

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA

SAPIENZA



FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA SCIENZE MORFOFUNZIONALI

**p53 promuove la progressione tumorale nelle cellule di
melanoma resistenti agli inibitori di BRAF**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Alfredo Colosimo

Candidata: Elisabetta Botti

Tutor: Ch.mo Prof. Stefano Calvieri

Co Tutor: Ch.mo Prof. Antonio Costanzo

Indice	
ABSTRACT.....	3
1 INTRODUZIONE.....	4
1.1 Epidemiologia e Patogenesi del Melanoma.....	4
1.2 Cenni clinici e varietà morfologiche.....	5
1.3 Criteri per la diagnosi di melanoma.....	10
1.4 Diffusione e metastasi.....	13
1.5 Il linfonodo sentinella.....	15
1.6 Stadiazione del melanoma.....	16
1.7 Fattori prognostici.....	18
2 GENETICA DEL MELANOMA.....	22
2.1 BRAF.....	24
2.2 Vie genetico-molecolari coinvolte nella patogenesi del melanoma.....	26
2.3 Confronto tra istotipi tradizionali e classificazione molecolare.....	31
2.4 Modello di sviluppo e progressione del melanoma.....	32
3 TERAPIA.....	34
3.1. Meccanismi di Resistenza agli inibitori di BRAF.....	37
3.2. Meccanismi ERK-Dipendenti.....	38
4 SCOPO DELLO STUDIO.....	39
5 MATERIALI E METODI.....	40
6 RISULTATI.....	43
7 DISCUSSIONE.....	46
8 FIGURE.....	48
Bibliografia.....	55

ABSTRACT

Le mutazioni oncogeniche di BRAF nel melanoma inducono l'inappropriata attivazione di ERK1/2 portando a proliferazione incontrollata. Il trattamento con gli inibitori di BRAF risulta in una rapida regressione delle metastasi. Comunque, le cellule di melanoma si adattano velocemente agli inibitori di BRAF portando a resistenza e a re-insorgenza di metastasi dopo 6-9 mesi. Lo scopo dello studio è stato indagare il ruolo di p53 nei meccanismi di resistenza indotti dal vemurafenib in linee cellulari di melanoma. I nostri dati indicano che il trattamento cronico con gli inibitori di BRAF favorisce la selezione di cellule con l'allele p53-72R portando eventualmente alla ri-attivazione di alcune proprietà trascrizionali e all'aumentata sintesi di citochine che controllano la resistenza secondaria ai BRAF, in maniera paracrina.

Infatti i nostri dati dimostrano che un programma oncogenico trascrizionale p53-dipendente viene attivato nelle cellule resistenti a PLX4032 e modifica le proprietà delle cellule circostanti, promuovendo la loro resistenza agli inibitori di BRAF.

1 INTRODUZIONE

1.1 Epidemiologia e Patogenesi del Melanoma

Il melanoma è una neoplasia maligna che origina dai melanociti presenti nello strato basale dell'epidermide, per poi nelle forme invasive invadere il derma diventando capace di dare metastasi a distanza. La cute è colpita nell'85% circa dei casi, più raramente il melanoma origina nelle mucose, nell'orecchio interno e nelle meningi.¹ L'incidenza del melanoma cutaneo è in continuo incremento in tutto il mondo, soprattutto tra gli individui giovani. Rappresenta il 3-5% dei tumori cutanei ed è tra questi il più aggressivo vista la sua propensione a sviluppare metastasi, infatti è causa del 65% delle morti per cancro della cute. Pazienti con melanoma al IV stadio hanno una sopravvivenza media stimata di 8-18 mesi.² È ormai ben noto che l'esposizione agli UV insieme al fototipo chiaro (I e II) deficit immunitari e predisposizione genetica rappresentano i maggiori fattori di rischio nell'insorgenza del melanoma cutaneo. L'esposizione al sole è da sempre considerato un fattore causale per il melanoma insieme a fattori genetici. Da alcuni studi emerge una relazione tra il tipo di esposizione ai raggi solari, l'età ed il rischio di sviluppare un melanoma: in particolare un'esposizione intermittente e prolungata sembra svolgere un ruolo maggiore rispetto all'età in cui ci si espone al sole anche se l'esposizione in età infantile/adolescenziale determina un maggior rischio rispetto all'età più avanzata.

Nel 2010 sono stati stimati 68.130 nuovi casi di melanoma in entrambi i sessi e 8.700 decessi sono attesi negli Stati Uniti a causa di questa patologia. Il melanoma rappresenta il 5% (quinto tumore per incidenza relativa) di tutti i tumori nel sesso maschile ed il 4% (settimo per incidenza relativa) nel sesso femminile. Le percentuali di incidenza e di mortalità del melanoma sono

stabilmente in incremento negli USA come nella maggior parte d'Europa, mantenendo la più alta incidenza in Australia ed in Nuova Zelanda.

Nell'ultimo quinquennio circa, in Italia i decessi attribuiti al melanoma cutaneo sono stati 4.000 nei maschi e oltre 3.000 nelle femmine, corrispondenti a tassi di mortalità rispettivamente di 5 e 6 su 100.000 abitanti l'anno.

1.2 Cenni clinici e varietà morfologiche

Il melanoma può insorgere de novo su cute sana oppure su nevi melanocitici acquisiti o congeniti preesistenti (20-30% dei casi). Le lesioni cutanee considerate sospette devono essere sempre esaminate con un'adeguata illuminazione coadiuvata da lenti di ingrandimento e dermatoscopia.

Una serie di fattori ispettivi devono essere presi in considerazione per poter valutare una lesione melanocitaria attraverso l'adozione di una check-list o il sistema ABCDE. È utile ricordare che alcuni melanomi, in particolare se di dimensioni <1mm di diametro possono non avere alcuna caratteristica sospetta all'ispezione clinica e rilevare la loro natura attraverso il dermatoscopia.

La diagnosi clinica di melanoma è generalmente difficoltosa ed è condizionata direttamente dall'esperienza del clinico con variabile sensibilità oscillante tra il 50% e 85%. L'impiego della dermatoscopia ha migliorato la diagnosi di lesioni melanomatose in fase precoce rispetto alle ispezioni che non prevedono tale metodica ^{3,4}.

Le caratteristiche semeiologiche che permettono di porre il sospetto diagnostico di melanoma sono state sintetizzate nell'acronimo ABCDE:

A: asimmetria;

B: bordi irregolari ed indentati, a carta geografica.

C: colore policromo variabile dal marrone chiaro al nero

D: diametro frequentemente superiore a 6 mm

E (evoluzione): recenti modificazioni della dimensione, forma, colore e superficie.

Clark propose di classificare il melanoma in base al concetto di progressione naturale. Durante la prima fase, definita di crescita orizzontale, la neoplasia si estende radialmente, rimanendo confinata all'epidermide dimostrando una iniziale e focale infiltrazione del derma papillare in forma di cellule isolate o disposte in piccoli nidi. Questa fase può avere una durata variabile da pochi mesi ad anni e si caratterizza per l'assenza di aggressività e una buona prognosi⁵.

Il passaggio alla seconda fase, definita di crescita verticale, è indicato dalla comparsa di uno o più cloni cellulari che acquisiscono la capacità di proliferazione autonoma e di crescita coesiva con formazione di aggregati o noduli che si estendono al derma reticolare o al sottocute acquisendo proprietà invasive e metastatizzanti. Clark identificò inoltre un tipo di melanoma che sviluppa in fase di crescita verticale ab inizio e che definì nodulare. Negli anni successivi la classificazione fu ampliata e modificata da McGovern.

La classificazione dei melanomi è stata definita quindi da studiosi del calibro di Clark e Mihm negli Stati Uniti e di McGovern in Australia^{6,7}.

Con una suddivisione in:

Melanoma in situ: forma di melanoma ristretta all'epidermide ed alla giunzione dermo-epidermica; un pattern peculiare di melanoma in situ è la lentigo maligna. Clinicamente il melanoma in situ è più curabile mediante la sua completa escissione chirurgica e non ha tendenza a metastatizzare. Di solito si tratta di piccole macchie brunastre irregolarmente pigmentate di

circa 0,8 cm di diametro, con bordi sfumati. Sono state riportate forme di melanoma in situ amelanotiche. Il sito più colpito è di solito la cute foto esposta. Tutti questi aspetti possono essere presenti nel melanoma in situ, occasionalmente possono esser presenti anche solo uno o due di queste alterazioni caratteristiche della lesione. Altri importanti fattori da valutare nella diagnosi istologica di melanoma in situ sono le modificazioni che spesso subisce l'epidermide che nella maggior parte dei casi vanno dall'iperplasia all'acantosi e che contribuiscono a rendere la silhouette dell'epidermide asimmetrica. L'irregolare distribuzione del pigmento e l'irregolare distribuzione dell'infiltrato infiammatorio nel derma sono anche questi un importanti indizi nella diagnosi.

Lentigo maligna-melanoma: si instaura su lentigo di Hutchinson, tipicamente insorge in sedi foto esposte di soggetti di razza bianca, più frequentemente sul volto. Si tratta di lesioni piatte, a crescita lenta di colorito non omogeneo da brunoastro a nero, i bordi della lesione tendono ad essere irregolari. Istologicamente si ha una proliferazione di melanociti atipici in corrispondenza dello strato basale dell'epidermide, distribuiti o singolarmente o in teche con pleomorfismo spiccato. La lentigo di Hutchinson è indotta da un danno attinico dei melanociti, rappresentando la controparte melanocitaria della cheratosi attinica per cheratinociti; questo è importante perché i due aspetti possono coesistere nella stessa lesione. Nella diagnosi istologica si può parlare di melanoma solo in presenza di una chiara invasione del derma. Di solito il melanoma che insorge da una lentigo di Hutchinson è a cellule fusate e poco aggressivo, con bassi tassi di mortalità e di metastasi a distanza; un altro tipo di melanoma più aggressivo che può insorgere dalla suddetta lesione è quello desmoplastico, per la tendenza a recidivare e per la capacità di dare metastasi a distanza.

Melanoma a diffusione superficiale: è la più comune forma di melanoma cresce orizzontalmente nell'epidermide e può interessare il derma papillare e il derma reticolare. Si può

ritrovare in qualunque sede e variare nel colore: brunastro, nerastro, rosato, bluastro ed anche biancastro, le dimensioni della lesione sono di solito 10mm di diametro. Nelle prime fasi della malattia la neoplasia appare di colore variegato. La superficie è lievemente rilevata e i margini sono palpabili; le aree più chiare corrispondono alla regressione spontanea; sono correlate alle dimensioni del tumore ma non al livello d'invasione o alla prognosi. Le aree rosate e quelle bluastre corrispondono sempre alla regressione, ma associate a fibrosi dermica e accumulo di macrofagi ripieni di melanina. I margini della lesione sono irregolari solitamente comprendono indentature o noduli. L'invasione in profondità generalmente si associa macroscopicamente alla comparsa di un nodulo rilevato in superficie; microscopicamente le aree non invasive sono costituite da melanociti atipici che formano teche o con invasione pagetoide dell'epidermide.

Melanoma nodulare: clinicamente può presentarsi come un nodulo esofitico o polipoido generalmente ulcerato sulla superficie cutanea il colore può variare dal nero, rossastro a parzialmente pigmentato o completamente acromico. La distribuzione del pigmento non è omogenea. Può localizzarsi su qualunque area della superficie cutanea e di solito colpisce individui giovani. La vasta componente neoplastica presente nel derma, in assenza o quasi di un interessamento dell'epidermide gli conferisce il pattern nodulare.

Melanoma acrale lentiginoso: in genere si localizza nelle regioni palmo-plantari, regioni subungueale, alle giunzioni mucoso-cutanee della cavità orale, nasale e dell'ano. Più frequentemente colpisce individui orientali e di razza nera, istologicamente è caratterizzato in fase iniziale da una proliferazione giunzionale di tipo lentiginosa con melanociti atipici disposti in filiera continua. Clinicamente la diagnosi differenziale va posta con una ampia serie di lesioni pigmentate quali i vari tipi di nevi benigni, l'istiocitoma fibroso benigno, emangiomi trombosati o infiammati, cheratosi seborroiche pigmentate e anche epiteliomi basocellulari pigmentati. Bisogna anche tener presente che esistono forme amelanotiche di melanomi maligni, ricoperti da

uno spesso strato di cheratina, che possono essere confusi addirittura con calli o granulomi piogenici.

Melanoma desmoplastico: sottotipo estremamente subdolo di melanoma a cellule fusate, clinicamente molto aggressivo e facilmente confuso clinicamente e istologicamente con altre entità come cicatrici ipertrofiche, il fibroxantoma atipico e l'epitelioma spinocellulare a cellule fusate, il tumore delle guaine nervose periferiche o il nevo blu, col grave danno che ne può conseguire. Istologicamente è una proliferazione di cellule a nucleo ipercromatico, circondate da uno stroma collageneo estremamente denso; a complicare ulteriormente la situazione contribuisce il fatto che anche con le metodiche immunoistochimiche la diagnosi può essere difficoltosa perché risulta S-100 positivo, ma spesso non reagisce con tipici marcatori dei melanociti quali HMB45 e MART1, mentre può assumere marcatori mesenchimali come l'actina. In questo caso il sospetto diagnostico deve originare da aspetti caratteristici di malignità quali l'infiltrazione perineurale, l'invasione in profondità, l'infiltrato linfocitario periferico alla lesione, la presenza di anomalie simili a quelle evidenziabili nella lentigo di Hutchinson nell'epidermide sovrastante, accanto ad un pattern di crescita fascicolare.

Altri tipi di melanoma ancora un po' controversi e di difficile diagnosi differenziale con le lesioni benigne sono il melanoma spitzoide ed il melanoma nevoide. Il pattern di crescita del melanoma può essere pseudoghiandolare, pseudopapillare, periteliomatoso, emangiopericitoma-like, Spitzoide, nevoide e follicolare. A volte si può osservare anche una differenziazione verso strutture neuroidi quali cellule di Schwann, corpuscoli tattili, cellule ganglionari. Bisogna inoltre notare che alcune metastasi sia linfonodali che viscerali possono assumere aspetti morfologici indistinguibili da un tumore maligno delle guaine nervose periferiche.

La diagnosi di melanoma è infatti tra le diagnosi istologiche quella più complicata. Una prima difficoltà può essere quella di individuare come melanoma una lesione chiaramente maligna ma

priva di melanina; in questo caso accanto ai criteri morfologici è indispensabile il ricorso all'immunoistochimica. Ancora più problematico è la diagnosi differenziale tra lesioni melanocitarie benigne e maligne, in ogni caso esistono dei criteri che possono essere utili poiché elencano alcuni aspetti caratteristici delle lesioni maligne ⁽⁸⁻¹⁵⁾.

