



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

«ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ»

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Ιατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»
Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ)

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΥΜΙΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ:

ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ:

ΣΥΡΡΟΥ ΜΑΡΙΚΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

ΜΠΑΤΙΣΤΑΤΟΥ ΑΝΝΑ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

«ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ»

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Ιατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»
Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ)

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΥΜΙΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ:

ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ:

ΣΥΡΡΟΥ ΜΑΡΙΚΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

ΜΠΑΤΙΣΤΑΤΟΥ ΑΝΝΑ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2018

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

ΠΡΥΜΙΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Βασικών Βιοιατρικών Επιστημών

12/09/2018

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

**ΜΠΑΤΙΣΤΑΤΟΥ ΑΝΝΑ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

**ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΣΥΡΡΟΥ ΜΑΡΙΚΑ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

«ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ» ΠΡΥΜΙΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Περίληψη

Το μελάνωμα, ή αλλιώς κακόηθες μελάνωμα, είναι ένα κακόηθες νεόπλασμα που προέρχεται από τα μελανοκύτταρα του δέρματος. Αντιστοιχεί σε μικρό ποσοστό των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου του δέρματος, αλλά έχει με διαφορά το μεγαλύτερο ποσοστό θανάτων και η συχνότητα εμφάνισής του αυξάνεται συνεχώς. Η ανησυχητική αύξηση της επίπτωσης του μελανώματος έχει εντείνει τις ερευνητικές προσπάθειες με στόχο την αποσαφήνιση των γενετικών, περιβαλλοντικών, συμπεριφορικών και φαινοτυπικών παραγόντων που συμβάλλουν στην παθογένεση αυτής της ασθένειας. Η εισαγωγή νέων γενετικών τεχνικών οδήγησε σε πολύ καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεση του μελανώματος.

Το μελάνωμα είναι ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα της πολυπαραγοντικής εξέλιξης του καρκίνου, που εξαρτάται από μεταλλάξεις στο μονοπάτι ΜΑΡΚ, με πολλαπλές πρόσθετες γενετικές αλλοιώσεις σε άλλες οδούς που οδηγούν σε ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη και αποφυγή απόπτωσης. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε και η συμμετοχή επιγενετικών παραγόντων στην παθογένεση του μελανώματος, χωρίς όμως την πλήρη αποσαφήνιση των μηχανισμών.

Η γενετική πρόοδος έχει καταστήσει δυνατή την αναγνώριση πολλών σχετικών παθογενετικών συμβάντων και έχει ήδη οδηγήσει στην επιτυχή εισαγωγή στοχευμένων θεραπειών που αντιπροσωπεύουν τους πρώτους αποτελεσματικούς θεραπευτικούς παράγοντες σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα.

Η παρούσα εργασία αποτελεί μια ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που οδηγούν στη δημιουργία και στην ανάπτυξη του δερματικού μελανώματος. Αναφέρονται ο ρόλος της υπεριώδους ακτινοβολίας, οι γενετικοί παράγοντες που επηρεάζουν, καθώς και ο ρόλος των επιγενετικών μηχανισμών που δρουν στο μελάνωμα. Επίσης αναλύονται τα στάδια της εξέλιξης του όγκου και τα βασικά μονοπάτια που απορυθμίζονται κατά αυτήν. Τέλος παρουσιάζονται οι μέθοδοι πρόληψης, οι κλινικοί βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται και οι θεραπείες που υπάρχουν ή αναπτύσσονται βάσει των ανωτέρω μοριακών μηχανισμών.

"MOLECULAR PATHOGENESIS OF DERMAL MELANOMA" PRYMIDIS DIMITRIOS

Summary

Melanoma, or malignant melanoma, is a malignant neoplasm originating from melanocytes of the skin. It accounts for only a small percentage of all cases of skin cancer, but it has the largest proportion of deaths and its incidence is constantly increasing. The alarming increase in the incidence of melanoma has intensified the research efforts aimed at clarifying the genetic, environmental, behavioral and phenotypic factors contributing to the pathogenesis of this disease. The introduction of new genetic techniques has led to a much better understanding of the mechanisms involved in the pathogenesis of melanoma.

Melanoma is a notable example of the multifactorial development of cancer, which is dependent on mutations in the MAPK pathway, with multiple additional genetic alterations in other pathways leading to uncontrolled cell growth and avoidance apoptosis. Recently, the involvement of epigenetic agents in the pathogenesis of melanoma has been discovered, but with no complete clarification of the mechanisms.

Genetic progress has made it possible to identify many relevant pathogenic events and has already led to the successful introduction of targeted therapies that represent the first effective therapeutic agents in patients with metastatic melanoma.

This paper is a review of the international literature on the molecular mechanisms that lead to the creation and development of skin melanoma. The role of ultraviolet radiation, the genetic factors that affect it, and the role of epigenetic mechanisms that are involved in melanoma are mentioned. It also analyzes the stages of tumor progression and the basic pathways that are deregulated therein. Finally, there are presented the prevention methods, the clinical biomarkers used and the therapies that exist or are developed based on the above molecular mechanisms.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....σελ. 9	σελ. 9
a. Το μελανοκύτταρο.....σελ. 9	σελ. 9
b. Τύποι δερματικού μελανώματος.....σελ. 10	σελ. 10
c. Μοριακή ταξινόμηση μελανώματος.....σελ. 12	σελ. 12
2. Παθοφυσιολογία.....σελ. 13	σελ. 13
a. Μοντέλα-Στάδια ανάπτυξης μελανώματος.....σελ. 14	σελ. 14
i. Ανατομικό στάδιο διήθησης κατά Clark.....σελ. 14	σελ. 14
ii. Βάθος διήθησης κατά Breslow.....σελ. 15	σελ. 15
iii. Το σύστημα ταξινόμησης TNM.....σελ. 15	σελ. 15
3. Αίτια πρόκλησης μελανώματος.....σελ. 17	σελ. 17
a. Ο ρόλος της υπεριώδους ακτινοβολίας (UVR).....σελ. 17	σελ. 17
i. Το αποτύπωμα της UV ακτινοβολίας στο δέρμα.....σελ. 18	σελ. 18
ii. Μηχανισμός πρόκλησης αλλοιώσεων του DNA από τη UV ακτινοβολία.....σελ. 18	σελ. 18
iii. Η επίδραση της UV ακτινοβολίας στο μελάνωμα.....σελ. 21	σελ. 21
iv. Ο ρόλος της φλεγμονής που προκαλείται από τη UV ακτινοβολία.....σελ. 23	σελ. 23
b. Γενετικοί παράγοντες μελανώματος.....σελ. 24	σελ. 24
i. Το μονοπάτι των MAP κινασών.....σελ. 26	σελ. 26
1. RAS.....σελ. 26	σελ. 26
2. BRAF.....σελ. 28	σελ. 28
3. MEK 1 και 2σελ. 29	σελ. 29
4. KIT.....σελ. 29	σελ. 29
ii. Το μονοπάτι PI3K/AKT.....σελ. 30	σελ. 30
1. PTEN.....σελ. 32	σελ. 32
2. Σύνδρομο Cowden.....σελ. 33	σελ. 33
3. AKT.....σελ. 33	σελ. 33
iii. Ο γονιδιακός τόπος του CDKN2A /p16INK4A/p14ARF στα μονοπάτια Rb και p53.....σελ. 34	σελ. 34
iv. Άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην εμφάνιση ή εξέλιξη του μελανώματος.....σελ. 36	σελ. 36
1. GNAQ / GNA11.....σελ. 36	σελ. 36
2. NF1.....σελ. 37	σελ. 37
3. BAP1.....σελ. 38	σελ. 38
4. CDK4 και CDK6.....σελ. 38	σελ. 38
v. Γονίδια με μικρή διεισδυτικότητασελ. 39	σελ. 39
1. MC1R.....σελ. 39	σελ. 39
2. MITF.....σελ. 39	σελ. 39
3. POLE.....σελ. 40	σελ. 40
vi. Γονίδια συντήρησης των τελομερών.....σελ. 40	σελ. 40
1. TERT.....σελ. 40	σελ. 40
2. POT1.....σελ. 41	σελ. 41
3. ACD και TERF2IPσελ. 41	σελ. 41
vii. Γονίδια που σχετίζονται με την επισκευή του DNA.....σελ. 41	σελ. 41
1. XP.....σελ. 41	σελ. 41
2. BRCA2.....σελ. 42	σελ. 42

3. MGMT.....σελ.	42
4. Li-Fraumeni (TP53).....σελ.	42
c. Ο ρόλος της επιγενετικής στην ανάπτυξη του μελανώματοςσελ.	44
i. Οι αρχές τις επιγενετικής.....σελ.	45
ii. Μεθυλίωση του DNA.....σελ.	46
1. RAR-b2.....σελ.	49
2. RASSF1A.....σελ.	49
3. CDKN2A / INK4A / ARF.....σελ.	49
4. MGMT.....σελ.	50
iii. Υπομεθυλίωση.....σελ.	50
1. TBC1D16.....σελ.	50
iv. Τροποποιήσεις ιστονών.....σελ.	51
v. Αναδιαμόρφωση χρωματίνης.....σελ.	52
vi. Ο ρόλος των MicroRNAs και άλλων μη κωδικών RNAs στο μελάνωμα.....σελ.	55
1. Το μη κωδικό RNA που ενεργοποιείται από το BRAF (BANCR).....σελ	58
2. Το αντιπληροφοριακό RNA μεταγράψωμα HOX (HOTAIR).....σελ.	58
3. SPRY4-IT1.....σελ.	59
4. l1me23.....σελ.	59
5. Το αντιπληροφοριακό μη κωδικοποιητικό RNA στη θέση INK4 (ANRIL).....σελ.	60
6. Το RNA συσχετιζόμενο με ουροθηλιακό καρκίνωμα 1 (UCA1).....σελ.	61
7. Το μετάγραφο 1 του πνευμονικού αδενοκαρκινώματος που σχετίζεται με την μετάσταση (MALAT1).....σελ.	61
4. Χαρακτηριστικά της εξέλιξης του όγκου.....σελ.	61
a. Γενετική βάση της νεοπλασματικής εξέλιξης στο μελάνωμα.....σελ.	62
b. Κοινοί μελανοκυτταρικοί σπίλοι.....σελ.	63
c. Δυσπλαστικοί σπίλοι.....σελ.	65
d. Μελάνωμα οριζόντιας φάσης ανάπτυξηςσελ.	67
e. Μελάνωμα σε κάθετη φάση ανάπτυξηςσελ.	69
f. Μεταστατικό μελάνωμα.....σελ.	70
5. Πρόληψη- Διάγνωση.....σελ.	71
a. Μέθοδος ABCDE.....σελ.	71
b. Μέθοδος "ασχημόπαπον".....σελ.	72
6. Βιοψία.....σελ.	73
a. Συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση.....σελ.	73
b. Φθορίζον in situ υβριδισμός (FISH).....σελ.	74
7. Κλινικοί βιοδείκτες στο μελάνωμα: «Τρέχουσα κατάσταση».....σελ.	76
8. Θεραπεία.....σελ.	78
a. Χειρουργική επέμβαση.....σελ.	78
b. Επικουρική θεραπεία.....σελ.	79
c. Χημειοθεραπεία και ανοσοθεραπεία.....σελ.	79
d. Στοχεύουσες θεραπείεςσελ.	80
i. Αναστολείς BRAF.....σελ.	80
ii. Αναστολείς MEK.....σελ.	83
iii. Αναστολείς KIT.....σελ.	83
9. Μελλοντικές προοπτικές.....σελ.	84
10. References.....σελ.	86

1. Εισαγωγή

Το μελάνωμα, ή αλλιώς κακοήθες μελάνωμα, είναι ένα κακοήθες νεόπλασμα που προέρχεται από τα μελανοκύτταρα του δέρματος (*National Cancer Institute, 2015*). Είναι ένας από τους δύο κύριους τύπους καρκίνου του δέρματος μαζί με τα μη μελανοκυτταρικά νεοπλάσματα. Αν και το μελάνωμα αντιστοιχεί σε μικρό ποσοστό των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου του δέρματος (περίπου 4%), έχει με διαφορά το μεγαλύτερο ποσοστό θανάτων (περίπου 50%) (*The American Cancer Society, 2016, Skin Cancer Foundation, 2015, Guy GP, et al, 2002-2006 & 2007-2011*). Ο φυσιολογικός ρόλος των μελανοκυττάρων είναι να παράγουν με την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας την μελανίνη που είναι ουσία η οποία δίνει το χρώμα στο δέρμα μας. Ένας μεγάλος αριθμός μελανωμάτων αναπτύσσεται επί εδάφους απλού μελαγχρωματικού σπίλου. Μελάνωμα όμως, μπορεί να παρουσιαστεί και *de novo*, σε σημείο όπου δεν υπήρχε προηγουμένως κανένας σπίλος αλλά φυσιολογικό μέχρι πρότινος δέρμα.

Το μελάνωμα είναι μια πάρα πολύ σοβαρή νόσος γιατί δίνει εύκολα μεταστάσεις σε άλλα όργανα του σώματος, μέσω του λεμφικού συστήματος. Αυτό το σύστημα αποτελείται από λεμφαγγεία που σχηματίζουν δίκτυο όπως τα αιμοφόρα αγγεία, σε όλους τους ιστούς του σώματος. Τα καρκινικά κύτταρα, αποσπώνται από τον πρωτοπαθή όγκο και δια μέσου της λεμφικής οδού, φτάνουν στους λεμφαδένες. Το μελάνωμα μπορεί επίσης να δώσει αιματογενείς μεταστάσεις.

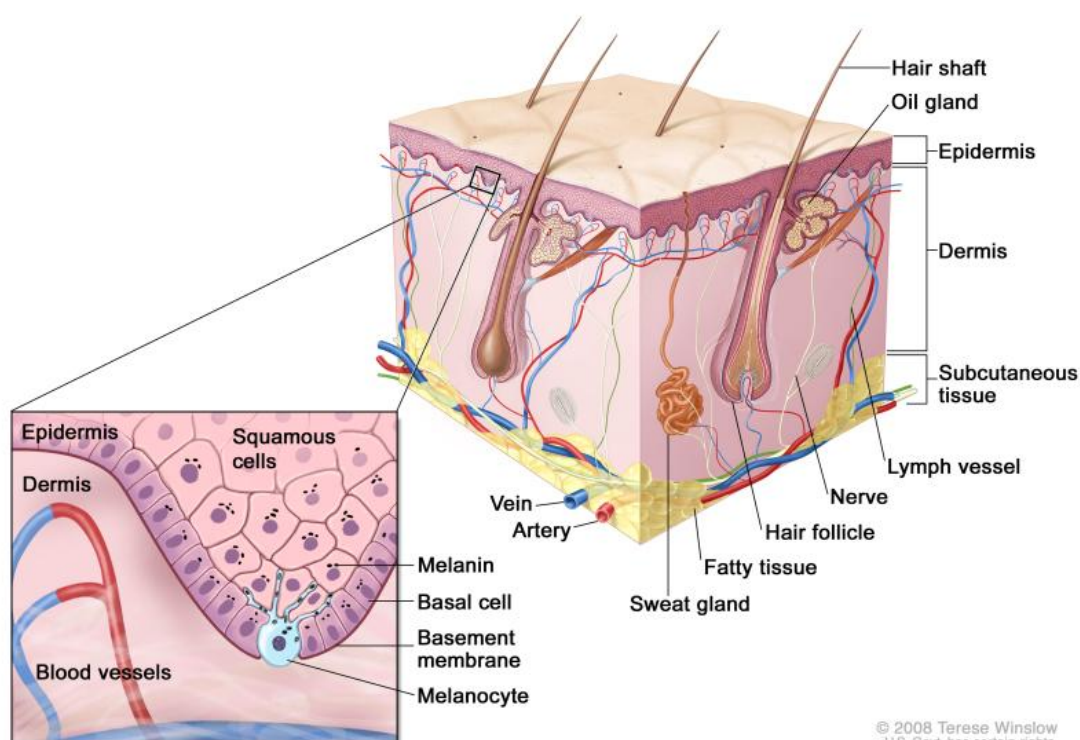
Το μελάνωμα, αντίθετα με τις άλλες μορφές καρκίνου του δέρματος που προσβάλλουν συνήθως άτομα μεγάλης ηλικίας, εμφανίζεται επίσης συχνά και στο δέρμα νέων ανθρώπων, καθώς και σε βλεννογόνους. Αποτελεί το πέμπτο και έβδομο πιο σύννηθες νεόπλασμα στους άνδρες και στις γυναίκες αντίστοιχα, και η συχνότητά του όλο και αυξάνεται, με ρυθμό μεγαλύτερο από αυτόν όλων των λοιπών κακοηθών νεοπλασμάτων (*The American Cancer Society, 2016*). Υπολογίζεται ότι το 2015 παγκόσμια υπήρχαν 3,1 εκατομμύρια περιπτώσεις μελανώματος, που είχαν σαν αποτέλεσμα 59,800 θανάτους (*GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence, Collaborators, 2016, GBD 2015 Mortality and Causes of Death, Collaborators, 2016*).

1.a. Το μελανοκύτταρο

Τα μελανοκύτταρα είναι κύτταρα του δέρματος προερχόμενα από την νευρική πλάκα (ακρολοφία) (*Cramer, et al, 1991*) και βρίσκονται στην βασική στοιβάδα της επιδερμίδας (*stratum basale*) και σε μεσαίες στοιβάδες στον οφθαλμό (αγγειακός χιτώνας (*Braden H, et al, 1983*)). Βρίσκονται επίσης στο εσωτερικό των αυτιών (*Market CL, et al, 1956*), στις μήνιγγες (μεμβράνες που περικλείουν τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό) (*Mintz B, et al, 1971*), στα οστά (*Nichols SE, et al, 1969*), και στην καρδιά (*Theriaunt LL, et al, 1970*). Ο αριθμός τους είναι σχετικά σταθερός στους ανθρώπους, ανάμεσα στα 1000 με 2000 ανά τετραγωνικό χιλιοστό δέρματος και αποτελούν το 5 με 10% των κυττάρων της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας.

Τα μελανοκύτταρα παράγουν μια ουσία, την μελανίνη, που είναι η χρωστική που ευθύνεται για το χρώμα του δέρματος, των ματιών και των μαλλιών. Το μελανοκύτταρο παράγει την μελανίνη μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται μελανογένεση. Η μελανογένεση συμβαίνει συνεχώς σε κάποιο βαθμό και αυξάνεται με την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Η λειτουργία της μελανίνης είναι να προστατεύει τα κύτταρα της επιδερμίδας και του χορίου από βλάβες στο DNA τους που προκαλούνται από την έκθεση στην ακτινοβολία UV, μέσω απορρόφισής της.

Η μελανίνη αποτελεί προστατευτικό στοιχείο του δέρματος και ανάλογα με την ποσότητά της στο δέρμα, σχετίζεται με διαβαθμίσεις χρωμάτων που αντιστοιχούν από την λευκή μέχρι την μαύρη φυλή. Γενικά άτομα με πιο ανοιχτό δέρμα έχουν χαμηλότερα επίπεδα μελανογένεσης από άτομα με σκούρο δέρμα. Γι' αυτό και οι λευκοί αναπτύσσουν πιο συχνά μελάνωμα συγκριτικά με τα άτομα της μαύρης φυλής. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα σκουρόχρωμα άτομα αναπτύσσουν μελάνωμα στα λιγότερο χρωματισμένα σημεία του σώματός τους, που είναι οι παλάμες και τα πέλματα.



Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση του φυσιολογικού δέρματος. Η επιδερμίδα περιλαμβάνει μιτωτικά ενεργά και ανενεργά πλακώδη κύτταρα, τα κερατινοκύτταρα. Υπάρχουν επίσης και τα μελανοκύτταρα που χρησιμεύουν για την παραγωγή της μελανίνης. Η βασική μεμβράνη που βρίσκεται ακριβώς κάτω από την βασική στοιβάδα της επιδερμίδας (περιέχει τα μιτωτικά ενεργά κερατινοκύτταρα) διαχωρίζει της επιδερμίδα από το χόριο. (Πηγή: National Cancer Institute "Terese winslow, 2008")

1.b. Τύποι δερματικού μελανώματος

Υπάρχουν διάφοροι τύποι μελανώματος, ο καθένας με τα δικά του χαρακτηριστικά, αλλά τέσσερις είναι οι βασικοί τύποι με τους οποίους εμφανίζεται το μελάνωμα στο δέρμα: Το επιπολής επεκτεινόμενο μελάνωμα (Superficial spreading melanoma), το μελάνωμα αναπτυχθέν σε μελανωτική κηλίδα Hutchinson ή κακοήθης κηλίδα (Lentigo melanoma), το μελάνωμα των άκρων ή Παλαμοπελματιαίο- υπονύχιο- βλεννογόνο μελάνωμα (Acral lentiginous melanoma) και το οζώδες μελάνωμα (Nodular melanoma).

Το επιπολής επεκτεινόμενο μελάνωμα είναι ο πιο κοινός τύπος μελανώματος και αντιστοιχεί περίπου στο 65% των περιπτώσεων και είναι ο τύπος που εμφανίζεται κυρίως στους νέους. Αυτός ο τύπος μελανώματος αναπτύσσεται στην επιδερμίδα για μεγάλο διάστημα πριν διηθήσει το χόριο. Αρχικά εμφανίζεται σαν μια επίπεδη μελαγχρωματική περιοχή, ασύμμετρη και με ασαφή όρια. Μπορεί να έχει ποικίλες αποχρώσεις και αναπτύσσεται σχεδόν παντού στο σώμα. Κυρίως εμφανίζεται στον κορμό στους άνδρες, στα πόδια στις γυναίκες και στην άνω περιοχή της ράχης και στα δύο φύλα. Το "in situ" μελάνωμα αφορά σε ένα πολύ λεπτό επιπολής επεκτεινόμενο μελάνωμα που δεν εκτείνεται πιο βαθιά από την επιδερμίδα, την φυσιολογική τοποθεσία των μελανοκυττάρων.



