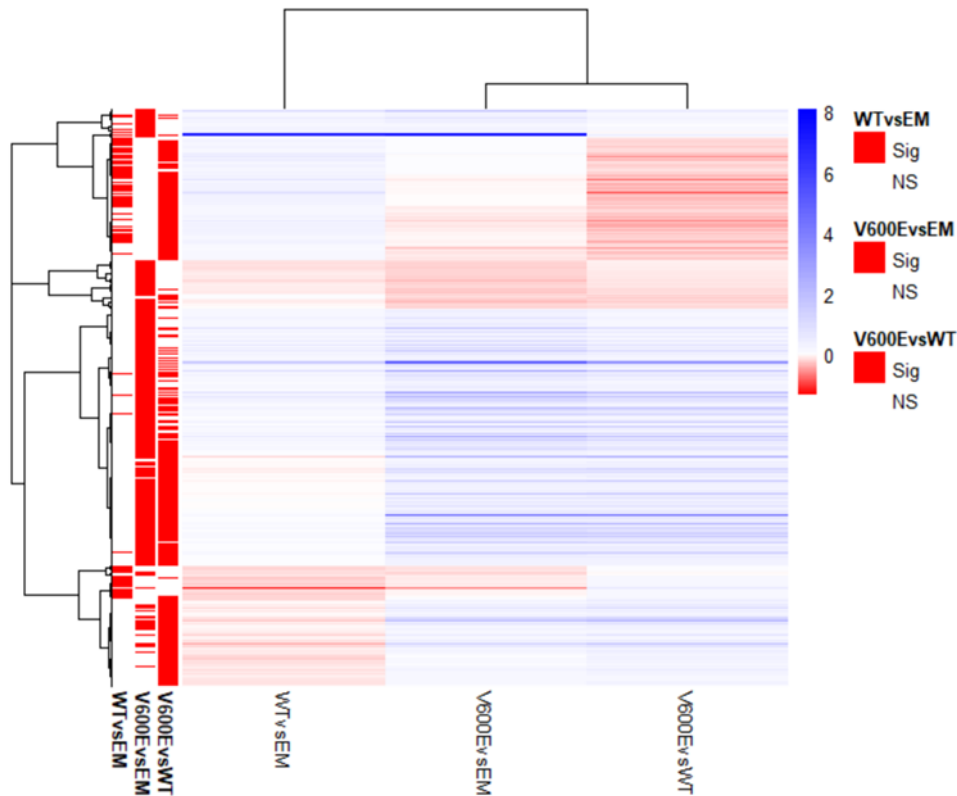
Rycina 10. Liczba genów o zmienionej ekspresji (DEGs) uzyskana w wyniku sekwencjonowania transkryptomu BGI RNA-Seq. Przyjęto wartość istotności statystycznej wynoszącej p-value cut-off 0,1 z zastosowaniem korekcji Benjamini-Hochberga.

Analiza transkryptomu wykazała 436 genów o istotnie różnej ekspresji we wszystkich warunkach eksperymentalnych. Liczbę DEGs rozdzieloną pomiędzy poszczególnymi zestawieniami przedstawiono w postaci diagramu Venna (rycina 11). Otrzymano 25 DEGs (5,7%) w zestawieniu BRAF WT vs EM; 100 DEGs (22,9%) w zestawieniu BRAF V600E vs EM i 87 DEGs (20%) w zestawieniu BRAF V600E vs BRAF WT.



Rycina 11. Liczba genów o zmienionej ekspresji przedstawiona w postaci diagramu Venna. Analizowano trzy zestawienia: BRAF WT vs EM, BRAF V600E vs EM oraz BRAF V600E vs BRAF WT. Nakładające się części kół wskazują liczbę genów wspólnych dla poszczególnych grup.

Ponadto, zgrupowane geny zostały przedstawione w postaci *heat*-mapy (rycina 12). Kolumny przedstawiają próbki w zestawieniach (BRAF WT vs EM, BRAF V600E vs EM, BRAF V600E vs BRAF WT), podczas gdy w każdy wiersz reprezentuje pojedynczy gen. DEGs są zaznaczone kolorem niebieskim. Lista genów z najbardziej podwyższoną oraz z najbardziej obniżoną ekspresją jest przedstawiona w tabeli 1.



Rycina 12. Heat-mapa wszystkich genów o zróżnicowanej ekspresji. Słupki po lewej stronie przedstawiają geny o istotnie zróżnicowanej ekspresji. Niebieski odcień skali wskazuje geny o największym poziomie zmian w badanych zestawieniach. *BRAF* i *BRAFPI* (ang. *BRAF pseudogen 1*) są przedstawione jako niebieski słupek.

Tabela 1. Lista genów o najbardziej podwyższonej oraz obniżonej ekspresji. Wyniki przedstawiono jako krotność zmian (ang. *fold change*) w zestawieniach BRAF V600E vs BRAF WT.

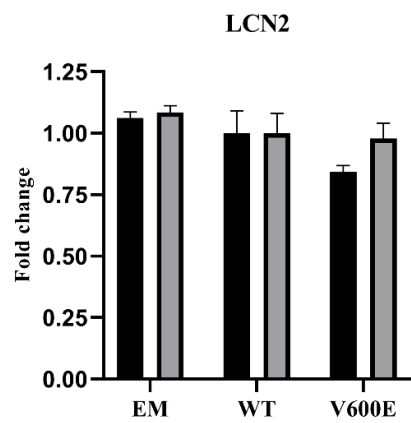
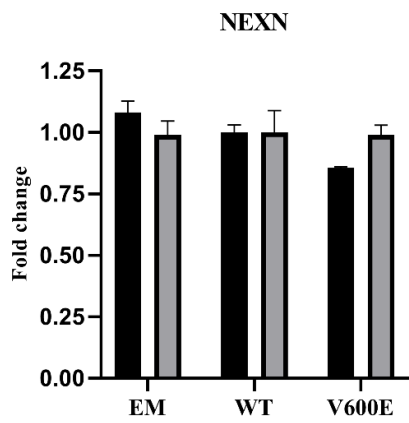
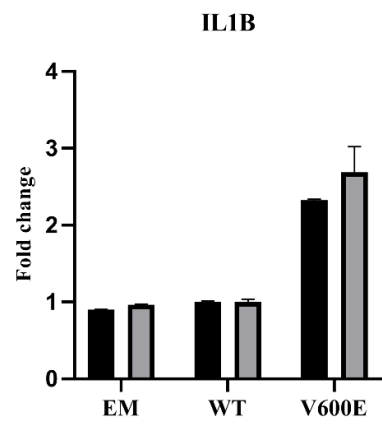
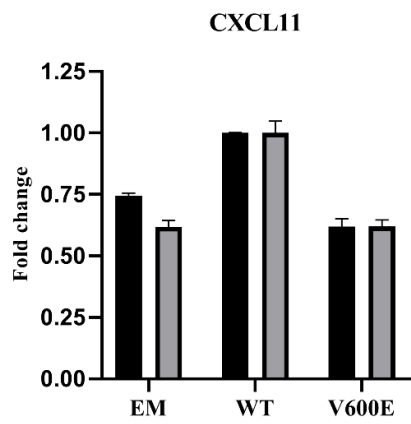
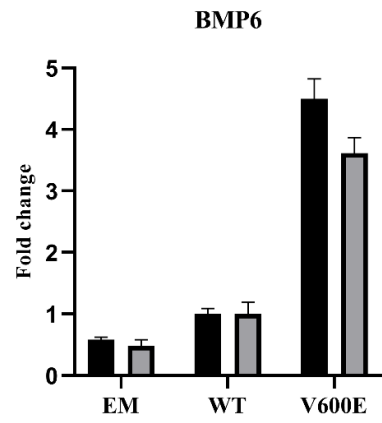
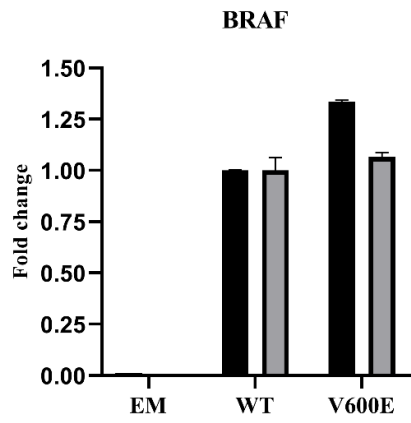
Up-regulated		Down-regulated	
BRAF V600E vs BRAF WT			
Gene	Fold change	Gene	Fold change
<i>MMP10</i>	4.847	<i>CXCL10</i>	-0.948
<i>TBX21</i>	4.205	<i>RSAD2</i>	-0.855
<i>SERPIND1</i>	2.823	<i>CXCL11</i>	-0.675
<i>COL5A3</i>	2.600	<i>CMPK2</i>	-0.619
<i>ADAMTS18</i>	2.338	<i>CCL5</i>	-0.557
<i>IL33</i>	2.325	<i>HSH2D</i>	-0.500
<i>BMP6</i>	2.185	<i>NT5C3A</i>	-0.488
<i>NTSR1</i>	2.173	<i>IFIT2</i>	-0.449
<i>LRRC15</i>	1.903	<i>BATF2</i>	-0.435
<i>TAGLN3</i>	1.859	<i>RTP4</i>	-0.435
<i>ESM1</i>	1.834	<i>IFIT1</i>	-0.429
<i>MMP9</i>	1.809	<i>IFIT3</i>	-0.413
<i>SIGLEC15</i>	1.741	<i>USP18</i>	-0.405