1.3 Criteri per la diagnosi di melanoma.

Da un punto di vista istologico esistono alcuni criteri per la diagnosi di melanoma:

- 1) Le grandi dimensioni: tutte le lesioni melanocitiche con diametro laterale di 1cm e con tendenza ad invadere il sottocute sono da considerare probabilmente melanomi. Al contrario lesioni inferiori a 0,6 cm di diametro, estese prevalentemente alla giunzione dermoepidermica o al derma papillare sono più probabilmente nevi. Esiste inoltre un gruppo di lesioni melanocitarie di grandi dimensioni e con tendenza ad invadere in derma chiamati nevi congeniti, nevo di Spitz, nevo blu. In questi casi la diagnosi è basata su altri criteri e non sulle dimensioni .
- 2) La asimmetria della silhouette: se si immagina di dividere la lesione melanocitaria con una linea verticale e il risultato è che le due emisilhouette non sono simmetriche, pertanto la lesione probabilmente è maligna .
- 3) La asimmetria laterale: ossia una distribuzione asimmetrica dei melanociti neoplastici (che nel melanoma possono essere grandi ed epitelioidi o piccole e fusate al contrario nei nevi dove la citologia è normalmente uniforme) nei bordi laterali giunzionali di un melanoma e la tendenza dei singoli melanociti a diffondere lateralmente, a differenza di quanto si osserva nelle lesioni benigne, che hanno margini ben definiti.

4) Distribuzione asimmetrica dei melanociti: la scarsa coesione dei melanociti della componente intraepidermica, sia per quanto riguarda le teche, che tendono ad essere meno definite di quelle osservabili nelle lesioni benigne, sia per quanto riguarda le singole cellule che compongono le teche, che appaiono disgiunte le une dalle altre.

5) Distribuzione asimmetrica del pigmento: questo è uno dei più importanti criteri di valutazione, infatti nel melanoma la distribuzione del pigmento può essere estremamente asimmetrica, zone con densi accumuli di pigmento alternate a zone acromatiche.

6) Distribuzione asimmetrica dell'infiltrato infiammatorio: l'infiltrato linfocitario dermico nel melanoma è particolarmente asimmetrico. La presenza di plasmacellule dovrebbe sempre essere considerata un indizio di melanoma se la lesione non è ulcerata.

7) Asimmetria delle alterazioni epidermiche: cambiamenti dell'epidermide si verificano in tutte le lesioni melanocitarie. Nel melanoma le modificazioni epidermiche ossia atrofia e iperplasia hanno una distribuzione irregolare. Il risultato è una silhouette epidermica asimmetrica. Al contrario nelle lesioni nevice come per esempio il nevo di Spitz dove l'epidermide è iperplastica in maniera uniforme. In altre parole mentre nei nevi le modificazioni dell'epidermide sono simmetriche, nel melanoma atrofia e ipertrofia sono irregolarmente alternate contribuendo all'asimmetria della lesione. Questo può riflettere una produzione irregolare di citocheratine e proteasi dalle cellule del melanoma.

8) Asimmetria dei dettagli citologici : il pleomorfismo citologico nel melanoma è una costante. Un modo pratico per apprezzare la asimmetria citologica è disegnare una serie di linee parallele trasversali alla lesione osservando che nel melanoma le cellule non sono tutte uguali. Le cellule possono essere epitelioidi, fusate, balloniformi e più bizzarre; anche le dimensioni variano da estremamente piccole, linfocito-simile, a molto voluminose fino a giganti e multinucleate.

Caratteristiche sono: le atipie nei melanociti accompagnate da prominenza di nuclei e nucleoli ed aumentato rapporto nucleo/citoplasma, la presenza di mitosi nei melanociti, in particolare se atipiche o nella componente dermica la necrosi di singoli melanociti (diagnosi differenziale con i corpi ialini eosinofili del nevo di Spitz). Concludendo una lesione melanocitaria che presenta pleomorfismo cellulare o atipie o scarse mitosi può essere benigna ma una lesione con pleomorfismo cellulare e atipie è molto più probabilmente un melanoma.

9) Scarsa delimitazione della lesione: di solito uno o entrambi i margini laterali del melanoma sono sfumati ciò è determinato dalla presenza di singoli melanociti neoplastici che tendono sparpagliarsi in maniera irregolare dallo strato spinoso dell'epidermide fino ai bordi laterali della lesione.

10) Presenza di grandi noduli e pattern di crescita solido: ossia la presenza di grandi noduli che sono composti da aggregati cellulari epitelioidi. Questi comprimono e distorcono le strutture del derma di cui sono circondati e vanno sempre posti in diagnosi differenziale con i noduli proliferativi dei nevi congeniti nei quali non vi è la compressione delle strutture del derma adiacente.

11) I tipi cellulari: melanociti epitelioidi o fusati che sono i più comuni con nucleo grande e vescicoloso, cromatina finemente dispersa e citoplasma abbondante; melanociti nevoidi piccoli e rotondi tipici del melanoma nevoide con nucleo ipercromatico e cromatina addensata; melanociti dendritici tipici del melanoma acrale sede di zone foto esposte.

12) La migrazione pagetoide: è la diffusione di melanociti, singolarmente o in teche, attraverso lo strato malpighiano e negli annessi, non dimenticando che comunque questa si può osservare anche in lesioni benigne quali in nevo di Spitz, nevo di Meyerson, nevo acrale, raramente nei nevi congeniti e nevi in regressione.

13) Segni del danno solare: l'elastosi è un altro importante segno di danno cellulare provocato da una eccessiva esposizione al sole e che si sviluppa nelle lesioni melanocitarie della cute fotoesposta, le fibre elastiche sono eccessivamente prodotte dai fibroblasti ¹⁶⁻²².

Qualsiasi lesione giunzionale o composta che si sviluppa su cute gravemente danneggiata dal sole può essere considerata come un probabile melanoma, e questo è particolarmente vero per la Lentigo Maligna.

L'HMB45 è un marcatore molto specifico ma meno sensibile. L'anticorpo riconosce una glicoproteina premelanosomica (g100), legata al sistema della tirosinasi e questo spiega come mai risulti negativa nei melanomi indifferenziati melanotici. MART1 è un antigene di differenziazione melanocitaria, inizialmente individuato come target dei linfociti T citotossici, che risulta positivo nell'80% dei melanomi ma anche nelle cellule produttrici di steroidi di surrene, ovaio e testicolo e nelle neoplasie da esse originate.

Ci sono tuttavia molti altri marcatori immunoistochimici che reagiscono positivamente con i melanociti, ma che però non risultano utili ai fini della diagnosi in quanto reagiscono anche con molte altre cellule, come NK1/C3 ed NSE. Infine bisogna tener presente la positività di alcuni melanomi per le citocheratine a basso peso molecolare come la Cam5.2 e che sono stati descritti casi di positività per CEA, EMA, α 1antitripsina e CD68.

1.4 Diffusione e metastasi

Il melanoma (tutti tranne il melanoma nodulare) si diffonde inizialmente lungo la giunzione dermo-epidermica ed il derma superficiale per poi invadere il derma profondo ed eventualmente

il tessuto sottocutaneo ed i tessuti più profondi; l'infiltrazione viene definita in maniera semiquantitativa dal livello di Clark e dallo spessore misurato secondo Breslow.

Nella valutazione della lesione bisogna considerare se la fase di crescita sia radiale o verticale; nella fase di crescita radiale si osserva la proliferazione di melanociti nell'epidermide o nel derma papillare, senza la formazione di noduli neoplastici, nella fase di crescita successiva, cioè quella verticale, in cui la neoplasia comincia a diffondersi in senso perpendicolare rispetto all'epidermide invadendo il derma reticolare ed acquisendo il reale potenziale di metastatizzare.

Alcuni melanomi hanno una spiccata tendenza all'invasione vascolare (melanoma angiotropico). Le metastasi nei linfonodi regionali sono frequenti, anche in assenza di evidenza clinica. L'esplorazione dei linfonodi loco-regionali è un momento fondamentale per la stadiazione chirurgica; inoltre il riscontro del coinvolgimento linfonodale ha un'influenza determinante sulla prognosi (AIOM). Il rischio del coinvolgimento linfonodale è direttamente proporzionale allo spessore della malattia (AIOM); in un melanoma con spessore compreso tra 1,5mm e 4mm tale coinvolgimento è verificato nel 25% dei casi e sale al 60% per melanomi con spessore superiore a 4mm (AIOM). Le metastasi a distanza possono situarsi in quasi tutti i distretti corporei: in sede epatica, polmonare, del tratto gastro-enterico, osseo, del sistema nervoso centrale, comunque sono state descritte metastasi un po' ovunque, compreso a livello cutaneo e cardiaco.

Il comportamento biologico di un melanoma sostanzialmente è imprevedibile, infatti talvolta si ha il decesso anche dopo 15-20 anni dalla diagnosi con neoplasie che erano rimaste silenti per tutto il tempo, mentre altre volte si ha una lunghissima sopravvivenza in soggetti con linfonodo sentinella metastatico. Fattori immunologici sembrano essere coinvolti che nel determinare la prognosi delle singole neoplasie ma che per la maggior parte non sono stati completamente compresi²³.

1.5 Il linfonodo sentinella

La tecnica del linfonodo sentinella è una procedura considerata minimamente invasiva che permette di valutare lo status linfonodale e di meglio individuare i pazienti con i linfonodi metastatici, clinicamente non palpabili, candidati alla dissezione linfonodale completa. In un recente studio si è osservato che pazienti con melanoma di spessore compreso tra 1,2mm e 3,5mm presentano una mediana di sopravvivenza più elevata se viene eseguita la biopsia linfonodale rispetto al gruppo in cui questa tecnica non viene adottata.

Nell'ultimo decennio è diventata di routine la tecnica del linfonodo sentinella nel melanoma. Essa è basata sul concetto che la diffusione del melanoma avvenga in maniera ordinata e che se il linfonodo "sentinella" (cioè il primo linfonodo della catena che drena quel distretto cutaneo) risulta negativo, sono molte le probabilità che lo siano anche i restanti componenti della catena; se invece il linfonodo sentinella risulta positivo si procede alla linfadenectomia. La tecnica è attualmente controversa, ma la maggior parte degli autori continuano a ritenerla un indice prognostico di prima importanza. Il linfonodo sentinella viene esaminato in tutti i melanomi che misurino almeno 1mm; si individua attraverso l'impiego di un isotopo radioattivo ed inviato al servizio di anatomia patologica che provvede ad includerlo totalmente in paraffina. Le linee guida prevedono l'esecuzione di 3 livelli di sezioni istologiche ad intervalli di 250µm e per ciascun livello si colorano 3 sezioni istologiche, una con ematossilina-eosina, una con S-100 ed una con HMB45 e questo consente di evidenziare la maggior parte delle metastasi linfonodali. Anche in questo caso si possono porre dei problemi di diagnosi differenziale con i nevi linfonodali (che sono assolutamente benigni) e con gli istiociti.

I nevi linfonodali in genere sono limitati alla capsula del linfonodo, hanno disposizione a semiluna, sono privi di atipie e di solito si colorano con S-100 e MART1 ma non con HMB45. Gli istiociti pongono problemi di diagnosi differenziale perché possono risultare positivi ad S-

100 ed HMB45, ma anche in questo caso mancano le atipie citologiche. Nella refertazione devono essere riportati il numero di linfonodi sentinella esaminati, ed il numero di linfonodi positivi. Secondo l'attuale sistema di Stadiazione, il linfonodo sentinella viene considerato positivo in presenza di cellule tumorali isolate anche se evidenziate solamente con colorazioni immunoistochimiche per HMB45 e/o per MelanA/Mart1 od altri marcatori melanoma specifici.

Si raccomanda di segnalare nel referto anche:

- il diametro massimo della metastasi (se ci sono più focolai, il diametro massimo di quello maggiore);
- la sede della metastasi: capsulare, sottocapsulare, parenchimale o mista;
- la presenza di estensione extracapsulare;
- la profondità di invasione secondo che viene misurata dalla superficie interna della capsula linfonodale al punto più profondo di infiltrazione del parenchima linfonodale ed espressa in mm;
- la presenza di cellule nevice ²⁴⁻²⁷.

1.6 Stadiazione del melanoma

Nel 2002 e poi nel 2009, l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) e l'Unione Internazionale per la Ricerca sul Cancro (UICC) hanno effettuato una revisione del sistema di classificazione e stadiazione del melanoma basandosi sull'analisi di dati relativi a 17.600 pazienti provenienti da 13 diversi centri di ricerca sul cancro. La commissione per la stadiazione del melanoma si è riunita a partire dal 2006 per definire la nuova versione del sistema di stadiazione AJCC, la cui pubblicazione è avvenuta alla fine del 2009 e tale versione (VII edizione del

“AJCC Cancer Staging Manual” –Manuale AJCC di Stadiazione del Cancro) è stata resa operativa a partire dal 2010. Lo studio ha fornito importanti dati relativi alla stadiazione e al tasso di stadiazione del melanoma. Sono stati, inoltre, definiti tre fattori che consentono una migliore classificazione dello stato dei linfonodi regionali (N) ovvero il numero dei linfonodi metastatici, sia clinicamente occulti che evidenti, e la presenza o assenza di ulcerazione del tumore primario infatti tutti i pazienti in Stadio I, II, III passano allo stadio superiore se il melanoma primitivo è ulcerato. Infine, si è stabilito, per la categoria delle metastasi a distanza (M), che metastasi non viscerali si associano ad una migliore sopravvivenza rispetto ai casi in cui vi sono metastasi d'organo.

Nuovo TNM melanoma (AJCC 2010)

pTis

pT1: spessore ≤ 1 mm a: senza ulcerazione e mitosi $< 1/\text{mm}^2$

b: ulcerato o mitosi $> 1/\text{mm}^2$

pT2: spessore 1.01-2.00 mm, a: non ulcerato, b: ulcerato

pT3: spessore 2.01-4.00 mm a: ulcerato, b: non ulcerato

pT4: spessore > 4.00 mm a: ulcerato, b: non ulcerato

N0: assenza di mts linfonodali

N1: 1 linfonodo con mts, a: micrometastasi, b: macrometastasi

N2: 2-3 linfonodi con mts, a: micrometastasi, b: macrometastasi, c: in transit o satelliti senza lfn metastatico

N3: 4 o + lfn metastatici o pacchetti lfn o in transit/ satelliti con lfn metastatici ^{28,29}

1.7 Fattori prognostici

Il tasso di mortalità per melanoma è ancora troppo alto, un dato inaccettabile in considerazione del fatto che se la neoplasia viene diagnosticata in tempo si può guarire completamente. Ad esempio in una serie di 3000 pazienti con melanoma in Norvegia del 1977 la sopravvivenza a 5 anni era del 60%, attualmente la situazione non è molto diversa. Dalla valutazione generale di 17600 pazienti con melanoma attraverso il sistema TNM è emerso che : nella categoria T (tumore) ciò che più conta sono lo spessore e l'ulcerazione, mentre il livello è importante solo nei melanomi fino ad 1mm;

Nella categoria N (linfonodi) non ci sono sensibili differenze di prognosi se il coinvolgimento linfonodale è singolo o multiplo e se è clinicamente rilevabile o meno; Nella categoria M (metastasi) le metastasi non viscerali sono associate a prognosi migliore rispetto a quelle viscerali. Sono stati studiati vari fattori prognostici che influenzano la diagnosi: Tumor stage: secondo i criteri di stadiazione del TNM è stato valutato che pazienti il tasso di sopravvivenza a 10 anni varia dal 70% delle malattie localizzate al 20% delle malattie metastatiche. Il sistema di stadiazione del melanoma divide la malattia in tre stadi: I malattia localizzata, II metastasi regionali cutanee (in transit) o metastasi linfonodali regionali, III metastasi a distanza. L' American Joint Committee on Cancer (AJCC), del quale fanno parte esponenti dei principali gruppi cooperativi internazionali di studio sul melanoma, e che vanta di un'esperienza clinica basata su più di 40.000 pazienti, ha apportato alcune revisioni dei criteri di classificazione TNM e di stadiazione del melanoma. L'ultima edizione del Manuale AJCC di Stadiazione delle neoplasie si basa sui più importanti fattori prognostici indipendenti (predittivi di rischio di metastasi e di sopravvivenza) emersi dai più recenti e accreditati trial clinici. Livello di invasione e spessore del tumore: questi sono due importanti fattori prognostici. Il livello di invasione secondo Clark ha dimostrato possedere un valore aggiunto da un punto di vista prognostico nei

melanomi con spessore di Breslow $<1\text{mm}$. Nel sistema di Clark il melanoma viene diviso in base al livello di invasione in cinque classi: I intradermico (in situ), II nel derma papillare, III invasione di tutto il derma papillare, all'interfaccia tra derma papillare e derma reticolare, IV nel derma reticolare, V nel sottocute.