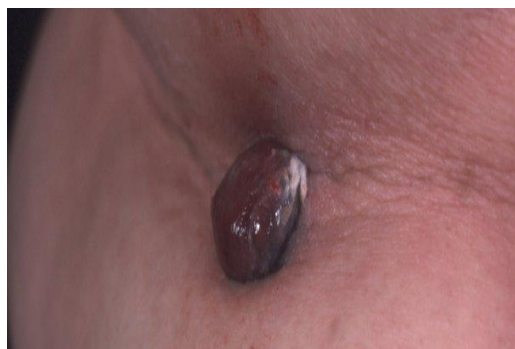
Το μελάνωμα αναπτυχθέν σε μελανωτική κηλίδα Hutchinson ή κακοήθης κηλίδα είναι παρόμοιο με το επιπολής επεκτεινόμενο μελάνωμα αλλά εμφανίζεται με μικρότερη συχνότητα, περίπου 5-10 %. Αναπτύσσεται στην επιδερμίδα για μεγάλο χρονικό διάστημα δημιουργώντας σταδιακά μια επίπεδη ή ελαφρά υπεργεμένη μελαγχρωματική περιοχή με ποικίλες αποχρώσεις. Συνήθως η μακροσκοπική του εικόνα μεταβάλλεται με την πάροδο των χρόνων. Αυτός ο τύπος μελανώματος εμφανίζεται στους ηλικιωμένους και οφείλεται σε βλάβες στα κύτταρα του δέρματος λόγω μεγάλης χρονικά έκθεσης στην UV ακτινοβολία. Εντοπίζεται στο πρόσωπο, τα αυτιά, τα χέρια και τον κορμό. Όταν αποκτήσει διηθητική ικανότητα, διηθεί το χόριο και βαθύτερα και τότε ονομάζεται Lentigo maligna melanoma.



Το μελάνωμα των άκρων ή παλαμοπελματιαίο-υπονύχιο μελάνωμα επίσης αναπτύσσεται στην επιφάνεια του δέρματος πριν διηθήσει το χόριο. Μακροσκοπικά διαφέρει από τους λοιπούς τύπους, καθώς εμφανίζεται ως μελαγχρωματικές σκούρες κηλίδες στα πέλματα, τις παλάμες και κάτω από τα νύχια. Αυτός ο τύπος μελανώματος εμφανίζεται και στους σκουρόχρωμους πληθυσμούς (συχνότητα 2-13% στη λευκή φυλή, το πιο συχνό στην ασιατική και μαύρη φυλή) και εξελίσσεται πιο γρήγορα από τους πρώτους δύο τύπους που προαναφέρθηκαν.



Το οζώδες μελάνωμα είναι συνήθως ήδη διηθητικό όταν διαγνωστεί καθώς είναι ο πιο επιθετικός τύπος μελανώματος. Αυτός ο τύπος μελανώματος αποτελεί περίπου το 10-15% των μελανωμάτων, και εμφανίζει γρήγορα διηθητική ανάπτυξη. Παρουσιάζεται ως οζώδης υπεργερμένη περιοχή, σκούρου καφέ-μαύρου χρώματος, ενώ συχνά αναγνωρίζεται και ποικιλία χρωμάτων, όπως γκρι, λευκό και κόκκινο. Βρίσκεται κυρίως στην πρόσθια και οπίσθια θωρακική επιφάνια, στην κεφαλή και τον τράχηλο.



Σπανιότερα, μελάνωμα μπορεί να αναπτυχθεί και σε άλλα μέρη του σώματος εκτός από το δέρμα, όπως τα μάτια (ocular melanoma) αλλά και βλεννογόνους, όπως ο πρωκτός (anorectal melanoma).

(Πηγή: *National Health Service, united Kingdom*)

1.c. Μοριακή ταξινόμηση του μελανώματος

Οι πρόσφατα ανακαλυφθείσες μοριακές μεταβολές που σχετίζονται με τη βιολογία του μελανώματος χρησιμοποιούνται σήμερα για τον καθορισμό διακριτών ομάδων μελανώματος (Cancer Genome Atlas, 2015, Hayward NK, et al, 2017). Η επιτυχία πρωτοποριακών μοριακών θεραπειών που στοχεύουν σε συχνά μεταλλαγμένα ογκογονίδια, όπως το BRAF, υπογραμμίζει την κλινική σημασία της ενσωμάτωσης σημαντικών μοριακών χαρακτηριστικών στη διάγνωση, και στον καθορισμό προγνωστικών και προβλεπτικών δεικτών του μελανώματος, ώστε να είναι δυνατή η εξατομικευμένη θεραπεία (Long GV, et al, 2014, Sosman JA, et al, 2012). Επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι τα διαφορετικά πρότυπα έκθεσης στον ήλιο, συμπεριλαμβανομένου του τρόπου και της διάρκειας της έκθεσης, συνδέονται με διαφορετικές μεταλλάξεις γονιδίων οδηγών στο μελάνωμα και, ενδεχομένως, με διαφορετικά ποσοστά επιβίωσης (Whiteman DC, et al, 2006, Whiteman DC, et al, 1998, Gordon D, et al, 2017). Η χρόνια έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το ποσό των μεταλλάξεων που συσσωρεύονται στα κύτταρα της επιδερμίδας (Matrincorena I, et al, 2015). Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι οι ασθενείς με μελανώματα που έχουν πολλές μεταλλάξεις είναι πιο πιθανό να ανταποκριθούν σε νέες ανοσοθεραπείες (Snyder A, et al, 2014, Riaz N, et al, 2015). Αυτή η αυξημένη θεραπευτική απόκριση στο δερματικό μελάνωμα με υψηλό φορτίο μεταλλάξεων που προκαλείται από UV ακτινοβολία σχετίζεται πιθανώς με τη μεγαλύτερη πιθανότητα που έχουν αυτές οι νέες μεταλλάξεις να κωδικοποιούν ισχυρούς αντιγονικούς επιτόπους.

Το μονοπάτι των Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο ογκογόνο μονοπάτι στο δερματικό μελάνωμα. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι υπάρχει αύξηση της ενεργότητας της οδού MAPK στο 98% των δειγμάτων μελανώματος που μελετήθηκαν (Hayward NK, et al, 2017).

Τα αποτελέσματα του The Cancer Genome Atlas (TCGA) και άλλων (Hayward NK, et al, 2017, Curtin JA, et al, 2005) συνηγορούν ότι το μελάνωμα μπορεί να διακριθεί σε τέσσερις ευρείς-ετερογενείς μοριακούς υποτύπους που βασίζονται στο πρότυπο των πλέον συχνά μεταλλαγμένων γονιδίων. (Cancer Genome Atlas, 2015, Hayward NK, et al, 2017).

1. BRAF
2. NRAS
3. NF1
4. Υποτύπου τριπλού άγριου τύπου (μη μεταλλαγμένα BRAF, NRAS, NF1)

Από αυτές τις υποομάδες, ο πληθυσμός με μετάλλαξη στο γονίδιο BRAF είναι ο πλέον διαδεδομένος και αντιστοιχεί σε περισσότερο από το 50% των δερματικών μελανωμάτων που αναλύθηκαν. Η κυρίαρχη μετάλλαξη BRAF είναι η υποκατάσταση V600E (Davies H, et al, 2002), η οποία έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη σηματοδότηση μέσω της οδού MAPK που οδηγεί σε πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των μελανοκυττάρων (Dhomen N, et al, 2007). Ενεργώντας στο ίδιο μονοπάτι σηματοδότησης, οι μεταλλάξεις στο NRAS εμφανίζονται κυρίως στη θέση 61 (NRAS^{Q61}) (Carr J, et al, 1994, Hocker T, et al, 2012). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι σε πρώιμα μελανώματα, οι μεταλλάξεις στα BRAF και NRAS είναι αμοιβαία αποκλειόμενες (Hordis E, et al, 2012, Maldonado JL, et al, 2003, Viros A, et al, 2008), γεγονός που υποδηλώνει είτε λειτουργικό πλεονασμό είτε προέλευση από ένα αρχικό κύτταρο ευαίσθητο σε συγκεκριμένα ογκογόνα γονίδια οδηγούς. Σε αντίθεση με τον αμοιβαίο αποκλεισμό των μεταλλάξεων BRAF και NRAS, πολλές από τις δευτερεύουσες μεταλλάξεις που συνεργάζονται για την εξέλιξη του όγκου, όπως η TP53, είναι κοινές σε όλες τις μοριακές κατηγορίες μελανώματος [Hayward NK, et al, 2017, Berger MF, et al, 2012]. Είναι σημαντικό ότι τα δευτερογενή συνεργατικά μόρια ή τα γονίδια οδηγοί του καρκίνου είναι εξαιρετικά ετερογενείς στις μοριακές κατηγορίες. Έτσι επισημαίνεται ότι λόγω της γονιδιωματικής πολυπλοκότητας είναι δύσκολη η χρήση αποκλειστικά των γενετικών αλλαγών για να κατηγοριοποιηθεί το μελάνωμα.

Η πιο συνηθισμένη μετάλλαξη που παρατηρείται στο μελάνωμα είναι μια μετάλλαξη του υποκινητή της αντίστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης (TERT) (Horn S, et al, 2013, Huang FW, et al, 2013). Αυτές οι μεταλλάξεις συνήθως φέρουν αποτύπωμα UV ακτινοβολίας και συνδέονται με δυσμενέστερη πρόγνωση (Nagore E, et al, 2016, Griewank KG, et al, 2014). Οι μεταλλάξεις του υποκινητή TERT κατανέμονται εξίσου μεταξύ των τεσσάρων μοριακών υποομάδων που συζητήθηκαν παραπάνω, υποδηλώνοντας ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα για όλα τα κύτταρα μελανώματος. Παραδόξως, αυτή η μετάλλαξη συσχετίζεται με βραχύτερα τελομερή σε εμφανώς κακοήθη κύτταρα σε σύγκριση με τα προ-κακοήθη μελανοκύτταρα. Πρόσφατη εργασία in vitro αναδεικνύει ότι οι μεταλλάξεις του υποκινητή TERT προάγουν την πρόωπη αθανатоποίηση των κυττάρων με την αποκατάσταση των βραχύτερων τελομερών και την αποφυγή της αναπαραγωγικής γήρανσης. Τα σύντομα τελομερή οδηγούν αρχικά σε αστάθεια γονιδιώματος, και μετέπειτα σε κύτταρα με μεταλλάξεις του υποκινητή της τελομεράσης TERT. Η επιπρόσθετη ρύθμιση του υποκινητή είναι ζωτικής σημασίας για να διατηρηθεί ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και να διατηρηθεί η λειτουργία των τελομερών Chiba K, et al, 2017).

2. Παθοφυσιολογία

Τα κακοήθη νεοπλάσματα εξελίσσονται μέσω διαφόρων σταδίων ανάπτυξης. Αρχικά κάποιο καρκινογόνο ερέθισμα όπως η ακτινοβολία UV συνήθως οδηγεί σε μεγάλο αριθμό αλλοιώσεων, οι περισσότερες από τις οποίες είναι καλοήθειες. Οι περισσότερες από αυτές τις βλάβες στα μελανοκύτταρα θα παραμείνουν ή θα επιδιορθωθούν, ενώ μερικές θα

οδηγήσουν σε κυτταρολογική και αρχιτεκτονική ατυπία. Στην φάση αυτή τα μελανοκύτταρα βρίσκονται σε μια μορφολογικά «ενδιάμεση» κατηγορία ανάμεσα σε εντελώς καλοήθη και πλήρως κακοήθη. Είναι σημαντικό να κατηγοριοποιηθούν οι ενδιάμεσες βλάβες, καθώς μπορεί να είναι δείκτες κινδύνου και δυνητικοί πρόδρομοι κακοήθειας.

Στο μελάνωμα όπως και σε άλλους όγκους, η εξέλιξη έχει σαφώς σχέση με τη σταδιακή απόκτηση γενετικών ανωμαλιών. Το πρώτο βήμα είναι η ενεργοποίηση ενός μόνο ογκογονιδίου «οδηγού», το οποίο είναι επαρκές για την πρόκληση ενός καλοήθους νεοπλάσματος. Στις ενδιάμεσες βλάβες συμβαίνουν επιπρόσθετες γενετικές αλλοιώσεις, όπως πρόσθετες μεταλλάξεις του γονιδίου του οδηγού ή ετεροζυγωτική απώλεια καταστολέων. Οι κακοήθεις βλάβες χαρακτηρίζονται από πλήρη απώλεια σχετικών καταστολέων και από επιπρόσθετες ανωμαλίες, οι οποίες μαζί προσδίδουν χαρακτηριστικά κακοήθειας, όπως διηθητική ικανότητα και μετάσταση. Οποιοδήποτε από τα βήματα της εξέλιξης μπορεί να «παραλειφθεί», ενδεχομένως λόγω της εξέλιξης με εναλλακτικές διαδρομές. Η φάση κάθετης ανάπτυξης είναι το κρίσιμο στάδιο της εξέλιξης του μελανώματος στο οποίο αποκτάται μεταστατική ικανότητα. Αυτός ο κίνδυνος μπορεί να χαρακτηριστεί στατιστικά με τη χρήση προγνωστικών χαρακτηριστικών τα οποία επί του παρόντος είναι κατά κύριο λόγο κλινικοπαθολογοανατομικά, αν και στο μέλλον το μοριακό προφίλ μπορεί να συμβάλει ή και να αντικαταστήσει αυτά τα χαρακτηριστικά. Σε μεταστατική νόσο, τα μελανώματα συνεχίζουν να εξελίσσονται, αποκτώντας αντίσταση στην θεραπεία, παρουσιάζοντας έτσι σημαντική πρόκληση στην αποτελεσματικότητα των σύγχρονων ελπιδοφόρων θεραπευτικών στρατηγικών (David E, et al, 2016).

2.a. Μοντέλα- Στάδια εξέλιξης μελανώματος

Στην επιδερμίδα, τα καλοήθη, ενδιάμεσα και πλήρως κακοήθη στάδια της εξέλιξης μιας μελανοκυτταρικής αλλοίωσης έχουν αναγνωριστεί από καιρό, ίσως επειδή είναι ορατά στο δέρμα και είναι εύκολη η λήψη βιοψίας. Χρησιμοποιούνται διάφορα συστήματα σταδιοποίησης των μελανωμάτων, με το βάθος της διήθησης να είναι ο καλύτερος δείκτης όσον αφορά στην πρόγνωση. Τα μοντέλα αυτά είναι το ανατομικό στάδιο διήθησης κατά Clark, το βάθος διήθησης κατά Breslow, και με βάση αυτά και λοιπά κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά η TNM ταξινόμηση (AJCC Cancer Staging 8th Edition).

2.a.i. Ανατομικό στάδιο διήθησης κατά Clark

Ο Clark περιγράφει πέντε στάδια εξέλιξης του μελανώματος σε σχέση με την ιστολογία του δέρματος

Επίπεδο I (in situ): Το μελάνωμα βρίσκεται στη θέση της προέλευσής του, στη βασική στοιβάδα της επιδερμίδας (οριζόντια φάση ανάπτυξης).

Επίπεδο II: Διήθηση στο θηλώδες χόριο, χωρίς σχηματισμό όγκου (συνήθως οριζόντια φάση ανάπτυξης).

Επίπεδο III: Διήθηση στο θηλώδες χόριο, με σχηματισμό ογκιδίου και πίεση στο υποκείμενο δικτυωτό χόριο (κάθετη φάση ανάπτυξης).

Επίπεδο IV: Διήθηση στο δικτυωτό χόριο (κάθετη φάση ανάπτυξης).

Επίπεδο V: Διήθηση του υποδόριου λιπώδους ιστού.

Ωστόσο, με περαιτέρω μελέτη, έχει αποδειχθεί ότι το μοντέλο του Clark έχει χαμηλότερη προγνωστική αξία, είναι λιγότερο αναπαραγωγίμο και είναι πιο υποκειμενικό σε σχέση με το μοντέλο του Breslow (Balch CM, et al, 2001).

2.1.ii. Βάθος διήθησης κατά Breslow

Το βάθος διήθησης κατά του Breslow χρησιμοποιείται ως κύριος προγνωστικός παράγοντας στο μελάνωμα του δέρματος. Είναι μια μέτρηση του βάθους διήθησης του μελανώματος στο δέρμα και τις υποκείμενες δομές, και περιλαμβάνεται στην TNM ταξινόμηση, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Πίνακας 1: Breslow's depth

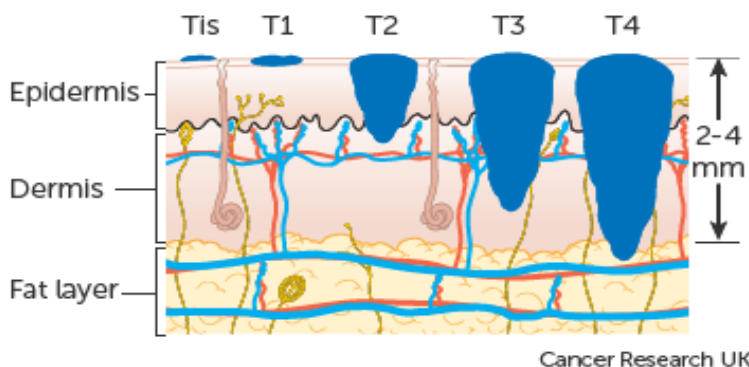
T	Βάθος
1	μικρότερο ή ίσο με 1 mm
2	1 mm – 2 mm
3	2 mm – 4 mm
4	μεγαλύτερο των 4 mm

2.1.iii. Το σύστημα ταξινόμησης TNM

Το TNM σύστημα σταδιοποίησης του μελανώματος είναι ένα από τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα συστήματα. Το σύστημα αυτό αναπτύχθηκε και διατηρείται από την American Joint Committee on Cancer (AJCC) και υιοθετήθηκε από την Διεθνή ένωση για τον Καρκίνο (Union for International Cancer Control, UICC). Το σύστημα ταξινόμησης TNM αναπτύχθηκε ως εργαλείο στην θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών, ώστε να υπάρχει κοινή γλώσσα στην σταδιοποίηση. Το κάθε στάδιο καθορίζεται από το μέγεθος, την τοπική διήθηση και την μεταστατική επέκταση ή όχι του κακοήθους νεοπλασματος.

Το (T) αντιστοιχεί στον όγκο (Tumor), και ειδικότερα στο βάθος διήθησης (πάχος) του μελανώματος. Υπάρχουν 5 κύρια στάδια του πάχους όγκου στο μελάνωμα - Tis σε T4.

- Το Tis σημαίνει ότι τα κύτταρα μελανώματος περιορίζονται στην επιδερμίδα.
- Το T1 σημαίνει ότι το μελάνωμα έχει πάχος μικρότερο από 1 mm
- Το T2 σημαίνει ότι το μελάνωμα έχει πάχος μεταξύ 1 mm και 2 mm
- Το T3 σημαίνει ότι το μελάνωμα έχει πάχος μεταξύ 2 mm και 4 mm
- Το T4 σημαίνει ότι το μελάνωμα έχει πάχος μεγαλύτερο από 4 mm



Εικόνα 2: Σταδιοποίηση με βάση το βάθος διήθησης (T). (Πηγή: Cancer Research, United Kingdom)

Η κατηγορία T (Tumor) διαιρείται περαιτέρω σε 2 υποομάδες, a και b, ανάλογα με την παρουσία ή όχι εξέλκωσης, δηλαδή αν υπάρχει άθικτη επιδερμίδα πάνω από τον όγκο.

Το T_a σημαίνει ότι δεν υπάρχει εξέλκωση

Το T_b σημαίνει ότι υπάρχει εξέλκωση

Στην προηγούμενη TNM σταδιοποίηση (2010) τα λεπτότερα μελανώματα (T₁) διακρίνονταν επίσης ανάλογα με τον μιτωτική δραστηριότητα (περισσότερες ή λιγότερες από μια μίτωση ανά mm²).

Τα μελανώματα T_{1a} δεν έχουν εξέλκωση και έχουν λιγότερες από 1 μίτωση/mm²

Τα T_{1b} μελανώματα έχουν ίσες ή περισσότερες από 1 μίτωση/mm²

Το (N) αντιπροσωπεύει την μετάσταση των κακοήθων μελανοκυττάρων στους λεμφαδένες.

Το N₀ σημαίνει ότι οι περιοχικοί λεμφαδένες δεν περιέχουν κύτταρα μελανώματος

Το N₁ σημαίνει ότι υπάρχουν κύτταρα μελανώματος σε έναν λεμφαδένα

Το N₂ σημαίνει ότι υπάρχουν κύτταρα μελανώματος σε 2 ή 3 λεμφαδένες

Το N₃ σημαίνει ότι υπάρχουν κύτταρα μελανώματος σε 4 ή περισσότερους λεμφαδένες

Η κατηγορία N χωρίζεται περαιτέρω στις ομάδες a, b και c.

Το N_a σημαίνει ότι ο καρκίνος στον λεμφαδένα μπορεί να παρατηρηθεί μόνο με μικροσκόπιο (μικρομετάσταση)

Το N_b σημαίνει ότι υπάρχουν εμφανή σημάδια καρκίνου στον λεμφαδένα (μακρομεταστολή)

N_c σημαίνει ότι υπάρχουν κύτταρα μελανώματος σε μικρές περιοχές του δέρματος πολύ κοντά στο πρωτεύων μελάνωμα (δορυφορικές μεταστάσεις) ή στα δερματικά λεμφαγγεία

Το (M) αντιστοιχεί στην μετάσταση και περιγράφει εάν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε διαφορετικό μέρος του σώματος. Υπάρχουν δύο στάδια μετάστασης - M₀ και M₁:

Το M₀ σημαίνει ότι το μελάνωμα δεν έχει εξαπλωθεί σε άλλο μέρος του σώματος.

Το M₁ σημαίνει ότι το μελάνωμα έχει εξαπλωθεί σε άλλο μέρος του σώματος.

Το M₁ χωρίζεται σε M_{1a}, M_{1b} και M_{1c}.

Το M_{1a} σημαίνει ότι υπάρχουν κύτταρα μελανώματος στο δέρμα σε άλλα μέρη του σώματος ή σε λεμφαδένες μακριά από το σημείο πρωτοπαθούς ανάπτυξης του μελανώματος.

Το M_{1b} σημαίνει ότι υπάρχουν κύτταρα μελανώματος στον πνεύμονα.

Το M_{1c} σημαίνει ότι υπάρχουν κύτταρα μελανώματος σε άλλα όργανα ή το μελάνωμα προκαλεί υψηλά επίπεδα μιας χημικής ουσίας που παράγεται από το ήπαρ (γαλακτική αφυδρογονάση).

3. Αίτια πρόκλησης μελανώματος

Τα μελανώματα προκαλούνται συνήθως από βλάβες στο DNA που προκύπτουν από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η γενετική και η επιγενετική παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο. Επίσης ένα εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα διευκολύνει την εμφάνιση νεοπλασίας (Whiteman D, et al, 1999).

3.a. Ο ρόλος της υπεριώδους ακτινοβολίας (UVR)

Το υπεριώδες φως UVB (μήκη κύματος μεταξύ 315 - 280 nm) από τον ήλιο απορροφάται από το DNA των κυττάρων του δέρματος και οδηγεί σε έναν τύπο άμεσης βλάβης του DNA, στην δημιουργία διμερών κυκλοβουτανίου πυριμιδίνης (CPDs) (Εικόνα 3).