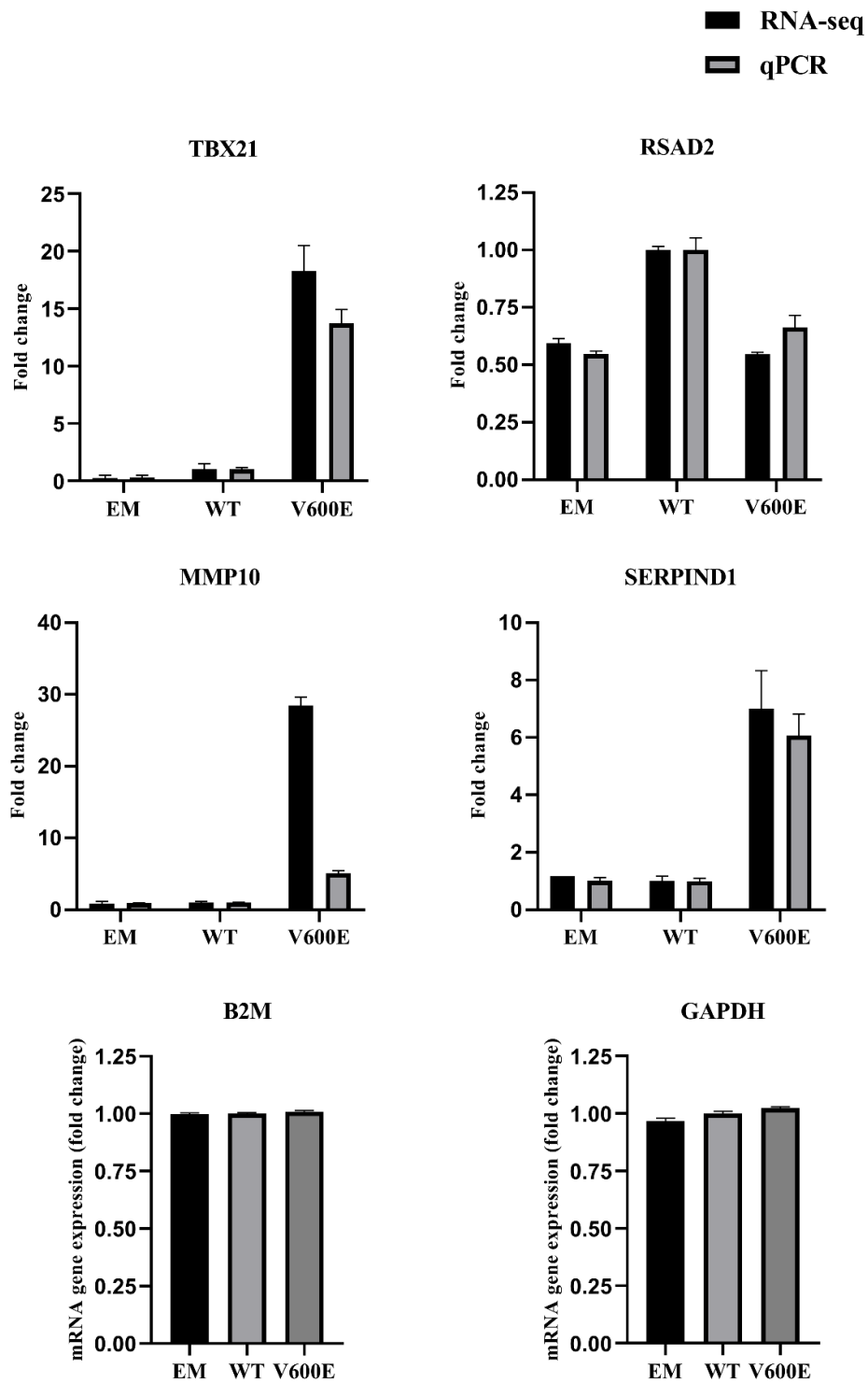
<i>ITGAX</i>	1.716	<i>GBP4</i>	-0.400
<i>TRPV3</i>	1.681	<i>GMPR</i>	-0.400
<i>DIRAS3</i>	1.625	<i>SLC15A3</i>	-0.391
<i>MMP1</i>	1.569	<i>C4orf33</i>	-0.381
<i>IL13RA2</i>	1.545	<i>LGALS9</i>	-0.377
<i>MMP3</i>	1.493	<i>TNFSF10</i>	-0.376
<i>RCSD1</i>	1.464	<i>OASL</i>	-0.373
<i>TNFSF15</i>	1.447	<i>BST2</i>	-0.371
<i>NOX5</i>	1.445	<i>GBP1</i>	-0.362
<i>CHRNA9</i>	1.287	<i>MX2</i>	-0.358
<i>EGR3</i>	1.250	<i>PSMB9</i>	-0.352
<i>IL1B</i>	1.233	<i>HERC5</i>	-0.342

Walidacja wyników RNA-seq przy użyciu qPCR

Otrzymane wyniki potwierdziły kierunek zmian dla większości wybranych genów. Podobne zmiany ekspresji genów zostały stwierdzone dla następujących genów: *BRAF*, *BMP6* (ang. *bone morphogenetic protein 6*), *CXCL11* (ang. *C-X-C motif chemokine ligand 11*), *IL1B* (ang. *interleukin 1 beta*), *TBX21* (ang. *T-box transcription factor 21*), *RSAD2* (ang. *radical S-adenosyl methionine domain containing 2*), *SERPIND1* (ang. *serpin family D member 1*). Dane otrzymane z RNA-seq wykazały, iż *NEXN* (ang. *nexilin F-actin binding protein*) i *LCN2* (ang. *lipocalin 2*) wykazują obniżoną ekspresję, podczas gdy nie zostało to zaobserwowane stosując technikę qPCR. Ponadto, podwyższony poziom ekspresji *MMP10* (ang. *matrix metalloproteinase 10*) otrzymano używając tych dwóch metod, jednakże nie był on na porównywalnym poziomie. W celu normalizacji ekspresji genów sprawdzono ekspresję dwóch genów: *GAPDH* (ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) i *B2M* (ang. *beta-2-microglobulin*). Ostatecznie, *B2M* został użyty jako gen referencyjny, ze względu na wysoką stabilność we wszystkich analizowanych próbkach (rycina 13).

■ RNA-seq
▒ qPCR

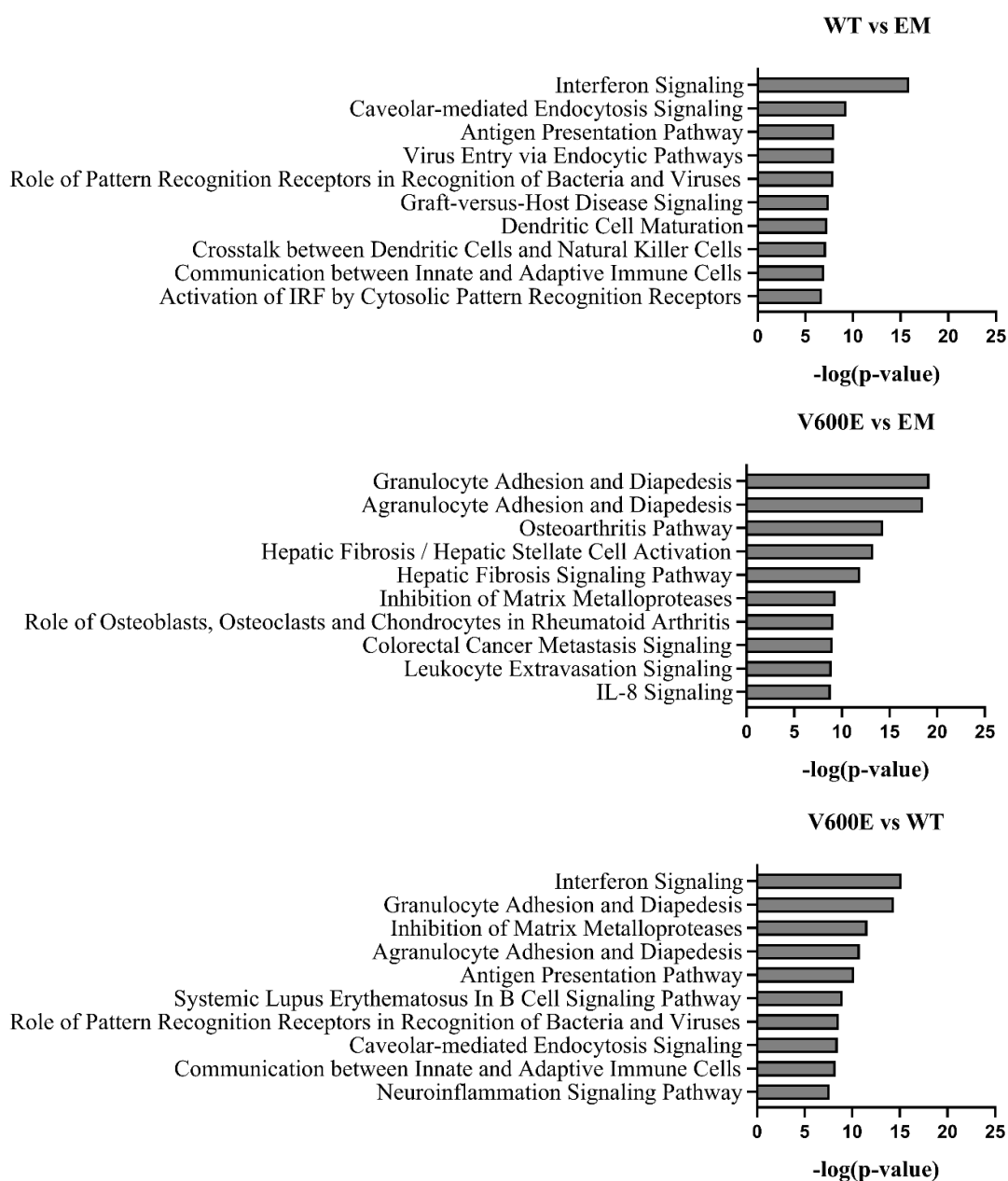




Rycina 13. Walidacja wyników otrzymanych z RNA-seq za pomocą qPCR. Analizę przeprowadzono dla 10 genów o różnej ekspresji. Czarne słupki przedstawiają wyniki uzyskane z RNA-seq, szare zaś odpowiadają wynikom otrzymanym z qPCR. Wykresy przedstawione są jako średnie (\pm SEM) i zostały wykonane w dwóch powtórzeniach.

Analiza ścieżek kanonicznych

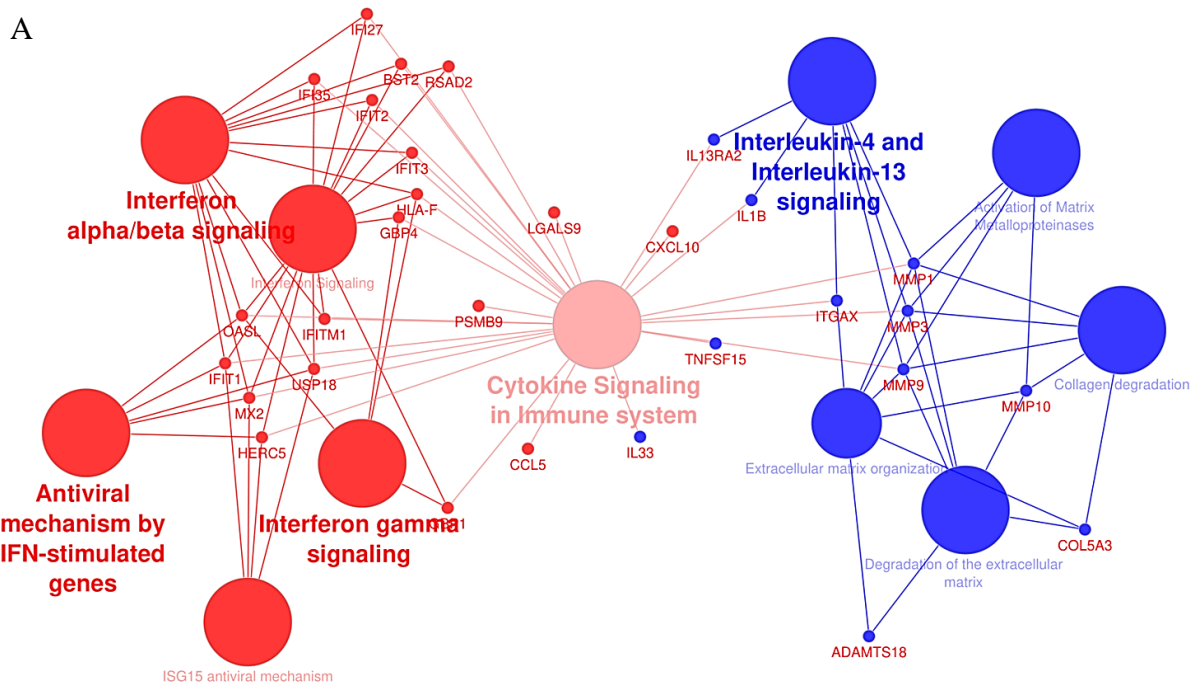
Geny o istotnie zróżnicowanej ekspresji zostały przypisane do ścieżek kanonicznych, w celu potencjalnej oceny ich wpływu na poszczególne procesy i funkcje komórki. Rycina 14 przedstawia najbardziej rozregulowane ścieżki dla wszystkich badanych grup. Szczególnie biorąc pod uwagę zestawienie BRAF V600W vs BRAF WT można stwierdzić, iż do najbardziej zmienionych szlaków zalicza się sygnalizacja związana z interferonem, adhezją i diapedezą granulocytów i agranulocytów, hamowaniem działania metaloproteinaz macierzy, prezentacją antygenów, które są kluczowymi szlakami w regulacji odporności, stanów zapalnych, proliferacji i migracji komórek. Ponadto wskazano, na aktywację procesów związanych z patogenezą wątroby takich jak np. zwłóknienie wątroby.