Esiste una relazione diretta tra il livello di invasione e la capacità di metastatizzare ai linfonodi. Lo spessore della neoplasia è valutato da una microstadiazione o sistema di Breslow, esso viene misurato mediante un oculare micrometrico in millimetri a partire dallo strato dei granuli dell'epidermide (o dalla base dell'ulcera, se il melanoma è ulcerato) fino alla massima profondità raggiunta dalla componente invasiva della neoplasia. Secondo l'attuale suddivisione delle classi di Breslow, sono previste fasce di rischio progressivo di metastasi, man mano che si procede da melanomi solo inizialmente infiltranti (cosiddetti melanomi "sottili", inferiori al millimetro di spessore) fino a lesioni infiltranti per 3 o più mm. Anche in questo caso si individuano diverse categorie di rischio: basso rischio per le neoplasie fino a 0,76mm; rischio intermedio tra 0,76 e 1,5mm; alto rischio oltre i 1,5mm ed anche in questo caso i tassi di sopravvivenza liberi da malattia a 5 anni sono diversi: 98% per il basso rischio; variabile da 44 a 63% per l'alto rischio e livelli intermedi per il rischio intermedio; inoltre c'è una stretta correlazione tra lo spessore del melanoma e la probabilità di trovare micrometastasi nel linfonodo sentinella. Pertanto lo spessore è considerato il fattore prognostico più importante e dovrebbe essere sempre riportato nel referto istopatologico di ogni melanoma invasivo.

Forma della lesione: Lesioni polipoidi hanno prognosi peggiore rispetto a quelle a cupola non per la forma in sé, ma perché raggiungono maggiori spessori.

Sesso: nella solita serie del 1977 è risultato un tasso di sopravvivenza a 5 anni di 50,5% per i maschi e di 70,5% per le femmine, probabilmente per vari fattori quali la

sede d'insorgenza e la profondità d'invasione.

Età: l'età giovanile si associa a miglior prognosi nel sesso maschile, probabilmente perché nelle donne anziane le lesioni rilevate tendono ad avere maggiori spessori

Gravidanza: questo rimane un argomento controverso, in particolare non è chiaro se eserciti un'azione negativa o nessun effetto. Non sono mai stati riscontrati recettori ormonali sulle cellule di melanoma neanche in gravidanza.

Sede anatomica: sono ad alto rischio: cuoio capelluto, area mandibolare, area mediana del tronco, porzione prossimale della coscia, mani, piedi, cavo popliteo e genitali, non necessariamente in correlazione allo spessore. Classicamente è pessima a prognosi del melanoma subungueale, in relazione al tardivo riconoscimento.

Dimensioni: il diametro del melanoma non ha significato prognostico, a meno che non si associ ad uno spessore molto elevato.

Varietà clinico-patologiche: la prognosi peggiore è quella del melanoma nodulare, la migliore è quella della lentigo malignamelanoma, mentre il melanoma a diffusione superficiale rimane a livelli intermedi. Studi più recenti, però, sembrano indicare che a parità di spessore le altre differenze tendono ad annullarsi.

Aspetto citologico: qualunque sia l'aspetto delle cellule, non incide sulla prognosi.

Grado di pigmentazione: neanche questo aspetto sembra influenzare la prognosi.

Attività mitotica e attività proliferativa: la presenza del numero di mitosi per mm^2 ha sempre più assunto un ruolo importante come determinante prognostico ed è stato introdotto come variabile utile per la stadiazione nell'ultima revisione del sistema classificativo AJCC. E' sufficiente una mitosi / mm^2 per passare dallo stadio T1a al T1b. La presenza e numero di mitosi atipiche sono

valutati nel derma insieme all' attività proliferativa valutata mediante il Ki67/MIB-1. Questi pertanto devono essere sempre riportati nel referto istopatologico.

Infiltrato infiammatorio nel derma: la quota della popolazione linfocitaria T intratumorale (TIL), risultato della proliferazione clonale di T-linfociti diretti contro antigeni tumorali. I TIL possono essere molto evidenti (brisk), poco presenti (non brisk) o praticamente assenti (absent). Il valore prognostico favorevole di una cospicua presenza di dei TIL sembra rimanere valido anche per lesioni metastatiche.

Ulcerazione: la sua presenza costituisce un fattore prognostico sfavorevole. È stata riconosciuta infatti come una variabile prognostica di sicuro impatto e tende a predire una maggiore probabilità di metastatizzare a livello viscerale ed osseo. La presenza di ulcerazione microscopica dovrebbe essere sempre annotata nel referto istopatologico.

La regressione: la presenza di marcati fenomeni regressivi al momento della diagnosi istologica rappresenta un serio problema di inquadramento prognostico di diversi casi di melanoma. Infatti la misurazione dello spessore del melanoma, che per definizione deve essere effettuata dallo strato granuloso dell'epidermide fino ai melanociti neoplastici situati più profondamente nel derma/ipoderma, non tiene conto che, in questi casi probabilmente la lesione iniziale si spingeva più in profondità.

Si ottiene quindi una probabile sottostadiazione di alcuni casi di melanoma. Per tale motivo, nella refertazione istologica viene sempre indicata la presenza e l'entità di fenomeni regressivi, oltre all'indicazione dello spessore secondo Breslow e dei livelli di Clark.

La regressione parziale della lesione è un aspetto piuttosto comune, in particolare nella lentigo maligna. La regressione completa è molto meno comune, ma sono stati descritti diversi casi di metastasi viscerali e linfonodali senza che sia stato possibile individuare la neoplasia primitiva.

Questo fenomeno potrebbe anche spiegare anche quei casi in cui la prognosi reale del paziente è peggiore di quella prevista basandosi sullo spessore della lesione alla diagnosi. Clinicamente la regressione di una lesione è annunciata dalla comparsa di un alone irregolare tutto intorno; microscopicamente nelle fasi iniziali si osserva un denso infiltrato di linfociti, simile a quello che si ha nella regressione dei nevi, mentre nelle fasi avanzate residuano una cicatrice vascolarizzata e macrofagi contenenti pigmento melanico. A tutt'oggi non esistono criteri standardizzati per quantizzare in maniera riproducibile la regressione.

Colorazioni: non sono state evidenziate correlazioni tra la prognosi e le caratteristiche citologiche evidenziabili con metodiche istochimiche o immunoistochimiche.

Satelliti: la presenza di microsattelliti, definiti come nidi di tumore di almeno 50µm rilevabili a distanza dalla massa principale; risulta correlata sia con la probabilità di metastasi a distanza sia con la prognosi.

Preesistente nevo benigno: la prognosi sembra essere migliore quando c'è evidenza istologica di un nevo residuo.

La prima considerazione che si può fare dopo aver valutato tutti i precedenti parametri è che non è ancora stato individuato un singolo fattore in grado di definire la prognosi di un melanoma e che rimane ancora da chiarire in maniera definitiva il reale significato della metodica del linfonodo sentinella e se si possa individuare un gruppo di pazienti con maggior rischio di metastasi linfonodali senza ricorrervi ³⁰⁻³².

2 GENETICA DEL MELANOMA

Agli inizi del XXI secolo abbiamo assistito ad uno straordinario sviluppo delle applicazioni cliniche delle tecnologie di biologia molecolare che ha enormemente facilitato la comprensione dei meccanismi patogenetici e molecolari di numerose neoplasie maligne, compreso il melanoma. Nel 2005, Curtin pubblicò il lavoro fondamentale, che mostrava la presenza di un'elevata frequenza di mutazioni somatiche oncogene e di amplificazioni in melanomi umani e la loro associazione con la sede anatomica del tumore primitivo e con il grado di foto-danneggiamento.

L'attivazione aberrante della via di segnale di MAPK è stata documentata in oltre l'80% dei melanomi primitivi e specifiche mutazioni di proteine lungo la via RAS- RAFMEK- ERK oggi sono ritenute mutualmente esclusive. Tali mutazioni sono state documentate in tutti gli istotipi di melanoma, compreso il melanoma cutaneo (50% BRAF, 15% NRAS, fino al 17% cKIT in cute cronicamente foto-danneggiata), melanomi mucosi (11% BRAF, 5% NRAS, 21% cKIT) ed uveali (50%GNAQ). Queste mutazioni risultano in effetti complessi biologici pro-oncogenici.

L'oncogene NRAS tra le varie proprietà, attiva anche la cascata di PI3K. La via di segnale di MAPK può condurre ad una proliferazione in cellule trasformate, ma si ritiene che sia anche in grado di indurre un forte arresto della crescita, noto come senescenza, in melanociti normali. Nel 2002, per la prima volta sono state identificate mutazioni somatiche missense di BRAF in un numero elevato di neoplasie, che in genere portano ad un'attivazione costitutiva di BRAF.

Attualmente, sono state identificate più di 75 mutazioni nel gene BRAF, le più frequenti sono a livello dell'esone 15. Il 75% di queste rappresentano mutazioni puntiformi del DNA, che causano una singola sostituzione aminoacidica (Valina 600 in Acido Glutamico, V600E) nel prodotto proteico, un ulteriore 20% determina la sostituzione da Valina 600 in Lisina (V600K) ed infine il 6% è rappresentato da altri genotipi. I melanomi che mostrano mutazioni di BRAF si manifestano in età per lo più giovanile (tali mutazioni si osservano nell'86% dei pazienti di età

compresa tra 20 e 30 anni), a livello del tronco od agli arti ed associati ad un basso danno solare cumulativo.

2.1 BRAF

La famiglia di chinasi RAF consiste di tre proteine (ARAF, BRAF e CRAF), che fanno tutte parte della cascata di trasduzione del segnale nominata Mitogen- Activated-Protein-Kinase (MAPK) pathway. Nei melanociti, BRAF induce l'attivazione della chinasi MEK, la quale, a sua volta, attiva ERK, che costituisce l'effettore finale della cascata MAPK. E' stata osservata e descritta la mutazione di BRAF nei melanomi, nel carcinoma colon-rettale, nei gliomi, nelle neoplasie polmonari, ovariche, mammarie ed in alcuni sarcomi. Se andiamo a considerare l'espressione dei diversi membri della famiglia RAF nei vari tessuti umani scopriamo che mentre RAF1 è praticamente ubiquitario, A-RAF è espressa prevalentemente dall'urotelio (ma anche da molti altri tessuti), mentre l'espressione di BRAF è molto ristretta, in particolare al tessuto nervoso e più in generale ai tessuti di derivazione neuronale, alla milza e al testicolo.

Il gene BRAF può andare incontro a diversi splicing, dando luogo ad almeno 10 isoforme di proteine, espresse in maniera diversa dai vari tessuti. Tali isoforme presentano dimensioni variabili da 67 a 99 kDa. Sono state individuate 43 probabili mutazioni a potenziale oncogeno, tutte localizzate negli esoni 11 e 15. In genere nei tessuti non si ritrova la proteina codificata dal gene ma il suo mRNA.

Il ruolo di BRAF nella progressione neoplastica è strettamente correlato alla sua azione su MEK ed ERK. Dei tre membri della famiglia è proprio BRAF ad essere un "target mutazionale" nei melanociti in virtù della sua capacità di attivare MEK, che già di base risulta maggiore rispetto a quella di Araf e di Raf1, ed è ulteriormente potenziata dalle mutazioni V599E e V600E. Nel

melanoma, il gene BRAF risulta mutato nel 40-60% dei casi; la mutazione prevalente (circa il 90% dei casi) è rappresentata dalla sostituzione di una valina con acido glutammico al codone 600 (V600EBRAF). La variante V600EBRAF, come le restanti mutazioni a carico della regione chinasica di BRAF, inducono, attraverso la fosforilazione (attivante) di ERK, una continua stimolazione della proliferazione cellulare e della crescita tumorale. Tuttavia, la dimostrazione che BRAF è mutato anche nei nevi comuni suggerisce che la sua attivazione oncogenica sia una condizione necessaria, ma non sufficiente, per lo sviluppo del melanoma.

Nei melanociti nevici, la presenza di mutazioni di BRAF è in grado di stimolare l'aumento di espressione di p16CDKN2A (con normali livelli di p14ARF), con conseguente induzione dei meccanismi di senescenza cellulare ed arresto del ciclo cellulare. Questo fenomeno appare come una reazione "protettiva", in risposta a tale inappropriato segnale mitogeno. A conferma dell'importanza di questo equilibrio funzionale, l'espressione di p16CDKN2A risulta ridotta od assente in circa 1/3 dei melanomi con mutazione V600EBRAF. Analogamente, l'attivazione oncogenica di BRAF è in grado di promuovere significativamente la trasformazione maligna di melanociti carenti in p53. Tutto questo conferma che BRAF mutato coopera con membri di entrambi i pathway di CDKN2A (p16CDKN2A e p53).

I melanomi che insorgono in aree cutanee esposte in maniera intermittente al sole e che, quindi, non rappresentano i segni di un danno solare cronico, presentano la più alta frequenza di mutazioni del gene BRAF. Si può ipotizzare che i raggi ultravioletti siano in grado di indurre tali mutazioni oncogeniche solo se l'esposizione solare non è sufficientemente prolungata da causare i cambiamenti tissutali tipici dell'esposizione cronica al sole.

È stato dimostrato che alcune varianti genetiche del recettore di membrana Melanocortin-1 Receptor (MC1R) non sono in grado di stimolare adeguatamente la produzione della melanina capace di proteggere la pelle dai danni dei raggi ultravioletti. La combinazione tra la presenza di

tali varianti di MC1R e l'esposizione intermittente ai raggi ultravioletti solari (i quali sembrano determinare un incremento della produzione di radicali liberi a livello cutaneo) è considerata responsabile dell'attivazione oncogenica di BRAF, attraverso un aumento indotto dei livelli intracellulari di AMP ciclico. A rendere ulteriormente complesso tale scenario è l'osservazione che, in presenza di mutazioni del gene NRAS, che sono state dimostrate essere mutuamente esclusive con le mutazioni del gene BRAF, la traduzione del segnale mitogeno nell'ambito del MAPK pathway è dirottato su CRAF, che pertanto viene ad acquisire un ruolo chiave nel mantenimento della stimolazione della proliferazione cellulare in questo sottogruppo di melanomi. Infatti, un aumentato livello di espressione di CRAF è responsabile dell'acquisizione di resistenza alla terapia con inibitori di BRAF.