Ομοδιμερή θυμίνη-θυμίνη, κυτοσίνη-κυτοσίνη ή ετεροδιμερή κυτοσίνη-θυμίνη σχηματίζονται με την ένωση δύο γειτονικών βάσεων πυριμιδίνης μέσα σε έναν κλώνο DNA. Κάπως ομοίως με την UVB, η UVA ακτινοβολία (μήκη κύματος μεγαλύτερου μήκους μεταξύ 400 - 315 nm) από τον ήλιο ή από τεχνητές πηγές μπορεί επίσης να απορροφηθεί άμεσα από το DNA του δέρματος (σε περίπου 100 έως 1000 φορές χαμηλότερη αποτελεσματικότητα από ότι απορροφάται το UVB) (Hayward NK, et al, 2017).

Μελέτες δείχνουν ότι η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία [UVA (Long GV, et al, 2014) και UVB] είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του μελανώματος. Η περιστασιακή ακραία έκθεση στον ήλιο (που προκαλεί ηλιακά εγκαύματα) έχει αιτιολογική σχέση με το μελάνωμα (Sosman JA, et al, 2012). Το μελάνωμα είναι πιο συνηθισμένο στην πλάτη στους άνδρες και στα πόδια στις γυναίκες (περιοχές συχνότερης περιοδικής έκθεσης στον ήλιο). Ο κίνδυνος φαίνεται να επηρεάζεται έντονα από τις κοινωνικοοικονομικές συνθήκες και όχι από την φύση του επαγγέλματος του ατόμου (ασχολία σε εσωτερικό ή εξωτερικό χώρο). Άλλοι παράγοντες είναι οι μεταλλάξεις ή η ομοζυγωτική απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Επίσης η υπεριώδης ακτινοβολία από τεχνητές πηγές (solarium) (με βαθιά διεισδυτικές ακτίνες UVA) αυξάνει τον κίνδυνο μελανώματος (Whiteman DC, et al, 2006, Matricone I, et al, 2015). Ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο διαπιστώνει ότι τα solarium είναι "καρκινογόνα για τον άνθρωπο" και ότι οι άνθρωποι που αρχίζουν να τα χρησιμοποιούν πριν από την ηλικία των τριάντα ετών είναι κατά 75% πιθανότερο να αναπτύξουν μελάνωμα κάποια στιγμή στην ζωή τους (Tsaο H, et al, 2012). Εκείνοι που εργάζονται σε αεροπλάνα φαίνεται επίσης να έχουν αυξημένο κίνδυνο, που πιστεύεται ότι οφείλεται σε μεγαλύτερη έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (Cancer Genome Atlas, 2015).

Πιθανά σημαντικά στοιχεία για τον προσδιορισμό του κινδύνου από την ηλιακή ακτινοβολία, περιλαμβάνουν την ένταση και τη διάρκεια της έκθεσης στον ήλιο, την ηλικία κατά την οποία γίνεται η έκθεση στον ήλιο και το χρώμα του δέρματος. Τα ποσοστά μελανώματος τείνουν να είναι υψηλότερα στις χώρες, όπως η Αυστραλία, όπου εγκαθίστανται μετανάστες από τη βόρεια Ευρώπη οι οποίοι είναι ευαίσθητοι στην έντονη άμεση ηλιακή ακτινοβολία. Η έκθεση κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας είναι ένας πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου από την έκθεση στην ενηλικίωση. Αυτό φαίνεται σε σχετικές μελέτες μετανάστευσης στην Αυστραλία (Snyder A, et al, 2014).

Η ύπαρξη πολλαπλών σοβαρών ηλιακών εγκαυμάτων αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης μελανώματος λόγω σωρευτικών βλαβών (Snyder A, et al, 2014). Τέλος, πληθυσμοί που ζουν κοντά στον ισημερινό έχουν αυξημένη έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία (Whiteman D, et al, 1999).

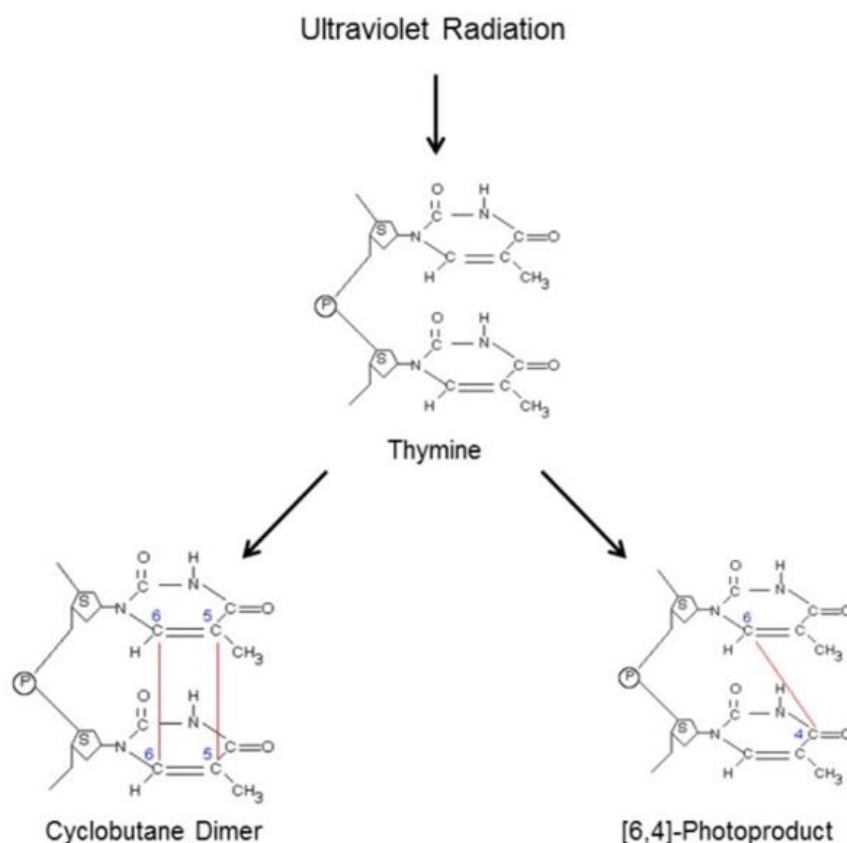
3.a.i. Το αποτύπωμα της UV ακτινοβολίας στο δέρμα

Περαιτέρω επιπλοκές δημιουργήθηκαν, πριν από την εμφάνιση νέων γονιδιωματικών αναλυτικών εργαλείων, διότι έλειπαν οι άμεσες ενδείξεις πιθανής βλάβης που προκλήθηκε από UV ακτινοβολία στο γενετικό υλικό. Τα γνωστά ογκογονίδια οδηγού BRAF^{V600} και NRAS^{Q61} που σχετίζονται με το μελάνωμα δεν παρουσιάζουν την κλασική μετάλλαξη υπογραφής προκαλούμενη από την υπεριώδη ακτινοβολία (UVR), όπου η μετάλλαξη C σε T λαμβάνει χώρα στο άκρο 3' των διμερών της πυριμιδίνης (Pfeifer GP, et al, 2005). Επίσης άτυπο είναι και το ογκοσταλτικό γονίδιο CDKN2A, το οποίο παρουσιάζει συχνές μεταπτώσεις C σε T σε θέσεις πυριμιδίνης, αν και πολλές από αυτές τις μεταλλάξεις δεν συνδέονται με τη UV ακτινοβολία καθώς δεν εμφανίζονται στο 3' άκρο των διμερών πυριμιδίνης (Hocker T, et al, 2007). Επιπλέον, αυτές οι μεταλλάξεις στο CDKN2A μπορούν να παρουσιαστούν και σε εκτεθειμένους σε UV ακτινοβολία σπλαχνικούς καρκίνους. Μερικές μεταλλάξεις που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία στο γονίδιο καταστολέα PTEN αναφέρθηκαν σε ασθενείς με σπάνια σύνδρομο επιδιόρθωσης DNA (Masaki T, et al, 2014). Δεν υπήρχαν άμεσες αποδείξεις μέχρι την έλευση της τεχνολογίας επόμενης γενιάς υψηλής παραγωγικότητας για να συνδέσουμε την έκθεση σε UV ακτινοβολία με μεταλλάξεις υπογραφής στο DNA σε όλο το γονιδίωμα του μελανώματος.

3.a.ii. Μηχανισμός πρόκλησης αλλοιώσεων του DNA από τη UV ακτινοβολία

Το υπεριώδες φως αποτελείται από δύο κύριες ζώνες ακτινοβολίας, την UVA και την UVB. Η πρώτη αποτελεί το 95% των ακτίνων UV που φθάνουν στην επιφάνεια της γης και έχουν ένα φάσμα συχνοτήτων χαμηλής ισχύος (320-400 nm). Η δεύτερη είναι 20 φορές λιγότερο άφθονη αλλά αποτελείται από υψηλότερη ισχύ (ισχυρότερα μήκη κύματος) (290-320 nm) (Christiaens FJ, et al, 2010, Narayanan DL, et al, 2010). Οι ακτίνες UVB απορροφώνται κυρίως από την κεράτινη στοιβάδα της επιδερμίδας ενώ οι ακτίνες UVA διεισδύουν βαθύτερα στην επιδερμίδα και μπορούν να επηρεάσουν το δερματικό στρώμα (Agar NS, et al, 2004, Marionnet C, et al, 2014).

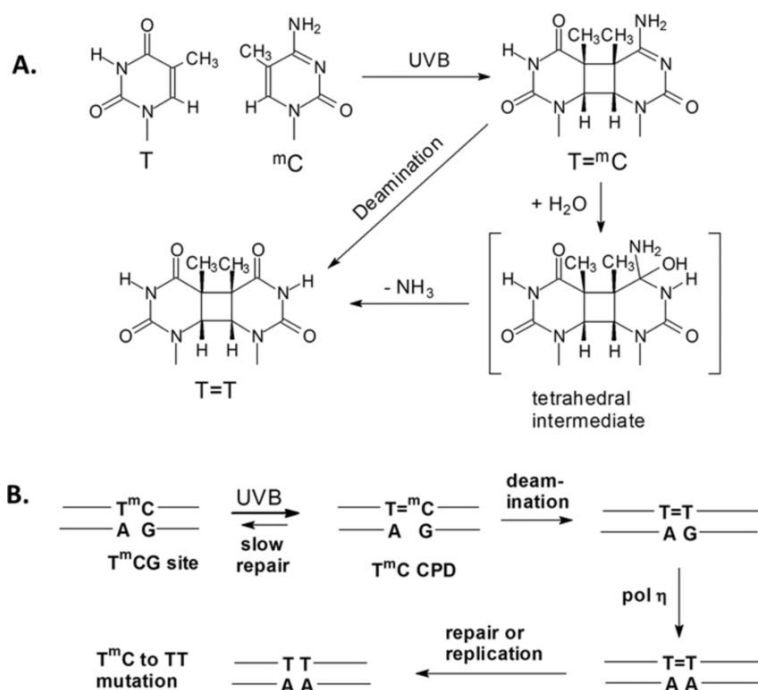
Λόγω της διαφορετικής διείσδυσης και της απορρόφησης των UVA και UVB ακτινοβολιών, αυτά τα μήκη κύματος ασκούν διαφορετικά βιολογικά αποτελέσματα. Τα φωτόνια UVB ακτινοβολίας έχουν άμεσες επιδράσεις στο κυτταρικό DNA, προκαλώντας την παραγωγή δύο κοινών βλαβών στο δέρμα: τα διμερή κυκλοπυριμιδίνης (CPD) και τα φωτοπροϊόντα πυριμιδίνης-πυριμιδίνης ((6-4) PP) (You YH, et al, 2001, Budden T, et al, 2013, Courdavaunt S, et al, 2005) (εικόνα 3).



Εικόνα 3: Οι δύο τύποι αλλοιώσεων στο DNA από την UV ακτινοβολία. Τα διμερή κυκλοπυριμιδίνης (CPD) (αριστερά) και τα φωτοπροϊόντα πυριμιδίνης-πυριμιδίνης ((6-4) PP) (δεξιά) (Πηγή: AMANDA YARNELL, SCIENCE & TECHNOLOGY, 2005)

Και οι δύο τύποι αλλοιώσεων σχηματίζονται σε θέσεις στον κλώνο του DNA όπου οι βάσεις πυριμιδίνης είναι γειτονικές μεταξύ τους (CC, CT, TT, TC). Η UVB ακτινοβολία δημιουργεί (6-4) PP με αντίδραση με την ομάδα καρβονυλίου και δεσμό άνθρακα μεταξύ των πυριμιδινών. Ωστόσο, αυτές οι αλλοιώσεις απομακρύνονται και αποκαθίστανται αποτελεσματικά από τα ενδοκυτταρικά συστήματα επιδιόρθωσης καθιστώντας 'τες πολύ λιγότερο μεταλλαξιγόνες από τα CPD (You YH, et al, 2001). Τα CPD σχηματίζονται όταν η UVB ακτινοβολία επάγει έναν επιπρόσθετο απλό ή ακόμη και διπλό ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ γειτονικών πυριμιδινών προκαλώντας την παραμόρφωση του κλώνου DNA στο σημείο εκείνο (You YH, et al, 2001, Kim JK, et al, 1995).

Η δυσλειτουργία και η ογκώδης βλάβη του DNA που οδηγείται από τα CPDs επισκευάζεται μέσω του συστήματος αποκοπής- αντικατάστασης νουκλεοτιδίων, το οποίο μπορεί να οδηγήσει στην αντικατάσταση βάσεων από C> T ή CC> TT (Budden T, et al, 2013) και υπολογίζεται ότι τα CPDs συμβάλλουν στο 80% των επαγόμενων από UVB μεταλλάξεων (You YH, et al, 2001, Kim JK, et al, 1995) (εικόνα 4). Οι προκαλούμενες από την UVB ακτινοβολία CPDs συμβαίνουν στις θέσεις διπυριμιδίνης TT, TC, CT και CC στα 28% , 26% , 16% και 30%, αντίστοιχα (Rochette PJ, et al, 2003). Σύμφωνα με αυτό, οι ασθενείς με γενετικές διαταραχές στα συστήματα αποκατάστασης βλαβών μέσω αποκοπής και αντικατάστασης νουκλεοτιδίων, που παρατηρούνται σε συνθήκες όπως π.χ. η xeroderma pigmentosa, είναι πιο ευαίσθητοι και το δέρμα τους παρουσιάζει ακόμη μεγαλύτερη αναλογία μεταλλάξεων υπογραφής της UV ακτινοβολίας (Budden T, et al, 2013, Brash DE, et al, 2013).



Εικόνα 4: Μηχανισμός δημιουργίας μεταλλάξεων στο DNA επαγόμενες από υπεριώδη ακτινοβολία. (A) Δημιουργία ενός CPD σε μια θέση TmC και η δημιουργία μετάλλαξης στον ένα κλώνο του DNA με απομόνωσή του. (B) Πορεία σχηματισμού μετάλλαξης και στους 2 κλώνους του DNA, επαγόμενου από υπεριώδη ακτινοβολία σε θέση TmCG, στις οποίες η πολυμεράση η εισάγει ένα A έναντι του T που προκύπτει από την αφαίρεση του 5-μεθυλC στη CPD που σχηματίζεται από το υπεριώδες φως (Πηγή: Qian Song, et al, 2014).

Ο όρος "μεταλλάξεις υπογραφής UVR", επίσης γνωστός ως "αποτύπωμα υπεριώδους ακτινοβολίας", αρχικά δημιουργήθηκε μέσω μετα-ανάλυσης δεδομένων αλληλουχίας από *in vitro* μελέτες και οι συγγραφείς καθόρισαν ένα όριο 60% των μεταλλάξεων C> T και 5% CC> TT για ένα μοτίβο μετάλλαξης, για να συμπεριλάβει μια «υπογραφή UVR» (Brash DE, et al, 2013). Πολλές περαιτέρω έρευνες αλληλουχίας έχουν υποστηρίξει αυτό το μοτίβο ως μοναδικά συνδεδεμένο με την ακτινοβολία UV και σημαντικό είναι ότι η υπογραφή UV ακτινοβολίας απουσιάζει από άλλες εσωτερικές κακοήθειες (Alexandron LB, et al, 2013).

Αν και η UVB ακτινοβολία προκαλεί άμεσες αλλοιώσεις του DNA, έχει επίσης αποδειχθεί ότι και η UVA προκαλεί σημαντικές βλάβες. Το UVA διεγείρει τους ενδοκυτταρικούς φωτοευαισθητήρες και οδηγεί σε παραγωγή ενδιάμεσων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) (Greinert R, et al, 2012) με τελικό αποτέλεσμα να προκαλέσει βλάβη στο DNA (Lavker RM, et al, 1995). Οι αλλοιώσεις του DNA που προκαλούνται από τα ROS περιλαμβάνουν τόσο μονόκλωνες όσο και δίκλωνες θραύσεις στο DNA (Greinert R, et al, 2012), καθώς και οξειδώσεις πρωτεϊνών (Brenner M, et al, 2008). Παρόμοια με τις προκαλούμενες από την UVB ακτινοβολία βλάβες στο DNA, η UVA μπορεί επίσης να προκαλέσει σχηματισμό CPD, με την διαφορά ότι αυτά συμβαίνουν συχνότερα σε θέσεις TT (UVA 57% σε σύγκριση με UVB περίπου 28%) (Rochette PJ, et al, 2003), ενδεχομένως αντικατοπτρίζοντας τους διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Ένας νέος μηχανισμός με τον οποίο το UVA μπορεί να προκαλέσει οποιοδήποτε τύπο σχηματισμού CPD προτάθηκε πρόσφατα, και παραδόξως, αυτό εξαρτάται από τη μελανίνη (Premi S, et al, 2015). Αυτή η δεύτερη οδός περιλαμβάνει επαγόμενη από την UV ακτινοβολία δημιουργία υπεροξειδίου του υδρογόνου και μονοξειδίου του αζώτου, τα οποία οδηγούν σε διέγερση των ηλεκτρονίων μέσα στα θραύσματα μελανίνης. Το υψηλό επίπεδο ενέργειας των παραγώγων μελανίνης μεταφέρεται στο DNA, δημιουργώντας μεταλλαξιογόνες CPDs πολύ μετά την έκθεση στον

ήλιο. Αυτή η μελέτη ορόσημο αυξάνει την πιθανότητα η μελανίνη να παίζει καρκινογόνο καθώς και τον γνωστό φωτοπροστατευτικό ρόλο της.

Η συμβολή της μελανίνης στην καρκινογένεση αποδεικνύεται περαιτέρω από in vitro μελέτες που αναλύουν τον κίνδυνο μελανώματος σε ποντικούς (Mitra D, et al, 2012). Το γονίδιο υποδοχέα της μελανοκορτίνης 1 (MC1R) κωδικοποιεί έναν συζευγμένο με πρωτεΐνη G υποδοχέα ο οποίος ρυθμίζει την ενδοκυτταρική σηματοδότηση μέσω cAMP στα μελανοκύτταρα. Γενετικές παραλλαγές απώλειας λειτουργίας του MC1R προσδίδουν ευαίσθητο δέρμα, φωτοευαισθησία και κόκκινα μαλλιά (Raimondi S, et al, 2008). Το MC1R ενεργοποιείται από κερατινοκύτταρα ακτινοβολημένα με υπεριώδη ακτινοβολία που εκκρίνουν ορμόνη διέγερσης των μελανοκυττάρων (Gracia-Borrón JC, et al, 2014). Η ενεργοποίηση του MC1R οδηγεί στη λειτουργία της τυροσινάσης, ένα ένζυμο που οδηγεί τη σύνθεση της καστανής ευμελανίνης, με φωτοπροστατευτική ικανότητα, η οποία στη συνέχεια μεταφέρεται στα κερατινοκύτταρα. Σε άτομα που φέρουν παραλλαγές απώλειας λειτουργίας του MC1R (άτομα με ευαίσθητο δέρμα, φωτοευαίσθητα άτομα), υπάρχουν χαμηλότερα επίπεδα δραστηριότητας τυροσινάσης, τα οποία οδηγούν στην υπεροχή της ερυθράς φαιομελανίνης. Η φαιομελανίνη όχι μόνο δεν προστατεύει τα άτομα από τις επιβλαβείς ακτίνες UV, αλλά προκαλεί επίσης το σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και την επακόλουθη βλάβη του DNA (Mitra D, et al, 2012).

3.a.iii. Η επίδραση της UV ακτινοβολίας στο μελάνωμα

Το μελάνωμα που εμφανίζεται σε θέσεις χρόνιας έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία (κεφαλή και λαιμός) είναι πιθανότερο να εμφανιστεί σε ηλικιωμένους ασθενείς (έβδομη δεκαετία) με υψηλό συνολικό επίπεδο έκθεσης σε UV ακτινοβολία (Curtun JA, et al, 2005). Οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν επίσης τυπικά καρκίνους του δέρματος που δεν σχετίζονται με τα μελανοκύτταρα (καρκινώματα των βασικών και των πλακωδών κυττάρων) (Whiteman DC, et al, 1998). Αντίθετα, τα μελανώματα που εμφανίζονται σε χώρους που εκτίθενται μόνο περιοδικά σε UV ακτινοβολία (κορμός) εμφανίζονται σε νεότερους ασθενείς (τρίτη έως έκτη δεκαετία ζωής) (Viros A, et al, 2008). Αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζουν μικρότερη ολική έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία ιστολογικά, αλλά είναι πιο πιθανό να αναφέρουν παροδική έκθεση και ηλιακά εγκαύματα στον κορμό μετά από ψυχαγωγικές δραστηριότητες (Whiteman DC, et al, 1999, Whiteman DC, et al, 2006, Whiteman DC, et al, 1998, Whiteman DC, et al, 2003). Η χορήγηση περαιτέρω κλινικής υποστήριξης στους παρατηρούμενους υποτύπους, η καταμέτρηση των σπύλων και της υπερκεράτωσης του δέρματος, δείκτης της προκαλούμενης από τον ήλιο βλάβης του δέρματος, συσχετίζονται στενά με μελανώματα του κορμού έναντι κεφαλής (Bataille V, et al, 1998, Carli P, et al, 2003).