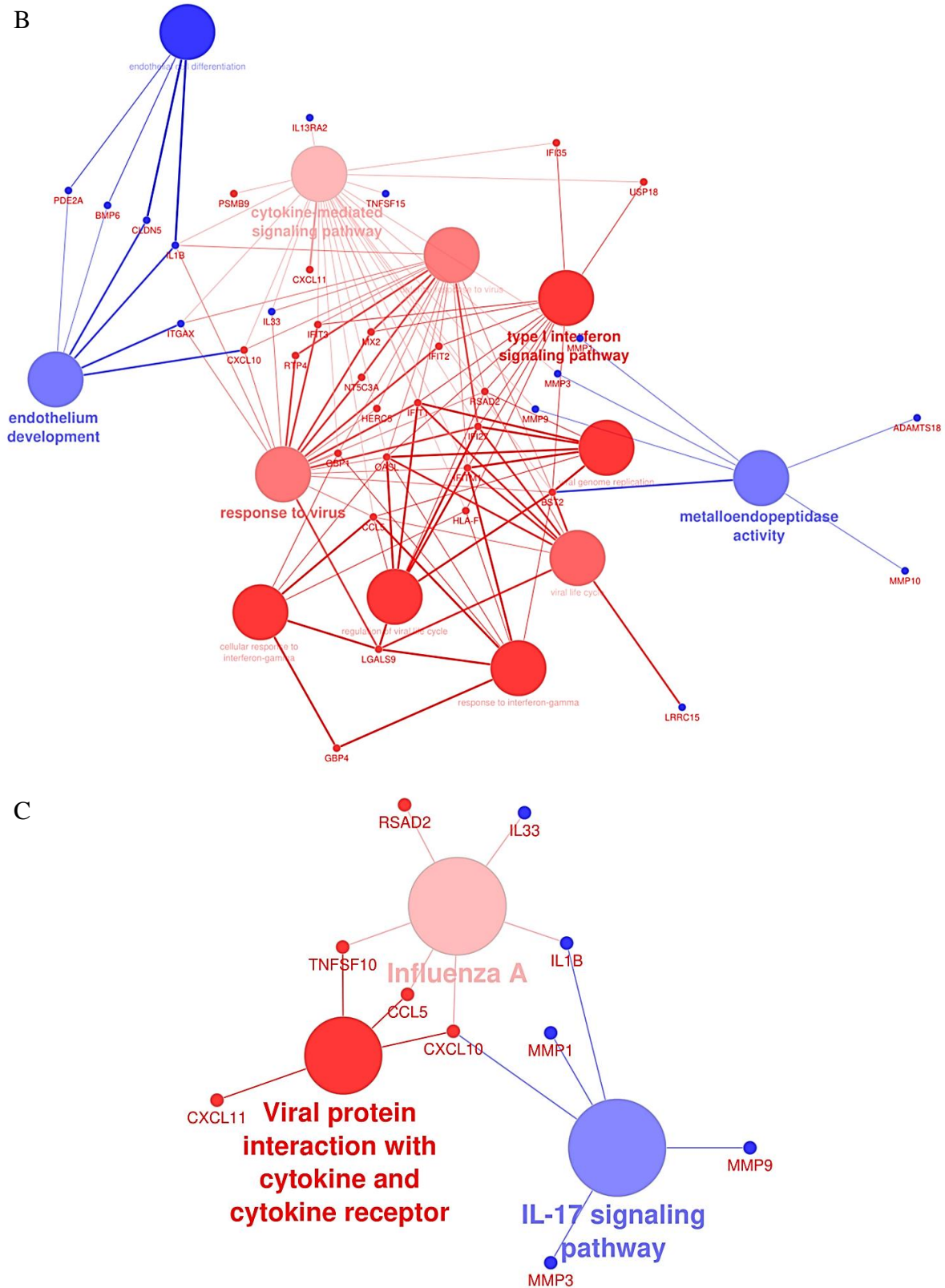


Rycina 14. Najbardziej rozregulowane ścieżki kanoniczne w badanych grupach.

Analiza zmienionych ścieżek sygnałowych

Geny o istotnie zróżnicowanej ekspresji w zestawieniu BRAF V600E vs BRAF WT poddano analizie bioinformatycznej tzw. „analizy wzbogacenia zbiorów genów” (ang. *gene set enrichment analysis*), której celem było zmapowanie danych z ekspresji genów na sieci zależności biologicznych oraz interakcji między genami a procesami biologicznymi. W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano i opracowano sieć oddziaływujących na siebie ścieżek sygnałowych i metabolicznych takich jak: sygnalizacja związana z interferonem, cytokinami, metaloproteinazami macierzy zewnątrzkomórkowej, rozwojem śródbłonka czy też odpowiedzią przeciwwirusową (rycina 15).

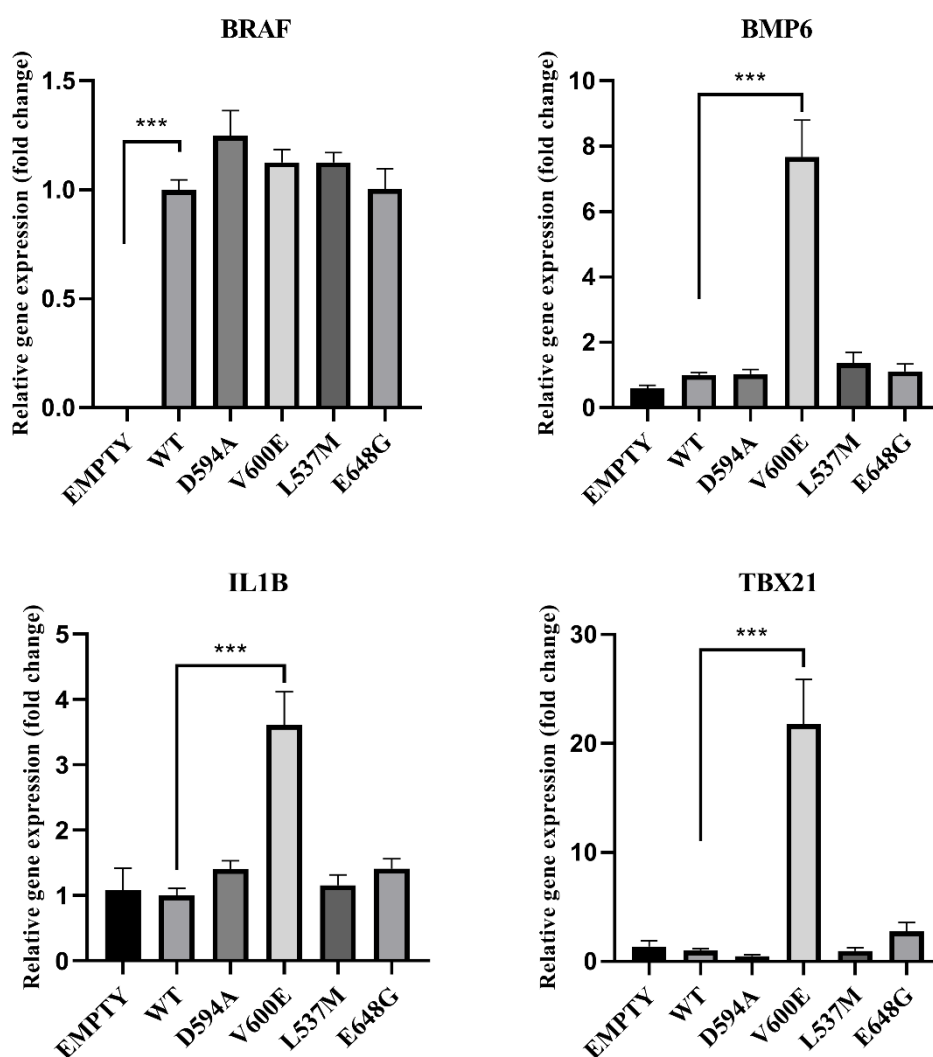


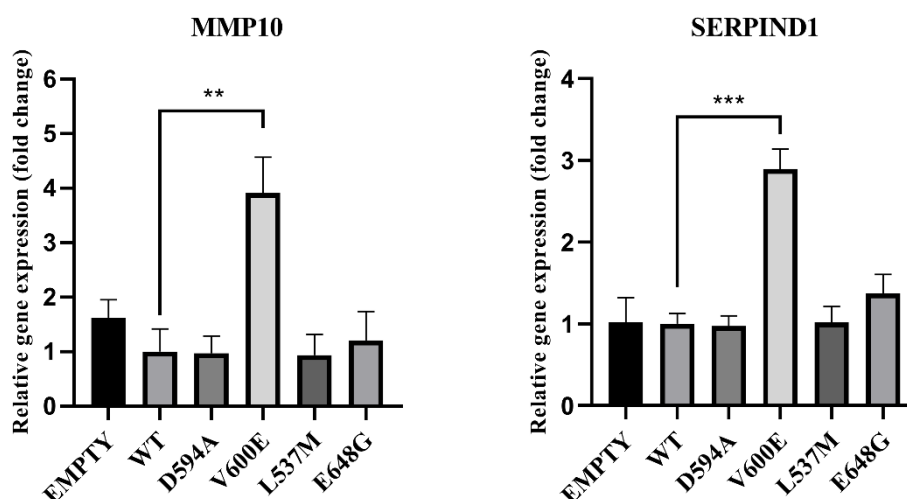


Rycina 15. Analiza sieciowa Cytoscape-ClueGo genów o podwyższonej (niebieski) i obniżonej (czerwony) ekspresji. A) Nadekspresja BRAF V600E w komórkach THLE-2 wpływa na szlaki sygnałowe zależne od interferonu i metaloproteinazy. B) Analiza wykazała, iż rozregulowane geny zaangażowane są w rozwój śródbłotka i odpowiedź przeciwwirusową. C) Aktywacja szlaku sygnałowego IL-17 przy jednoczesnym obniżeniu aktywności szlaku odpowiedzi na infekcję wirusową i produkcję cytokin.

Analiza ekspresji genów w komórkach THLE-2 z nadekspresją mutacji *BRAF*

Na podstawie wyników uzyskanych w RNA-seq zbadano poziom ekspresji genów (*BRAF*, *BMP6*, *IL1B*, *TBX21*, *MMP10*, i *SERPIND1*) w komórkach THLE-2 z nadekspresją mutacji *BRAF* (D594A, V600E, L537M, E648G) (rycina 16). Ekspresja mRNA *BRAF* utrzymywała się podobnym poziomie dla wszystkich mutacji *BRAF* i *BRAF* WT, co wskazuje na równą wydajność transfekcji we wszystkich grupach eksperymentalnych. Ponadto, nie zaobserwowano wpływu plazmidu bez wstawki (EMPTY) na zmiany ekspresji *BRAF* w komórkach THLE-2. Poziom ekspresji genów: *BMP6*, *IL1B*, *TBX21*, *MMP10*, i *SERPIND1* był znacząco podwyższony w hepatocytach z nadekspresją *BRAF* V600E, podczas gdy inne mutacje *BRAF* nie wpływały znacząco na zmiany ekspresji wymienionych genów.