Questi dati hanno pertanto implicazioni nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sulla combinazione di trattamenti inibenti simultaneamente BRAF e CRAF ovvero BRAF e PI3K, l'altro pathway attivato da NRAS mutato³³⁻⁴⁰.

2.2 Vie genetico-molecolari coinvolte nella patogenesi del melanoma.

Ad oggi, i seguenti geni, ed i pathway da essi dipendenti, sono stati dimostrati giocare un ruolo cruciale nella patogenesi del melanoma: CDKN2A (p16CDKN2A- CDK4-RB e p14CDKN2A-MDM2-p53 pathway), NRAS-BRAF (MAPK e PI3K-AKT pathway), cKIT e MITF. Purtroppo però la reale sequenza di alterazioni che porta al melanoma non è stata chiarita.

CDKN2A

Il gene Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A) svolge un ruolo fondamentale sia nella suscettibilità sia nella patogenesi del melanoma. Esso è localizzato sul cromosoma 9p21 e codifica per due proteine: p16CDKN2A e p14CDKN2A.

Il gene CDKN2A è un oncosoppressore ed agisce con un meccanismo d'azione di tipo recessivo; pertanto, è necessaria l'inattivazione di entrambi gli alleli per lo sviluppo del melanoma. In particolare, mutazioni di questo gene sono 7-10 volte più frequenti nei pazienti con una forte storia di ricorrenza familiare di melanoma (tre o più membri della famiglia affetti), rispetto alla stragrande maggioranza (circa il 90%) di pazienti con malattia classificata come sporadica.

In condizioni fisiologiche, p16CDKN2A inibisce il sistema di proteinchinasi Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4)/Cyclin D1 (CCND1), che, a sua volta, inibisce l'attività antiproliferativa della proteina RB (retinoblastoma-susceptibility) e permette la progressione nel ciclo cellulare.

Nel melanoma, alterazioni del pathway p16CDKN2A-CDK4-RB sono correlate alla progressione della malattia; assenti nei nevi, cominciano a manifestarsi nei tumori primari, fino ad aumentare nei melanomi metastatici e nelle linee cellulari di melanoma. Le due principali alterazioni riscontrate a carico di tale pathway sono l'inattivazione di p16CDKN2A e l'amplificazione di CCND1. In una piccola frazione di melanomi metastatici (circa 15% dei casi), è stata tuttavia dimostrata la coesistenza di amplificazione di CCND1 e mutazioni del gene BRAF, che sembra conferire resistenza alla terapia con inibitori di BRAF.

Analogamente, p14CDKN2A interferisce con le proteine Murine Double Minute 2 (MDM2) e p53, prevenendo la degradazione di quest'ultima e favorendo il suo controllo della progressione del ciclo cellulare; l'incremento del livello di espressione di p53 in risposta ad un danno genotossico previene infatti la divisione cellulare ed induce l'apoptosi. Nel melanoma, la riduzione dei livelli della proteina p53 contribuisce ad aumentarne l'aggressività e la refrattarietà

alla terapia; l'inattivazione di p53 può essere dovuta a mutazioni di p14CDKN2A o ad aumentata espressione di MDM2 o, in alternativa, al silenziamento del gene TP53 (principalmente, mediante un meccanismo funzionale epigenetico; la frequenza di mutazioni in tale gene è molto bassa).

NRAS

Lo ritroviamo mutato in una percentuale piuttosto elevata di melanomi: 12-25%, mentre gli altri membri della stessa famiglia, come K-RAS e H-RAS non sono quasi mai coinvolti.

Si ritiene che N-RAS entri in gioco nel controllo della crescita cellulare, inducendo proliferazione neoplastica.

La mutazione consiste nella sostituzione, in posizione 61, di una Glutamina con Arginina, Lisina o Leucina; questo rende la molecola che ne risulta costituzionalmente attivata, in quanto il legame che si forma con il GTP diventa stabile.

La via metabolica che viene alterata è RAS-RAF-MEK-ERK, che ritroviamo coinvolta nell'80-90% dei melanomi in diverse tappe; semplificando si tratta di una via che si attiva a partire dal legame con una proteina transmembrana dotata di un domain tirosinchinasico e che risulta nell'attivazione di fattori di trascrizione nucleari.

PI3K

Oltre a MAPK, il secondo sistema di regolazione della crescita cellulare, prevalentemente dipendente da RAS attivato, è costituito dal pathway incentrato sulla proteina PI3K e costituito dalla cascata di trasduzione del segnale delle proteine PTEN, PI3K e AKT (in particolare, l'isoforma AKT3 nel melanoma). In condizioni fisiologiche, l'attività fosfatase della proteina PTEN riduce il livello

intracellulare dei fosfoinositoli PIP2 e PIP3 prodotti dall'attivazione di PI3K.

Quest'ultima determina infatti un aumento dei livelli intracellulari di PIP3 che vanno ad attivare AKT e, di conseguenza, il suo substrato mTOR, il quale è deputato a modulare la sintesi di proteine coinvolte nella sopravvivenza e crescita cellulare nonché nell'apoptosi. Nel melanoma, il gene PTEN è deletato nel 30-40% dei casi sporadici (con perdita della corrispondente proteina nel 5-20% dei melanomi primari) e nel 30-50% delle linee cellulari.

Aumentata espressione di AKT3 è presente nel 50% dei nevi displastici, nel 70% dei melanomi primari e nel 70% delle metastasi. L'attivazione di AKT: a) promuove la proliferazione cellulare attraverso l'induzione e la stabilizzazione di CCND1; b) inibisce l'apoptosi mediante l'inattivazione di molte proteine ad attività proapoptotica, quali BAD (antagonista di BCL-2, che invece ostacola di meccanismi di morte cellulare) e MDM2 (che causa la degradazione di p53). Riassumendo, l'effetto combinato della perdita di PTEN e dell'attivazione del sistema PI3K-AKT, che si verifica nel melanoma, risulta in una crescita aberrante delle cellule neoplastiche, con acquisizione di resistenza

all'apoptosi e, quindi, di refrattarietà al trattamento chemioterapico.

MITF

Tra i prodotti genici che operano a valle del pathway di trasduzione del segnale BRAF-MEK-ERK, il più rilevante nel melanoma è rappresentato dal Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF). In aggiunta al suo coinvolgimento nella pigmentazione cutanea, MITF sembra giocare un ruolo di primaria importanza nella proliferazione e differenziazione dei melanociti.

Il meccanismo d'azione di MITF è tuttavia alquanto complesso: una bassa od assente espressione di tale proteina predispone la cellula all'apoptosi; livelli intermedi di espressione di MITF

promuovono la proliferazione e la sopravvivenza cellulare; elevate quantità di MITF all'interno della cellula producono un effetto antiproliferativo. Nel melanoma, si sono probabilmente sviluppate strategie per mantenere i livelli intracellulari della proteina MITF in un range compatibile con gli altri meccanismi di tumorigenesi. A conferma di ciò, è stato dimostrato che l'attivazione costitutiva di ERK, stimolata da mutazioni oncogeniche di BRAF, risulta associata ad una marcata degradazione di MITF. Nelle cellule di melanoma MITF interagisce con numerosi effettori che svolgono azioni contrapposte, quali CDK2 e BCL-2, che promuovono la progressione del ciclo cellulare e la riduzione dell'apoptosi, favorendo la proliferazione neoplastica, ovvero p21 e p16CDKN2A, che invece inducono l'arresto del ciclo cellulare e l'attivazione dei meccanismi di senescenza cellulare. Bassi livelli intracellulari della proteina MITF sono stati riscontrati nei melanomi invasivi e sono stati associati ad una peggiore prognosi ed alla progressione clinica di malattia.

L'amplificazione del gene MITF è stata osservata in circa il 15-20% dei melanomi metastatici portatori di mutazioni di BRAF. Tale fenomeno potrebbe essere dovuto ad una sorta di bilanciamento funzionale in risposta alla riduzione dei livelli della proteina indotta da BRAF mutato e la sua presenza è associata ad aumento della resistenza alla chemioterapia.

c-KIT

c-KIT è il recettore tirosin-chinasico per lo stem cell factor, che nei melanociti regola migrazione e sopravvivenza cellulare. Sebbene subisca frequentemente perdita di espressione nei melanomi, particolari alterazioni del recettore sono coinvolte nella patogenesi di alcuni sottogruppi di queste neoplasie. Anche se complessivamente meno frequenti delle mutazioni di BRAF e NRAS, specifiche variazioni di sequenza del gene c-KIT causano attivazione costitutiva del dominio chinasico, risultando in un'induzione continua della proliferazione cellulare, attraverso la stimolazione del MAPKpathway.

Le mutazioni di c-KIT sono state descritte nei melanomi acrali (10% dei casi), mucosali (15-20% dei casi) ed insorti nelle aree cutanee cronicamente esposte al sole (5% dei casi) (2,27). In aggiunta alle mutazioni, si osservano anche amplificazioni geniche di c-KIT; infatti, circa 1/3 di melanomi con cKIT mutato presentano un aumento del numero di copie geniche. Considerando insieme entrambe le alterazioni (mutazioni ed amplificazioni), circa 1/4 di melanomi delle mucose ed acrali sono caratterizzati dalla presenza di un'aberrazione genomica di c-KIT. Non è stata descritta una marcata coesistenza di mutazioni di BRAF o NRAS ed alterazioni di c-KIT^{31,43}.

2.3 Confronto tra istotipi tradizionali e classificazione molecolare.

Lo studio delle possibili correlazioni tra stato mutazionale e caratteristiche morfologiche cito-architetture del melanoma mostra che i melanomi BRAF mutati insorgono tipicamente in sedi anatomiche sottoposte ad esposizione solare

intermittente e che istologicamente mostrano caratteristiche di SSM. Inoltre, la mutazione di BRAF è risultata associata alle seguenti caratteristiche morfologiche: significativa risalita intra-epidermica pagetoide, tendenza dei melanociti a disporsi in teche, intensa pigmentazione, melanociti epitelioidi di grandi dimensioni, circoscrizione, ispessimento epidermico e minima elastosi solare, la cute non è

cronicamente esposta e la sede più frequentemente colpita è il tronco. I melanomi che insorgono su cute cronicamente foto-esposta (regione testa/collo, volto, superficie dorsale e distale delle estremità) ed associati istologicamente a marcata elastosi solare hanno una minore prevalenza di mutazioni di BRAF, mentre circa il 30-40% di essi mostra mutazioni di c-KIT o NRAS. Mutazioni di c-KIT, inoltre, si osservano in melanomi del tipo ALM e melanomi mucosali lentiginosi. Inoltre, le amplificazioni osservate nei melanomi in sede acrale coinvolgono

generalmente il cromosoma 11q13 (dove si trova il locus della ciclina D1) e hTERT a livello del cromosoma 5p.

Al contrario, la ciclina D1 è raramente amplificata nei melanomi delle mucose, dove le amplificazioni coinvolgono i loci CDK4 e MDM2 su 12q. Al presente, i melanomi nodulari non sembrano mostrare alterazioni molecolari peculiari. Questo suggerisce che il melanoma nodulare verosimilmente non rappresenti un istotipo assimilabile agli altri ^{40, 42}.

2.4 Modello di sviluppo e progressione del melanoma

Malgrado tale complessità, vanno acquisendo un ruolo sempre più determinante dal punto di vista patogenetico le interazioni tra le diverse vie genetico-molecolari precedentemente descritte. Considerando nel suo complesso i diversi pathway come un'unica rete funzionale, sono compresi meglio i motivi per cui, nel melanoma, possano coesistere, oppure no, alterazioni imputabili all'influenza dei diversi geni.

E' stato così sviluppato un modello di melanomagenesi di tipo lineare, basato sull'accumulo progressivo delle alterazioni molecolari descritte in precedenza.

Ricapitolando potremmo riassumere la cascata di eventi genetici che si realizzano nella progressione neoplastica del melanoma in una serie di step:

1° step: mutazioni a carico di N-RAS o di BRAF, che si traducono in attivazione della proliferazione cellulare ed in promozione della sopravvivenza delle cellule neoplastiche; tali mutazioni sono ancora insufficienti a garantire la proliferazione neoplastica;

2° step: è quello cruciale in cui bisogna superare la barriera della senescenza eludendo i meccanismi di difesa del genoma rappresentati da p16INK4 e, probabilmente in minor misura, da p53;

3° step: vengono meno i meccanismi di riparazione del danno al DNA e in questo caso è coinvolta p53;

4° step: una volta avviata la proliferazione neoplastica in senso maligno, l'ulteriore progressione prevede l'acquisizione della capacità di invasione e di metastatizzare ed entrano in gioco geni quali PTEN, PI3KCA, KIT, NRAS nelle fasi tardive. Sembra coinvolta anche la E-Caderina, che anche nei melanociti è una molecola di adesione normalmente espressa, ma viene persa nel melanoma invasivo. Recentemente, si è tuttavia ipotizzata l'esistenza, in un numero non ancora quantificato di casi, di una seconda via di trasformazione neoplastica melanocitaria (di tipo "non lineare"), che vede il coinvolgimento di cellule staminali tessutali, le cui alterazioni darebbero direttamente origine a cellule di melanoma in fase di crescita superficiale oppure verticale ovvero, addirittura, in fase metastatica.

Questa seconda ipotesi si basa sull'evidenza di alcune incongruenze del modello di tumorigenesi progressiva in alcuni sottogruppi di melanomi, quali una maggiore incidenza di mutazioni BRAF nei melanomi a crescita verticale rispetto a quelli a crescita superficiale, nonché l'osservazione di amplificazioni delle regioni genomiche 9p21 e 1p22 in maniera prevalente nei melanomi nodulari.

Da quanto sopra riportato, diventa evidente che una più approfondita conoscenza dei bersagli molecolari consente di identificare marcatori in grado di predire sia la prognosi (valore prognostico) sia la risposta terapeutica a specifici trattamenti (valore predittivo), nei pazienti con melanoma. In questo ultimo caso, è ormai chiaro che l'introduzione di composti antitumorali

mirati su bersagli genici in combinazione con le terapie convenzionali rende necessaria una più appropriata selezione dei pazienti da indirizzare ai vari trattamenti innovativi. È infatti alquanto improbabile che l'attuazione di una terapia mirata contro un componente dei pathway molecolari patogenetici possa produrre una significativa risposta antitumorale in pazienti non selezionati per alterazioni in quello specifico bersaglio. Per tali motivi, la classificazione molecolare sarà sempre più parte integrante della diagnosi e stadiazione dei pazienti con melanoma fornendo informazioni insostituibili per la sperimentazione di nuovi approcci terapeutici ⁴⁴.