Οι διαφορές στη συνολική ποσότητα και στο πρότυπο της έκθεσης σε UV ακτινοβολία δείχνουν ότι η έκθεση με διαστήματα συσχετίζεται με μελανώματα του κορμού και η συνηθισμένη έκθεση συνδέεται έντονα με το μελάνωμα της κεφαλής και του αυχένα σε ηλικιωμένα άτομα. Αυτό υποδηλώνει ότι τα μελανοκύτταρα σε διαφορετικές θέσεις παρουσιάζουν μοναδική ευαισθησία, ειδικές ιδιότητες θέσης ή ίσως διαφορετικό μηχανισμό προσαρμογής στην έκθεση στην UV ακτινοβολία. Συγκεκριμένα, η έκθεση από την παιδική ηλικία είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου μελανώματος (Green AC, et al, 2001). Η έκθεση κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας έχει συνδεθεί με την υψηλότερη πιθανότητα απόκτησης καλοήθων μελανοκυτταρικών σπύλων (Bauer J, et al, 2005), οι οποίοι κατά κύριο λόγο φέρουν μετάλλαξη BRAF και αποτελούν ανεξάρτητα παράγοντα κινδύνου για το μελάνωμα (Viros A, et al, 2014, Pollock PM, et al, 2003).

Πρόσφατες μελέτες, όπως η μελέτη TCGA, δεν έχουν μόνο κατηγοριοποιήσει το μελάνωμα σε γενετικά διακριτές κατηγορίες που ορίζονται από μεταλλάξεις ογκογόνου οδηγού και την αλλοίωση του αριθμού αντιγράφων στο DNA, αλλά έχουν αναδείξει σαφείς μοριακές ανωμαλίες που σχετίζονται με μελανώματα που εμφανίζονται σε διαφορετικές θέσεις (Curtin JA, et al, 2005, Maldonado JL, et al, 2003, Viros A, et al, 2008). Συγκεκριμένα, οι υπο-τύποι μελανώματος συχνά διαιρούνται μεταξύ εκείνων που προκύπτουν σε περιοχές του δέρματος που λαμβάνουν συνεχή έκθεση στον ήλιο (κεφάλι και λαιμός) έναντι εκείνων που λαμβάνουν διακοπτόμενη έκθεση στον ήλιο (τον κορμό). Στην πρώτη, κυριαρχούν οι μεταλλάξεις των NRAS, NF1 και BRAF χωρίς την κλασική μετάλλαξη V600E. Στην τελευταία, η μετάλλαξη BRAF^{V600E} είναι η πιο κοινή μετάλλαξη οδηγού (Cancer Genome Atlas 2015, Curtin JA, et al, 2005).

Η χρήση νέων τεχνολογιών μαζικού προσδιορισμού αλληλουχιών έχει βρει ότι τα μελανώματα που αναπτύσσονται από τις εκτεθειμένες στην UV ακτινοβολία περιοχές έχουν έναν τεράστιο αριθμό μεταλλάξεων που προκύπτουν από βλάβες που προκαλούνται από αυτήν και παρουσιάζουν μεταλλάξεις υπογραφής (Hayward NK, et al, 2017). Ωστόσο, ο αριθμός των προκαλούμενων μεταβολών ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των μελανωμάτων και δεν έχουν ακόμη διεξαχθεί μελέτες συσχέτισης με επιδημιολογικά κριτήρια. Πιθανότατα ο μεγαλύτερος αριθμός αλλαγών στις αλληλουχίες του DNA στο δέρμα με χρόνια έκθεση σε UV ακτινοβολία δεν συμβάλλει στην κακοήγη εξέλιξη. Οι πρόσφατες προσπάθειες στην έρευνα για το μελάνωμα επικεντρώνονται στα δεδομένα εξόρυξης γενωμικού προφίλ από μελέτες με μεγάλο μέγεθος δείγματος για να ανακαλύψουν γονίδια που συνεργάζονται για την εξέλιξη του καρκίνου.

Ο συνδυασμός γενετικής και στατιστικής ανάλυσης έχει ως στόχο να ανακαλύψει ποια γονίδια εμπλέκονται λειτουργικά στην πρόοδο του μελανώματος. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η υπεριώδης ακτινοβολία (UVR) δημιουργεί πολλές επιπλέον μεταλλάξεις υπογραφής από την πρώιμη εμφάνιση του μελανοκυτταρικού πολλαπλασιασμού, μέχρι και το κακοήθες μελάνωμα (Shain AH, et al, 2016). Υπάρχουν συνεχείς προσπάθειες που στοχεύουν στην ανακάλυψη των συγκεκριμένων βιοχημικών μηχανισμών με τους οποίους η UV ακτινοβολία μπορεί να συμβάλλει στην δημιουργία του μελανώματος και στην μεταστατική διαδικασία (Viros A, et al, 2014, Zaidi MR, et al, 2011, Bald T, et al, 2012). Επίσης είναι γνωστό ότι η UV ακτινοβολία μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ανάπτυξη μελανώματος (Zaidi MR, et al, 2011) και την πρόοδο (Bald T, et al, 2012) μέσω της επαγωγής μιας φλεγμονώδους απάντησης. Ωστόσο, η επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας δεν μπορεί να είναι ίδια σε όλα τα μελανώματα. Όπως γνωρίζουμε, υπάρχουν σαφείς διαφορές ως προς την έκταση της βλάβης, το πρότυπο έκθεσης, πρωταρχική θέση και την ηλικία του ασθενούς με μελάνωμα, και τους υποκείμενους γενετικούς οδηγούς που οδηγούν σε ξεχωριστούς υποτύπους.

Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η χορήγηση μίας δόσης UV ακτινοβολίας σε ενήλικα μελανοκύτταρα ζώων που εκφράζουν BRAF^{V600E} είναι επαρκής για να αυξήσει τον αριθμό και το μέγεθος τους, γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο μελανώματος (Viros A, et al, 2014). Αυτό το εύρημα υποστηρίζει τα επιδημιολογικά στοιχεία που δείχνουν ότι τα παιδιά σε μεγαλύτερα γεωγραφικά πλάτη έχουν υψηλότερο αριθμό σπίλων και κατά συνέπεια υψηλότερο κίνδυνο μελανώματος (Bauer J, et al, 2005). Τα ανθρώπινα δεδομένα επιβεβαιώνουν την δημιουργία πολλών βλαβών στο DNA από τη UV ακτινοβολία, μεταλλάξεων TP53 που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία και μεταλλάξεων του BRAF (Hayward NK, et al, 2017). Η έρευνα έχει αναδείξει ότι οι μεταλλάξεις στην TP53 είναι σχετικά σπάνιες στο μελάνωμα, και ανιχνεύονται μόνο σε 15-19% των αλληλουχιών των όγκων (Cancer Genome Atlas, 2015, Hocker T, et al, 2007). Ωστόσο, οι όγκοι μπορούν να παρακάμψουν την δραστηριότητα της TP53 άγριου τύπου μέσω ενίσχυσης του MDM4 (Gembarska A, et al, 2012) και του MDM2 (Muthusamy V, et al, 2006), ή της απαλειφής του CDKN2A (Stott FJ, et al, 1998). Η συνέπεια αυτού είναι ότι μετάλλαξη των ρυθμιστών του

TP53 μπορεί να συμβάλλει στην εξέλιξη του μελανώματος χωρίς να απαιτείται άμεση μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας του TP53. Αν και τα BRAF και NRAS είναι τα συχνότερα μεταλλαγμένα γονίδια, το πρότυπο μετάλλαξης τους δεν είναι η τυπική μετάλλαξη υπογραφής της UV (C>T) (Hocker T, et al, 2007). Αντίθετα, η TP53 συχνά φέρει μεταλλάξεις υπογραφής UV ακτινοβολίας και εμφανίζεται σε δείγματα με υψηλότερο φορτίο C σχετικά με το T (Viros A, et al, 2017). Περιέργως, μελανώματα που προκύπτουν σε περιοχές που είναι πιο πιθανό να υποστούν χρόνιες βλάβες λόγω ηλιακής ακτινοβολίας έχουν δείξει υψηλότερο φορτίο μεταλλάξεων και λιγότερες αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων στο γονιδίωμα, καθώς και λιγότερες μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN. Αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι στο μελάνωμα, η οδός προς την ογκογένεση οδηγείται από την ειδική συνεργασία μεταλλαγμένων ογκογονιδίων και καταστολέων όγκων στο πλαίσιο της UV ακτινοβολίας.

Περαιτέρω απόδειξη ότι η UV ακτινοβολία μπορεί να διαδραματίσει διαφορετικούς ρόλους ανάλογα με το πλαίσιο παρέχεται από κλινικές παρατηρήσεις που σχετίζονται με το δεύτερο πιο διαδεδομένο ογκογόνο του μελανώματος NRAS. Οι μεταλλάξεις του NRAS πιστεύεται ότι επηρεάζουν περίπου το 15% των μελανωμάτων και μερικές μελέτες δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις NRAS σχετίζονται με συγκεκριμένους υποτύπους μελανώματος ή με τη θέση της πρωτοταγούς αλλοίωσης (Carlini MS, et al, 2014). Πολλές κλινικές μελέτες δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις του NRAS είναι πιο πιθανό να εμφανιστούν σε μελανώματα του δέρματος που αναπτύσσονται στις εκτεθειμένες στον ήλιο περιοχές, κυρίως την κεφαλή και τον τραχήλου, ενώ άλλες έχουν παρουσιάσει υψηλότερη συχνότητα μετάλλαξης NRAS στα οζώδη και στα οφθαλμικά μελανώματα (ένας υποτύπος που συνδέεται έντονα με την ηλικία, τη χρόνια έκθεση στον ήλιο και την ηλιακή βλάβη στο χόριο) (Bastian BC, et al, 2014). Αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι η UV ακτινοβολία μπορεί να διαδραματίσει έναν συγκεκριμένο ρόλο στη γένεση μελανώματος που κατευθύνεται από NRAS. Ωστόσο, γνωρίζουμε ότι οι μεταλλάξεις NRAS είναι επίσης συχνά παρούσες σε άλλες κατηγορίες μελανώματος, όπου υπάρχει μικρή σχέση με την υπεριώδη ακτινοβολία όπως στους βλεννογόνους και στο μελάνωμα των άκρων και μπορεί επίσης να βρεθεί σε δερματικά μελανώματα χωρίς ιστολογικές ενδείξεις σοβαρής βλάβης από τον ήλιο (Viros A, et al, 2008). Αυτές οι κλινικές και επιδημιολογικές παρατηρήσεις δείχνουν ότι η συμβολή της UV ακτινοβολίας στη μελανογένεση είναι ετερογενής. Τα μοντέλα αλληλεπίδρασης της στις διάφορες ογκογόνες μεταλλάξεις, στο πλαίσιο της έκθεσης σε ενήλικες, δεν έχουν ακόμη δημοσιευθεί.

3.a.iv. Ο ρόλος της φλεγμονής που προκαλείται από τη UV ακτινοβολία

Προσπάθειες για την θεραπεία του μελανώματος έχουν οδηγήσει σε έρευνες σχετικά με την αλληλεπίδραση του καρκίνου και του ανοσοποιητικού συστήματος. Εκτός από την περιγραφή του περίπλοκου τρόπου με τον οποίο τα κύτταρα μελανώματος μπορούν να αποφύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα, μεγάλο μέρος αυτού του έργου έχει διερευνήσει τον ενδεχομένως παθογόνο ρόλο του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει μια σύνδεση μεταξύ της UV ακτινοβολίας, των ανοσοκυττάρων και των κυτοκινών που υπάρχουν στο μικροπεριβάλλον του μελανώματος. Επίσης η UV ακτινοβολία επάγει την απόπτωση των κερατινοκυττάρων μέσω του TP53, σχηματίζοντας «κύτταρα ηλιακού εγκαύματος» που μπορεί να φανεί να κορυφώνονται 48 ώρες μετά την έκθεση (Lee JH, et al, 2002). Η απελευθέρωση μορίων που σχετίζονται με την απόπτωση λόγω βλαβών στα κύτταρα με τη σειρά της προκαλεί μια έντονη ανοσοαπόκριση, περιλαμβάνοντας ουδετερόφιλα και μακροφάγα (Bald T, et al, 2014, Tuting T, et al, 2016). Αυτό αποδείχθηκε ότι συμβάλλει σε μεταγενέστερα στάδια εξέλιξης του μελανώματος, προκαλώντας αυξημένη αγγειογένεση και διευκολύνοντας τη

μεταστατική διάδοση των κυττάρων μελανώματος μέσω αγγειοτροπικής οδού (κύτταρα μελανώματος που φέρουν τα αιμοφόρα αγγεία). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι με τη χημική εξάντληση των μακροφάγων σε ποντίκια που εκτίθενται σε UV ακτινοβολία, ο πολλαπλασιασμός των μελανοκυττάρων μειώνεται (Handoko. HY, et al, 2013). Αυτό υποδηλώνει ότι το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να παίξει άμεσο ρόλο στην παθογένεση του μελανώματος, ανεξάρτητα από την προκαλούμενη γενετική βλάβη. Υποθέτουμε ότι τέτοιοι προ-καρκινικοί φλεγμονώδεις μηχανισμοί μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στο μελάνωμα που προκύπτει από εκτεθειμένο στον ήλιο δέρμα, που φέρει μικρότερους αριθμούς μεταλλάξεων που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία, επηρεάζοντας τα άτομα με καθαρό ιστορικό φλεγμονώδους ηλιακού εγκαύματος (Ahain AH, et al, 2016).

Εκτός από την αλλαγή των πληθυσμών ανοσοκυττάρων που υπάρχουν στο στρώμα του δέρματος, η UV ακτινοβολία μπορεί να μεταβάλλει την απελευθέρωση των κυτοκινών κατά τη διάρκεια της απόκρισης (Rhodes LE, et al, 2009). Προηγούμενες μελέτες εξέτασαν την επίδραση της ιντερφερόνης γάμμα (IPNγ) μετά από την έκθεση σε UV ακτινοβολία. Μέσω της χρήσης ποντικών γενετικά ελλειμματικών σε IPNγ, η IPNγ βρέθηκε ότι είναι κρίσιμη για την ρύθμιση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης που απαιτούνται για την πρόσληψη εγγενών ανοσοκυττάρων (Lugade AA, et al, 2008). Περαιτέρω, αποδείχθηκε ότι η υψηλή δόση UV ακτινοβολίας που χορηγείται σε νεογνικά ποντίκια με γενετική ευαισθησία στο μελάνωμα προκαλεί απόκριση υπογραφής της ιντερφερόνης, συμπεριλαμβανομένης της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την αποφυγή του ανοσοποιητικού, και αποδεικνύει ότι αυτή είναι μια κρίσιμη οδός για την έναρξη του όγκου σε ποντίκια και ανθρώπους (Zaldi MR, et al, 2011).

Επιπλέον, τα μακροφάγα που προσλαμβάνονται στις θέσεις φλεγμονής του δέρματος μετά από UV ακτινοβολία έχει αποδειχθεί ότι παράγουν IFNγ, και η πρόσμιξη αυτών των μακροφάγων με μεταμοσχευμένα κύτταρα μελανώματος είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη ανάπτυξη του καρκίνου (Zaldi MR, et al, 2011). Συνολικά, αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν μια προ-ογκογονική σχέση μεταξύ του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος και των μελανοκυττάρων σε συγκεκριμένες περιστάσεις.

3.b. Γενετικοί παράγοντες μελανώματος

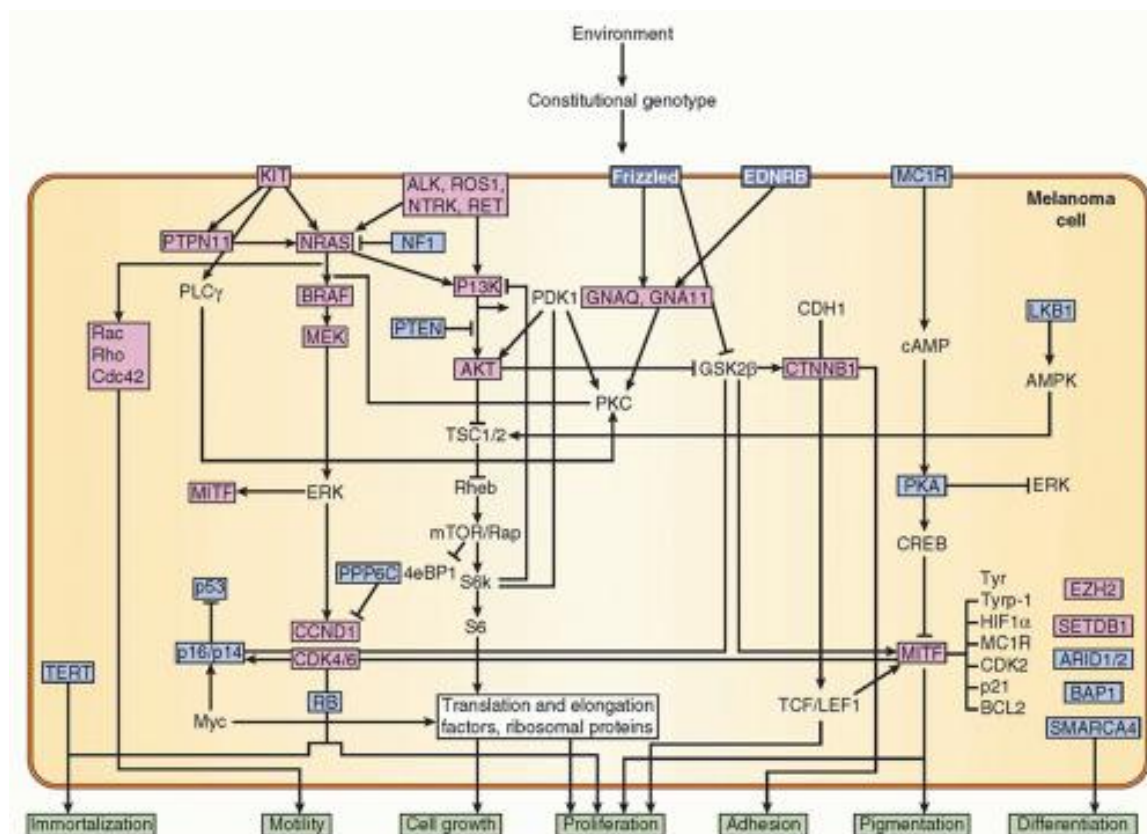
Το κακόηθες μελάνωμα είναι μια σπάνια, ετερογενής μορφή καρκίνου του δέρματος με σύνθετη πολυγονιδιακή αιτιολογία. Περίπου το 5-10% των περιπτώσεων μελανώματος είναι οικογενειακές (Gnadini et al, 2005). Ένας αριθμός κληρονομικών παραγόντων συμβάλλουν στο συνολικό κίνδυνο μελανώματος του ασθενούς, συμπεριλαμβανομένων των χαρακτηριστικών της χρωματισμού, της απόκρισης στο υπεριώδες φως και του αριθμού των κηλίδων. Ωστόσο, η πλειοψηφία των περιπτώσεων οικογενειακού μελανώματος δεν παρουσιάζει αναγνωρίσιμες μεταλλάξεις στα γεννητικά κύτταρα σε γνωστά γονίδια ευαισθησίας.

Το μελάνωμα είναι ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα μιας ιστολογικής εξέλιξης του καρκίνου που εξαρτάται από τις μεταλλάξεις του οδηγού στο μονοπάτι MAPK, με πολλαπλές πρόσθετες γενετικές αλλοιώσεις σε άλλες οδούς που οδηγούν σε ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη και αποφυγή απόπτωσης (Εικόνα 5) Η ανησυχητική αύξηση της επίπτωσης του μελανώματος έχει διεγείρει τις αυξημένες ερευνητικές προσπάθειες με στόχο την αποσαφήνιση των γενετικών, περιβαλλοντικών, συμπεριφορικών και φαινοτυπικών παραγόντων που συμβάλλουν στην παθογένεση αυτής της ασθένειας. Στα πλαίσια αυτά αναπτύχθηκε η τεχνική CGH η οποία επέτρεψε την πρώτη λεπτομερή ανάλυση πρωτογενών όγκων. Οι Bastian et al, (Bastian BC et al, 1998) διαπίστωσαν ότι οι

χρωμοσωμικές αλλοιώσεις ουσιαστικά απουσίαζαν από τους σπίλους, αλλά ήταν συχνές στο μελάνωμα. Περιλάμβαναν απώλειες χρωμοσωμάτων 9p (81%) και 10q (63%), εστιακές απώλειες σε χρωμοσώματα 6q και 8p και ενισχύσεις στα χρωμοσώματα 1q, 2, 4q, 6p, 7, 8, 11q, 17 και 20. Τα πρότυπα των χρωμοσωμικών ενισχύσεων και/οι απωλειών διέφεραν μεταξύ των κλινικοπαθολογικών υποτύπων του μελανώματος (Curtin JA, et al, 2005).

Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια έχουν βρεθεί να είναι ισχυρά αποδιοργανωμένα στο μελάνωμα είναι:

1. Το μονοπάτι των MAP κινασών (mitogen- activated protein kinase), σαν αποτέλεσμα μεταλλάξεων στο RAS, RAF και KIT
2. Το PI3K/AKT μονοπάτι, σαν αποτέλεσμα μεταλλάξεων στο RAS , μεταλλάξεων ή πλήρης έλλειψη του PTEN (phosphatase and tensin homolog) και απορρυθμισμένη έκφραση του AKT.
3. Τα μονοπάτια Rb και p53 σαν αποτέλεσμα μεταλλάξεων στους γενετικούς τόπους CDKN2A/p14ARF/p16INK4A και p53



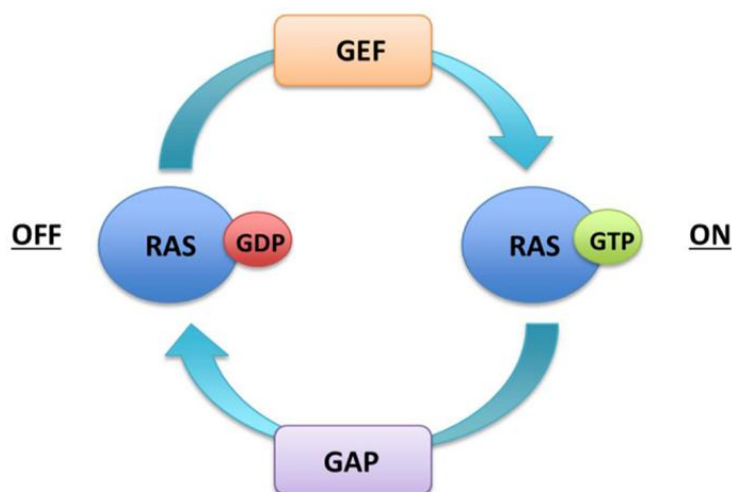
Εικόνα 5: Διαδρομές σηματοδότησης διαταραγμένες από τις γενετικές αλλοιώσεις και τη σχέση τους με τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του μελανώματος. Οι πρωτεΐνες που είναι με κόκκινο χρώμα επηρεάζονται από μεταλλάξεις κέρδους-λειτουργίας, ενώ αυτές που βρίσκονται με μπλε χρώμα επηρεάζονται από μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (Πηγή: Bastian BC, 2014).