Rycina 16. Wpływ mutacji *BRAF* na ekspresję wybranych genów. Wyniki przedstawiono jako krotność zmiany w porównaniu do kontroli (*BRAF* WT) \pm SEM. Poziom ekspresji genów był normalizowany do genu referencyjnego *B2M*. Analizę statystyczną przeprowadzono z zastosowaniem AVOVA z korekcją Bonferroniego, n = 3, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Analiza potencjalnych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych w rejonach promotorowych wybranych genów

Ścieżka sygnałowa MAPK/ERK aktywuje czynniki transkrypcyjne np. ELK1, c-FOS, c-MYC, ETS1 i SP1 [13, 107, 124], które następnie wpływają na ekspresję docelowych genów poprzez interakcję z sekwencją znajdującą się promotorze danego genu [16, 17, 48, 75, 140]. Nadekspresja *BRAF* V600E znacząco zwiększyła ekspresję kilkudziesięciu genów w komórkach THLE-2. Analiza *in silico* wykazała, że sekwencje w promotorach genów o najwyższym poziomie ekspresji mogą być miejscem wiązania białek: c-FOS, ETS1 i SP1 (tabela 2). Analiza ta wykazała złożoność potencjalnych mechanizmów, za pomocą których ścieżka MAPK/ERK kontroluje ekspresję genów.

Tabela 12. Identyfikacja miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych w obrębie sekwencji promotora wybranych genów.

Gene Promoter	Transcription factor				
	c-Myc	c-Fos	Elk-1	ETS1	SP1
<i>BMP6</i>	×	×		×	×
<i>TBX21</i>		×	×	×	×
<i>IL1B</i>			×	×	×
<i>SERPIND1</i>		×			×
<i>MMP10</i>			×	×	×
<i>COL5A3</i>		×		×	×
<i>ADAMTS18</i>		×		×	×
<i>IL33</i>			×		×
<i>LRRC15</i>		×		×	×
<i>TAGLN3</i>		×		×	×
<i>ESM1</i>		×		×	×

DYSKUSJA

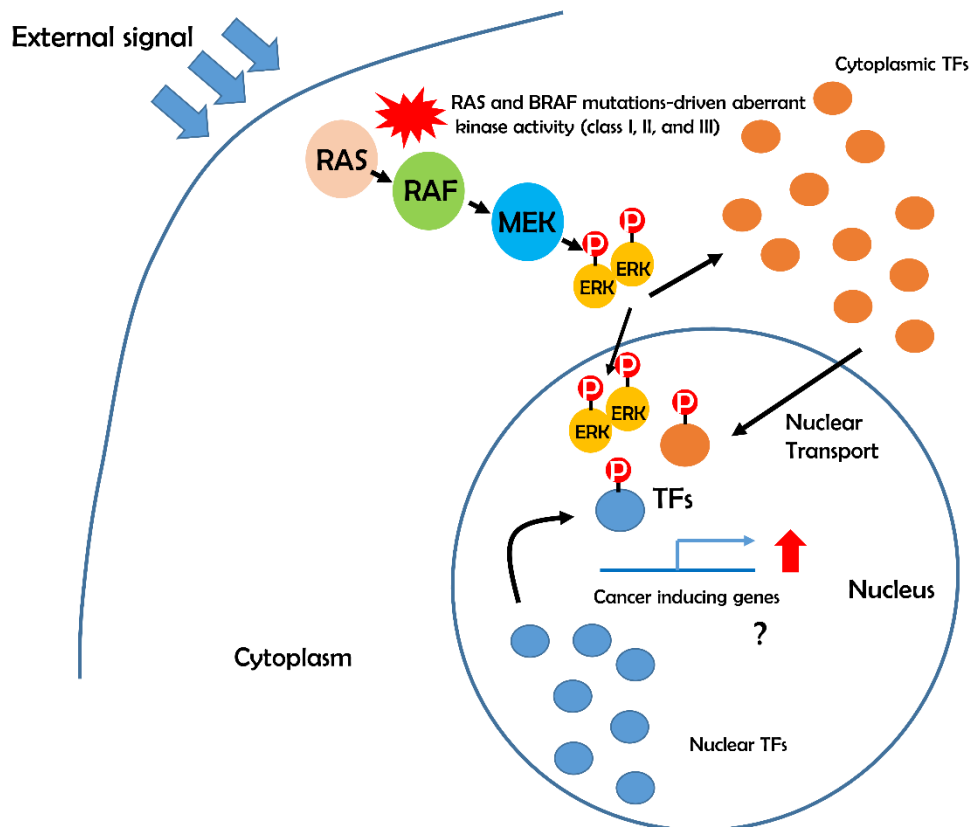
Nagromadzenie mutacji w genach, takich jak geny supresji nowotworowej lub protoonkogeny, znacząco wpływają na homeostazę komórkową. Nieprawidłowości w mechanizmach kontrolujących proliferację komórkową, mogą przyczynić się do znacznego przyspieszenia wzrostu i podziałów komórkowych, na skutek utraty wrażliwości na sygnały zewnątrzkomórkowe i mechanizmy ich regulacji [37]. Za pomocą kompleksowej analizy DNA pochodzącego z próbek raka wątroby (raka wątrobowokomórkowego związanego z wirusem) zidentyfikowano nowe i rzadkie mutacje w genie *BRAF*, a także często występujące w innych typach nowotworu mutację *BRAF* V600E [98]. Dotychczas nie został zbadany wpływ tych mutacji na proces rozwoju raka wątroby. W naszych badaniach wykazano kancerogenny wpływ mutacji *BRAF* V600E na hepatocyty linii THLE-2. Ponadto zidentyfikowaliśmy geny potencjalnie regulowane przez szlak sygnałowy MAPK/ERK zależny od *BRAF* V600E. Analiza funkcjonalna pozwoliła wykazać, że mutacje *BRAF* L537M, D594A i E648G nie wywołują efektu patologicznego w komórkach wątroby linii THLE-2.

Nieprawidłowe działanie onkogenu *BRAF* może wpływać na rozwój raka [135]. Najczęstszą zmianą związaną z rozwojem różnych nowotworów jest mutacja *BRAF* V600E [77, 113]. Ze względu na fakt, że ta mutacja została po raz pierwszy zidentyfikowana u pacjenta z rakiem wątroby, zbadaliśmy jej wpływ na funkcjonowanie hepatocytów linii THLE-2, jak również określiliśmy rolę innych mutacji *BRAF*, takich jak L537M, D594A, czy też E648G.

Konstitutywna aktywacja ścieżki MAPK/ERK zależna od mutacji *BRAF* V600E była badana u różnych zwierząt. Guzy obserwowane u psów wykazują znaczne podobieństwo do ludzkich pod względem cech histopatologicznych, zdolności do przerzutów, heterogenności guza i odpowiedzi na terapię [89]. Ponadto sekwencja aminokwasów jest wysoce konserwatywna ewolucyjnie między ludźmi i psami [95]. *BRAF* V450E (lub V595E, zależnie od sekwencji referencyjnej) u psów odpowiada ludzkiemu V600E i podobnie wywołuje silną aktywację ścieżki sygnałowej MAPK/ERK. Do nowotworów spotykanych u psów ze stwierdzoną mutacją *BRAF* V450E zalicza się czerniaka złośliwego, raka nabłonka dróg moczowych i gruczołu krokowego, guzy mózgu, nowotwory układu krwiotwórczego i tarczycy [63, 94, 121]. Jednakże nie zostały przeprowadzone badania, potwierdzające wpływ tej mutacji na rozwój wyżej wymienionych nowotworów, co jest również warte rozważenia. Nasza analiza sekwencji aminokwasów regionu domeny kinazy ujawniła wysoką konserwację ewolucyjną wśród wielu organizmów. Najwyższy wynik zgodności sekwencji aminokwasów *BRAF* wskazuje na kluczową rolę tej kinazy w regulacji procesów komórkowych.

BRAF jest kinazą serynowo-treoninowa i jednocześnie jednym z głównych białek szlaku sygnałowego MAPK/ERK, który reguluje proliferację, wzrost i przeżycie komórek [27]. Zaburzenia funkcjonowania tej kaskady białkowej są jednym z głównych przyczyn rozwoju

wielu typów raka [111]. Mutacje BRAF wpływają na aktywność kinazy, co z kolei skutkuje zaburzeniami w funkcjonowaniu dalszych białek tego szlaku. Aktywny (fosforylowany) ERK, jako końcowy element szlaku MAPK/ERK aktywuje wiele genów docelowych w jądrze, jak i w innych organellach komórkowych (rycina 17) [69].



Rycina 17. Szlak sygnału MAPK/ERK w progresji nowotworu. Czynniki transkrypcyjne (TFs) są aktywowane przez P-ERK w jądrze komórkowym i cytoplazmie, skąd są transportowane w postaci aktywnej do jądra komórkowego. Nieprawidłowa aktywność MAPK/ERK spowodowana mutacją BRAF lub RAS aktywuje geny wywołujące raka [142].

W naszych badaniach stwierdzono wysoką ekspresję fosforylowanej formy ERK w komórkach THLE-2 z nadekspresją BRAF V600E. Wyniki te potwierdzają, że mutacja BRAF V600E silnie aktywuje szlak sygnałowy MAPK/ERK w hepatocytach. Konstytutywną aktywację tej ścieżki stwierdzono w wielu przypadkach czerniaka złośliwego, raka jelita grubego, brodawkowego tarczycy, gruczolaka płuc i innych typach nowotworów [26, 28, 70, 80, 83]. Nasze wyniki badań są zgodne z rezultatami innych grup badawczych i sugerują, że mutacja BRAF V600E może być uważana jako czynnik ryzyka w rozwoju raka wątroby. W przyjętym przez nas modelu badawczym mutacje BRAF L537M i E648G powodowały obniżenie aktywności ścieżki sygnałowej MAPK/ERK. Biorąc pod uwagę fakt, że mutacje BRAF L537M, D594A i E648G nie wpływają na wzrost i migrację komórek oraz nie

zwiększają poziomu fosforylacji ERK, możemy stwierdzić, że nie są one patogenne w przypadku raka wątroby. Jednakże, dalsze szczegółowe badania są niezbędne.

Mutacje BRAF w kodonie 594, a także 596 zidentyfikowano u pacjentów z przerzutowym rakiem jelita grubego, jak również ze szpiczakiem mnogim i niedrobnokomórkowym rakiem płuc [97, 133]. W naszych badaniach mutacja BRAF D594A, w przeciwieństwie do BRAF V600E nie nasilała fosforylacji ERK w hepatocytach i komórkach HEK293. Inna grupa badawcza wykazała, że mutacja D594A BRAF różni się istotnie od V600E pod względem cech molekularnych, patologicznych i klinicznych, dając jednocześnie lepsze rokowanie i dłuższe przeżycie pacjentów [88]. Wyniki innych badań z wykorzystaniem mysiego modelu czerniaka udowodniły, że mutacja BRAF D594A osłabia aktywność kinazy i przyczynia się do rozwoju guza przy jednoczesnym występowaniu onkogennej mutacji RAS. Wyniki tych badań wykazały złożoność transdukcji sygnału w obrębie ścieżki MAPK/ERK i podkreśliły istotność zrozumienia tego mechanizmu w praktyce klinicznej [59]. Mutacje w segmencie aktywacyjnym (*loci* 564 i 596) powodują zmiany w prawidłowej konformacji białka, która jest kluczowa dla zakotwiczenia ATP [58]. Zmiany w kodonie 594 należą do trzeciej klasy mutacji BRAF i powodują obniżenie aktywności kinazy [109]. Jednakże w naszych badaniach mutacja BRAF D594A nie zmieniła ekspresji P-ERK, wzrostu i migracji w komórkach THLE-2, co sugeruje, że nie jest ona patogenna w komórkach wątroby. Mutacje BRAF L537M i BRAF E648G zidentyfikowano po raz pierwszy i nie ma badań opisujących ich funkcję.