3 TERAPIA

La terapia chirurgica: il trattamento di scelta è l'escissione chirurgica della lesione primitiva con un margine di almeno 1cm, anche se in passato era raccomandato un margine di 5cm. Attualmente si tende a considerare sufficiente un margine di 1cm per le lesioni al di sotto di 1mm e di 2 e 3cm tra 1 e 4mm. Se si ritiene clinicamente che il linfonodo sentinella sia coinvolto si procede immediatamente alla linfadenectomia, altrimenti si esegue la già ricordata metodica dell'esame del linfonodo sentinella ⁴⁵.

Terapia sistemica adiuvante del melanoma: l'uso della terapia adiuvante nel melanoma resta tuttora un argomento controverso, per la presenza di dati talora contraddittori in letteratura e verosimilmente per l'assenza di farmaci fortemente efficaci anche negli stadi avanzati di malattia. La terapia adiuvante va offerta a pazienti senza evidenza di metastasi ma ad alto rischio di recidiva. A tutt'oggi l'unico farmaco che ha dimostrato efficacia come terapia adiuvante nel melanoma è l'Interferone, pur con notevoli differenze di valutazioni circa le dosi, la durata dei trattamenti, i subsets di pazienti trattati ed il tipo di beneficio registrato. Essa incrementa l'intervallo libero da malattia del 10% circa a 5 anni e può avere un modesto impatto sulla

sopravvivenza totale. I suoi benefici vanno in ogni caso bilanciati con la considerevole, anche se rapidamente reversibile, tossicità ⁴⁶.

La terapia del melanoma in fase avanzata: la prognosi dei pazienti affetti da melanoma in fase avanzata è tuttora sfavorevole. La sopravvivenza mediana per tali pazienti è stimata in 6-9 mesi, con meno del 10% di pazienti vivi a 5 anni, pur con variazioni dipendenti da diversi fattori prognostici quali il sito ed il numero delle metastasi e l'elevato valore ematico di LatticoDeidrogenasi (LDH). Fra i chemioterapici che hanno dimostrato una efficacia terapeutica in monochemioterapia la Dacarbazina resta un farmaco di riferimento. Per questo, a tutt'oggi nelle review è considerata la terapia "standard", pur offrendo, nei più recenti trial clinici, percentuali di risposte globali (OR) veramente modeste: 5,5-12% ed una sopravvivenza mediana (OS) di 7-7,4 mesi, altrettanto deludente ^{47,48}.

Fotemustina e Temozolomide sono farmaci di più recente introduzione ed hanno mostrato una "non-inferiorità" rispetto alla DTIC. Spesso la sostituiscono nella pratica clinica, anche per una certa efficacia nei confronti delle metastasi cerebrali. Fra i farmaci definiti "biologici", la IL-2 è una citochina approvata dalla Food and Drug Statunitense per la terapia del melanoma ⁴⁹.

Le recenti pubblicazioni che riguardano farmaci come l'anticorpo monoclonale anti- CTLA-4 (ipilimumab), che, agendo con meccanismi esclusivamente immunoterapici, fornisce la dimostrazione di possibile efficacia delle terapie immunologiche ⁵⁰.

Vaccini:

approcci vaccinici di vario tipo sono spesso usati nella sperimentazione clinica in pazienti affetti da melanoma e pur non essendo entrati nella routine, per la eterogeneità delle metodiche ed i risultati talora dissimili fra loro, mostrano complessivamente una tendenza all'aumento della sopravvivenza nei pazienti che mostrano segni di immunoresponsività ⁴⁵.

La target-therapy:

La determinazione di oncogeni mutati quali target specifici apre la via per terapie da applicarsi a sottogruppi di pazienti selezionati appunto per la presenza o meno di tali target. Le 4 mutazioni note (BRAF, GNAQ, c-KIT, NRAS) della via di segnale di MAPK sono generalmente mutualmente esclusive. Con il progredire delle conoscenze, è probabile che nell'arco di pochi anni verranno identificate nuove e diverse mutazioni che potranno costituire ulteriori bersagli per terapie innovative, tra le quali la mutazione di ERBB4 (tyrosine receptor kinase), che è stata riportata in circa il 19% dei melanomi. Inoltre, un ulteriore approfondimento del fenotipo clinicopatologico che corrisponda a tali mutazioni potrebbe rappresentare una cornice all'interno della quale selezionare opportunamente i pazienti candidati alle nuove terapie ^{37,51}.

La proteina BRAF sembra rappresentare un bersaglio particolarmente attraente in Termini terapeutici poiché la mutazione ha un'elevata prevalenza nel melanoma; coinvolge una serine/threonine kinase con un kinase domain identificabile come relativamente facile bersaglio per farmaci ad azione inibitoria; non è presente in cellule normali. L'inibizione della proteina BRAF mutata nel melanoma rappresenta una strategia terapeutica di grande potenzialità già evidenziata in studi clinici condotti in pazienti affetti da melanoma metastatico. Risultati recenti di uno studio di fase III con Vemurafenib (PLX-4032) hanno mostrato una risposta clinica del 48.4%, in pazienti con melanoma BRAFV600E mutato ed un intervallo libero da progressione pari a 5,3 mesi, con un significativo vantaggio rispetto ai pazienti trattati con chemioterapia standard.

Dacarbazina (DTIC).

Questo trattamento è stato ben tollerato, sebbene il 18% dei pazienti trattati abbia sviluppato carcinomi a cellule squamose e cheratoacantomi, verosimilmente dovuti all'attivazione oncogenica

della via di segnale di MAPK nei cheratinociti. Pertanto, nel prossimo futuro la strategia terapeutica più promettente potrebbe essere quella dell'utilizzo di una combinazione di inibitori di BRAF ed inibitori di MEK.

I pazienti affetti da melanoma metastatico con mutazioni di c-KIT sono stati invece trattati con inibitori di c-KIT, con evidenze di una parziale risposta clinica. Nonostante queste incoraggianti risposte iniziali con inibitori di BRAF, in termini di intervallo libero da malattia, evidenziate negli studi clinici, va ricordato che la maggior parte dei pazienti ha sviluppato resistenza acquisita alla terapia. Inoltre, il 20-40% dei pazienti non risponde già in fase iniziale, (resistenza primaria) e remissioni complete sono estremamente rare.

Pertanto, in analogia con altre neoplasie, la resistenza acquisita agli inibitori chinasi sembra anche nel melanoma limitare fortemente la durata dell'efficacia terapeutica. È verosimile che la scoperta dei meccanismi responsabili dell'instaurarsi della resistenza porterà nel prossimo futuro a nuovi approcci di combinazione più duraturi nella loro efficacia.

3.1. Meccanismi di Resistenza agli inibitori di BRAF

La resistenza all'inibizione di BRAF include una resistenza primaria o insensibilità al trattamento e la resistenza secondaria acquisita dopo trattamento cronico.

La resistenza primaria comprende quei tumori che progrediscono precocemente in corso di terapia, mentre la resistenza secondaria definisce una progressione una risposta iniziale.

La resistenza primaria agli inibitori di BRAF si osserva nel 20% dei pazienti affetti da melanoma con BRAF mutato trattati con PLX4032 ³⁶. Studi preclinici hanno identificato che livelli elevati

di CRAF, in aggiunta a amplificazione del gene CCND1, overespressione di ciclina D1 e di CDK4⁵² sono associati a resistenza primaria all'inibizione di BRAF⁵³.

La maggior parte dei pazienti ha risposto al trattamento con PLX4032 e GSK2118436 ma ha recidivato entro 2-8 mesi e ha sviluppato resistenza al Trattamento^{35, 37}. Fino ad ora, studi preclinici hanno identificato multipli meccanismi di resistenza acquisita agli inibitori di BRAF, alcuni dei quali si verificano nelle lesioni metastatiche di pazienti trattati. La riattivazione della pathway di MAPK sembra essere coinvolta nella maggior parte dei casi di resistenza acquisita ma è stata anche identificata la trasduzione del segnale MAPK effettuata da pathways paralleli⁵⁴⁻⁵⁷. In generale, la resistenza acquisita può essere classificata in meccanismi acquisiti ERK-dipendenti e ERK-indipendenti. **(Fig 1).**

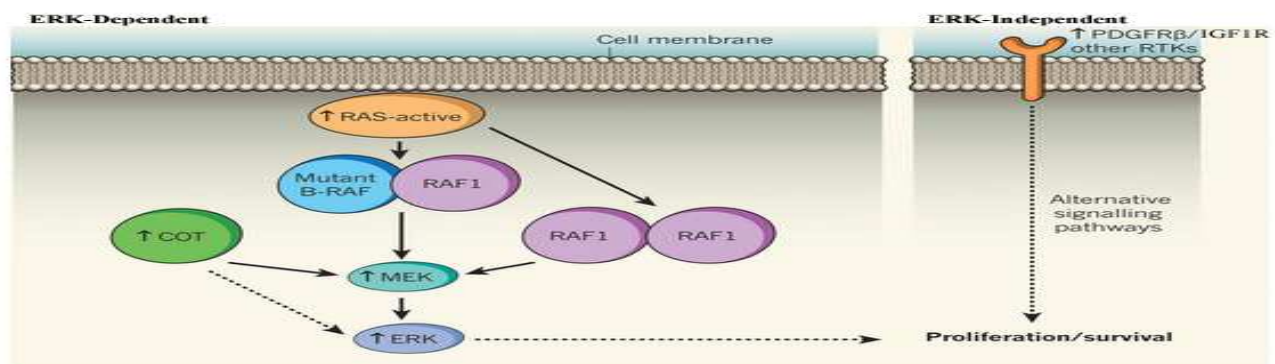


Fig.1 Meccanismi di resistenza acquisita agli inibitori di BRAF (Modificata da Solit et al, 2010)⁵⁷

3.2. Meccanismi ERK-Dipendenti

La grande maggioranza dei meccanismi di resistenza acquisita agli inibitori di BRAF mostra la riattivazione del signaling di ERK nonostante la presenza degli inibitori di BRAF.

L'elevata attività di CRAF è stata identificata quale meccanismo di resistenza all'inibitore di BRAF AZ628 in studi preclinici ⁵³. In cloni resistenti di cellule di AZ628 generate in vitro da una linea cellulare melanomatosa BRAF mutata, sono stati trovati livelli di CRAF più elevati rispetto alle linee cellulari parentali sensibili, con le cellule tumorali che pare abbiano mutato signaling da BRAF a CRAF. Comunque, non è stata individuata nessuna amplificazione del gene CRAF. Mentre mutazioni secondarie a livello del dominio chinasi di BRAF non sono state ancora identificate come una delle cause della resistenza agli inibitori di BRAF, Corcoran et al hanno identificato un'amplificazione dell'allele BRAF mutato in due linee cellulari indipendenti di tumore del colon-retto resistenti al MEK-inibitore AZD6244 ⁵⁸. Oltretutto, l'amplificazione del gene BRAF è stato riportato verificarsi in 4/20 pazienti con resistenza acquisita all'inibitore di BRAF PLX4032 che fornisce ulteriore evidenza riguardo il fatto che alterazioni nel target del farmaco causi recidiva clinica ⁵⁹.

4 SCOPO DELLO STUDIO

Le mutazioni oncogeniche di BRAF nel melanoma inducono l'inappropriata attivazione di ERK1/2 portando a proliferazione incontrollata ⁵⁴⁻⁵⁷. Perciò, il trattamento con gli inibitori di BRAF risulta in una rapida regressione delle metastasi. Comunque, le cellule di melanoma si adattano velocemente agli inibitori di BRAF portando a resistenza e a re-insorgenza di metastasi dopo 6-9 mesi. Lo scopo dello studio è stato indagare il ruolo di p53 nei meccanismi di resistenza indotti dal vemurafenib in linee cellulari di melanoma. Il gene p53, è noto essere un oncosoppressore e svolge un ruolo chiave nel regolare il ciclo cellulare ⁶⁰. L'inattivazione funzionale di p53 è presente in circa metà dei tumori umani ^{61, 62}. p53 raramente è mutato nei melanomi anche se spesso è mantenuto in uno stato inattivo, inoltre è pubblicato che SNP intronici di p53 sono frequenti nei melanomi ⁶³⁻⁶⁵. Il polimorfismo p53-72R, che consiste nella

sostituzione di un'arginina con una prolina, modifica la struttura primaria della proteina, con successiva modificazione della migrazione elettroforetica ⁶⁰. Il significato biologico di questo SNP in vari tumori rimane non chiaro, ma vi sono differenze nel legame a fattori che regolano la trascrizione, inducendo l'attivazione trascrizionale e l'apoptosi ⁶⁶⁻⁶⁸.

5 MATERIALI E METODI

Gli esperimenti condotti su campioni umani sono stati approvati dal comitato etico locale. Le linee cellulari utilizzate sono state M00921 (BRAFFV600E, p53WT) isolate da melanoma primitivo presso l'Università di Zurigo, WM1158 (BRAFFV600E, p53WT), WM793(BRAFFV600E, p53WT), A375M (BRAFFV600E, p53WT) linee disponibili in commercio.

Le cellule resistenti al vemurafenib sono state generate utilizzando stimolazione in cronico con PLX 4032 (Selleck chemicals) ad una concentrazione di 3 μ M. Le colture cellulari sono state mantenute in (RPMI) con aggiunta del 10% FBS e PenStrep-Glutamina, utilizzando tecniche colturali standard.

I mezzi condizionati utilizzati sono stati ottenuti dalle cellule in coltura dopo 24 o 48 ore, congelati a -80°C.

I reagenti utilizzati nello studio sono stati: inibitore di BRAF (PLX 4032, Vemurafenib), acquistato dalla Selleck chemicals.

La proliferazione cellulare è stata valutata utilizzando il saggio di proliferazione Cristal violetto. In breve: 25x10⁴ cellule/ pozzetto sono piastrate in piastre da 48 pozzetti e trattate con i vari farmaci indicati per 72 ore e confrontate con il controllo non trattato. In seguito le cellule vengono

fissate con una soluzione contenente paraformaldeide e colorate con Cristal violetto (Sigma). Il colorante che si lega al DNA viene poi solubilizzato con una soluzione di PBS con acido acetico al 30%. L'assorbanza (A600nm) viene misurata direttamente attraverso uno spettrofotometro (Eppendorf). Il tasso di crescita viene calcolato in riferimento alla stessa linea cellulare non trattata.

Immunoblotting. Le cellule sono state lisate in RIPA buffer contenente inibitori di proteasi e fosfatasi (Sigma). La concentrazione proteica è stata determinata attraverso BioRad dye-binding assay (Irvine, California). Gli estratti cellulari sono poi stati caricati su un denaturing SDS-PAGE denaturante e blottate su una membrana di nitrocellulosa (BioRad). Gli anticorpi utilizzati sono stati ERK1/2 (sc-153), p53 (DO-1) (sc-126), actina (sc-1615), Santa-Cruz Biotechnology; p-ERK (#9106), p53-Ser15p (#9284) (Cell Signaling). Gli anticorpi sono stati utilizzati alle concentrazioni come suggerito dal produttore. L'analisi in Western blot è stata effettuata tramite l'utilizzo del Sistema enhanced chemiluminescence system (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech Inc. Uppsala, Sweden).