3.b.i. Το μονοπάτι των MAP κινασών (RAS/RAF/MEK/ERK)

Το MAPK μονοπάτι είναι ένα υψηλά διατηρημένο σηματοδοτικό μονοπάτι που εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η μετανάστευση. Αυτό το μονοπάτι μπορεί να ενεργοποιηθεί από ερεθίσματα από σηματοδοτικά μόρια όπως είναι growth factor receptors και g-protein-coupled receptors (Wellbrock, et al, 2004a, Gray-Schorfer, et al, 2007). Η απορύθμιση του κλασικού MAPK μονοπατιού με την extracellular signal-regulated kinase (ERK) σαν την τελευταία κινάση του είναι συχνό φαινόμενο στον ανθρώπινο καρκίνο και είναι συχνά αποτέλεσμα ενεργοποιητικών μεταλλάξεων κυρίως στα ογκογονίδια RAF και RAS (15–30%, Bos, 1989) με βάση αναλύσεων όλων των τύπων καρκίνου (Εικόνα 7). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι οι μεταλλάξεις στο RAS και RAF είναι αμοιβαία αποκλειόμενες στους καρκίνους συμπεριλαμβανομένου και του μελανώματος (Brose, et al, 2002).

3.b.i.1. RAS

Η RAS πρωτεΐνες (H, K, και N-RAS) είναι μικρές GTPάσες εντοπισμένες στην εσωτερική μεριά της πλασματικής μεμβράνης όπου δρουν σαν σημαντικοί μεσολαβητές της κυτταρικής ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης (Trahe, et al, 1987, Lowy, et al, 1993). Η ενεργότητα του RAS ελέγχεται από την κυκλική εναλλαγή πρόσδεσης μιας διφωσφορικής γουανωσύνης GDP (απενεργοποίηση) και μιας τριφωσφορικής γουανωσύνης GTP (ενεργοποίηση) (Downward, 1996, Schef- fzek, et al, 1997). Η εναλλαγή σύνδεσης του GTP και του GDP ρυθμίζεται εν μέρη, από την ενδογενή ενεργότητα GTPάσης του RAS, την ενεργότητα των GTPase-activating protein (GAPs) τα οποία προωθούν την δημιουργία ανενεργών RAS-GDP συμπλόκων και από τους guanine-nucleotide exchange factors (GEFs) οι οποίοι επιταχύνουν την δημιουργία RAS-GTP συμπλόκων (Cales, et al, 1988, Herrmann, et al, 1996)(εικόνα 6). Λίγο μετά την αναγνώριση του NRAS ως ογκογονίδιο (Shimizu K, et al, 1983, Hall A, et al, 1983), βρέθηκε ότι μεταλλάσσεται σε κυτταρικές γραμμές μελανώματος (Albino AP, et al, 1984, Padua RA, et al, 1985).



Εικόνα 6: Ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της RAS GTPάσης. Οι guanine-nucleotide exchange factors (GEFs) προωθούν την δημιουργία RAS-GTP συμπλόκων με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της RAS. Η RAS απενεργοποιείται όταν έχει συνδεδεμένο GDP που δημιουργείται λόγω της ενδογενούς ενεργότητας GTPάσης της RAS ή/και λόγω της δράσης των GTPase-activating protein (GAPs) τα οποία προωθούν την δημιουργία των ανενεργών RAS-GDP συμπλόκων (Πηγή: Thomas Knight, et al, 2014) .

Οι μεταλλάξεις NRAS εμφανίζονται στο 15% έως 20% των μελανωμάτων (Omholt K, et al, 2003, Jakob JA, et al, 2012, Ellerhorst JA, et al, 2011, van 't Veer LJ, et al, 1989). Οι μεταλλάξεις στα άλλα δύο μέλη της οικογένειας RAS, το HRAS και το KRAS, είναι λιγότερο συχνές (1% -2%). Μεταλλάξεις σε γονίδια RAS τυπικά επηρεάζουν τα κωδικόνια Q61, G12 ή G13. Μεταλλάξεις στα γονίδια RAS μπορούν και μειώνουν την ενδογενή ενεργότητα GTPάσης καθώς επίσης και την ευαισθησία στα GAPs αποκλείοντας την απομάκρυνση του GTP (Trahey, et al, 1987, Scheffzek et al, 1997, Wittinghofer, et al, 1997). Όλες αυτές οι μεταλλάξεις οδηγούν σε απενεργοποίηση της GTPάσης, με αποτέλεσμα τη συστατική δέσμευση του GTP και την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης. Το RAS μπορεί να ενεργοποιήσει διάφορα μόρια τελεστές όπως είναι το RAF (Marais, et al, 1995) και η κινάση της 3, υδρόξυ φωσφατιδυλοινουσιτόλης (PI3K) (Rodriguez-Viciano, et al, 1994). Το RAS μέσω της ενεργοποίησης τέτοιων μορίων μπορεί να ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τις λειτουργίες που συνδέονται με τον μετασχηματισμό σε ογκογόνα κύτταρα. Η ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού ξεκινά με την φωσφορυλίωση του RAF από το RAS (Marais, et al, 1995, Weber, et al, 2001), το οποίο στην συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί MEK κινάσες 1 και 2 (MEK1 και 2), οι οποίες με την σειρά τους φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις ERK1 και 2 (Rubinfeld, et al, 2004, Rapp, et al, 2006). Οι ενεργοποιημένες ERK1 και 2, φωσφορυλιώνουν πάρα πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες και ελέγχουν γονίδια όπως το ELK1 (Babu, et al, 2000), το FOS (Monje, et al, 2005), και το c-JUN (Lopez-Bergami, et al, 2007) (εικόνα 7).

Το RAS μπορεί επίσης να ενεργοποιεί το PI3K/AKT μονοπάτι μέσω αλληλεπιδράσεων με την καταλυτική υπομονάδα p110 του PI3K που οδηγεί στην ενεργοποίηση, μετακίνηση στην μεμβράνη και διαμορφωτικές αλλαγές στην λιπιδιακή κινάση. Η PI3K φωσφορυλιώνει την 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλοινουσιτόλη (PIP2) για να παράγει 3,4,5 τριφωσφορική φωσφατιδυλοινουσιτόλη (PIP3), που δρα σαν 2^{ος} αγγελιοφόρος και συνδεέεται με πολλές πρωτεΐνες όπως είναι η AKT/protein kinase B (PKB) (Haslam, et al, 1993, Datta, et al, 1995, Franke, et al, 1995) μέσω ομόλογων περιοχών pleckstrin.

Κλινικά, η παρουσία μεταλλάξεων NRAS σχετίζεται με πρωτεύοντες όγκους μεγαλύτερου πάχους σε σύγκριση με τους BRAF μεταλλαγμένους όγκους, BRAF ή NRAS άγριου τύπου (Ellerhorst JA, et al, 2011) και με φτωχότερη πρόγνωση στη μεταστατική νόσο (Jakob JA, et al, 2012).

Η AKT είναι ένα ρυθμιστής της ογκογενούς μεταμόρφωσης (Mirza, et al, 2000), της κυτταρικής επιβίωσης (Edinger, et al, 2002), της απόπτωσης (Cheung, et al, 2008), της προώθησης του κυτταρικού κύκλου (Liang, et al, 2002) και της σύνθεσης γλυκογόνου (Cross, et al, 1995).

Το N-RAS είναι η ισομορφή του RAS που βρίσκεται περισσότερες φορές μεταλλαγμένη στο ανθρώπινο μελάνωμα (Der, et al, 1986, Trahey, et al, 1987, Trahey, et al, 1987). Αναλύσεις με μεταλλάξεις έδειξαν ότι περίπου το 56% των εκ φύσης σπίλων (congenital nevi) παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο RAS συγκριτικά με το 33% του πρωτογενούς και 26% του μεταστατικού μελανώματος (Albino, et al, 1989, Jafari, et al, 1995, Demunter, et al, 2001). Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο RAS σχετίζονται με την έκθεση στη UV ακτινοβολία και είναι πιο συχνές σε όγκους κάτω από συνεχή έκθεση με 56% σε σχέση με όγκους σε εσωτερικά μέρη όπου δεν εκτίθενται στον ήλιο που είχαν 21% (Ball, et al, 1994, Jafari, et al, 1995, van Elsas, et al, 1996). Οι πιο συχνά παρατηρούμενες μεταλλάξεις ήταν στα κωδικόνια 12, 13 και 61 και οδηγούσαν στην απώλεια της ενδογενούς ενεργότητας GTPάσης του RAS που είχε σαν αποτέλεσμα την συνεχή ενεργοποίηση των μονοπατιών που ελέγχονται από αυτό (Der, et al, 1986, Trahey, et al, 1987, Trahey, et al, 1987). Αυτή η δυσλειτουργία προωθεί τον ανώμαλο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Dumaz, et al, 2006), την μετάσταση (Ackermann, et al, 2005), την αναστολή της απόπτωσης (Kodaki, et

al, 1994, Eskandarpour, et al, 2005) και την χημειοαντίσταση (Kodaki, et al, 1994, Rodriguez-Viciano, et al, 1994).

Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του K-RAS στο μελάνωμα φαίνεται να είναι ένα σπάνιο φαινόμενο που συμβαίνει μόνο στο 2% των περιπτώσεων, με πιο συχνή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 (common missense mutation) (Shukla, et al, 1989, Milagre, et al, 2010). Αυτή η μετάλλαξη επάγει ανάπτυξη χωρίς να είναι απαραίτητη η αγκυροβόλιση των μελανοκύτταρων, ωστόσο είναι λιγότερο ογκογονική συγκριτικά με κύτταρα με N-RAS μεταλλάξεις, δείχνοντας έτσι ότι το K-RAS μπορεί να είναι πιο αδύναμο ογκογόνο σε σχέση με το N-RAS στα μελανοκύτταρα (Whitwam, et al, 2007).

Οι μεταλλάξεις στο H-RAS είναι επίσης σπάνιες, εντοπίζονται στο 1% των μελανωμάτων (Milagre et al., 2010), κυρίως στα σποραδικά μελανώματα, πιθανώς από αύξηση του του γονιδιώματος στο χρωμόσωμα 11p και από ογκογόνες σημειακές μεταλλάξεις (Bastian, et al, 2000). Σε ζωικά μοντέλα, η ογκογονικότητα του μεταλλαγμένου H-RAS^{G12V} έχειδειχθεί να είναι αυξημένη σε ποντίκια με έλλειψη του p16Ink4a (Chin, et al, 1997, 1999), μεταλλάξεις στο p53 (Bardeesy, et al, 2001) και έκθεση σε UV ακτινοβολία (Hacker, et al, 2005).

3.b.i.2. BRAF

Το BRAF είναι ένα από τα τρία RAF γονίδια. Παρόμοια με τα γονίδια RAS, η RAF αναγνωρίστηκε αρχικά ως το κυτταρικό ομόλογο του v-raf, ενός γονιδίου που βρίσκεται σε έναν μετασχηματισμένο ρετροϊό ποντικού (Rapp UR, et al, 1983). Η πρώτη ισομορφή που εντοπίστηκε ήταν CRAF (Rapp UR et al, 1983 Jansen HW et al, 1983). Τα σπονδυλωτά φέρουν δύο άλλες ισομορφές RAF, ARAF και BRAF (Huebner K, et al, 1986, Wellbrock C, et al, 2004, Marais R, et al, 1996, Ikawa S, et al, 1988).

Η BRAF είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, αποτελεί ένα κομμάτι του μονοπατιού των MAPK και είναι μετά το RAS και όταν ενεργοποιηθεί φωσφοριλώνει την MEK (Johnson and Lapadat, 2002) (εικόνα 7). Μεταλλάξεις στο BRAF είναι πολύ συχνές στον ανθρώπινο καρκίνο (7%) με πιο συχνή εμφάνιση στο κακοήθες μελάνωμα (27-70%), καρκίνου του θυρεοειδούς (36-53%), καρκίνου του παχέως εντέρου (5-22%) και καρκίνου των ωοθηκών (30%) (Davies, et al, 2002, Kumar, et al, 2003, Pollock, et al, 2003a, Young, et al, 2005). Έχουν βρεθεί πάνω από 40 ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του BRAF, με την BRAF^{V600E} την πιο κοινή, και απαντά στο 92% των μεταλλάξεων του BRAF στο σποραδικό μελάνωμα και 82% στους καλοήθεις σπίλους, υπονοώντας ότι μπορεί να εμπλέκεται στην εξέλιξη από την καλοήθη προς την καρκινική μορφή (Davies, et al, 2002, Kumar, et al, 2003, Pollock, et al, 2003a). Μία μόνο αλλαγή σε μία βάση (από A σε T στο νουκλεοτίδιο 1,799) αλλάζει την βαλίνη σε γλουταμινικό οξύ στο κωδικόνιο 600 (V600E) του εξονίου 15 που έχει σαν αποτέλεσμα την συνεχή ενεργοποίηση της BRAF κινάσης (Davies, et al, 2002, Gar-nett, et al, 2004, Wan, et al, 2004). Η μετάλλαξη του BRAF^{V600E} βρέθηκε να μετασχηματίζει τους NIH3T3 φιμπροβλάστες και μελανοκύτταρα ποντικού με αποτέλεσμα την αύξηση του πολλαπλασιασμού τους in vitro, ενεργοποίηση της ERK και καρκινογένεση in vivo (Houben, et al, 2004, Ikenoue, et al, 2004, Wan, et al, 2004, Wellbrock, et al, 2004a). Όμως οι καλοήθεις σπίλοι με μετάλλαξη στο BRAF εμφανίζουν χαρακτηριστικά σταματήματος της κυτταρικής ανάπτυξης εμπειροχόμενου και ενός μάρκερ που παρουσιάζουν τα γηρασμένα κυττάρα, την β-γαλακτοζιδάση (Michalogliou, et al, 2005, Gray-Schopfer, et al, 2006, Dhomen, et al, 2009). Αυτό μπορεί να υπονοεί ότι χρειάζονται και άλλες μεταλλάξεις για να προωθήσουν την καρκινογένεση στα μελανοκύτταρα, και υποστηρίζεται από μελέτες όπως τέτοιες που δείχνουν ότι η έλλειψη του p53 οδηγεί στην μετατροπή σε μελάνωμα (Patton, et al, 2005). Ωστόσο, είναι επίσης πιθανό ότι οι καλοήθεις σπίλοι με μεταλλαγμένο BRAF γονίδιο μπορούν κάποια στιγμή να αποφύγουν τη γήρανση αυτή και να εξελιχτεί σε

μελάνωμα, πράγμα το οποίο μπορεί να εξηγήσει τα αυξημένα ποσοστά μεταλλάξεων στο σποραδικό μελάνωμα (Wellbrock, et al, 2004b, Dhomen, et al, 2009). Τα αποτελέσματα άλλων λιγότερο συχνών μεταλλάξεων στην BRAF έχουν επίσης μελετηθεί. Μέσα σε αυτά είναι η BRAF^{V600K} που βρίσκεται στο 12% και οι BRAF^{V600R} και BRAF^{V600D} που και οι δύο βρίσκονται στο ~5% (Lonly, et al, 2012). Αυτές οι μεταλλάξεις, όπως και η BRAF^{V600E} έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας της BRAF κινάσης που οδηγεί στην αύξηση την φωσφορυλίωσης των MEK και ERK (Wan, et al, 2004). Η παρουσία BRAF μεταλλάξεων έχει συσχετιστεί με μια δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς με μελάνωμα (Mann GJ, et al, 2013, Long GV, et al, 2011).

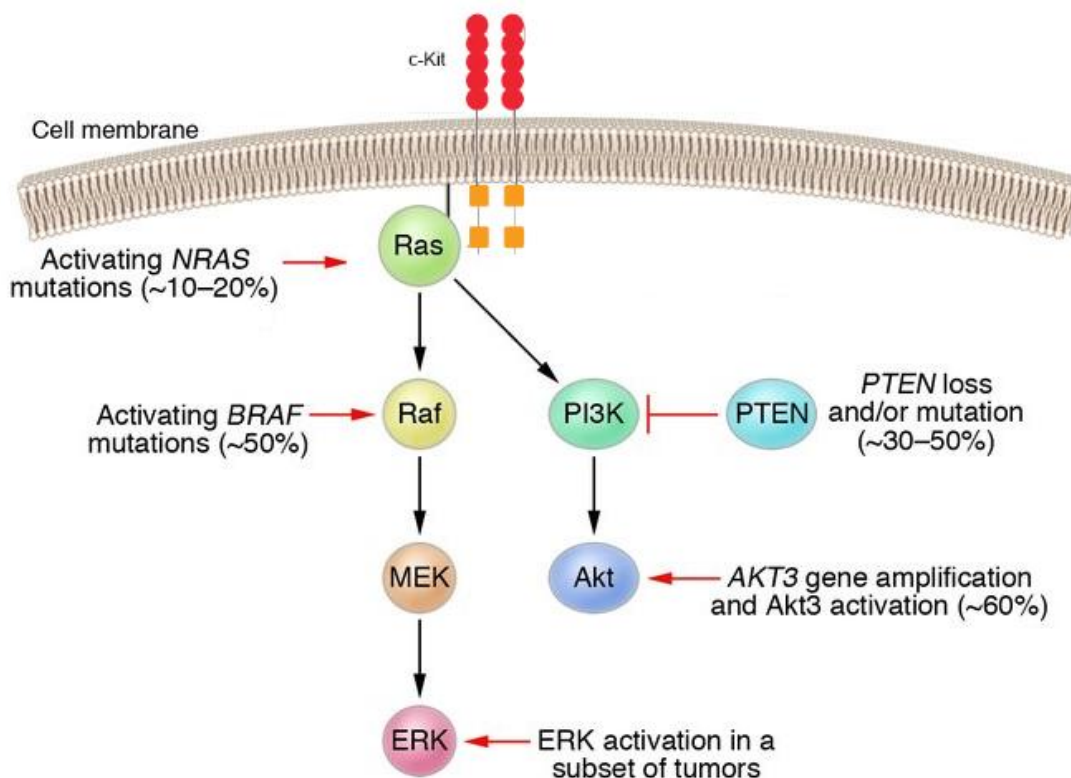
3.b.i.3. MEK 1 και 2

Η MEK 1 και 2 είναι κινάσες που φωσφορυλιώνουν υπολείμματα τυροσίνης και θρεονίνης στις ERK1/2 κινάσες (Roskoski, 2012) (εικόνα 7). Οι μεταλλάξεις MEK είναι σπάνιες σε καρκίνους του ανθρώπου με ελάχιστα μεταλλαγμένα περιστατικά που ανιχνεύονται στον καρκίνο του πνεύμονα (Marks, et al, 2008, Sasaki, et al, 2010) και στον καρκίνο των ωοθηκών (Ester, et al, 2007). Αναλύσεις όγκων ανθρώπινου μελανώματος έχουν επίσης δείξει χαμηλή επίπτωση (3-8%) σωματικών μεταλλάξεων στο MEK (Murugan, et al, 2009, Nikolaev, et al, 2012).

3.b.i.4. KIT

Το KIT είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας τυροσινικής κινάσης τύπου III. Η κλασική ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα με τη σύνδεση ενός προσδέτη, οδηγώντας σε διμερισμό του υποδοχέα και αυτοφωσφορυλίωση υπολειμμάτων τυροσίνης. Οι καθοδικοί στόχοι που ενεργοποιούνται από το KIT είναι τα μονοπάτια MAPK, η PI3K/AKT και JAK/STAT (εικόνα 7).

Η συχνότητα των μεταλλάξεων του KIT ποικίλει (2% -21%) ανάλογα με τον υπότυπο μελανώματος (Kong Y, et al, 2011, Handolias D, et al, 2010, Curtin JA, et al, 2006). Μεγαλύτερες μελέτες που έλαβαν επιλεκτικά ασθενείς με ήδη ανιχνευμένες αλλοιώσεις στο KIT έδειξαν αποκρίσεις σε θεραπεία, κυρίως σε εκείνες τις περιπτώσεις με μεταλλάξεις στο εξόνιο 11 (L576P) και το εξόνιο 13 (K642E) (Guo J et al, 2011, Carvajal RD, et al, 2011, Hodi FS, et al, 2013).

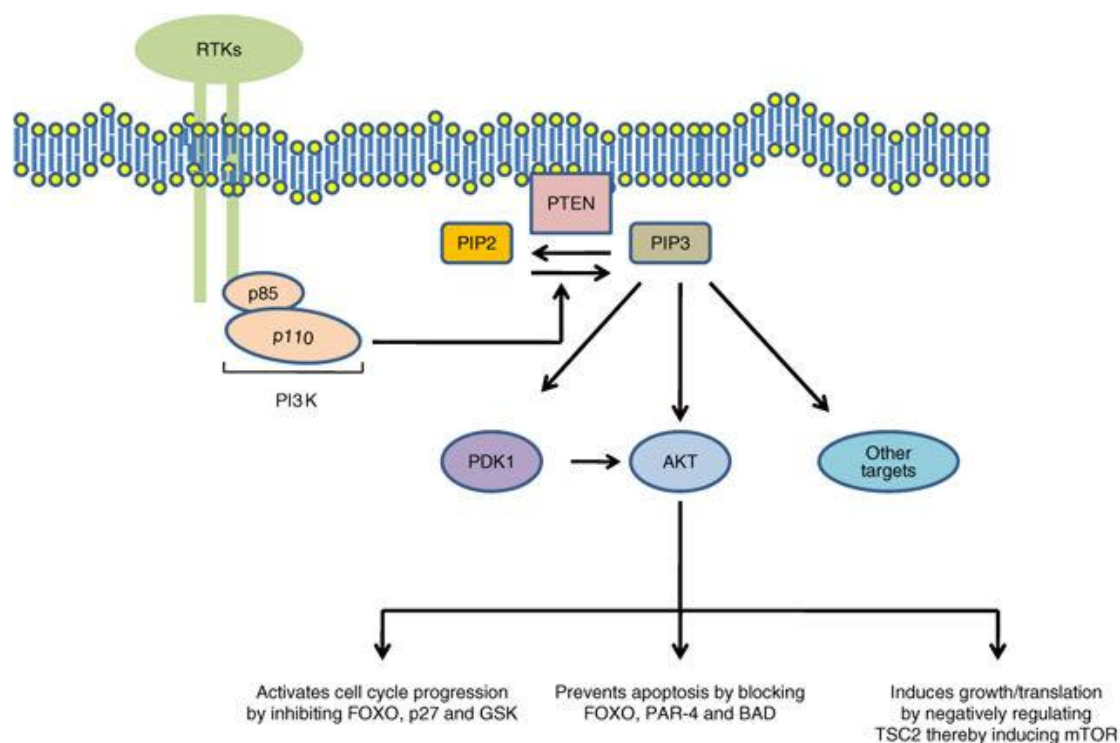


Εικόνα 7: Το μονοπάτι των MAP κινασών στο δερματικό μελάνωμα. Η οδός των (MAPK) ενεργοποιείται φυσιολογικά με δέσμευση αυξητικού παράγοντα στον υποδοχ τυροσινικής κινάσης. Το ερέθισμα μεταδίδεται στον πυρήνα μέσω της GTPάσης NRAS και της δραστηριότητας των κινασών των BRAF, MEK και ERK. Μέσα στον πυρήνα αυτό οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Ο κεντρικός ρόλος αυτής της οδού στην μελανοκυτταρική νεοπλασία επισημαίνεται από το γεγονός ότι είτε NRAS είτε BRAF μεταλλάσσεται σε περίπου 80% όλων των δερματικών μελανωμάτων και των μελανοκυτταρικών νευρών. Η οδός PI3K-AKT είναι ένας άλλος σημαντικός ρυθμιστής της κυτταρικής επιβίωσης, της ανάπτυξης και της απόπτωσης. Το RAS ενεργοποιεί το PI3K/AKT μονοπάτι μέσω αλληλεπιδράσεων με την PI3K. Ως αποτέλεσμα, υπάρχει αυξημένη δραστηριότητα της οδού σηματοδότησης PI3K-AKT (Πηγή: Yakov Chudnovsky, et al, 2005).