Komórki rakowe wykazują podwyższoną zdolność do migracji i tworzenia przerzutów. Jest to obserwowane podczas gdy pojedyncze komórki odrywają się od guza pierwotnego, przemieszczają się przez naczynia limfatyczne i krwionośne, a następnie osiadają w nowym miejscu w organizmie, tworząc guzy wtórne [47]. Zdolność do ruchu komórek zależy od kinetyki cytoszkieletu i receptorów zlokalizowanych na ich powierzchni [30]. Komórki rakowe wykorzystują te same mechanizmy migracji, co prawidłowe komórki, jednak są zdolne do omijania restrykcyjnych systemów kontroli komórkowych [33]. Dlatego też zwiększona migracja komórek jest jednym z parametrów definiujących komórki rakowe [47]. W naszych badaniach określono wpływ wybranych mutacji BRAF na migrację komórek. Zauważono, że mutacja BRAF V600E zwiększały migracje komórek, w przeciwieństwie do BRAF L537M, D594A i E648G. Podobny efekt był obserwowany przez inne grupy badawcze, gdzie zwiększony wskaźnik migracji był stwierdzony w komórkowym modelu raka tarczycy, niosących mutację BRAF V600E [143]. Ponadto, zahamowanie aktywności BRAF V600E zmniejszyło inwazyjność komórek oraz przerzuty w mysim modelu anaplastycznego raka tarczycy [73, 98].

Zdrowe komórki różnią się istotnie od komórek nowotworowych pod względem regulacji procesów komórkowych [42]. Sygnały są odbierane z zewnętrznego środowiska komórki poprzez wiązanie mitogenów do receptorów transbłonowych i dalsze przekazywanie informacji do efektorów docelowych. Komórki nowotworowe wykazują wysoki wskaźnik proliferacji niezależny od bodźców zewnętrznych [19]. Jednakże obserwowano również utratę zdolności do proliferacji w komórkach rakowych. Jest to związane ze spadkiem tempa syntezy białek w retikulum endoplazmatycznym i aparacie Golgiego [42]. W naszych badaniach poziom proliferacji został zbadany jako jedna z głównych cech definiujących komórki nowotworowe. Wysoką proliferację wykazywały hepatocyty z nadekspresją BRAF V600E, podczas gdy dla pozostałych badanych mutacji BRAF poziom ten był porównywalny do proliferacji komórek kontrolnych. Liczne badania wskazują na podobny efekt w przypadku różnych typów komórek rakowych niosących mutacje BRAF V600E [44, 54, 62].

Oprócz tego oceniliśmy wpływ nadekspresji BRAF V600E na zmiany w fazach cyklu komórkowego. Wiadome jest, że BRAF V600E konstytutywnie aktywuje szlak MAPK/ERK, który jest kluczowym regulatorem cyklu i wzrostu komórek [38]. W naszym badaniu wykazano, że mutacja BRAF V600E wpływała na zmiany w cyklu komórkowym, poprzez zwiększenie populacji komórek linii THLE-2 będących w fazie G2 w porównaniu do komórek kontrolnych. W fazie tej komórki przygotowują się do wejścia w mitozę poprzez intensywną syntezę białek i szybki wzrost komórek [22]. Z innych badań wynika, że zablokowanie aktywności ERK1/2 przez leki celowane (np. wemurafenib) wykazało zmniejszenie proliferacji komórek i zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 [43, 51]. Wemurafenib hamuje proliferację komórek u chorych cierpiących na czerniaka z mutacją BRAF V600E [92], co sugeruje terapeutyczne zastosowanie wemurafenibu również u chorych na raka wątroby, posiadających tą mutację.

Nasze badania wykazały, że mutacja BRAF V600E wpływa na fenotyp prawidłowych hepatocytów. Można zatem stwierdzić, iż podobnie jak w innych nowotworach mutacja BRAF V600E jest onkogenna niezależnie od typu komórki [72]. Szlak sygnałowy MAPK/ERK jest konstytutywnie aktywny w około 30% wszystkich typów nowotworów [40]. Ze względu na to, że ta kaskada reguluje wiele procesów komórkowych, ważne jest, aby zidentyfikować jej docelowe geny oraz ich funkcje w rozwoju raka. Jednak geny regulowane przez MAPK/ERK o zwiększonej aktywacji są w dużej mierze nieznane. W komórkach THLE-2 z nadekspresją BRAF V600E stwierdziliśmy zróżnicowaną ekspresję genów w porównaniu do ekspresji komórek kontrolnych. Zidentyfikowaliśmy 436 genów o istotnie zróżnicowanej ekspresji. Jednym z genów o zwiększonej ekspresji był *BMP6*, który to jest regulatorem wielu procesów komórkowych, takich jak homeostaza żelaza, rozwój kości i tkanki tłuszczowej [55, 84]. Mutacje w mysim genie *Bmp6* są związane z nadmiernym odkładaniem żelaza w narządach,

w tym wątrobie [57]. Ponadto stwierdzono, że nadekspresja *BMP6* w komórkach raka prostaty sprzyja migracji i inwazyjności [50]. Podobne wyniki uzyskano dla komórek raka piersi, gdzie zwiększona ekspresja *BMP6* była związane z przerzutami guza [46]. Zgodnie z danymi prezentowanymi przez Atlas Genomu Raka, w próbkach raka wątroby stwierdzono wysoki lub średni poziom ekspresji *BMP6*. Ponadto pacjenci z rakiem wątroby i wysoką ekspresją *BMP6* wykazują zmniejszoną przeżywalność w porównaniu z pacjentami z niską ekspresją tego genu [3]. W mysim modelu czerniaka niedobór *Bmp6* wiąże się ze znacznym zmniejszeniem tempa rozwoju guza [127]. Podobnie do tych badań, obserwowaliśmy podwyższony poziom *BMP6* w hepatocytach z nadekspresją BRAF V600E, podczas gdy inne mutacje BRAF (L537M, D594A i E648G) nie zmieniały jego ekspresji.

Innym zidentyfikowanym w naszych badaniach genem o zwiększonej ekspresji był *SERPIND1*. *SERPIND1* należy do rodziny wysoce konserwatywnych inhibitorów proteaz serynowych i jest syntetyzowany w hepatocytach i w cholangiocytych wątroby oraz w makrofagach [3, 99, 122]. Nadekspresja tego genu została zidentyfikowana w niektórych typach nowotworów. Pacjenci z niedrobnokomórkowym rakiem płuc (NSCLC) i jednocześnie podwyższonym poziomem *SERPIND1* wykazywali krótszy wskaźnik przeżycia niż pacjenci z niższym jego poziomem [91]. Zmniejszoną ilość *SERPIND1* wykryto u pacjentów z rakiem prostaty i płuc po leczeniu chemioterapią. Fakt ten może służyć jako wskaźnik skuteczności leczenia [74]. Ponadto, podwyższoną ekspresję *SERPIND1* wykryto w przypadku występowania raka wątrobowokomórkowego, raka jelita grubego, szpiczaka mnogiego, raka piersi i innych nowotworów złośliwych [3, 99]. W NSCLC wysoka ekspresja *SERPIND1* zwiększa migrację komórek poprzez tworzenie pseudopodiów w komórkach nowotworowych [99]. Inna grupa badawcza wykazała w komórkowym modelu raka jajnika, że *SERPIND1* wpływa na wzrost proliferacji komórek. Ponadto wysunięto wniosek, że poziom ekspresji *SERPIND1* może być stosowany jako biomarker do diagnozowania pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (B-komórkową) [99].

Oprócz tego wykazaliśmy, że podwyższony poziom *TBX21* w hepatocytach z nadekspresją BRAF V600E. *TBX21* jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za procesy rozwojowe i regulację ekspresji cytokin Th1 i interferonu gamma (IFNG) [117]. W innych badaniach zostało stwierdzone, że wysoka ekspresja *TBX21* jest związana ze złym rokowaniem pacjentów z rakiem piersi i gruczolakorakiem płuc [85, 117].

Rola *MMP10* w progresji nowotworowej oraz w procesie powstawania przerzutów była badana w wielu typach nowotworów. Zidentyfikowano istotnie zwiększoną ekspresję *MMP10* np. w raku skóry, okrężnicy, płuc, czy też w raku szyjki macicy [20, 49, 86, 101]. W badaniach z wykorzystaniem mysiego modelu HCC wykazano, że *MMP10* było aktywowane przez szlak MAPK/ERK oraz oś CXCR4/SDF1 (ang. *C-X-C chemokine receptor-4/stromal-derived factor-*

1), co przyczyniło się do rozwoju HCC i tworzenia przerzutów [90]. W naszych badaniach również zaobserwowaliśmy podwyższony poziom ekspresji *MMP10*, ale tylko w komórkach THLE-2 z nadekspresją mutacji BRAF V600E, co może sugerować, że ta mutacja jest silnie związana ze złośliwą transformacją hepatocytów.

Rola IL1B jako czynnika odpowiedzi zapalnej jest znana w kontekście regulacji różnych procesów komórkowych, takich jak proliferacja, migracja i apoptoza. Jednak wiele badań wskazuje na rolę IL1B w nowotworach, polegającą na wspomaganiu komórek supresorowych pochodzenia szpikowego oraz procesu angiogenezy, czy też aktywacji komórek śródbłonna i immunosupresyjnej aktywności makrofagów związanych z guzem (TAM) [114]. W naszych badaniach wykazaliśmy, że zwiększona ekspresja *IL1B* jest związana z nadekspresją BRAF V600E w komórkach THLE-2. Podobnie, podwyższony poziom *IL1B* został zidentyfikowany w różnych guzach litych, w tym np. w raku płuc, okrężnicy, piersi, jak również w czerniaku [14, 29, 96, 141]. Badania *in vitro* z wykorzystaniem melanocytów oraz modelu czerniaka wykazały, że transkrypcja *IL1B* jest indukowana mutacją BRAF V600E. Efekt ten może być blokowany przez zastosowanie wemurafenibu [71]. W naszych badaniach analiza ekspresji genów wykazała podobny profil ekspresji genów, jaki jest obserwowanych w innych typach nowotworów z mutacją BRAF V600E.

Przeprowadzone przez nas sekwencjonowanie NGS transkryptomu hepatocytów z nadekspresją BRAF V600E, pozwoliło na wskazanie szeregu DEGs. Zbadanie interakcji między tymi genami umożliwiło nam zidentyfikować szlaki o najbardziej zmienionych ekspresjach. Jednym z nich był szlak sygnalizacji interferonu (IFN). Białka IFN to grupa czynników sygnałowych wytwarzanych przez komórki w celu aktywacji ochrony przed różnymi zaburzeniami wynikającymi z inwazji wirusów lub rozwoju komórek nowotworowych. IFN mogą bezpośrednio przyczyniać się do walki z rakiem lub pośrednio aktywować i kierować układ odpornościowy do komórek nowotworowych [132]. Mutacja BRAF V600E wpływa na obniżenie przekazywania sygnału zależnego od IFN-alpha oraz ekspresji receptora IFNAR1 (ang. *IFN-alpha receptor-1*) [100, 104]. W naszych badaniach również obserwowaliśmy zmniejszoną aktywność szlaku zależnego od interferonu, a także podwyższoną ekspresję metaloproteinaz. Macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*, ECM) kształtuje środowisko komórkowe i tkankowe, podczas gdy MMPs wykazujące aktywność proteolityczną, biorą udział w przebudowie ECM [139]. Zaburzenia w strukturze i komponentach ECM są nieodłącznym elementem wzrostu guza, co zwiększa tempo migracji komórek poprzez utratę ich adhezji i unaczynienie guza [116]. W komórkach prawidłowych ścieżka MAPK/ERK kontroluje ekspresję genów MMPs. W guzach z mutacją BRAF V600E obserwuje się znaczną nadekspresję MMP9 [115]. Istnieje powiązanie między tymi dwiema grupami zaangażowanymi w sygnalizację cytokin takie jak geny *CXCL10*, *IL33*, *CCL5*. W

przyjętym przez nas modelu obserwujemy nadekspresję IL33. Wiadome jest, iż IL33 bierze udział w rozwoju wielu chorób, takich jak cukrzyca i alergie. Ostatnie badania pokazały, że IL33 wykazuje zależne od tkanek działanie pro-nowotworowe, w tym promowanie angiogenezy, przebudowę ECM i znaczący wpływ na ekspresję innych cytokin [123]. Obserwacje te sugerują, że analizowane przez nas geny (*CXCL10*, *IL33*, *CCL5*) mogą negatywnie modulować ścieżkę sygnalizacyjną interferonu i zwiększać ekspresję metaloproteinaz. Sprawdzenie efektu wyciszenia lub wzmocnienia ekspresji tych genów mogłoby być interesujące w dalszych badaniach nad rozwojem raka wątroby.