Estrazione di RNA: l'RNA totale è stato estratto utilizzando il Trizol (Invitrogen) seguendo le istruzioni del produttore. La concentrazione dell'RNA è stata valutata tramite Qubit (Qiagen). La retrotrascrizione è stata effettuata utilizzando 1µg di RNA in 20 µl di reazione totale utilizzando la Multireverse (Applied Biosystem) seguendo le istruzioni del produttore ed il termociclatore (BioRad).

Real Time-qPCR. Gli esperimenti in Real Time-qPCR sono stati effettuati utilizzando SYBR green (Qiagen) e normalizzati utilizzando β-GUS come housekeeping. Sono state utilizzate le seguenti condizioni: denaturazione 1 minuto a 95°C, annealing 30 secondi a 58°C. I seguenti primers sono stati utilizzati (MWG Operon): p21 for 5'-GATGTCCGTCAGAACCCATG-3', p21 rev 5'-CCACATGGTCTTCCTCTGCTG-3', GADD45A for 5'-

GGGGTGTACGAAGCGGCCAA-3', GADD45A rev 5'-GGTTGCTGACGCGCAGGATGT-3', HDM2 for 5'-TGTAAGTGAACATTCAGGTG-3', HDM2 rev 5'-TTCCAATAGTCAGCTAAGGA-3', MITF for 5'-GGAGCTCACAGCGTGTATTTTCCC-3', MITF rev 5'-CCGGTTGGCGTGCTCCAGTT-3', , SERPIN1 for 5'-CAGAGCAGGACGAACCGCCA-3', SERPIN1 rev 5'-CCTGCGCCACCTGCTGAAACA-3',INHBA for 5'-ACCCAAGGCGGCGCTTCTGA-3', INHBA rev 5'-GCCAGACTTCTGCACGCTCCA-3', KITLG_RT_for 5'-AGAGCCCAGAACCCAGGCTCTTT-3', KITLG_RT_rev 5'-AAGGGAGCTGGCTGCAACAGG-3', HGFAC for 5'- hTGFB1 for 5'-AGGGCTACCATGCCAACTTC-3', hTGFB1 rev 5'-CCCGGGTTATGCTGGTTGTA-3', b-GUS for 5'-GGCACCTCCCGCGCTTTTCT-3', b-GUS rev 5'-CCCCACAACAACGGCCCGAG-3', HGF for 5'-GCAGTTCCTCGACGAGTAG-3', HGF rev 5'-CCCGGTCGTAGTTGTGAGTT-3'. La Real Time-qPCR per I geni c-MET e GAPDH è stata effettuata utilizzando TaqMan assay Hs01565584 e Hs99999905, (Applied Biosystem).

Genotipo e sequenziamento del DNA. Lo SNP di p53 *rs1042522* (P72R polymorphism) è stato analizzato utilizzando TaqMan SNP genotyping Assays C_2403545 (Applied Biosystem). Il sequenziamento del cDNA di p53 è stato effettuato utilizzando le tecniche standard presso BioFab Research Inc. Il sequenziamento esonico delle metastasi di pazienti affetti da è stata effettuata utilizzando Illumina HiSeq presso l'Università di Zurigo. E' stata valutata la percentuale di sequenze contenenti ogni allele dello SNP *rs1042522* (polimorfismo P72R).

SiRNAs. Il silenziamento di p53 negli esperimenti è stato effettuato utilizzando p53siRNA (Eurofins MWG Operon). La trasfezione è stata effettuata utilizzando la Lipofectamina RNAiMAX seguendo le istruzioni del produttore (Invitrogen-Life Technologies) (Carlsbad California).

Beta-galattosidasi Assay. Per effettuare la colorazione della β -galattosidasi associata alla senescenza 3×10^4 di cellule sono state piastrate nelle piastre da 6 pozzetti, colorate dopo 5 giorni di coltura, seguendo le tecniche standard. Successivamente le cellule positive sono state contate rispetto al numero totale di cellule. A tal fine, la conta cellulare è stata effettuata su 10 campi scelti in modo casuale.

6 RISULTATI

Per studiare il ruolo di p53 nella resistenza del melanoma agli inibitori di BRAF, abbiamo trattato alcune linee umane di melanoma (M00921, A375M, WM793, WM1158, WM115, M101221) con l'inibitore di BRAF per tre giorni e abbiamo analizzato la relativa crescita cellulare, abbiamo osservato differenti livelli di resistenza al PLX4032, in particolare, WM793, WM1158, WM115, M101221 possedevano un'alta resistenza in confronto alle M00921 and A375M (Fig. 2A). Successivamente abbiamo trattato in cronico le linee cellulari M00921, A375M, WM793, WM1158 con PLX4032 al fine di valutarne il comportamento e la crescita cellulare a lungo termine. Le WM793 and WM1158 sono diventate velocemente resistenti al PLX4032, infatti la crescita cellulare rallenta solo all'inizio del trattamento, mentre le A375M mostrano una resistenza lenta, infatti si assiste ad una diminuzione della crescita cellulare all'inizio, poi ad una fase stazionaria e soltanto dopo più di mese di trattamento si assiste di nuovo al una ripresa della proliferazione cellulare. Al contrario le M00921 non sono in grado di generare cellule resistenti proliferanti al trattamento con PLX4032 (Fig. 2B).

Le linee cellulari di melanoma hanno mostrato differenti livelli di resistenza a PLX4032 correlati sia a mancanza di completa inibizione sia all'attivazione del signaling di Erk (Fig. 3A). La trascrizione di geni di arresto del ciclo cellulare p53-dipendenti quali CDKN1A (p21) e

GADD45A era aumentata in cellule resistenti a PLX4032, come i livelli di mRNA di HDM2, un inibitore p53-dipendente di p53^{69,70} (Fig 3B)

La riattivazione di p53 nelle cellule resistenti a PLX4032 è correlata a aumentati livelli di fosforilazione di p53-Serina15 (Fig. 4A), un marker dell'attivazione di p53 indotto da danno al DNA, dall' ipossia e attivazione in un ampio spettro di protein chinasi⁷¹.

Abbiamo osservato una differente capacità di migrazione di p53 su gel elettroforetico, M00921, presentano un'unica banda, così come le WM793. Al contrario le WM1158 presentano una doppia banda e abbiamo notato che le WM1158R presentano un aumento dell'espressione della banda più bassa (Fig.4A). L'espressione di p21 e HDM2 era ridotta nelle linee cellulari p53-deplete, indicando la loro dipendenza da p53 (Fig. 4B). È noto che il polimorfismo p53-72R, che consiste nella sostituzione di un'arginina con una prolina, modifica la struttura primaria della proteina, con successiva modificazione della migrazione elettroforetica⁶⁰. Sebbene non possiamo escludere una mutazione missenso, è verosimile che il trattamento con inibitori di BRAF abbia selezionato una piccola popolazione cellulare che porta l'allele 72R. Infatti abbiamo effettuato il genotipo per lo SNP di p53 *rs1042522* e le cellule M00921 sono risultate essere omozigoti p53 72P, le WM793 omozigoti p53 72R, mentre le WM1158 che sono eterozigoti per il polimorfismo 72, (Fig.5 A) e hanno mostrato aumento degli alleli 72R e l'espressione della proteina 72R dopo trattamento cronico con PLX4032 (Fig. 5B), suggerendo che il trattamento cronico con PLX4032 possa selezionare preferenzialmente p53-72R. La selezione dell'allele p53-72R nelle metastasi da melanoma che avviene durante il trattamento con PLX4032 è stata confermata *in vivo* dal sequenziamento esonico di alcune metastasi in pazienti pre e post trattamento con l'inibitore di BRAF, vemurafenib.

Abbiamo osservato che l'allele p53-72R era presente solo in una metastasi su 2 prima del trattamento ma dopo il trattamento con PLX-4032 era presente in tutte le metastasi (Fig.5C),

mentre il bilanciamento allelico della mutazione di BRAF non ha subito cambiamenti. P72R è un polimorfismo comune che influenza la fosforilazione di p53 e il suo legame ai regolatori di p53 risulta nell'alterazione di diverse funzioni biologiche includendo l'attivazione dell'apoptosi, i meccanismi di riparazione del DNA e la suscettibilità al cancro.

Alla luce di questi dati che indicano che l'inibizione di BRAF modifichi le funzioni di p53 nel melanoma, abbiamo ipotizzato che la riattivazione di p53 nelle cellule resistenti agli inibitori di BRAF e la selezione dell'allele p53-72R possa influenzare direttamente il pattern di proliferazione del melanoma. Per provare questa ipotesi, abbiamo analizzato l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione dei melanociti e nella pigmentazione. Abbiamo osservato un incremento nell'espressione di geni del meccanismo della pigmentazione (MITF), così come i geni coinvolti nel fenotipo invasivo (Serpina), e citochine come Kit Ligando (KITLG), l'Hepatocyte Growth Factor Activator (HGFAC), il recettore dell' Hepatocyte Growth Factor (cMET) ed il Transforming Growth Factor beta (TGF β) nelle cellule resistenti agli inibitori di BRAF (Fig.6). Il TGF β è un componente del fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP). KITLG è noto essere un gene target di p53^{72,73}. Al fine di confermare che TGF β e KITLG sono target diretto di p53 nelle cellule resistenti a PLX4032 la deplezione di p53 tramite specifici siRNAs è risultata in una significativa riduzione dei trascritti di KITLG e TGF β nelle cellule resistenti al PLX4032, confermando un coinvolgimento diretto di p53 nell'indurre questi geni (Fig.7). Inoltre, le cellule resistenti a PLX hanno mostrato un'aumentata attività della Beta-galattosidasi associata alla senescenza (SA- β -gal), un altro marker dell'attivazione di p53⁷⁴ (Fig. 8A).

L'aumentata espressione di HGFAC, KITLG e TGF β da parte di PLX4032 nelle cellule resistenti ci ha portato a cercare di confermare l'ipotesi che queste e altre citochine possano avere influenza sulle cellule circostanti. Perciò abbiamo eseguito una colorazione con la Beta-galattosidasi nelle

cellule A375M trattate o meno con mezzi condizionati delle A375M stesse, delle WM1158, WM1158R, WM793, WM793R. E abbiamo osservato un aumento della SA- β -gal, solo con i mezzi condizionati delle WM1158R, WM793, WM793R cioè con i mezzi delle cellule con un'aumentata espressione dell'allele p53 72R (Fig 8B).

Inoltre, se utilizziamo il mezzo condizionato delle WM793R o delle WM 1158R su colture cellulari di A375M, che normalmente impiegato circa 30 giorni a diventare resistenti al PLX4032, assistiamo ad un aumento della resistenza al PLX4032, infatti la crescita cellulare risulta aumentata rispetto alle cellule trattate con il PLX4032 ma stimulate con i mezzi condizionati delle stesse A375, WM793 e WM1158 (Fig. 8C).

L'attività paracrina delle cellule resistenti a PLX4032 è dipendente da p53, e viene negativamente alterata con mezzo condizionato proveniente da cellule p53 deplete (Fig. 8D)

I nostri dati indicano che il trattamento cronico con gli inibitori di BRAF favorisce la selezione di cellule con l'allele p53-72R portando eventualmente alla ri-attivazione di alcune proprietà trascrizionali e all'aumentata sintesi di citochine che controllano la resistenza secondaria ai BRAF, in maniera paracrina.

Infatti i nostri dati dimostrano che un programma oncogenico trascrizionale p53-dipendente viene attivato nelle cellule resistenti a PLX4032 e modifica le proprietà delle cellule circostanti, promuovendo la loro resistenza agli inibitori di BRAF.

7 CONCLUSIONI

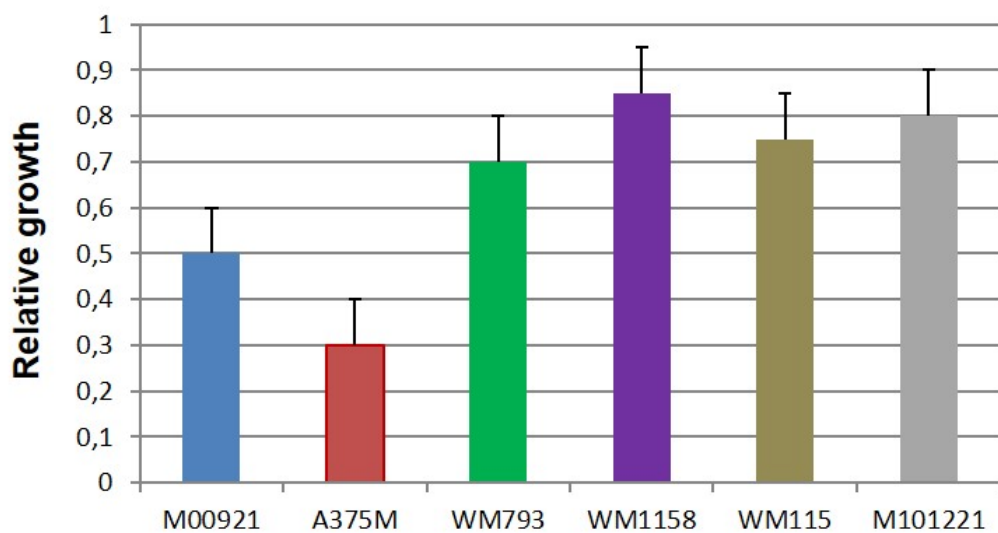
Abbiamo scoperto che la terapia con vemurafenib può selezionare il polimorfismo p53-72Arg in un subset di cellule di melanoma rendendole capaci di far secernere alle cellule circostanti un gruppo di citochine (KITLG, HGFAC, TGF β) che promuovono la resistenza agli inibitori di BRAF.

Le funzioni pro-apoptotiche e oncosoppressive di p53 potrebbero essere riattivate in queste cellule usando attivatori chimici di p53 come PRIMA e Nutlin3^{76,77}, che sono attualmente utilizzati per la terapia dei tumori con mutazione di p53. Le nostre scoperte possono essere di immediato utilizzo pratico: identificazione di p53-72R nelle metastasi di melanoma resistenti agli inibitori di BRAFi potrebbe portare all'individuazione di trattamenti selettivi con riattivatori di p53 come PRIMA o Nutlin3.

Non vi è dubbio che la comprensione di risultati della ricerca genetica e farmacologico-molecolare porterà a definire meglio la classificazione del melanoma, che dovrà integrare dati clinici, patologici e bio-molecolari, al fine ultimo di raggiungere una più precisa caratterizzazione dei tipi biologicamente distinti, che soprattutto possano indirizzare ad una terapia efficacemente personalizzata dei pazienti.