3.b.ii. Το μονοπάτι PI3K/AKT

Η απορρύθμιση του PI3 / AKT μονοπατιού είναι ένα από τα συχνότερα περιστατικά στον καρκίνο. Αυτό το μονοπάτι είναι ένας κρίσιμος παράγοντας όχι μόνο σε φυσιολογικές διεργασίες αλλά και στην ογκογόνο ανάπτυξη μέσω της θετικής ρύθμισης της εξέλιξης της φάσης G1/S, της αναστολής του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου και της αυξημένης επιβίωσης (Cully et al., 2006, Jiang and Liu, 2008, Yuan et al, 2008). Ενεργοποιείται όταν από οποιαδήποτε από μια ποικιλία μηχανισμών που περιλαμβάνουν ενεργοποιημένους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (Domchek, et al, 1992), αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες συζευγμένες με υποδοχείς αυξητικών παραγόντων 2 (GRB2) (Pawson, 2004) ή το RAS (Kodaki, et al, 1994, Rodriguez-Viciana, et al, 1994, Chan, et al, 2002) παράγεται ένα δεύτερο λιποειδές αγγελιοφόρο μόριο, την 3,4,5 τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη

(PIP3). Η PIP3 με τη σειρά της στρατολογεί τόσο την εξαρτώμενη από την φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη κινάση 1 (PDK1) όσο και την AKT/PKB στη μεμβράνη όπου η PDK1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την AKT/PKB και ενεργοποιεί εμμέσως το mTOR (Hay, et al, 2004, Sarbassov, et al, 2005) (εικόνα 8). Η ενεργοποιημένη AKT έχει πολλαπλές λειτουργίες που περιλαμβάνουν αυξημένο ογκογόνο μετασχηματισμό, επιβίωση, πολλαπλασιασμό, μεταβολισμό ινσουλίνης και ρύθμιση κυτταρικού κύκλου (Stambolic, et al, 1998, Mirza, et al, 2000, Shin, et al, 2002, Stahl, et al, 2004). Η AKT μπορεί επίσης να φωσφορυλιώσει απευθείας το mTOR μέσω της φωσφορυλίωσης (και αδρανοποίησης) του σύμπλοκου Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2), ενός αναστολέα του mTOR (Ma, et al, 2005). Η ενεργοποίηση του mTOR έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της διαθεσιμότητας γλυκόζης στο κύτταρο και στην ογκογένεση (Kim, et al, 2003, Sarbassov, et al, 2005). Η δυσλειτουργία της οδού PI3K / AKT στον καρκίνο μπορεί να συμβεί ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα p110 των υπομονάδων PI3K (Samuels, et al, 2004), στην απώλεια του ογκοκατασταλτικού PTEN, αρνητικού ρυθμιστή της PI3K / AKT (Li, et al, 1997) ή στις μοριακές μεταβολές της AKT (Staal, 1987, Bellacosa, et al, 1995, Cheung, et al, 2008). Στο μελάνωμα, η απώλεια PTEN και η ενίσχυση της AKT είναι κοινά γεγονότα και έχουν τεκμηριωθεί σε μεγάλο βαθμό.



Εικόνα 8: Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K / AKT. Η ενεργοποίηση ενός υποδοχέα τυροσινικής κινάσης ή κάποια πρωτεΐνη όπως το RAS, ενεργοποιεί την PI3K, η οποία φωσφορυλιώνει την PIP 2 για να παράγει PIP 3. Η PIP 3 προσλαμβάνει την PDK1 στη μεμβράνη όπου η δεύτερη φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την AKT, η οποία ρυθμίζει διάφορες κυτταρικές διεργασίες. Ο αναστολέας του μονοπατιού αυτού, ο PTEN αποφωσφορυλιώνει την PIP 3, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα της PIP 3 και αυξάνοντας τα επίπεδα της PIP 2, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη μείωση της δραστηριότητας AKT (Πηγή: M Keniry, et al, 2008).

3.b.ii.1. PTEN

Ένα γνωστό ογκοκατασταλτικό στο χρωμόσωμα 10, το PTEN δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της οδού σηματοδότησης της κινάσης της 3 υδρόξυ- φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K) και εμπλέκεται σε πλήθος καρκίνων. Το PIP3 είναι ένα μόριο κλειδί σηματοδότησης του κυττάρου που καταλύεται από το PIP2 μέσω της PI3K (Salmena, et al, 2008). Το PTEN υδρολύει το PIP3 για να δημιουργήσει PIP2, και έτσι ρυθμίζει αρνητικά την προς τα κάτω σήμανση (Stambolic, et al, 1998, Carracedo, et al, 2008) (εικόνα 8).

Μετά την απώλεια του PTEN, το PIP3 συσσωρεύεται και προάγει την πρόσληψη υποσυνόλου πρωτεϊνών που περιέχουν περιοχή ομολογίας pleckstrin σε κυτταρικές μεμβράνες, συμπεριλαμβανομένων κινάσων σερίνης / θρεονίνης AKT1, AKT2, AKT3 και PDK1 (Stambolic, et al, 1998). Η εξάλειψη, η μετάλλαξη ή η απενεργοποίηση του PTEN οδηγεί σε παρεκκλίνουσα ενεργοποίηση των τελεστών της οδού PI3K (Stambolic, et al, 1998, Suzuki, et al, 1998). Το PTEN αρχικά αναφέρθηκε ότι έχει χαθεί ή μεταλλαχθεί στο 43% κυτταρικών σειρών μελανώματος και στο 38% πρωτογενών μελανωμάτων (Guldberg P, et al, 1997). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει απώλειες στο 63% έως 70% των μελανωμάτων (Bastian BC, et al, 1998, Gast A, et al, 2010). Διάφορες μεταβολές στο PTEN έχουν ταυτοποιηθεί στο μελάνωμα που περιλαμβάνουν, απώλεια αλληλομόρφου στο 20%, αλλοιωμένη έκφραση σε 40% των όγκων και ημιζυγωτικές διαγραφές και αδρανοποίηση σε 57-60% κυτταρικές σειρές μελανώματος (Pollock, et al, 2002, Goel et al, 2006, Li, et al, 2007, Yin, et al, 2008). Η έκτοπη έκφραση του PTEN σε κύτταρα μελανώματος που στερούνται λειτουργικής πρωτεΐνης έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της AKT, αυξάνει την απόπτωση και μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Stewart, et al, 2002). Η μείωση του PTEN αγρίου τύπου με χρήση siRNA έχει αποδείξει ότι έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη φωσφορυλίωση της AKT3 και την οριζόντια ανάπτυξη, πράγμα που ενισχύει τη συμμετοχή της στην παθογένεση του μελανώματος (Stahl, et al, 2004). Η έλλειψη του λειτουργικού PTEN φαίνεται να ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση αυξάνοντας την έκφραση του BCL-2 και μειώνοντας την ευαισθησία σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Wu, et al, 2003, Stahl, et al, 2004, Madhunapantula, et al, 2007). Στο μελάνωμα, η απώλεια του PTEN θεωρείται ότι εμφανίζεται νωρίς στην μελανογένεση, όπως φαίνεται στις πρωτογενείς βλάβες που φέρουν απώλεια ενός αλληλόμορφου του PTEN ή ολόκληρου του χρωμοσώματος 10 (Parmiter, et al, 1988, Bastian, et al, 1998, Wu, et al, 2003). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η απώλεια PTEN μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλες μεταλλάξεις μελανώματος. Σε ένα γενετικώς τροποποιημένο μεταλλαγμένο μοντέλο ποντικού με BRAF μετάλλαξη, η διαγραφή ενός λειτουργικού PTEN μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη κακοήθους μελανώματος (Dankort, et al, 2009). Επιπλέον, άλλες μελέτες έχουν εντοπίσει το λειτουργικό πλεονασμό μεταξύ της απώλειας PTEN και της μετάλλαξης RAS και έχουν δείξει ότι αυτά τα δύο γονίδια είναι αμοιβαία αποκλειώμενα στην ανάπτυξη μελανώματος λόγω της περιττής ενεργοποίησης των οδών PI3K / AKT (Tsao, et al, 2000, 2004). De novo μεταλλάξεις του Ras έχουν παρατηρηθεί σε ένα μοντέλο ποντικών Pten +/- ενώ τα μελανώματα Pten +/- έδειξαν μειωμένη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων Ras, ενώ οι ποντικοί Pten - / - δεν παρουσίασαν καθόλου μεταλλάξεις στο Ras (Mao, et al, 2004). Περαιτέρω, οι Tsao, et al, (2000) παρατηρούσαν παρόμοια αποτελέσματα σε ανθρώπινες κυτταρικές γραμμές μελανώματος όπου κύτταρα με απώλεια PTEN δεν είχαν μεταλλάξεις RAS. Όμως στη μελέτη αυτή επίσης, διαπιστώθηκε ότι μία κυτταρική γραμμή είχε ταυτόχρονη απώλεια PTEN με μετάλλαξη NRAS. Επιπλέον, οι Nogueira et al, (2010) διαπίστωσαν ότι περίπου το 14% των ανθρώπινων μελανωμάτων που αναλύθηκαν σε μια μελέτη είχαν μετάλλαξη NRAS εκτός από την απώλεια του PTEN.

3.b.ii.2. Σύνδρομο Cowden

Το σύνδρομο Cowden είναι μια αμαρτωματική ασθένεια με αυτοσωματικό κυρίαρχο πρότυπο κληρονομικότητας. Προκαλείται κυρίως από μεταλλάξεις στο γονίδιο του PTEN. Τα άτομα με σύνδρομο Cowden διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πολλαπλών καρκίνων, ιδιαίτερα όγκων του μαστού, του νεφρού, του παχέος εντέρου, του ενδομητρίου και του θυρεοειδούς (Liaw D, et al, 1997, Risinger JI, et al, 1997, Bubien V, et al, 2013). Μια μελέτη 154 ασθενών με σύνδρομο καρκινώματος χαραματοειδούς PTEN βρέθηκε επίσης υψηλότερη από το προβλεπόμενο ποσοστό μελανώματος με ποσοστό επικράτησης 6% για ασθενείς με σύνδρομο Cowden (Bubien V, et al, 2013).

3.b.ii.3. AKT

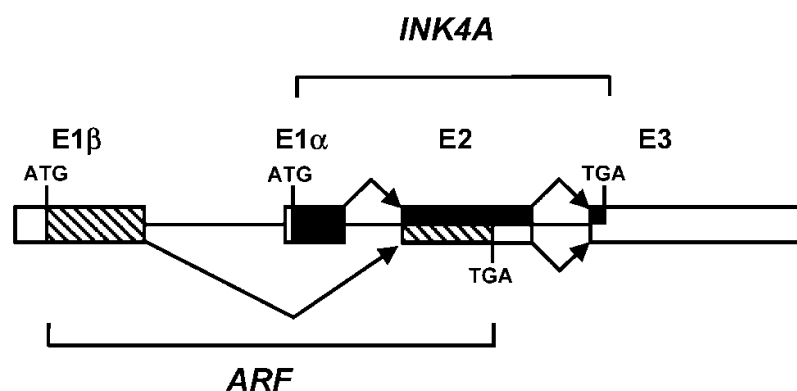
Η 3,4,5 τριφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP3) συνδέεται απευθείας με την PDK1 η οποία μπορεί να φωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει την AKT (Alessi, et al, 1997, Currie, et al, 1997). Η AKT έχει τρεις ισομορφές. AKT1, AKT2 και AKT3 με κάθε ισομορφή κωδικοποιημένη από διαφορετικά γονίδια που έχουν μεγάλο βαθμό δομικών ομοιοτήτων (Staal, 1987, Nakatani, et al, 1999). Μετά τη δέσμευση του PIP3, η PDK1 επάγει την δραστηριότητα κινάσης της AKT 30 φορές με φωσφορυλίωση της στην καταλυτική περιοχή στη θρεονίνη 308 ή με φωσφορυλίωση της στο καρβοξυτελικό υδρόφοβο κομμάτι στη σερίνη 473 από την PDK2 (Alessi, et al, 1997, Toker, et al, 2000). Η φωσφορυλίωση και των δύο θέσεων έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητη για την μέγιστη ενεργοποίηση της AKT (Alessi, et al, 1996). Αυτές οι ενεργοποιημένες κινάσες σερίνης/θρεονίνης AKT με τη σειρά τους πιστεύεται ότι φωσφορυλιώνουν περίπου 9000 πρωτεΐνες με την ελάχιστη αλληλουχία αναγνώρισης: R-X-R-X-X-S / T τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα (Lawlor, et al, 2001). Αυτές οι πρωτεΐνες εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην πρόληψη της απόπτωσης και στην ενεργοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης (Manning, et al, 2007).

Η έκφραση αυτών των τριών ισομορφών AKT έχει δείχθει ότι είναι διαφορετική μεταξύ των ιστών. Η AKT1 εκφράζεται στα περισσότερα όργανα και ιστούς σε υψηλά επίπεδα. Η έκφραση της AKT2 είναι κατά προτίμηση αυξημένη σε ευαίσθητους στην ινσουλίνη ιστούς όπως το ήπαρ, τους μύες και τον λιπώδη ιστό, ενώ η AKT3 εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο και στους όρχεις (Dong, et al, 1999, Zinda, et al, 2001, Franke, et al, 2008). Η έκφραση ωστόσο δεν συνεπάγεται πάντοτε ενεργοποίηση (Stahl, et al, 2004). Και οι τρεις ισομορφές της AKT έχουν συνδεθεί με καρκίνους του στομάχου, του μαστού, του παγκρέατος και των ωοθηκών (Staal, et al, 1987, Cheng, et al, 1992, 1996, Bellacosa, et al, 1995). Οι δυσπλαστικοί σπίλοι και τα μελανώματα παρουσιάζουν αυξημένη φωσφορυλίωση της AKT σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ή ελαφρώς δυσπλαστικούς σπίλους (Dhawan, et al, 2002). Οι AKT2 και AKT3 εμφανίστηκαν ως οι κυρίαρχες μορφές που απορρυθμίζονται στο μελάνωμα. Η ενεργοποιημένη AKT3 έχει ανιχνευθεί στο 43-60% του σποραδικού μεταστατικού μελανώματος σε σύγκριση με τα φυσιολογικά μελανοκύτταρα, μια παρατήρηση που αποδίδεται στον αυξημένο αριθμό αντιγράφων του γονιδίου AKT3 (Stahl, et al, 2004). Επιπλέον, τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης AKT3 βρέθηκαν να συσχετίζονται με την εξέλιξη του μελανώματος υποδηλώνοντας ότι η AKT3 μπορεί να έχει κάποιο ρόλο στην επιθετικότητα των μελανωμάτων (Stahl, et al, 2004). Εκτός από την αύξηση του αριθμού των αντιγράφων που οδηγεί σε ακατάλληλη ενεργοποίηση του AKT3, έχει αποδειχθεί ότι και η απώλεια του PTEN συμβάλλει στην αύξηση της ενεργοποίησης της AKT3. Η καταστολή του PTEN με χρήση siRNA οδήγησε σε αυξημένη φωσφορυλίωση της AKT3 τόσο σε μελανοκύτταρα όσο και σε κύτταρα ανθρώπινου

μελανώματος (Stahl, et al, 2004). Η μείωση της AKT3 από siRNA οδηγεί στην μείωση της κυτταρικής επιβίωσης και της ανάπτυξης του όγκου (Stahl, et al, 2004, Tran, et al, 2008). Η AKT3 έχει επίσης αποδειχθεί ότι συμμετέχει στην αντοχή των κυττάρων σε αναστολείς BRAF και η καταστολή της AKT3 μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένες κλινικές αποκρίσεις με αναστολείς BRAF (Shao, et al, 2010). Η υπερενεργοποίηση της AKT2 έχει επίσης εντοπιστεί στον καρκίνο του μελανώματος, του μαστού και των ωθηκών (Arboleda, et al, 2003, Yuan, et al, 2003, Nogueira, et al, 2010, Shin, et al, 2010). Η έκφραση του AKT2 στο μελάνωμα έχει καθιερωθεί σε πολλά διαφορετικά μοντέλα μελανώματος, με υπόβαθρο μεταλλαγμένου Ras (Nogueira, et al, 2010). Η διαμόρφωση των επιπέδων έκφρασης Akt2 σε ένα επαγόμενο σύστημα siRNA οδηγεί σε καταστολή ανάπτυξης *in vitro* και *in vivo* (Shin et al., 2010). Οι Nogueira, et al, (2010) έχουν επίσης δείξει ότι η απώλεια PTEN σε ένα υπόβαθρο μετάλλαξης του RAS μπορεί να οδηγήσει σε επιλεκτική ενεργοποίηση του AKT2. Αυτή η ρύθμιση της AKT2 βρέθηκε ότι συμβάλλει στην αύξηση του κυτταρικού μετασχηματισμού, της διεισδυτικότητας των κυττάρων μελανώματος και στην μείωση της έκφρασης της E-καντερίνης. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας μια συμπληρωματική γενετική προσέγγιση, ένα *dominant negative* μετάλλαγμα της AKT2 οδήγησε σε μείωση της επιθετικότητας των κυττάρων μελανώματος (Nogueira, et al., 2010). Ανεξάρτητα από το ποια ισομορφή της AKT εμπλέκεται στο μελάνωμα, η οδός PI3K / AKT είναι ένας σημαντικός θεραπευτικός στόχος στο μελάνωμα.

3.b.iii. Ο γονιδιακός τόπος του CDKN2A /p16INK4A/p14ARF στα μονοπάτια Rb και p53

Το CDKN2A (επίσης γνωστό ως P16, INK4A, MTS1 ή MLM) ήταν ο πρώτος υψηλού βαθμού ευαισθησίας γενετικός τόπος του μελανώματος που εντοπίστηκε σε οικογένειες με μελάνωμα (Hussussian CJ, et al, 1994) και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9p21 (Cannon-Albright LA, et al, 1992). Μεταγενέστερες μελέτες αυτής της θέσης αναγνώρισαν το CDKN2A, ένα γονίδιο που ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο (Hussussian CJ, et al 1994, Kamb A, et al, 1994, Kamb A, et al 1994) και έχει εναλλακτικά πλαίσια ανάγνωσης που κωδικοποιούν δύο πρωτεΐνες, την p14ARF και την p16INK4A (Quelle DE, et al, 1995). Οι μεταλλάξεις στην περιοχή της επικαλυπτόμενης κωδικοποίησης επηρεάζουν συνήθως τη δομή και των δύο πρωτεϊνών (εικόνα 9).

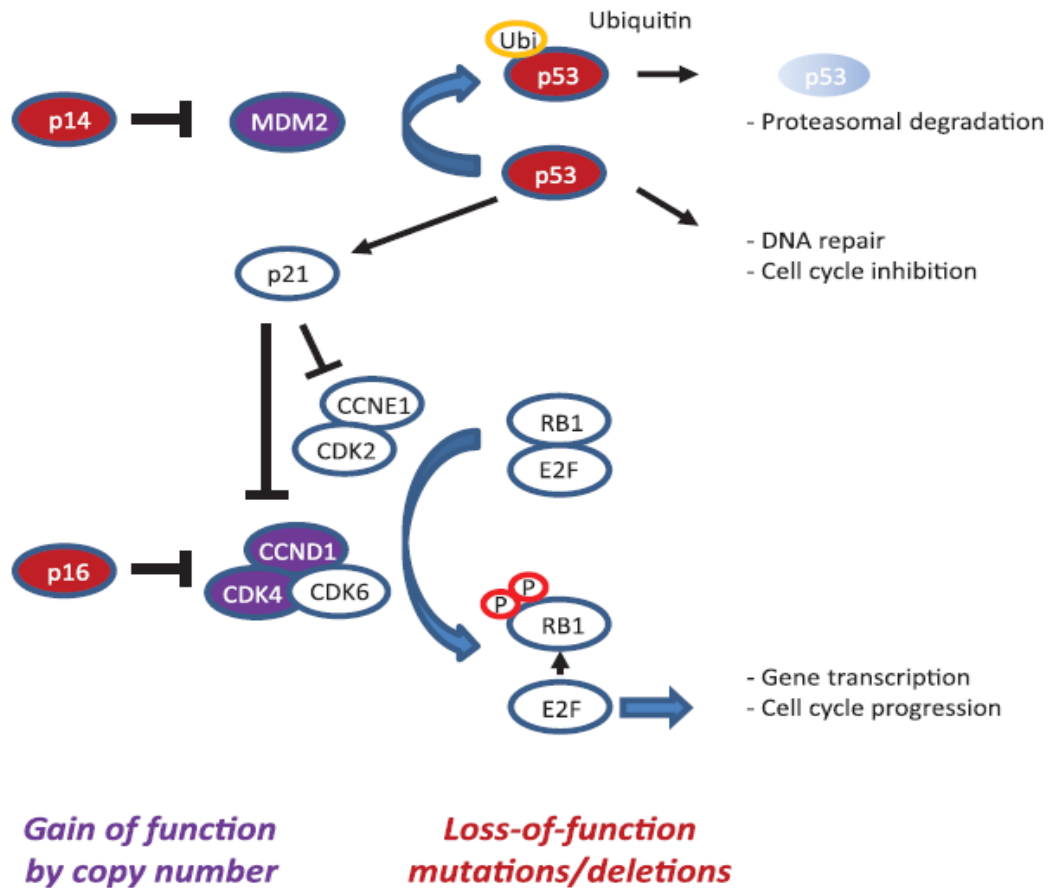


Εικόνα 9: Ο γενετικός τόπος CDKN2A. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί δύο ισχυρούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου που λειτουργούν σε γενετικά διακριτές οδούς (p16INK4a στο μονοπάτι του RB και p14ARF στο μονοπάτι του p53) (Πηγή: Nicholas K Hayward, 2003).