Ponadto, nasza dalsza analiza sieci wykazała, że geny *IL1B*, *CLDN5* (ang. *claudin-5*), and *PDE2A* (ang. *phosphodiesterase 2A*) są również zaangażowane w rozwój śródbłonna. W przebiegu nowotworu złośliwego obserwuje się wzrost ekspresji czynników proangiogennych, co z kolei skutkuje silnym unaczynieniem guza [11, 134]. Dlatego też, mutacja BRAF V600E wyzwała znaczące zmiany w sieci transkrypcyjnej promujące wzrost guza i jego dalsze przerzuty. Nasze badania wykazały, że mutacja BRAF V600E może być uznana za czynnik wysokiego ryzyka w raku wątroby. Analiza promotorów przypuszczalnych genów docelowych dla ścieżki sygnalizacyjnej zależnej od BRAF V600E wykazała, że mogą być one kontrolowane przez białka ETS1, SP1 i c-FOS.

Zastosowanie terapii skierowanej na konkretne białko szlaku sygnałowego, zaangażowanego w rozwój raka wątroby może potencjalnie skutkować mniejszą liczbą skutków ubocznych. Poszczególne białka ścieżki MAPK/ERK są od wielu lat są intensywnie badane pod kątem hamowania progresji nowotworowej [112, 126]. Konieczne są jednak dalsze badania w celu potwierdzenia roli zidentyfikowanych czynników w rozwoju raka wątroby z współistniejącą mutacją BRAF V600E.

WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań i analiz wysunięto następujące wnioski:

- Mutacje BRAF L537M, E648G i D594A nie wykazują istotnego, funkcjonalnego wpływu na szlak sygnałowy MAPK/ERK oraz nie są kancerogenne dla hepatocytów linii THLE-2.
- Mutacja BRAF V600E może być uznana za jeden z czynników wywołujących HCC poprzez aktywację ERK i zmiany na poziomie transkryptomu hepatocytów.
- Nadekspresja BRAF V600E powoduje istotne zmiany w profilu ekspresji wybranych genów w hepatocytach, podobnie jak w nowotworach innych tkanek i narządów zawierających tę mutację.

- Terapia oparta na hamowaniu szlaku sygnałowego zależnego od BRAF V600E mogłaby być zastosowana u pacjentów z rakiem wątroby, będących nosicielami tej mutacji.

LITERATURA

1. *AliBaba2.1*. [software] January 2000; Available from: <http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/>.
2. *The Eukaryotic Promoter Database* Available from: <https://epd.epfl.ch//index.php.%20AND%2010.1093/nar/gkw1069>.
3. *The Human Protein Atlas*. [cited 2021 28-02-2021]; Available from: <https://www.proteinatlas.org/>.
4. *ImageJ*. [cited 2020 2020-12-12]; Available from: <https://imagej.nih.gov/ij/>.
5. *International Cancer Genome Consortium data portal*. [cited 2021 18.02.2021]; Available from: <https://dcc.icgc.org/>.
6. Systems, I. *the Ingenuity Pathways Analysis*. [cited 2020 18.05.2020]; Available from: www.ingenuity.com/.
7. Anderson, L.J. and Sandison, A.T., *Tumors of the liver in cattle, sheep and pigs*. *Cancer*, 1968. **21**(2): p. 289-301.
8. Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S.H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., and et al., *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types*. *Nature*, 1989. **342**(6250): p. 705-8.
9. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C.C., *p53 mutations in human cancers*. *Science*, 1991. **253**(5015): p. 49-53.
10. Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., and Bacchetti, S., *Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity*. *Embo j*, 1992. **11**(5): p. 1921-9.
11. Hanahan, D. and Folkman, J., *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. *Cell*, 1996. **86**(3): p. 353-64.
12. Wingender, E., Dietze, P., Karas, H., and Knüppel, R., *TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites*. *Nucleic Acids Res*, 1996. **24**(1): p. 238-41.
13. Yang, B.S., Hauser, C.A., Henkel, G., Colman, M.S., Van Beveren, C., Stacey, K.J., Hume, D.A., Maki, R.A., and Ostrowski, M.C., *Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(2): p. 538-47.
14. Jin, L., Yuan, R.Q., Fuchs, A., Yao, Y., Joseph, A., Schwall, R., Schnitt, S.J., Guida, A., Hastings, H.M., Andres, J., Turkel, G., Polverini, P.J., Goldberg, I.D., and Rosen, E.M., *Expression of interleukin-1beta in human breast carcinoma*. *Cancer*, 1997. **80**(3): p. 421-34.
15. Reardon, J.T., Bessho, T., Kung, H.C., Bolton, P.H., and Sancar, A., *In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(17): p. 9463-8.
16. Kaiser, U.B., Sabbagh, E., Chen, M.T., Chin, W.W., and Saunders, B.D., *Sp1 binds to the rat luteinizing hormone beta (LHbeta) gene promoter and mediates gonadotropin-releasing hormone-stimulated expression of the LHbeta subunit gene*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(21): p. 12943-51.
17. Dang, C.V., *c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(1): p. 1-11.
18. *Molecular Cell Biology*. 4th edition ed. 2000: W. H. Freeman and Company.

19. Hanahan, D. and Weinberg, R.A., *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
20. Kerkelä, E., Ala-aho, R., Lohi, J., Grénman, R., V, M.K., and Saarialho-Kere, U., *Differential patterns of stromelysin-2 (MMP-10) and MT1-MMP (MMP-14) expression in epithelial skin cancers*. Br J Cancer, 2001. **84**(5): p. 659-69.
21. Brose, M.S., Volpe, P., Feldman, M., Kumar, M., Rishi, I., Gerrero, R., Einhorn, E., Herlyn, M., Minna, J., Nicholson, A., Roth, J.A., Albelda, S.M., Davies, H., Cox, C., Brignell, G., Stephens, P., Futreal, P.A., Wooster, R., Stratton, M.R., and Weber, B.L., *BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma*. Cancer Res, 2002. **62**(23): p. 6997-7000.
22. Bruce Alberts, A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter., *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. 2002: Garland Science.
23. Hall, B.E., Bar-Sagi, D., and Nassar, N., *The structural basis for the transition from Ras-GTP to Ras-GDP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12138-42.
24. Hindley, A. and Kolch, W., *Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 8): p. 1575-81.
25. Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Velculescu, V.E., *Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status*. Nature, 2002. **418**(6901): p. 934.
26. Yuen, S.T., Davies, H., Chan, T.L., Ho, J.W., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Tsui, W.W., Chan, A.S., Futreal, P.A., Stratton, M.R., Wooster, R., and Leung, S.Y., *Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia*. Cancer Res, 2002. **62**(22): p. 6451-5.
27. Zhang, W. and Liu, H.T., *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. Cell Res, 2002. **12**(1): p. 9-18.
28. Kumar, R., Angelini, S., Czene, K., Sauroja, I., Hahka-Kemppinen, M., Pyrhönen, S., and Hemminki, K., *BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(9): p. 3362-8.
29. Matanić, D., Beg-Zec, Z., Stojanović, D., Matakorić, N., Flego, V., and Milevoj-Ribić, F., *Cytokines in patients with lung cancer*. Scand J Immunol, 2003. **57**(2): p. 173-8.
30. Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
31. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T., *Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks*. Genome Res, 2003. **13**(11): p. 2498-504.
32. Bosch, F.X., Ribes, J., Díaz, M., and Cléries, R., *Primary liver cancer: worldwide incidence and trends*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S5-s16.
33. Friedl, P., *Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(1): p. 14-23.
34. Futreal, P.A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N., and Stratton, M.R., *A census of human cancer genes*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(3): p. 177-83.
35. Garnett, M.J. and Marais, R., *Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene*. Cancer Cell, 2004. **6**(4): p. 313-9.
36. Liptak, J.M., Dernell, W.S., Monnet, E., Powers, B.E., Bachand, A.M., Kenney, J.G., and Withrow, S.J., *Massive hepatocellular carcinoma in dogs: 48 cases (1992-2002)*. J Am Vet Med Assoc, 2004. **225**(8): p. 1225-30.
37. Michor, F., Iwasa, Y., and Nowak, M.A., *Dynamics of cancer progression*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(3): p. 197-205.
38. Sebolt-Leopold, J.S. and Herrera, R., *Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(12): p. 937-47.

39. Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D., and Marais, R., *Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF*. *Cell*, 2004. **116**(6): p. 855-67.
40. Scholl, F.A., Dumesic, P.A., and Khavari, P.A., *Effects of active MEK1 expression in vivo*. *Cancer Lett*, 2005. **230**(1): p. 1-5.
41. Olsen, J., [*Cancer-protecting genes (tumor-suppressor genes)*]. *Ugeskr Laeger*, 2006. **168**(24): p. 2329-31.
42. Baba AI, C.C., *Comparative Oncology*. 2007: The Publishing House of the Romanian Academy.
43. Bhatt, K.V., Hu, R., Spofford, L.S., and Aplin, A.E., *Mutant B-RAF signaling and cyclin D1 regulate Cks1/S-phase kinase-associated protein 2-mediated degradation of p27Kip1 in human melanoma cells*. *Oncogene*, 2007. **26**(7): p. 1056-66.
44. Liu, D., Liu, Z., Condouris, S., and Xing, M., *BRAF V600E maintains proliferation, transformation, and tumorigenicity of BRAF-mutant papillary thyroid cancer cells*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(6): p. 2264-71.
45. Vousden, K.H. and Lane, D.P., *p53 in health and disease*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(4): p. 275-83.
46. Yang, S., Du, J., Wang, Z., Yuan, W., Qiao, Y., Zhang, M., Zhang, J., Gao, S., Yin, J., Sun, B., and Zhu, T., *BMP-6 promotes E-cadherin expression through repressing deltaEF1 in breast cancer cells*. *BMC Cancer*, 2007. **7**: p. 211.
47. Yilmaz, M., Christofori, G., and Lehembre, F., *Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis*. *Trends Mol Med*, 2007. **13**(12): p. 535-41.
48. Zhang, X., Zhang, L., Yang, H., Huang, X., Otu, H., Libermann, T.A., DeWolf, W.C., Khosravi-Far, R., and Olumi, A.F., *c-Fos as a proapoptotic agent in TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(19): p. 9425-34.
49. Zhang, X., Zhu, S., Luo, G., Zheng, L., Wei, J., Zhu, J., Mu, Q., and Xu, N., *Expression of MMP-10 in lung cancer*. *Anticancer Res*, 2007. **27**(4c): p. 2791-5.
50. Darby, S., Cross, S.S., Brown, N.J., Hamdy, F.C., and Robson, C.N., *BMP-6 over-expression in prostate cancer is associated with increased Id-1 protein and a more invasive phenotype*. *J Pathol*, 2008. **214**(3): p. 394-404.
51. Lopez-Bergami, P., Fitchman, B., and Ronai, Z., *Understanding signaling cascades in melanoma*. *Photochem Photobiol*, 2008. **84**(2): p. 289-306.
52. Nishida, N., Nagasaka, T., Nishimura, T., Ikai, I., Boland, C.R., and Goel, A., *Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2008. **47**(3): p. 908-18.
53. Piccolo, S.R. and Frey, L.J., *Somatic mutation signatures of cancer*. *AMIA Annu Symp Proc*, 2008. **2008**: p. 202-6.
54. Preto, A., Figueiredo, J., Velho, S., Ribeiro, A.S., Soares, P., Oliveira, C., and Seruca, R., *BRAF provides proliferation and survival signals in MSI colorectal carcinoma cells displaying BRAF(V600E) but not KRAS mutations*. *J Pathol*, 2008. **214**(3): p. 320-7.
55. Camaschella, C., *BMP6 orchestrates iron metabolism*. *Nat Genet*, 2009. **41**(4): p. 386-8.
56. Mebratu, Y. and Tesfaigzi, Y., *How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?* *Cell Cycle*, 2009. **8**(8): p. 1168-75.
57. Meynard, D., Kautz, L., Darnaud, V., Canonne-Hergaux, F., Coppin, H., and Roth, M.P., *Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload*. *Nat Genet*, 2009. **41**(4): p. 478-81.
58. Moretti, S., De Falco, V., Tamburrino, A., Barbi, F., Tavano, M., Avenia, N., Santeusano, F., Santoro, M., Macchiarulo, A., and Puxeddu, E., *Insights into the molecular function of the inactivating mutations of B-Raf involving the DFG motif*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1793**(11): p. 1634-45.