8 FIGURE

A



B

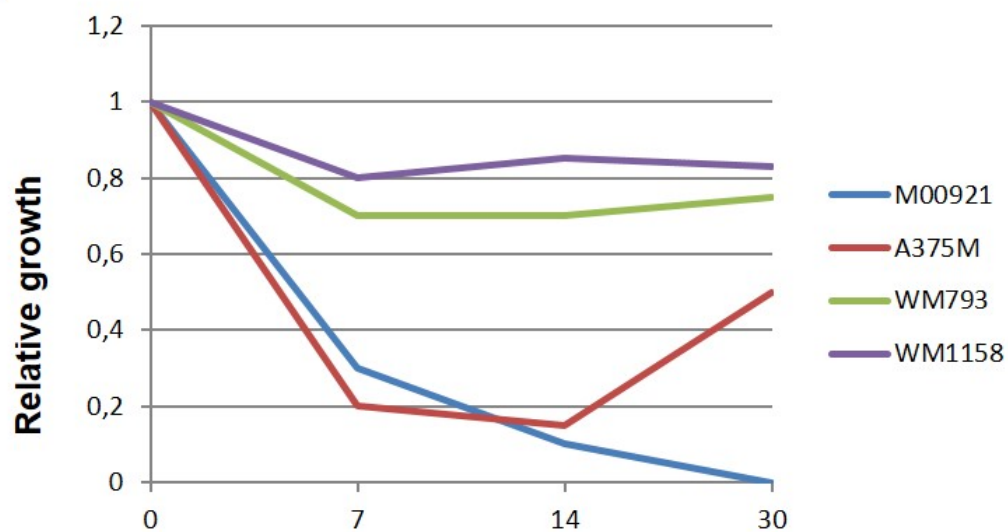


Fig 2. Sensibilità delle diverse linee umane di melanoma al trattamento con PLX4032. La crescita cellulare è stata valutata dopo 72 ore (A) e dopo 30 giorni di trattamento (B).

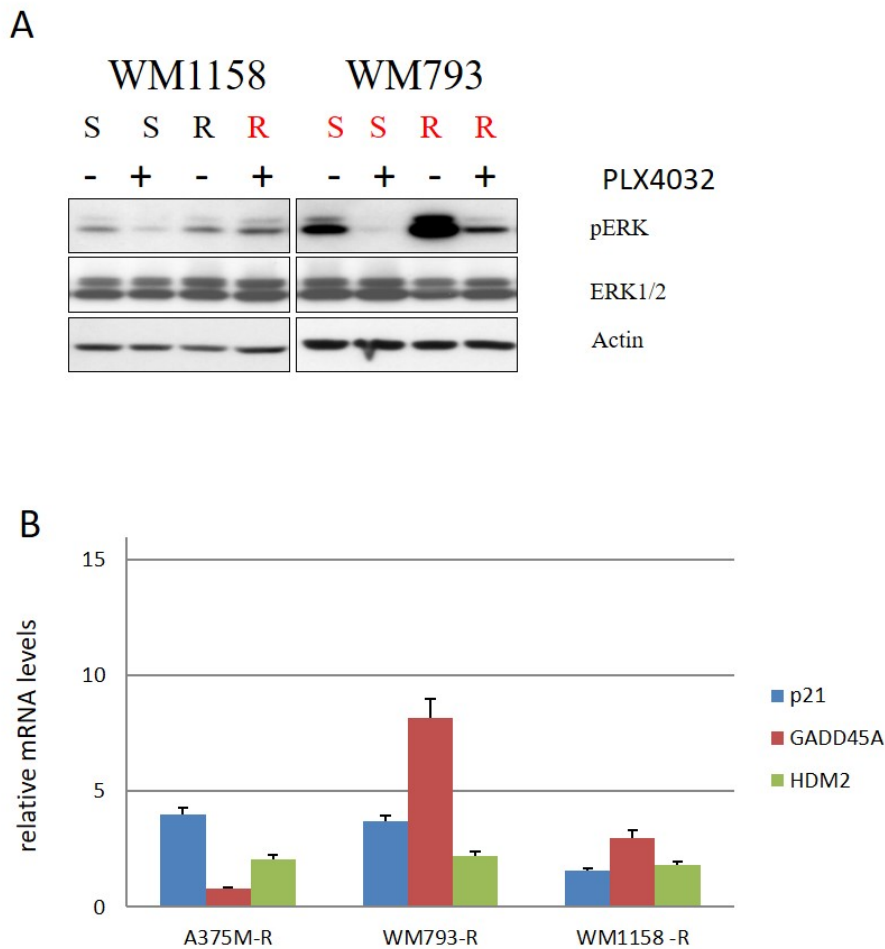
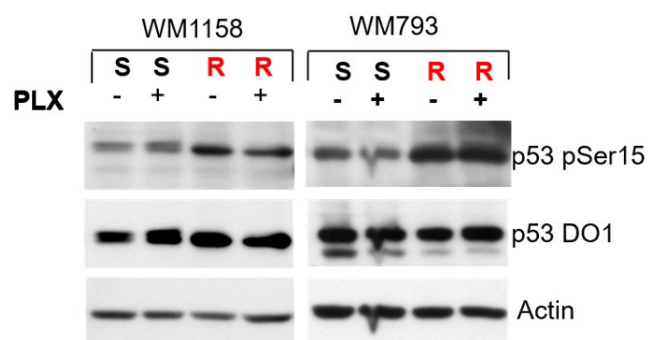


Fig 3. Fosforilazione di ERK nelle cellule di melanoma trattate e non trattate con PLX 4032 per 24 ore analizzata tramite blotting. L'actina è stata usata come controllo (A). Espressione relativa di mRNA di geni target di p53 CDKN1A (p21), GADD45A and HDM2 analizzata tramite Real time PCR nelle linee di melanoma indicate. I risultati sono indicate come espressione relativa di ogni linea resistente rispetto alla controparte sensibile settata come 1. Le barre di errore rappresentano la media $\pm$ s.d. I risultati sono rappresentativi di tre indipendenti esperimenti effettuati in triplicato (B).

A



B

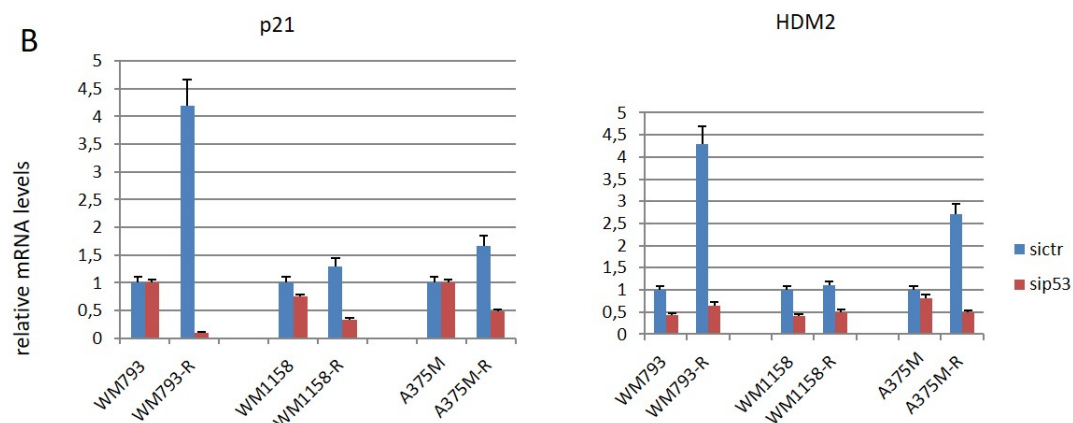


Fig 4. Espressione di p53 e fosforilazione di p53 Serine15 nelle cellule di melanoma trattate e non trattate con PLX 4032 per 24 ore analizzata tramite blotting, l'actina è stata utilizzata come controllo (A). Espressione relativa di mRNA di geni target di p53 CDKN1A (p21), e HDM2 analizzata tramite Real time PCR nelle linee di melanoma indicate trasfettate con siRNA specifici per p53 (sip53) o siRNA di controllo (sict). I risultati sono indicate come espressione relativa di ogni linea resistente rispetto alla controparte sensibile settata come 1. Le barre di errore rappresentano la media $\pm$ s.d. I risultati sono rappresentativi di tre indipendenti esperimenti effettuati in triplicato (B).

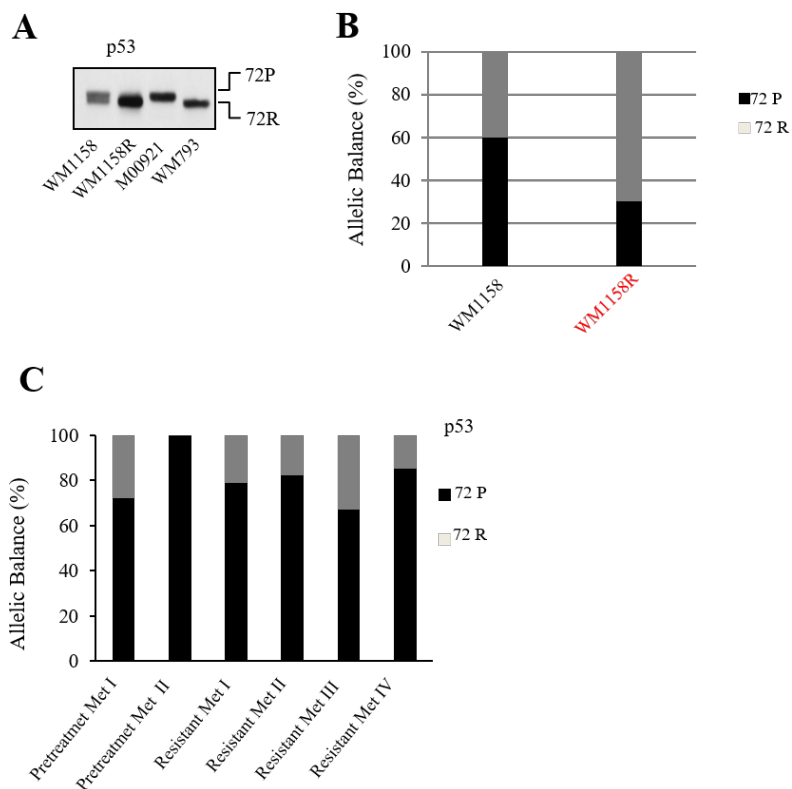


Fig 5. Selezione del polimorfismo p53 72R nelle cellule resistenti PLX4032. La migrazione della proteina p53 analizzata attraverso immunoblotting nelle WM1158, WM1158R, M00921 e WM793 (A). Analisi delle sequenze del cDNA di p53 nelle cellule di melanoma (B). Analisi del sequenziamento esonico del DNA estratto da metastasi pre-trattamento e da 4 metastasi insorte dopo trattamento con vemurafenib (C).

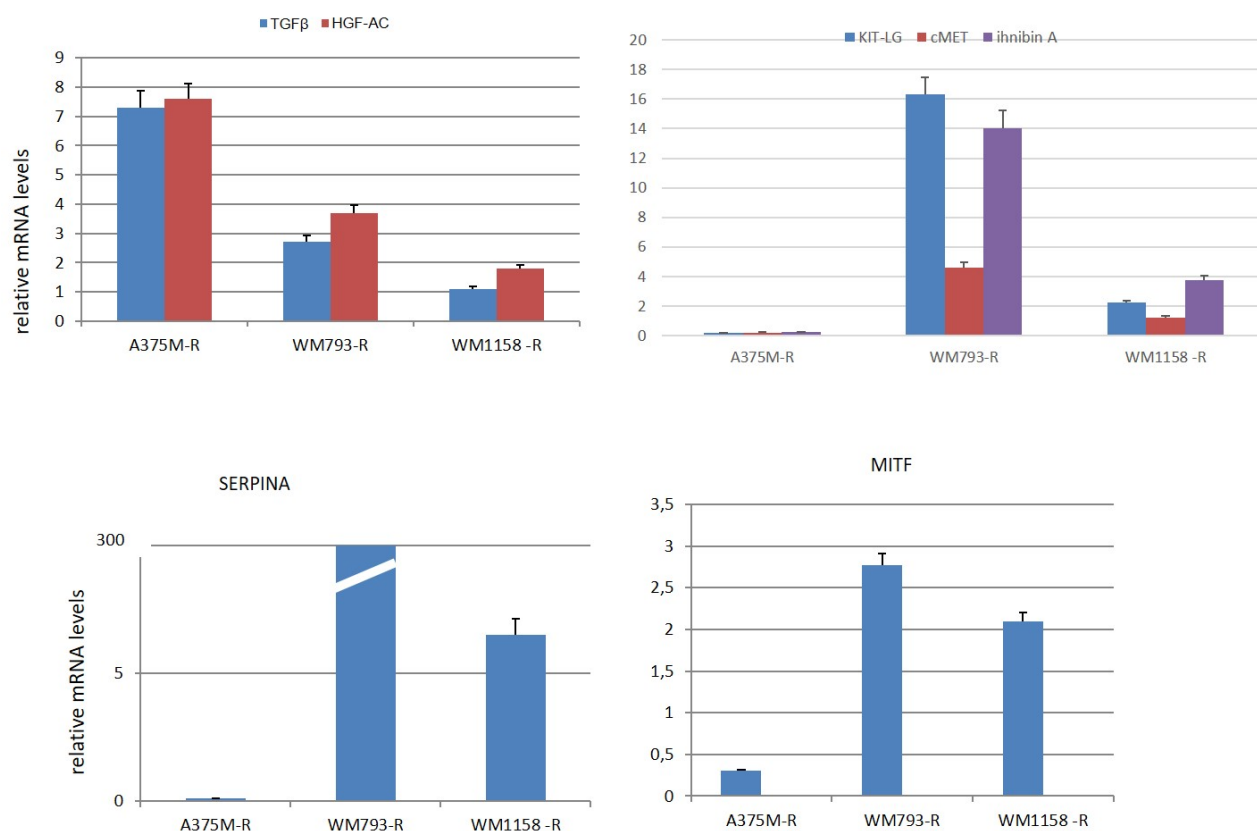


Fig 6. Espressione relativa di mRNA di geni TGFβ, HGFAC, KIT-LG, Cmet, INIBINA, SERPINA, MITF analizzati tramite Real time PCR nelle linee di melanoma indicate. I risultati sono indicate come espressione relativa di ogni linea resistente rispetto alla controparte sensibile settata come 1. Le barre di errore rappresentano la media $\pm$ s.d. I risultati sono rappresentativi di tre indipendenti esperimenti effettuati in triplicato (B).