Το p16INK4A ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο ρυθμίζοντας αρνητικά τις κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη (CDKs) 4 και 6, εμποδίζοντας έτσι τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) (Lukas J, et al, 1995, Koh J, et al, 1995). Η φωσφορυλίωση της Rb έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του παράγοντα μεταγραφής E2F, επιτρέποντας τη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 σε S (Weinberg RA, et al, 1995). Το p14ARF είναι θετικός ρυθμιστής του p53, καθώς αναστέλλει την MDM2, μια λιγάση ουμπικουϊτίνης που στοχεύει την p53 για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Μία λειτουργία της p53 είναι η επαγωγή της p21, η οποία παρεμποδίζει την φωσφορυλίωση του Rb (Weinberg RA, et al, 1995) (εικόνα 10).

Μεταλλάξεις στο CDKN2A, οδηγούν στην απώλεια των p16INK4a και p14ARF και στη διάταρραξη των μονοπατιών των RB και p53, αντίστοιχα. Περίπου το 30-40% των συγγενικών οικογενειών μελανωμάτων έχει βρεθεί ότι φιλοξενούν μεταλλάξεις στο CDKN2A, τη συνηθέστερη γονιδιακή μετάλλαξη που παρατηρείται σε οικογένειες μελανώματος (Goldstein AM, et al, 2007). Οι περισσότερες μεταλλάξεις στο CDKN2A συμβαίνουν στα εξόνια 1α και 2, αν και έχουν αναφερθεί επίσης πολλαπλές διαφορετικές μεταλλάξεις, οι οποίες είναι μοναδικές για συγκεκριμένους πληθυσμούς και τη γεωγραφική τους προέλευση. Το CDKN2A είναι επίσης το πιο συχνά επηρεασμένο γονίδιο καταστολής όγκου στο σποραδικό μελάνωμα (Curtin JA, et al, 2005). Απώλειες του CDKN2A, συχνά διαλληλικές, εντοπίζονται στο 50% έως 80% των σποραδικών μελανωμάτων (Bastian BC, et al, 1998, Gast A, et al 2010, Bennett DC, et al, 2008) και η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου έχει περιγραφεί στο 9% έως 28% των όγκων (Bennett DC, et al, 2008).

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο CDKN2A σχετίζονται επίσης με την αύξηση άλλων καρκίνων στον άνθρωπο, γεγονός που υποδηλώνει τον ευρύτερο ρόλο του στην καρκινογένεση. Δεδομένα από τη μελέτη γονιδίων, περιβάλλοντος και μελανώματος (GEM) κατέδειξαν κατά προσέγγιση 50% αυξημένο κίνδυνο μη μελανωματικού καρκίνου σε συγγενείς πρώτου βαθμού ατόμων που φέρουν την CDKN2A μετάλλαξη σε σύγκριση με συγγενείς πρώτου βαθμού από οικογένειες με σποραδικά μελάνωμα (Mukherjee B, et al, 2012). Πολλοί καρκίνοι έχουν αναφερθεί ότι είναι αυξημένοι σε αυτόν τον συγκεκριμένο πληθυσμό υψηλού κινδύνου, όπως ο καρκίνος του παγκρέατος, του γαστρεντερικού, του πνεύμονα, του μαστού και του καπνού (Mukherjee B, et al, 2012, Goldstein AM, et al, 1995, Helgadottir H, et al, 2014, Potrony, et al, 2014).



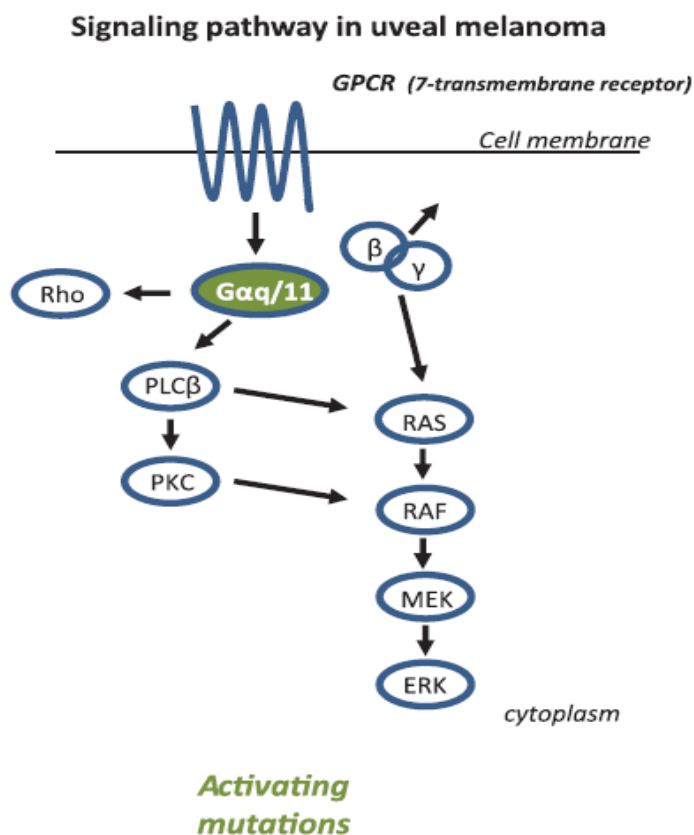
Εικόνα 10: Μεταβολές στους μηχανισμούς ρύθμισης ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Τα προϊόντα πρωτεΐνης του *CDKN2A*, *p14* (*p14ARF*) και *p16* (*p16INK*) ρυθμίζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Το *p16* αναστέλλει την εξαρτώμενη από την κυκλίνη D1 (*CCND1*) ενεργοποίηση των κινασών 4 και 6 (*CDK4*, *CDK6*) και έτσι αποτρέπει τη φωσφορυλίωση του *RB1*. Το φωσφορυλιωμένο *RB1* οδηγεί στη διάσπασή του από την *E2F* και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η *p14* αναστέλλει τη λειτουργία της *MDM2*, η οποία κανονικά ουβικουινώνει την *p53*, στοχεύοντάς την σε αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Η *p53* επάγει την έκφραση *p21*, η οποία αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου τόσο μέσω αναστολής των *CCND1* και *CDK4* / 6 όσο και των *CDK2* και *CCNE1*. Η απομάκρυνση τόσο της *p14* όσο και της *p16* οδηγεί σε μη ρυθμισμένες αυξήσεις στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (Πηγή: Klaus G, et al, 2013).

3.b.iv. Άλλα γονίδια που μπλέκονται στην εμφάνιση ή εξέλιξη του μελανώματος

3.b.iv.1. GNAQ / GNA11.

Τα GNAQ και GNA11 είναι δύο μέλη της οικογένειας Ga των πρωτεϊνών G. Και οιράζονται 90% ομολογία στο επίπεδο αμινοξέων (Hubbard KB, et al, 2006). G πρωτεΐνες υπάρχουν ως ετεροτριμερή α, β και γ υπομονάδων (Dorsam RT, et al, 2007). Η φυσιολογική ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα μέσω δέσμευσης ενός συνδέτη στον υποδοχέα, οδηγώντας σε δέσμευση του GTP στις Ga και Gα11 (μεταφρασμένες πρωτεΐνες GNAQ και GNA11, αντίστοιχα) και την αποσύνδεσή τους από το σύμπλοκο ετεροδιμερούς πρωτεΐνης G. Τα ευρέως αναγνωρισμένα συμβάντα σηματοδότησης του Ga και Gα11 είναι η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C beta, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση του σχηματισμού

πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και διακυβλυκερόλης, καθώς και στην ενεργοποίηση του Rho (Mizuno N, et al, 2009) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Οδοί σηματοδότησης στο μελάνωμα του αμφιβλοστορηδή. Ενε Οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στα GNAQ και GNA11 είναι τα πιο κοινά ογκογονικά συμβάντα (Πηγή: Klaus G, et al, 2013).

Μεταλλάξεις σε GNAQ και GNA11 συμβαίνουν σε 80% έως 90% των μελανωμάτων του αμφιβλοστορηδή (Van Raamsdonk CD, et al, 2009, Van Raamsdonk CD, et al, 2010). Οι μεταλλάξεις είναι επίσης συχνές και στα μελανοκύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος (Kusters-Vandeveldel HV, et al, 2010, Wiesner T, et al, 2012) αλλά είναι πολύ σπάνιες σε μελανώματα του δέρματος (<1%) (Van Raamsdonk CD, et al, 2010). Οι συχνότερες μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν και στα δύο γονίδια είναι οι μεταλλάξεις εξονίου 5 Q209 (> 90%) και του εξονίου 4 R183 (περίπου 5%). Όλες οι μεταλλάξεις οδηγούν στην αναστολή της λειτουργίας της GTPάσης που οδηγεί στην παρατεταμένη δεσμευμένη με GTP, με αποτέλεσμα την συνεχή ενεργοποίηση (Kleuss C, et al, 1994). Μέχρι σήμερα, η αναγνώριση αυτών των μεταλλάξεων δεν έχει μεταφραστεί σε επιτυχή θεραπεία με στοχοθετημένες θεραπείες, αλλά βρίσκονται σε εξέλιξη κλινικές δοκιμές με αναστολείς PKC και MEK καθώς και με άλλους παράγοντες.

3.b.iv.2. NF1.

Το NF1 είναι ένα γονίδιο καταστολής όγκου το οποίο απενεργοποιείται με γαμετικές μεταλλάξεις σε ασθενείς με νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (Wallace MR, et al, 1990, Viskochil D, et al, 1990, Cawthon RM, et al, 1990). Αδρανοποιείται σε έναν αριθμό κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένων των αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα, των

νευροβλαστωμάτων και των γλοιοβλαστωμάτων (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008, , Ding L, et al, 2008, Parsons DW, et al, 2008, Holzel M, et al, 2010). Το NF1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, την νευροφίμπρομίνη 1, η οποία αλληλεπιδρά με την RAS και ρυθμίζει αρνητικά τη λειτουργία της προάγοντας την υδρόλυση του συνδεδεμένου με RAS GTP σε GDP (Martin GA, et al, 1990). Η λειτουργική απενεργοποίηση του NF1 οδηγεί έτσι στην ενεργοποίηση του RAS και των καθοδικών οδών σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των οδών MAPK, PI3K / AKT και mTOR (Johannessen CM, et al, 2005, Dasgupta B, et al, 2005). Δύο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το NF1 μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των μελανωμάτων με μετάλλαξη στο BRAF, καθώς και σε όγκους ανθεκτικούς σε αναστολείς BRAF (Whittaker SR, et al, 2013, Maertens O, et al, 2013). Αν και η απώλεια NF1 σε BRAF μεταλλαγμένους όγκους οδήγησε σε αντίσταση σε ορισμένους αναστολείς BRAF (δηλ. PLX4720) και αναστολείς MEK, οι όγκοι εξακολουθούσαν να ανταποκρίνονται στη θεραπεία είτε με συνδυασμό αναστολέα MEK και mTOR, μη αναστρέψιμου αναστολέα RAF (AZ628) έναν αναστολέα ERK. Επομένως, ο προσδιορισμός της κατάστασης του NF1 στα μελανώματα μπορεί να είναι σημαντικός για τη λήψη αποφάσεων για τη θεραπεία.

3.b.iv.3. BAP1.

Η BAP1 (πρωτεΐνη 1 σχετιζόμενη με BRCA1) είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη της οποίας το γονίδιο βρήσκειται στο χρωμόσωμα 3. Περιγράφηκε για πρώτη φορά ως μια πρωτεΐνη που συνδέεται στην BRCA1 που ανέστειλε την κυτταρική ανάπτυξη (Jensen DE, et al, 1998). Η δραστηριότητα της υδρολάσης της ουβικιτίνης και ο πυρηνικός εντοπισμός της BAP1 αποδείχθηκε ότι είναι σχετικός με την καταστολή όγκων (Ventii KH, et al, 2008).

Η BAP1 αναγνωρίστηκε αρχικά σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και του πνεύμονα (Jensen DE, et al, 1998). Άλλες αναφορές έχουν εντοπίσει απώλειες ή απενεργοποιητικές μεταλλάξεις σε έναν αριθμό άλλων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου καρκίνου του μαστού (Wood LD, et al, 2007), καρκίνου νεφρού (Pena-Lloris S, et al, 2012), μεσοθηλιώματος (Bott M, et al, 2011, Carbone M, et al, 2013) και μελανώματος (Wiesner T, et al, 2012, Wiesner T, et al, 2011). Οι μεταλλάξεις των γαμετικών κυττάρων στην BAP1 προδιαθέτουν στην ανάπτυξη διαφόρων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων του οφθαλμικού μελανώματος, των διακριτικών επιθηλιοειδών μελανοκυτταρικών όγκων του δέρματος (Wiesner T, et al, 2011), του μεσοθωρακίου του καρκίνου (Abdel-Rahman MH et al, 2011), του μεσοθηλιώματος (Testa JR et al, 2011), του δερματικού μελανώματος (Wiesner T, et al, 2011) και άλλων.

3.b.iv.4. CDK4 και CDK6

Οι μεταλλάξεις βλαστικής σειράς στα CDK4 και CDK6 επιτρέπουν στα κύτταρα να προχωρήσουν μέσω του κυτταρικού κύκλου πιο γρήγορα παρόμοια με εκείνη που παρατηρείται με μεταλλάξεις στο CDKN2A. Οι μεταλλάξεις στο CDK4 είναι πολύ σπάνιες, αλλά έχουν περιγραφεί σε μικρό αριθμό οικογενειών με μελάνωμα αρνητικό κατά CDKN2A (Goldstein AM, et al, 2000, Puntervoll He, et al, 2013). Αυτές οι μεταλλάξεις στο CDK4 καταλήγουν σε τροποποιημένη πρωτεϊνική δομή καθιστώντας την ανθεκτική στις ανασταλτικές επιδράσεις του p16 και οι ασθενείς που φέρουν αυτές τις μεταλλάξεις δεν μπορούν φαινοτυπικά να διακριθούν από εκείνους με μεταλλάξεις βλαστικής σειράς CDKN2A (Puntervoll He et al., 2013). Παρά τις ανάλογες λειτουργίες των CDK4 και CDK6, οι μεταλλάξεις των γεννητικών σειρών στο CDK6 δεν έχουν ακόμη αναφερθεί σε οικογένειες με τάση εμφάνισης μελανώματος. Η σημασία της οδού CDKN2A / CDK / RB στο μελάνωμα και την καρκινογένεση υπογραμμίζεται περαιτέρω από την παρατήρηση ότι φορείς

μεταλλάξεων RB1 βλαστικής σειράς έχουν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο μελανώματος (Fletcher O, et al, 2004).

3.b.v. Γονίδια με μικρή διεισδυτικότητα

3.b.v.1. MC1R

Τοποθετημένο στο χρωμόσωμα 16, το γονίδιο του υποδοχέα μελανοκορτίνης 1 (MC1R) είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας συζευγμένος με G πρωτεΐνες που δεσμεύει την ορμόνη διέγερσης μελανοκυττάρων άλφα (α -MSH) και στην συνέχεια παράγει cAMP μέσω της αδενυλικής κυκλάσης. Αυτή η αύξηση του cAMP προάγει την παραγωγή της καφέ / μαύρης εμυελανίνης έναντι της κόκκινης / κίτρινης χρωστικής φαιομελανίνης. Οι λειτουργικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου MC1R είναι συνηθισμένοι στο γενικό πληθυσμό. Ειδικές παραλλαγές του MC1R διαταράσσουν την σηματοδότηση και την έκφραση του υποδοχέα του α -MSH στην κυτταρική επιφάνεια, που έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη αναλογία παραγωγής φαιομελανίνης. Οι παραλλαγές του γονιδίου MC1R είναι παρούσες σε περισσότερο από 80% των ατόμων με ανοιχτόχρωμα δέρμα και / ή με τον φαινότυπο του κόκκινου χρώματος των μαλλιών (RHC) (Valverde P, et al, 1995).

Οι Valverde et al. ήταν οι πρώτοι που περιγράφουν τη συσχέτιση μεταξύ μη-συνώνυμων μεταλλάξεων του MC1R και του αυξημένου κινδύνου για το μελάνωμα (Valverde P, et al, 1995). Αναφέρουν σημαντικά αυξημένο αριθμό παραλλαγών του MC1R σε περιπτώσεις μελανώματος έναντι των control και σχεδόν τέσσερις φορές αυξημένο κίνδυνο μελανώματος στους φορείς. Η αυξημένη επικράτηση των παραλλαγών του MC1R σε περιπτώσεις μελανώματος σε σύγκριση με τα control έχει επιβεβαιωθεί σε πολυάριθμες μετέπειτα μελέτες (Kennedy C, et al, 2001, Landi MT, et al, 2005, Palmer JS, et al, 2000, Pasquali E, et al, 2015). Οι παραλλαγές του MC1R εμφανίζουν περίπου διπλάσια έως τετραπλάσια αύξηση του κινδύνου μελανώματος και αυτός ο κίνδυνος φαίνεται να είναι πρόσθετος σε άτομα που μεταφέρουν περισσότερες από μία παραλλαγές (Palmer JS, et al, 2000, Pasquali E, et al, 2015). Είναι ενδιαφέρον ότι η συσχέτιση μεταξύ των παραλλαγών του MC1R και της ευαισθησίας στο μελάνωμα φαίνεται να είναι ισχυρότερη σε άτομα με σκούρο χρώμα δέρματος, υποδηλώνοντας ότι οι παραλλαγές του MC1R μπορεί να προάγουν την ανάπτυξη μελανώματος μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος είναι τουλάχιστον εν μέρει ανεξάρτητος από την δερματική χρώση (Kanetsky PA, et al, 2010).

Οι παραλλαγές του MC1R αλληλεπιδρούν επίσης με τον κίνδυνο άλλων γονιδίων, όπως του CDKN2A, για να αυξήσουν τον κίνδυνο μελανώματος. Μια μελέτη εξέτασε 815 μεταλλάξεις του CDKN2A από 186 οικογένειες και διαπίστωσε ότι η παρουσία μίας από τις τέσσερις πιο συνηθισμένες παραλλαγές του MC1R (V60L, V92M, R151C και R160W) αύξησε τον κίνδυνο μελανώματος ενός ατόμου δύο φορές και η παρουσία δύο ή περισσότερων παραλλαγών αύξησε τον κίνδυνο μελανώματος σχεδόν έξι φορές (Demenaïs F, et al, 2010). Μετά τη στρωματοποίηση για το χρώμα των μαλλιών, ο αυξημένος κίνδυνος μελανώματος σε αυτόν τον πληθυσμό περιοριζόταν σε φαινότυπους καστανής ή μαύρης τρίχας, παρέχοντας έτσι περαιτέρω στοιχεία για το ότι ο ρόλος του MC1R στην παθογένεση του μελανώματος είναι ανεξάρτητος από την επίδρασή του στην χρώση.

3.b.v.2. MITF

Ο μεταγραφικός παράγοντας που σχετίζεται με τη μικροφθαλμία (MITF) έχει σημαντικές λειτουργίες στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των μελανοκυττάρων. Ενεργοποιείται επίσης καθοδικά της οδού σηματοδότησης MC1R / cAMP

για την παραγωγή της ευμελανίνης. Η ταυτοποίηση της παραλλαγής του MITF E318K, μια μετάλλαξη κέρδους λειτουργίας, βρέθηκε τόσο σε οικογενειακά όσο και σε σποραδικά μελανώματα (Yokoyama, S et al, 2011). Αυτή η μετάλλαξη ελαττώνει την συγγένεια σύνδεσης με την πρωτεΐνη τροποποιητή τύπου ουμικουιτίνης (SUMO) (small-ubiquitin-like modifier protein), έναν μεταγραφικό ρυθμιστή που οδηγεί σε απορύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η παραλλαγή E318K προσδίδει μια κατά προσέγγιση διπλάσια αύξηση του μελανώματος και σχετίζεται με συγκεκριμένους φαινότυπους, συμπεριλαμβανομένου του μη-μπλε χρώματος των ματιών, της αυξημένου αριθμού σπύλων, και των πολλαπλών πρωτογενών μελανωμάτων (Berwick M, et al, 2014). Έχει επίσης βρεθεί ότι σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο άλλων κακοηθειών, όπως οι νεφρικοί και οι παγκρεατικοί καρκίνοι (Yokoyama S, et al, 2011, Bertolotto C, et al, 2011, Ghiorzo P, et al, 2013).

3.b.v.3. POLE

Το γονίδιο της DNA πολυμεράσης έψιλον (POLE) κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα για την DNA πολυμεράση ε και εμπλέκεται στην επισκευή DNA. Οι γαμετικές μεταλλάξεις που επηρεάζουν τις περιοχές διόρθωσης του POLE έχουν αναφερθεί ότι προδιαθέτουν τα προσβεβλημένα άτομα σε αδενώματα και καρκινώματα του παχέος εντέρου (Palles C et al, 2013). Πρόσφατα, μία ομάδα βρήκε μια νέα γενετική μετάλλαξη στο POLE στους γαμέτες σε 7 περιπτώσεις οικογενειακού δερματικού μελανώματος στην Αυστραλία. Νέες και σπάνιες παραλλαγές του POLE εν συνεχεία εντοπίστηκαν σε 10 επιπλέον περιπτώσεις (Aoude LG, et al, 2015). Είναι ενδιαφέρον ότι τα προσβεβλημένα άτομα εμφανίστηκαν να διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για πολλαπλούς άλλους καρκίνους συμπεριλαμβανομένου του νεφρικού μελανώματος, καρκίνου του προστάτη και του παχέος εντέρου. Επιπρόσθετες μελέτες είναι απαραίτητες για την επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων και τον προσδιορισμό του βαθμού κινδύνου για το μελάνωμα που σχετίζεται με κληρονομικές μεταλλάξεις POLE.