59. Heidorn, S.J., Milagre, C., Whittaker, S., Nourry, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J.S., Springer, C.J., Pritchard, C., and Marais, R., *Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF*. Cell, 2010. **140**(2): p. 209-21.
60. Liu, F., Killian, J.K., Yang, M., Walker, R.L., Hong, J.A., Zhang, M., Davis, S., Zhang, Y., Hussain, M., Xi, S., Rao, M., Meltzer, P.A., and Schrupp, D.S., *Epigenomic alterations and gene expression profiles in respiratory epithelia exposed to cigarette smoke condensate*. Oncogene, 2010. **29**(25): p. 3650-64.
61. Roskoski, R., Jr., *RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **399**(3): p. 313-7.
62. Sviatoha, V., Tani, E., Ghaderi, M., Kleina, R., and Skoog, L., *Assessment of V600E mutation of BRAF gene and rate of cell proliferation using fine-needle aspirates from metastatic melanomas*. Anticancer Res, 2010. **30**(9): p. 3267-72.
63. Wucherer, K.L. and Wilke, V., *Thyroid cancer in dogs: an update based on 638 cases (1995-2005)*. J Am Anim Hosp Assoc, 2010. **46**(4): p. 249-54.
64. Abdolmohammadi, A., Atashi, H., Zamani, P., and Bottema, C., *High resolution melting as an alternative method to genotype diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1) K232A polymorphism in cattle*. Czech J. Anim. Sci., 2011. **56**(8): p. 370-376.
65. Ashworth, A., Lord, C.J., and Reis-Filho, J.S., *Genetic interactions in cancer progression and treatment*. Cell, 2011. **145**(1): p. 30-8.
66. Cantwell-Dorris, E.R., O'Leary, J.J., and Sheils, O.M., *BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(3): p. 385-94.
67. Coglianò, V.J., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., and Wild, C.P., *Preventable exposures associated with human cancers*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(24): p. 1827-39.
68. Tanaka, M., Takahashi, J., Hirayama, F., and Tani, Y., *High-resolution melting analysis for genotyping Duffy, Kidd and Diego blood group antigens*. Legal Medicine, 2011. **13**(2011): p. 1-6.
69. Wortzel, I. and Seger, R., *The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles*. Genes Cancer, 2011. **2**(3): p. 195-209.
70. Chakraborty, A., Narkar, A., Mukhopadhyaya, R., Kane, S., D'Cruz, A., and Rajan, M.G., *BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma: significant association with node metastases and extra thyroidal invasion*. Endocr Pathol, 2012. **23**(2): p. 83-93.
71. Khalili, J.S., Liu, S., Rodríguez-Cruz, T.G., Whittington, M., Wardell, S., Liu, C., Zhang, M., Cooper, Z.A., Frederick, D.T., Li, Y., Zhang, M., Joseph, R.W., Bernatchez, C., Ekmekcioglu, S., Grimm, E., Radvanyi, L.G., Davis, R.E., Davies, M.A., Wargo, J.A., Hwu, P., and Lizée, G., *Oncogenic BRAF(V600E) promotes stromal cell-mediated immunosuppression via induction of interleukin-1 in melanoma*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(19): p. 5329-40.
72. Pratilas, C.A., Xing, F., and Solit, D.B., *Targeting oncogenic BRAF in human cancer*. Curr Top Microbiol Immunol, 2012. **355**: p. 83-98.
73. Baquero, P., Sánchez-Hernández, I., Jiménez-Mora, E., Orgaz, J.L., Jiménez, B., and Chilocheches, A., *(V600E)BRAF promotes invasiveness of thyroid cancer cells by decreasing E-cadherin expression through a Snail-dependent mechanism*. Cancer Lett, 2013. **335**(1): p. 232-41.
74. El-Akawi, Z.J., Abu-Awad, A.M., and Khouri, N.A., *Alpha-1 Antitrypsin Blood Levels as Indicator for the Efficacy of Cancer Treatment*. World J Oncol, 2013. **4**(2): p. 83-86.
75. Kajita, K., Kuwano, Y., Kitamura, N., Satake, Y., Nishida, K., Kurokawa, K., Akaike, Y., Honda, M., Masuda, K., and Rokutan, K., *Ets1 and heat shock factor 1 regulate*

- transcription of the Transformer 2 β gene in human colon cancer cells.* J Gastroenterol, 2013. **48**(11): p. 1222-33.
76. McCain, J., *The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma.* P t, 2013. **38**(2): p. 96-108.
77. Pakneshan, S., Salajegheh, A., Smith, R.A., and Lam, A.K., *Clinicopathological relevance of BRAF mutations in human cancer.* Pathology, 2013. **45**(4): p. 346-56.
78. Shiraha, H., Yamamoto, K., and Namba, M., *Human hepatocyte carcinogenesis (review).* Int J Oncol, 2013. **42**(4): p. 1133-8.
79. Teshima, T., Matsumoto, H., Shigihara, K., Sawada, H., Michishita, M., Takahashi, K., and Koyama, H., *Hepatocellular carcinoma in a young dog.* Can Vet J, 2013. **54**(9): p. 845-8.
80. *Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma.* Cell, 2014. **159**(3): p. 676-90.
81. Andrea Aquilato, V.L., Barbara Doonan Tze-Chen Hsieh, John Thomas Pinto, Erxi Wu, Joseph M Wu, *Polyphenols in Human Health and Disease. Chapter 102: BRAF Mutation in Melanoma and Dietary Polyphenols as Adjunctive Treatment Strategy* Vol. 2. 2014: Academic Press. 1353-1365.
82. Haling, J.R., Sudhamsu, J., Yen, I., Sideris, S., Sandoval, W., Phung, W., Bravo, B.J., Giannetti, A.M., Peck, A., Masselot, A., Morales, T., Smith, D., Brandhuber, B.J., Hymowitz, S.G., and Malek, S., *Structure of the BRAF-MEK complex reveals a kinase activity independent role for BRAF in MAPK signaling.* Cancer Cell, 2014. **26**(3): p. 402-413.
83. Robinson, S.D., O'Shaughnessy, J.A., Cowey, C.L., and Konduri, K., *BRAF V600E-mutated lung adenocarcinoma with metastases to the brain responding to treatment with vemurafenib.* Lung Cancer, 2014. **85**(2): p. 326-30.
84. Sharma, A., Huard, C., Vernochet, C., Ziemek, D., Knowlton, K.M., Tyminski, E., Paradis, T., Zhang, Y., Jones, J.E., von Schack, D., Brown, C.T., Milos, P.M., Coyle, A.J., Tremblay, F., and Martinez, R.V., *Brown fat determination and development from muscle precursor cells by novel action of bone morphogenetic protein 6.* PLoS One, 2014. **9**(3): p. e92608.
85. Yu, H., Yang, J., Jiao, S., Li, Y., Zhang, W., and Wang, J., *T-box transcription factor 21 expression in breast cancer and its relationship with prognosis.* Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(10): p. 6906-13.
86. Zhang, G., Miyake, M., Lawton, A., Goodison, S., and Rosser, C.J., *Matrix metalloproteinase-10 promotes tumor progression through regulation of angiogenic and apoptotic pathways in cervical tumors.* BMC Cancer, 2014. **14**: p. 310.
87. Center, S.A. *Veterinary Manual.* 2015; Available from: <https://www.merckvetmanual.com/digestive-system/hepatic-disease-in-small-animals/hepatic-neoplasia-in-small-animals#v3268797>.
88. Cremolini, C., Di Bartolomeo, M., Amatu, A., Antoniotti, C., Moretto, R., Berenato, R., Perrone, F., Tamborini, E., Aprile, G., Lonardi, S., Sartore-Bianchi, A., Fontanini, G., Milione, M., Lauricella, C., Siena, S., Falcone, A., de Braud, F., Loupakis, F., and Pietrantonio, F., *BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis.* Ann Oncol, 2015. **26**(10): p. 2092-7.
89. Decker, B., Parker, H.G., Dhawan, D., Kwon, E.M., Karlins, E., Davis, B.W., Ramos-Vara, J.A., Bonney, P.L., McNiel, E.A., Knapp, D.W., and Ostrander, E.A., *Homologous Mutation to Human BRAF V600E Is Common in Naturally Occurring Canine Bladder Cancer--Evidence for a Relevant Model System and Urine-Based Diagnostic Test.* Mol Cancer Res, 2015. **13**(6): p. 993-1002.
90. García-Irigoyen, O., Latasa, M.U., Carotti, S., Uriarte, I., Elizalde, M., Urtasun, R., Vespasiani-Gentilucci, U., Morini, S., Benito, P., Ladero, J.M., Rodriguez, J.A., Prieto, J., Orbe, J., Páramo, J.A., Fernández-Barrena, M.G., Berasain, C., and Avila, M.A., *Matrix metalloproteinase 10 contributes to hepatocarcinogenesis in a novel*

crosstalk with the stromal derived factor 1/C-X-C chemokine receptor 4 axis.

Hepatology, 2015. **62**(1): p. 166-78.