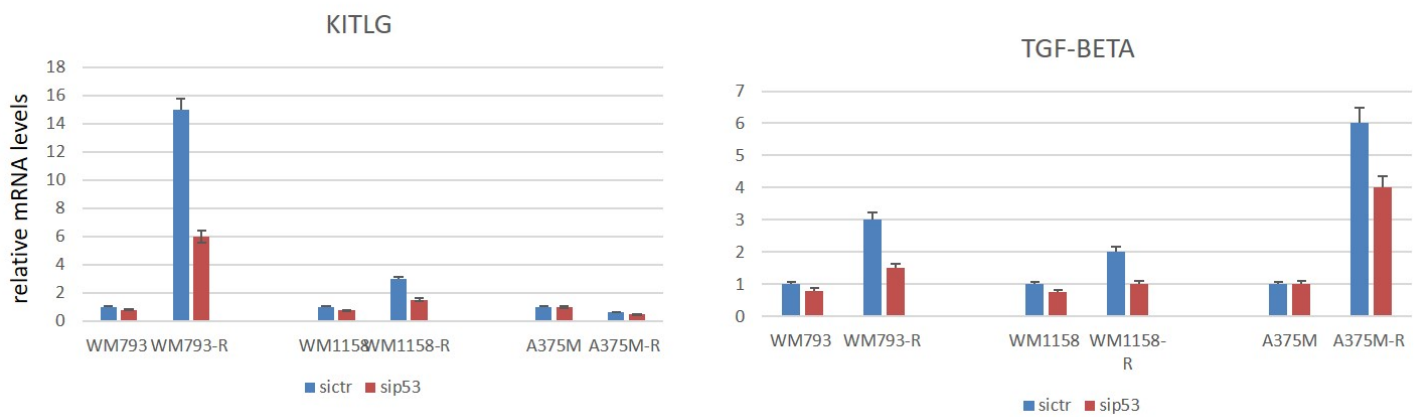


Fig 7. Espressione relativa di mRNA di geni KITLG E TGF β analizzata tramite Real time PCR nelle linee di melanoma indicate trasfettate con siRNA specifici per p53 (sip53) o siRNA di controllo (sictr). I risultati sono indicate come espressione relativa di ogni linea resistente rispetto alla controparte sensibile settata come 1. Le barre di errore rappresentano la media $\pm$ s.d. I risultati sono rappresentativi di tre indipendenti esperimenti effettuati in triplicato (B).

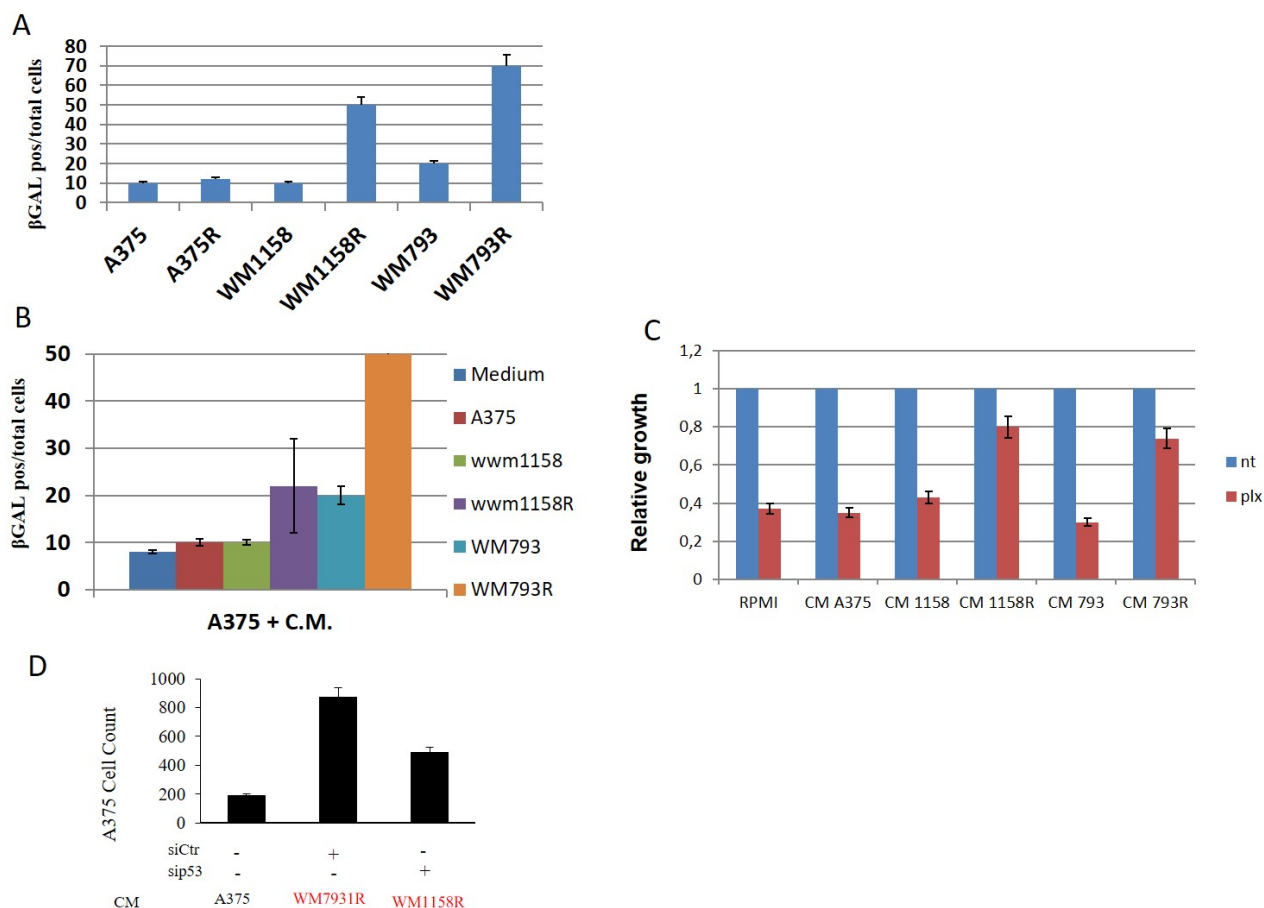


Fig 8. Colorazione con la beta-galattosidasi delle indicate melanoma mantenute in coltura in condizioni standard per 5 giorni. I risultati sono espressi come numero di cellule positive su numero totale di cellule per campo. Le barre di errore rappresentano la media $\pm$ s.d. (A). Colorazione con la beta-galattosidasi delle A375M mantenute in coltura in condizioni standard o con mezzi condizionati delle A375M, WM1158, WM1158R, WM793 e WM793R per 5 giorni. I risultati sono espressi come numero di cellule positive su numero totale di cellule per campo, Le barre di errore rappresentano la media $\pm$ s.d. (B). Proliferazione cellulare delle A375M mantenute in coltura in condizioni standard o con mezzi condizionati delle A375M, WM1158, WM1158R, WM793 e WM793R trattate o no con PLX4032, per 5 giorni. I risultati sono espressi come percentuale di crescita rispetto alle cellule non trattate. Le barre di errore rappresentano la media $\pm$ s.d (C). Proliferazione cellulare delle A375M mantenute in coltura con mezzi condizionati delle A375M, WM1158R e WM793R trasfettate con siRNA specifici per p53 (sip53) o siRNA di controllo (sicrt). I risultati sono espressi come numero di cellule. Le barre di errore rappresentano la media $\pm$ s.d (D).

BIBLIOGRAFIA

1. Atlante Di Dermatologia, Guido Massi, Masson 1996.
2. Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer Statistics, Bol Asoc Med 1991.
3. Healsmith MF, Bourke JE et al, An evaluation of the revised seven-point checklist for the early diagnosis of cutaneous malignant melanoma. Br J Dermatol 1994
4. Bafounta ML, Beauchel A, Aegerter P, et al. Is dermoscopy (epiluminescence microscopy) useful for the diagnosis of the melanoma? Results of a meta-analysis using techniques adapted to the evaluation of the diagnostic test. Arch Dermatol 2001.
5. Clark WH Jr, Elder R, Van Horn M The biologic form of malignant melanoma. Hum Pathol 1986
6. Mihm MC Jr, Clark WH Jr, From L. The clinical diagnosis, classification and histogenetic concept of the early stages of cutaneous malignant melanoma. N.Engl J Med 1971
7. McGovern VJ, Cochran AJ, Van Esch EP, Little JH, MacLennan R. The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration. A revision of the 1972 Sydney classification. Pathology 1986
8. McGovern VJ. Malignant melanoma. Clinical and histological diagnosis. New York, 1976, John Wiley & Sons.
9. Clark WH Jr. Melanoma in situ. Hum Pathol. 1990
10. Everett MA. Early melanoma: histologic terms. J cutan Pathol. 1991
11. Flotte TJ Malignant melanoma in situ. Hum Pathol 1990
12. Flotte TJ, Mihm MC Jr. Lentigo maligna and malignant melanoma in situ, lentigo maligna type. Hum Pathol. 1999
13. Prieto VG, McNutt NS, Prioleau PG, Shea CR. Scaly erythematous lesion in a patient with extensive solar damage. Malignant melanoma in situ, amelanotic type. Arch Dermatol. 1996
14. McGovern VJ. The nature of melanoma. A critical review. J Cutan Pathol 1982
15. Cohen LM Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. J Am Acad Dermatol. 1995
16. Guido Massi. Philip E. Leboite. Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma, 2004
17. Weinstock MA, Sober AJ. The risk of progression of lentigo maligna to lentigo maligna melanoma. Br J Dermatol. 1987
18. Gershenwald JE, Soong SJ, Balch CM 2010 TNM staging System for Cutaneous Melanoma... and Beyond. Ann Surg Oncol, 2010

19. Fitzpatrick TB, Rhodes AR, Sober AJ, et al. Primary malignant melanoma of the skin: the call for action to identify persons at risk; to discover precursor lesion; to detect melanoma. *Pigment Cell* 1988.
20. Duff CG, Melson D, Rigdby HS, et al. A 6 years prospective analysis of the diagnosis of malignant melanoma in pigmented-lesion clinic even the experts miss malignant melanoma, but not often. *Br J Plas Surg* 2001
21. Phillip H. McKee and J. Eduardo Calonje *Diagnostic Atlas of Melanocytic Pathology*. Expert Consult. Mosby 2009.
22. Batistatou A, Gököz O, Cook MG, et al. Dermatopathology Working Group of the European Society of Pathology. Melanoma histopathology report: proposal for a standardized terminology. *Virchows Arch* 2011.
23. LeBoit P.E., Burg G., Weedon D., et al. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology & Genetics of Skin tumours*. IARC Press, Lyon, 2006.
24. Cook MG, Di Palma S. Pathology of sentinel lymph nodes for melanoma. 1. *J Clin Pathol*. 2008
25. Cook MG, Green MA, Anderson B, et al. The development of optimal pathological assessment of sentinel lymph nodes for melanoma. *J Pathol* 2003.
26. Van Akkooi AC, Spatz A, Eggermont AM et al. Expert opinion in melanoma: the sentinel node; EORTC Melanoma Group recommendations on practical methodology of the measurement of the microanatomic location of metastases and metastatic tumor burden. *Eur J Cancer*. 2009
27. Starz H, Siedlecki K, Balda BR. Sentinel lymphonodectomy and s-classification: a successful strategy for better prediction and improvement of outcome of melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2004
28. Edge SE, Byrd DR, Compton CC et al. (eds). *Melanoma of the Skin. AJCC Cancer Staging Manual*, 7th edn. New York, NY, Springer, 2009
29. Scolyer RA, Murali R, Satzger I, Thompson JF. The detection and significance of melanoma micrometastases in sentinel nodes. *Surg Oncol* 2008
30. Soong SJ, Ding S, Coit D, et al. Predicting survival outcome of localized melanoma: an electronic prediction tool based on the AJCC melanoma database. *Ann Surg Oncol* 2010
31. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005
32. Clark WH Jr, Elder DE, DuPont G IV, et al. Model predicting survival in stage I Melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989
33. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T et al..Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005
34. Bauer J, Buttner P, Murali R, et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011

35. Arkenau HT, Kefford R, Long GV. Targeting BRAF for patients with melanoma. *Br J Cancer* 2011
36. Flaherty KT, Hodi FS, Bastian BC. Mutation-driven drug development in melanoma. *Curr Opin Oncol* 2010
37. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010
38. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2011
39. Broekaert SM, Roy R, Okamoto I, et al. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010
40. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, et al. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 2006
41. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med* 2008
42. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling. *Lancet* 2009
43. Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N Engl J Med* 2006
44. Gajewski TF, Fuertes M, Spaapen R, et al. Molecular profiling to identify relevant immune resistance mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 2011.
45. Line guida per il melanoma AIOM 2015
46. Wheatley K, Ives N, Eggermont A et al. Interferon- α as adjuvant therapy for melanoma: an individual patient data meta-analysis of randomised trials. *J Clin Oncol*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I 2007
47. Bellett RE, Mastrangelo MJ, Laucius JF, et al. Randomized prospective trial of DTIC (NSC-45388) alone versus BCNU (NSC-409962) plus vincristine (NSC-67574) in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer Treat Rep* 1976;
48. Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, et al. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1999.
49. Jacquillat C, Khayat D, Banzet P, Weil M, Fumoleau P, Avril MF et al. Final report of the French multicenter phase II study of the nitrosourea fotemustine in 153 evaluable patients with disseminated malignant melanoma including patients with cerebral metastases. *Cancer* 1990
50. Eggermont AM, Charion-Sileni V, Grobb JJ et al. Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015
51. Chapman PB, Hauschild A, Robert C et al. BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*.

52. Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M, et al. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther.* 2008
53. Montagut C, Sharma SV, Shioda Tet al. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res.* 2008.
54. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature.* 2010
55. Nazarian R, Shi H, Wang Q, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature.* 2010
56. Wagle N, Emery C, Berger MF et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol.* 2011
57. Solit D, Sawyers CL. Drug discovery: How melanomas bypass new therapy. *Nature.* 2010
58. Corcoran RB BRAF gene amplification can promote acquired resistance to MEK inhibitors in cancer cells harboring the BRAF V600E mutation. *Sci Signal.* 2010.
59. Shi H, Moriceau G, Kong X et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun.* 2012
60. Stefanaki I, Stratigos AJ, Dimisianos G, et al. p53 codon 72 Pro homozygosity increases the risk of cutaneous melanoma in individuals with dark skin complexion and among noncarriers of melanocortin 1 receptor red hair variants *Br J Dermatol.* 2007
61. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumorsuppressor gene. *N Engl J Med* 1993.
62. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 2000
63. Soto JL, Cabrera CM, Serrano S, et al. Mutation analysis of genes that control the G1/S cell cycle in melanoma: TP53, CDKN1A, CDKN2A, and CDKN2B. *BMC Cancer* 2005
64. Avery-Kiejda KA, Bowden NA, Croft AJ, et al. P53 in human melanoma fails to regulate target genes associated with apoptosis and the cell cycle and may contribute to proliferation. *BMC Cancer* 2011
65. HoubenR, Hesbacher S, Schmid CP et al., High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays. *PLoS One* 2011
66. Thomas M, Kalita A, Labrecque S et al. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 1999
67. Marin MC, Jost CA, Brooks LA et al. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet* 2000;
68. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC III et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003.

69. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, et al. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997.
70. Marine JC, Francoz S, Maetens M, et al., Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ* 2006.
71. Meek DW, Anderson CW, Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009.
72. Metcalfe AM, Dixon RM, Radda GK, Wild-type but not mutant p53 activates the hepatocyte growth factor/scatter factor promoter. *Nucleic Acids Res* 1997.
73. Wei CL Wu Q, Vega VB, et al., A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* 2006.
74. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 2008.
75. Bao W, Chen M, Zhao X, et al. PRIMA-1Met/APR-246 induces wild-type p53-dependent suppression of malignant melanoma tumor growth in 3D culture and in vivo. *Cell Cycle* 2011.
76. Smalley KS, Contractor R, Haass NK, et al. An organometallic protein kinase inhibitor pharmacologically activates p53 and induces apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Res* 2007.
77. Gembarska A, Luciani F, Fedele C, et al., MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat Med.* 2012