91. Liao, W.Y., Ho, C.C., Hou, H.H., Hsu, T.H., Tsai, M.F., Chen, K.Y., Chen, H.Y., Lee, Y.C., Yu, C.J., Lee, C.H., and Yang, P.C., *Heparin co-factor II enhances cell motility and promotes metastasis in non-small cell lung cancer.* J Pathol, 2015. **235**(1): p. 50-64.
92. Maverakis, E., Cornelius, L.A., Bowen, G.M., Phan, T., Patel, F.B., Fitzmaurice, S., He, Y., Burrall, B., Duong, C., Kloxin, A.M., Sultani, H., Wilken, R., Martinez, S.R., and Patel, F., *Metastatic melanoma - a review of current and future treatment options.* Acta Derm Venereol, 2015. **95**(5): p. 516-24.
93. McGlynn, K.A., Petrick, J.L., and London, W.T., *Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability.* Clin Liver Dis, 2015. **19**(2): p. 223-38.
94. Mochizuki, H. and Breen, M., *Comparative Aspects of BRAF Mutations in Canine Cancers.* Vet Sci, 2015. **2**(3): p. 231-245.
95. Mochizuki, H., Kennedy, K., Shapiro, S.G., and Breen, M., *BRAF Mutations in Canine Cancers.* PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0129534.
96. Voronov, E. and Apte, R.N., *IL-1 in Colon Inflammation, Colon Carcinogenesis and Invasiveness of Colon Cancer.* Cancer Microenviron, 2015. **8**(3): p. 187-200.
97. Zheng, G., Tseng, L.H., Chen, G., Haley, L., Illei, P., Gocke, C.D., Eshleman, J.R., and Lin, M.T., *Clinical detection and categorization of uncommon and concomitant mutations involving BRAF.* BMC Cancer, 2015. **15**: p. 779.
98. Baquero, P., Jiménez-Mora, E., Santos, A., Lasa, M., and Chiloeches, A., *TGFβ induces epithelial-mesenchymal transition of thyroid cancer cells by both the BRAF/MEK/ERK and Src/FAK pathways.* Mol Carcinog, 2016. **55**(11): p. 1639-1654.
99. Cavalcante Mde, S., Torres-Romero, J.C., Lobo, M.D., Moreno, F.B., Bezerra, L.P., Lima, D.S., Matos, J.C., Moreira Rde, A., and Monteiro-Moreira, A.C., *A panel of glycoproteins as candidate biomarkers for early diagnosis and treatment evaluation of B-cell acute lymphoblastic leukemia.* Biomark Res, 2016. **4**: p. 1.
100. Davar, D., Fuchs, S.Y., and Kirkwood, J.M., *BRAF Inhibitors and IFNα: Plus, Minus, or Indeterminate?* J Natl Cancer Inst, 2016. **108**(7).
101. Klupp, F., Neumann, L., Kahlert, C., Diers, J., Halama, N., Franz, C., Schmidt, T., Koch, M., Weitz, J., Schneider, M., and Ulrich, A., *Serum MMP7, MMP10 and MMP12 level as negative prognostic markers in colon cancer patients.* BMC Cancer, 2016. **16**: p. 494.
102. Nault, J.C. and Zucman-Rossi, J., *TERT promoter mutations in primary liver tumors.* Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2016. **40**(1): p. 9-14.
103. Rozhok, A.I. and DeGregori, J., *The evolution of lifespan and age-dependent cancer risk.* Trends Cancer, 2016. **2**(10): p. 552-560.
104. Sabbatino, F., Wang, Y., Scognamiglio, G., Favoino, E., Feldman, S.A., Villani, V., Flaherty, K.T., Nota, S., Giannarelli, D., Simeone, E., Anniciello, A.M., Palmieri, G., Pepe, S., Botti, G., Ascierto, P.A., Ferrone, C.R., and Ferrone, S., *Antitumor Activity of BRAF Inhibitor and IFNα Combination in BRAF-Mutant Melanoma.* J Natl Cancer Inst, 2016. **108**(7).
105. Ding, X.X., Zhu, Q.G., Zhang, S.M., Guan, L., Li, T., Zhang, L., Wang, S.Y., Ren, W.L., Chen, X.M., Zhao, J., Lin, S., Liu, Z.Z., Bai, Y.X., He, B., and Zhang, H.Q., *Precision medicine for hepatocellular carcinoma: driver mutations and targeted therapy.* Oncotarget, 2017. **8**(33): p. 55715-55730.
106. Rao, C.V., Asch, A.S., and Yamada, H.Y., *Frequently mutated genes/pathways and genomic instability as prevention targets in liver cancer.* Carcinogenesis, 2017. **38**(1): p. 2-11.
107. Tetsu, O. and McCormick, F., *ETS-targeted therapy: can it substitute for MEK inhibitors?* Clin Transl Med, 2017. **6**(1): p. 16.

108. Cope, N., Candelora, C., Wong, K., Kumar, S., Nan, H., Grasso, M., Novak, B., Li, Y., Marmorstein, R., and Wang, Z., *Mechanism of BRAF Activation through Biochemical Characterization of the Recombinant Full-Length Protein*. 2018. **19**(18): p. 1988-1997.
109. Dankner, M. and Rose, A.A.N., *Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations*. 2018. **37**(24): p. 3183-3199.
110. Gao, C., Wang, Y., Broaddus, R., Sun, L., Xue, F., and Zhang, W., *Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: a review*. *Oncotarget*, 2018. **9**(4): p. 5492-5508.
111. García-Gómez, R., Bustelo, X.R., and Crespo, P., *Protein-Protein Interactions: Emerging Oncotargets in the RAS-ERK Pathway*. *Trends Cancer*, 2018. **4**(9): p. 616-633.
112. Liu, F., Yang, X., Geng, M., and Huang, M., *Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy*. *Acta Pharm Sin B*, 2018. **8**(4): p. 552-562.
113. Loo, E., Khalili, P., Beuhler, K., Siddiqi, I., and Vasef, M.A., *BRAF V600E Mutation Across Multiple Tumor Types: Correlation Between DNA-based Sequencing and Mutation-specific Immunohistochemistry*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2018. **26**(10): p. 709-713.
114. Mantovani, A., Barajon, I., and Garlanda, C., *IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy*. *Immunol Rev*, 2018. **281**(1): p. 57-61.
115. Salemi, R., Falzone, L., Madonna, G., Polesel, J., Cinà, D., Mallardo, D., Ascierto, P.A., Libra, M., and Candido, S., *MMP-9 as a Candidate Marker of Response to BRAF Inhibitors in Melanoma Patients With BRAF(V600E) Mutation Detected in Circulating-Free DNA*. *Front Pharmacol*, 2018. **9**: p. 856.
116. Walker, C., Mojares, E., and Del Río Hernández, A., *Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(10).
117. Zhao, S., Shen, W., Yu, J., and Wang, L., *TBX21 predicts prognosis of patients and drives cancer stem cell maintenance via the TBX21-IL-4 pathway in lung adenocarcinoma*. *Stem Cell Res Ther*, 2018. **9**(1): p. 89.
118. Asrani, S.K., Devarbhavi, H., Eaton, J., and Kamath, P.S., *Burden of liver diseases in the world*. *J Hepatol*, 2019. **70**(1): p. 151-171.
119. Cope, N., Novak, B., Candelora, C., Wong, K., Cavallo, M., Gunderwala, A., Liu, Z., Li, Y., and Wang, Z., *Biochemical Characterization of Full-Length Oncogenic BRAF(V600E) together with Molecular Dynamics Simulations Provide Insight into the Activation and Inhibition Mechanisms of RAF Kinases*. 2019. **20**(22): p. 2850-2861.
120. Fontana, E. and Valeri, N., *Class(y) Dissection of BRAF Heterogeneity: Beyond Non-V600*. *Clin Cancer Res*, 2019. **25**(23): p. 6896-6898.
121. Grassinger, J.M., Merz, S., Aupperle-Lellbach, H., and Erhard, H., *Correlation of BRAF Variant V595E, Breed, Histological Grade and Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Transitional Cell Carcinomas*. 2019. **6**(1).
122. Guo, Q., Zhu, L., Wang, C., Wang, S., Nie, X., Liu, J., Liu, Q., Hao, Y., Li, X., and Lin, B., *SERPIND1 Affects the Malignant Biological Behavior of Epithelial Ovarian Cancer via the PI3K/AKT Pathway: A Mechanistic Study*. *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 954.
123. Joanna Jarosz, D.P., Joanna Wietrzyk, *IL-33 – positive or negative role in cancer progression?* *Postepy Hig Med Dosw*, 2019(73): p. 626-635.
124. Li, J., Wang, R., Hu, X., Gao, Y., Wang, Z., Li, J., and Wong, J., *Activated MEK/ERK Pathway Drives Widespread and Coordinated Overexpression of UHRF1 and DNMT1 in Cancer cells*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 907.
125. Park, E., Rawson, S., Li, K., Kim, B.W., Ficarro, S.B., Pino, G.G., Sharif, H., Marto, J.A., Jeon, H., and Eck, M.J., *Architecture of autoinhibited and active BRAF-MEK1-14-3-3 complexes*. *Nature*, 2019. **575**(7783): p. 545-550.
126. Pereira, S.S. and Monteiro, M.P., *MAPK/ERK pathway inhibition is a promising treatment target for adrenocortical tumors*. 2019. **120**(1): p. 894-906.

127. Stieglitz, D., Lamm, S., Braig, S., Feuerer, L., Kuphal, S., Dietrich, P., Arndt, S., Echtenacher, B., Hellerbrand, C., Karrer, S., and Bosserhoff, A.K., *BMP6-induced modulation of the tumor micro-milieu*. 2019. **38**(5): p. 609-621.
128. Sun, Q. and Wang, W., *Structures of BRAF-MEK1-14-3-3 sheds light on drug discovery*. Signal Transduct Target Ther, 2019. **4**(1): p. 59.
129. Takeshima, H. and Ushijima, T., *Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk*. 2019. **3**: p. 7.
130. Zaman, A., Wu, W., and Bivona, T.G., *Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future*. Cancers (Basel), 2019. **11**(8).
131. *Pan-cancer analysis of whole genomes*. Nature, 2020. **578**(7793): p. 82-93.
132. Abdolvahab, M.H. and Darvishi, B., *Interferons: role in cancer therapy*. 2020. **12**(11): p. 833-855.
133. Boyle, E.M., Ashby, C., Tytarenko, R.G., Deshpande, S., Wang, H., Wang, Y., Rosenthal, A., Sawyer, J., Tian, E., Flynt, E., Hoering, A., Johnson, S.K., and Rutherford, M.W., *BRAF and DIS3 Mutations Associate with Adverse Outcome in a Long-term Follow-up of Patients with Multiple Myeloma*. 2020. **26**(10): p. 2422-2432.
134. Chakraborty, S., Njah, K., and Hong, W., *Agrin Mediates Angiogenesis in the Tumor Microenvironment*. Trends Cancer, 2020. **6**(2): p. 81-85.
135. Dong, X., Huang, D., Yi, X., Zhang, S., Wang, Z., Yan, B., and Chung Sham, P., *Diversity spectrum analysis identifies mutation-specific effects of cancer driver genes*. 2020. **3**(1): p. 6.
136. Guo, Y.J., Pan, W.W., Liu, S.B., Shen, Z.F., Xu, Y., and Hu, L.L., *ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis*. Exp Ther Med, 2020. **19**(3): p. 1997-2007.
137. Lu, X., Paliogiannis, P., Calvisi, D.F., and Chen, X., *Role of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway in Liver Cancer: From Molecular Genetics to Targeted Therapies*. 2020.
138. Müller, M., Bird, T.G., and Nault, J.C., *The landscape of gene mutations in cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2020. **72**(5): p. 990-1002.
139. Napoli, S. and Scuderi, C., *Functional Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Melanoma*. 2020. **9**(5).
140. Oh, Y.T., Yue, P., Zhou, W., Balko, J.M., Black, E.P., Owonikoko, T.K., Khuri, F.R., and Sun, S.Y., *Correction: Oncogenic Ras and B-Raf proteins positively regulate death receptor 5 expression through co-activation of ERK and JNK signaling*. J Biol Chem, 2020. **295**(26): p. 8870.
141. Rébé, C. and Ghiringhelli, F., *Interleukin-1 β and Cancer*. 2020. **12**(7).
142. Śmiech, M. and Leszczyński, P., *Emerging BRAF Mutations in Cancer Progression and Their Possible Effects on Transcriptional Networks*. 2020. **11**(11).
143. Wiczorek-Szukala, K., Kopczynski, J., Kowalska, A., and Lewinski, A., *Snail-1 Overexpression Correlates with Metastatic Phenotype in BRAF(V600E) Positive Papillary Thyroid Carcinoma*. J Clin Med, 2020. **9**(9).