3.b.vi. Γονίδια συντήρησης των τελομερών

3.b.vi.1. TERT

Το γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης (TERT) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5 και κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης. Το ένζυμο της τελομεράσης διατηρεί το μήκος των τελομερών, εμποδίζοντας το κύτταρο από βλάβες και την απόπτωση. Η τελομεράση συνήθως ανιχνεύεται σε ταχέως διαχωρισμένα κύτταρα, όπως τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και των πνευμόνων. Οι μεταλλάξεις στην περιοχή του υποκινητή του TERT έχουν ταυτοποιηθεί σε έναν αριθμό πρωτοπαθών καρκίνων (Vinagre J, et al, 2013, Horn S, et al, 2013, Tapper W, et al, 2015). Οι μεταλλάξεις του υποκινητή του TERT στο οικογενειακό μελάνωμα έχουν εντοπιστεί, αλλά είναι εξαιρετικά σπάνιες (Horn S, et al, 2013, Harkand M, et al, 2016). Σε μία μελέτη οι Horn et al, εξετάζοντας μια γερμανική οικογένεια με 14 περιπτώσεις, το 33% των πρωτογενών μελανωμάτων και το 85% του μεταστατικού ιστού που αναλύθηκαν περιείχαν μεταλλάξεις στον υποκινητή του TERT (Horn S, et al, 2013). Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις βρέθηκαν σε δύο συγκεκριμένες θέσεις εντός του υποκινητή TERT, τα οποία πιστεύεται ότι ενισχύουν την έκφραση του. Σε μια μεγάλη ομάδα ασθενών του Ηνωμένου Βασιλείου, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο TERT αντιπροσώπευαν λιγότερο από 1% των περιπτώσεων οικογενειακού μελανώματος (Harkand M, et al, 2016). Η συχνότητα των μεταλλάξεων του

TERT σε μεγαλύτερες, πιο διαφοροποιημένες οικογένειες μελανώματος δεν είναι απολύτως σαφής.

3.b.vi.2. POT1

Το γονίδιο προστασίας των τελομερών 1 (POT1) είναι ένα εξαιρετικά διεισδυτικό γονίδιο ευαισθησίας στο μελάνωμα που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7. Περιλαμβάνει μια υπομονάδα καταφυγίου, ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών που εμπλέκεται στην προστασία και συντήρηση των τελομερών. Οι φορείς γαμετικών μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας του POT1 έχουν βρεθεί να έχουν μεγαλύτερα τελομερή, ένα εύρημα που βρέθηκε ως παράγοντας κινδύνου σε οικογένειες μελανώματος (Burke LS, et al, 2013). Δύο πρόσφατες μελέτες έχουν εντοπίσει εννέα γαμετικές παραλλαγές αυτό το γονίδιο σε 13 οικογένειες επιρρεπείς σε μελάνωμα, παρόλο που οι μεταλλάξεις POT1 παρατηρήθηκαν συχνότερα σε σποραδικά μελάνωμα (Robles-Espinoza CD, et al, 2014, Shi J, et al, 2014). Έχουν αναφερθεί αρκετοί μη δερματικοί καρκίνοι σε συνδυασμό με γαμετικές μεταλλάξεις του POT1 (Robles-Espinoza CD, et al, 2014, Bainbridge MN, et al, 2015).

3.b.vi.3. ACD και TERF2IP

Το ομόλογο αμφιβληστροειδικής δυσπλασίας (ACD) και η πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα πρόσδεσης των επαναλήψεων των τελομερών 2 (TERF2IP), είναι δύο προσφάτως αναγνωρισμένα γονίδια που έχουν εμπλακεί στον κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος. Το ACD και το TERF2IP, όπως το POT1, είναι επίσης σημαντικές υπομονάδες στο συγκρότημα καταφυγίων. Σε μία μελέτη με 510 οικογένειες επιρρεπείς σε μελάνωμα, 6 βρέθηκαν να έχουν μεταλλάξεις ACD, κυρίως συγκεντρωμένες εντός του πεδίου σύνδεσης με το POT1 (Aoude LG, et al, 2015). Επιπλέον, 4 οικογένειες βρέθηκαν να έχουν μεταλλάξεις TERF2IP. Τα άτομα με μεταλλάξεις ACD και TERF2IP έχουν αυξημένο κίνδυνο πολλαπλών πρωτογενών μελανωμάτων σε νεαρή ηλικία (π.χ. ηλικίες 15, 26 και 35 σε μία οικογένεια), καθώς και ευαισθησία για άλλους καρκίνους (Πίνακας 1) (Aoude LG, et al, 2015).

3.b.vii. Γονίδια που σχετίζονται με την επισκευή του DNA

3.b.vii.1. XP

Η Xeroderma pigmentosum (XP) είναι μια σπάνια ασθένεια που προκαλείται από μεταλλάξεις γονιδίων επιδιόρθωσης DNA. Τα άτομα με XP δεν είναι σε θέση να επιδιορθώσουν αποτελεσματικά τις βλάβες που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία και συνεπώς έχουν εξαιρετικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνων του δέρματος. Ο κίνδυνος μελανώματος που σχετίζεται με αυτούς τους ασθενείς εκτιμάται ότι είναι σχεδόν 1.000 φορές μεγαλύτερος από τον γενικό πληθυσμό (Kraemer KH, et al, 1994). Υπάρχουν επίσης στοιχεία που υποδηλώνουν ότι συγκεκριμένες παραλλαγές της νόσου XP μπορούν να προσδώσουν υψηλότερο κίνδυνο μελανώματος από άλλες λιγότερο συνηθισμένες παραλλαγές (Paszowska-Szczur K, et al, 2013). Αυτή η συγκεκριμένη γενετική ασθένεια υπογραμμίζει επίσης τη σημασία της έκθεσης σε UV ακτινοβολία για την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος και μελανώματος.

3.b.vii.2. BRCA2

Το γονίδιο του καρκίνου του μαστού 2 (BRCA2) είναι ένα γονίδιο καταστολής όγκων που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13 και είναι σημαντικό στην επιδιόρθωση του DNA ρυθμίζοντας τη χρωμοσωμική σταθερότητα μέσω της αλληλεπίδρασής του με το RAD51 (Davies AA, et al, 2001). Οι μεταλλάξεις στο BRCA2 συνδέονται σαφώς με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πολλών τύπων καρκίνου (Struewing JP, et al, 1997). Αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί επίσης να επηρεάσουν την ευαισθησία του μελανώματος. Το Breast Cancer Linkage Consortium εξέτασε 3278 άτομα με επιβεβαιωμένες ή υποψιαζόμενες μεταλλάξεις στο BRCA2 και διαπίστωσε ότι οι φορείς είχαν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (Journal of the National Cancer Institute, 1999). Οι μετέπειτα μελέτες δεν κατάφεραν να επιβεβαιώσουν αυτή τη σχέση ή να αναφέρουν αντικρουόμενες πληροφορίες. Επιπλέον, δεν έχουν αναφερθεί μελέτες για αυξημένο κίνδυνο για μελάνωμα που σχετίζεται με το BRCA1.

3.b.vii.3. MGMT

Η μεθυλτρανσφεράση O-6-μεθυλγουανίνης-DNA (MGMT) είναι ένα ένζυμο που παίζει προστατευτικό ρόλο στην επιδιόρθωση DNA με την απομάκρυνση αλκυλομάδων. Το γονίδιο MGMT βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10 και οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο είναι σπάνιες. Μια πρόσφατη μελέτη βρήκε μόνο μία οικογένεια βρέθηκε με μεταλλαγμένη MGMT από 64 οικογένειες επιρρεπείς σε μελάνωμα (Arpelqvist F, et al, 2014). Το επίπεδο δραστηριότητας αυτού του γονιδίου έχει επίσης μελετηθεί ως δείκτης ευαισθησίας στα αλκυλιωτικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα, με υψηλότερα επίπεδα που συσχετίζονται με την αντοχή στα φάρμακα. (Erice O, et al, 2015). Επομένως, ο προσδιορισμός του επιπέδου αυτού του γονιδίου σε ασθενείς με μελάνωμα που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία μπορεί να έχει κάποια προγνωστική αξία.

3.b.vii.4. Li-Fraumeni (TP53)

Το Li-Fraumeni είναι ένα κληρονομικό αυτοσωμικό κυρίαρχο καρκινικό σύνδρομο, το οποίο προκαλείται κυρίως από μια γενετική μετάλλαξη στους γαμέτες στο γονίδιο καταστολής όγκων του p53. Αν και σχετίζεται με πολλούς τύπους καρκίνου, η συσχέτιση του με το μελάνωμα είναι τόσο αμφιλεγόμενη όσο και σπάνια. Παρόλα αυτά, έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις γαμετικών κυττάρων στην TP53 σε ασθενείς με πολλαπλά πρωτογενή μελάνωματα (Curiel-Lewandrowski C, et al, 2011, Kollipara R, et al, 2014).

Πίνακας 2: Γονίδια που εμπλέκονται στο οικογενές μελάνωμα μελάνωμα και η σχέση τους με τον καρκίνο (Πηγή: Jason E. Hawkes, et al, 2016)

Gene	Chromosomal Location	Biological Function	Effect on Pigment	Effect on Nevus	Penetrance	Associated Non-Skin Cancers	Selected References
<i>CDKN2A</i>	9p21	Encodes two tumor suppressor proteins (p16 ^{INK4a} and p14 ^{ARF})	No	Yes	High	Pancreatic, breast, cervical, lymphoma, GI, lung, Wilm's tumor, tobacco-related cancers	21-24
<i>CDK4</i>	12q14	Cell cycle regulation	No	Yes	High	Similar to <i>CDKN2A</i>	30
<i>TERT</i>	5p15.33	Telomere maintenance	No	Yes	High	Renal, bladder, myeloproliferative neoplasms, AML	45-48
<i>POT1</i>	7q31.33	Telomere maintenance	No	No	High	Glioma, brain, breast, lung, CLL, endometrial	50,52
<i>ACD</i>	16q22.1	Telomere maintenance	No	No	High	Breast, brain, lung, ovarian, cervical, colorectal, prostate, myeloproliferative neoplasms	53
<i>TERF2IP</i>	16q23.1	Telomere maintenance	No	No	High	Similar to <i>ACD</i>	53

<i>BAP1</i>	3p21.1	Tumor suppressor	No	Yes	High	Uveal melanoma, mesothelioma, renal, meningioma, paraganglioma, cholangiocarcinoma	72-74
<i>PTEN</i>	10q23.3	Tumor suppressor	Yes	Yes	High	Breast, thyroid, endometrium, colorectal, kidney	59-61
<i>MC1R</i>	16q24.3	Melanin production	Yes	No	Medium	None reported	32
<i>BRCA2</i>	13q12.3	Tumor suppressor and DNA repair	No	No	Medium	Breast, ovarian, prostate, pancreatic	57
<i>MITF</i>	3p14.2–p14.1	Regulates melanocyte development	Yes	Yes	Medium	Pancreatic, renal	39,41,42
<i>SLC45A2</i>	5p13.2	Melanin production	Yes	No	Medium	None reported	64,66,67
<i>MGMT</i>	10q26	DNA repair	No	No	Low	None reported	62
<i>OCA2</i>	15q12–13.1	Melanin production via melanosome trafficking	Yes	No	Low	None reported	64,65
<i>ASIP</i>	20q11.2–q12	Melanin production	Yes	No	Low	None reported	68,69

3.c. Ο ρόλος της επιγενετικής στην ανάπτυξη του μελανώματος

Η ανάπτυξη και η εξέλιξη του μελανώματος έχουν αποδοθεί σε ανεξάρτητα ή συνδυασμένα γενετικά αλλά και επιγενετικά γεγονότα. Η επιγενετική - που ορίζεται ως οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν τις κληρονομικές αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση χωρίς να προκαλούν αλλαγές στην ακολουθία του DNA - παρέχει σημαντική βοήθεια για την διαλεύκανση των φαινοτυπικών, μορφολογικών και παθοβιολογικών διαφορών. Μεταβάλλοντας τη δομή της χρωματίνης μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης βάσεων DNA ή πρωτεϊνών των ιστονών ή ρυθμίζοντας την μετάφραση του mRNA μέσω μη-

κωδικοποιητικών RNAs, η επιγενετική ρυθμίζει σε τελευταίο στάδιο ποια γονίδια εκφράζονται και ποια διατηρούνται σιωπηρά. Αυτό το «υψηλότερο επίπεδο» γονιδιακής ρύθμισης μπορεί ακόμη και να παρέχει μια μηχανιστική σχέση μεταξύ του τρόπου με τον οποίο οι παράγοντες όπως το περιβάλλον, το φύλο και η γήρανση επηρεάζουν τον ατομικό μας φαινότυπο καθώς και τις δικές μας μοναδικές ευαισθησίες στον καρκίνο, όπως το μελάνωμα.

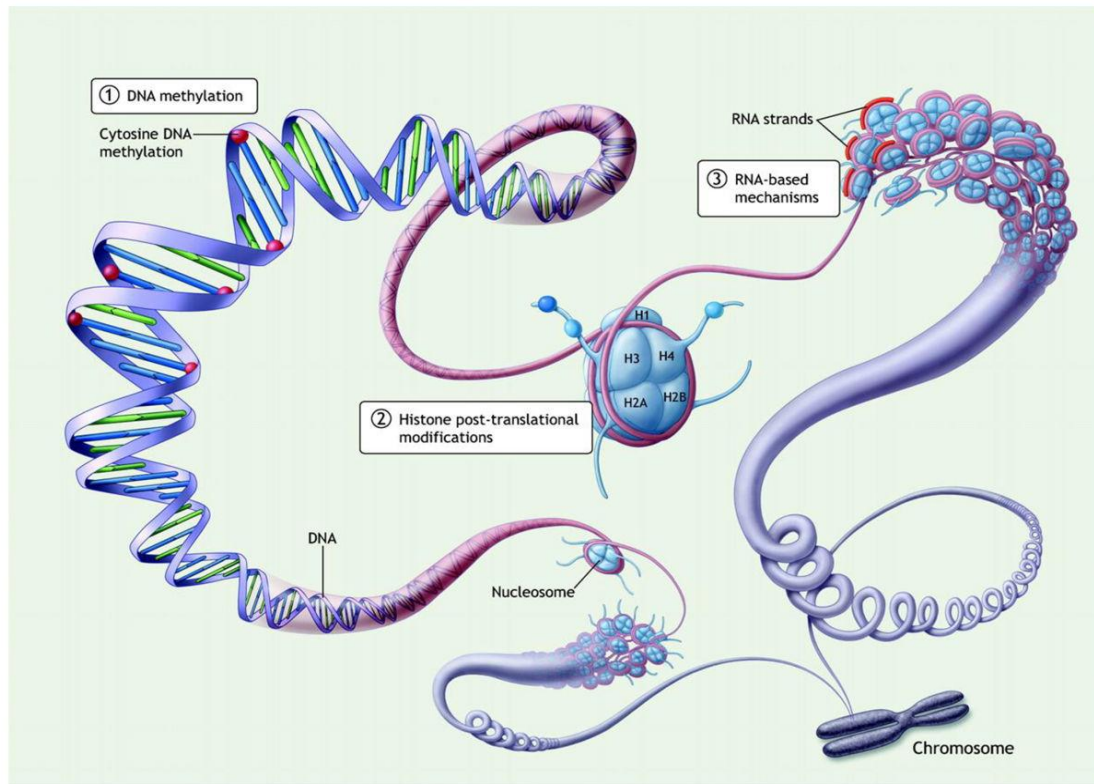
Μια βασική διαφορά μεταξύ του γονιδιώματος και του επιγονιδιώματος είναι ότι το τελευταίο μπορεί δυνητικά να είναι περισσότερο θεραπευτικά αναστρέψιμο από τις μεταλλάξεις που επηρεάζουν τον ίδιο τον γενετικό κώδικα. Δεδομένου ότι τα ξεχωριστά υποσύνολα κακοήθους μελανώματος οδηγούνται από ετερογενείς γενετικές μεταλλάξεις, αυτή η μορφή ανθρώπινου καρκίνου είναι ένα πολύ καλό παράδειγμα για την εξέταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ γενετικών και επιγενετικών συμβάντων. Παρά την ανάπτυξη των θεραπειών που απευθύνονται σε συγκεκριμένες γενωμικές μεταλλάξεις στο μελάνωμα, τα ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητας από αυτή τη θανατηφόρα ασθένεια συνεχίζουν να αυξάνονται παγκοσμίως ταχύτερα από οποιοδήποτε άλλο καρκίνο. Έχει σημειωθεί αξιοσημείωτη πρόοδος στην κατανόηση της παθογένειας του μελανώματος όσον αφορά τις γενετικές αλλοιώσεις. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει μια πολύπλοκη συμμετοχή επιγενετικών μηχανισμών στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, συμπεριλαμβανομένης της μεθυλίωσης, της τροποποίησης ή/και αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, και των ποικίλων δραστηριοτήτων των μη-κωδικοποιούντων RNAs. Όλα αυτά μαζί, επηρεάζουν τη λειτουργία σηματοδοτικών μονοπατιών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, διασταυρώνονται και σχηματίζουν δίκτυα στα οποία οι τοπικές διαταραχές διαταράσσουν τη δραστηριότητα ολόκληρου του συστήματος.

3.c.i. Οι αρχές της επιγενετικής

Αρχικά εισάχθηκε από τον Conrad Waddington, το 1939, ο όρος «επιγενετική» που προέρχεται από το «epigenesis» της ελληνικής, και σημαίνει «αλλαγές στη γονιδιακή δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης» (Holliday R, et al, 1987). Σε μια εποχή που η γενετική και η αναπτυξιακή βιολογία μελετήθηκαν ανεξάρτητα, ο Waddington και άλλοι τόνισαν την κρίσιμη σχέση μεταξύ αυτών των δύο αναδυόμενων πεδίων (Holliday R, et al, 2006). Σύντομα κατέστη σαφές ότι τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά της εμβρυολογίας και της ανάπτυξης απαιτούσαν εξηγήσεις πέρα από αυτές που παρέχονται από τον γενετικό «κώδικα». Μία, για παράδειγμα, ήταν πώς τα πολυδύναμα κύτταρα μπορούσαν να διαφοροποιηθούν σε εξειδικευμένα κύτταρα, όπως οι ινοβλάστες και τα λεμφοκύτταρα, και παρά την χρήση ίδιων γονοτύπων, μπορούν και διατηρούν σταθερά τους διακριτούς βιολογικούς φαινοτύπους τους μέσω των γενεών της κυτταρικής διαίρεσης (Holliday R, et al, 1987, Goldberg AD, et al, 2007).

Ιστορικά, παρατηρήσεις που δεν εξηγούνταν εύκολα με γενετικούς όρους αλλά είχαν κληρονομήσιμη συνιστώσα θεωρήθηκαν ως επιγενετικά φαινόμενα. Όπως την αντιλαμβανόμαστε σήμερα, ωστόσο, «επιγενετική» αναφέρεται ακριβέστερα σε μοριακούς μηχανισμούς όπου η έκφραση γονιδίου μπορεί να τροποποιηθεί αντιστρεπτά με κληρονομικό τρόπο χωρίς αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Τέτοιοι μηχανισμοί επιτρέπουν την διαφοροποίηση των εμβρυϊκών και ενήλικων βλαστικών κυττάρων, καθώς και την αποδιαφοροποίηση και την απόκτηση των πλειοδυναμίας σωματικών κυττάρων, πιθανώς ως συνέπεια περιβαλλοντικών ερεθισμάτων. Επιπλέον, οι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι πιθανόν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη και τη λειτουργία των αυτοανανεούμενων «καρκινικών βλαστικών κυττάρων». Η επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης λαμβάνει χώρα με μεταβολή της δομής και της διαμόρφωσης της χρωματίνης, επηρεάζοντας έτσι τη δυνατότητα του μεταγραφικού μηχανισμού να έχει πρόσβαση σε

γονίδια και υποκινητές, καθώς και επηρεάζοντας τη σταθερότητα των μεταγραφών mRNA. Οι κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν μεθυλίωση του DNA, ομοιοπολική τροποποίηση των ιστονών, και τα μη-κωδικοποιήσιμα RNAs, (εικόνα 12).



Εικόνα 12: Περίληψη των τριών πρωτογενών επιγενετικών μηχανισμών. (1) μεθυλίωση του DNA. (2) Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις Histone. (3) Μηχανισμοί που βασίζονται σε RNA, συμπεριλαμβανομένων των miRNAs και των lncRNAs. Σημείωση: αυτό το διάγραμμα δεν απεικονίζει τους μηχανισμούς δέσμευσης και σίγασης mRNAs. (Πηγή: Charles C. Matouk, et al, 2008)

Οι επιγενετικές αλλαγές, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, περιλαμβάνουν την ανώμαλη μεθυλίωση του DNA σε κυτοσίνη (5mC), τις τροποποιήσεις ιστονών, την έκφραση ncRNA, την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και την τοποθέτηση των νουκλεοσωμάτων στον χώρο (Rodriguez-Paredes M, et al, 2001. Οι χαρακτηριστικές επιγενετικές αλλαγές που ξεκινούν ή/και προάγουν την ανάπτυξη του ανθρώπινου μελανώματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν βιοδείκτες για την πρόληψη, την έγκαιρη ανίχνευση, τη θεραπεία και την παρακολούθηση της εξέλιξης αυτής της κακοήθειας (Kulis M, et al, 2010).

3.c.ii. Μεθυλίωση του DNA

Το 1975, η πρώτη πρόταση ότι η μεθυλίωση του DNA θα μπορούσε να ασκήσει έντονα αποτελέσματα στην έκφραση γονιδίων προήλθε από δύο ομάδες που εργάζονταν ανεξάρτητα για να αποκαλύψουν τον «μοριακό διακόπτη» που ενεργοποιούσε ή απενεργοποιούσε τα γονίδια κατά την ανάπτυξη (Ridder AD, et al, 1975, Holliday R, et al, 1975). Αυτός ο «διακόπτης» θεωρήθηκε κάποτε ότι ήταν μεθυλίωση του DNA, που συμβαίνει στον άνθρακα 5 της κυτοσίνης για να σχηματίσει την 5-μεθυλοκυτοσίνη (5-mC), γνωστή και ως «πέμπτη βάση» (Lister R, et al, 2009). Σήμερα, γίνεται κατανοητό ότι αυτή η μεθυλίωση δεν αποτελεί απλό «μετασχηματισμό» και ότι πολλοί επιπρόσθετοι και στενά εννορηστρομημένοι επιγενετικοί μηχανισμοί συνεργάζονται για τη αποσίωπιση ή ενεργοποίηση γονιδίων σε ένα περιβάλλον και σε έναν συγκεκριμένο τόπο. Εν τούτοις, η

μεθυλίωση του υποκινητή είναι γνωστό ότι είναι κρίσιμη για τη σταθεροποίηση της σιωπηρής κατάστασης ορισμένων γονιδίων στα τελικώς διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα, όπου πιστεύεται ότι δρα ως στόχος για δέσμευση πρωτεϊνών που, από κοινού, αποτρέπουν την επανενεργοποίηση των γονιδίων πολυδυναμίας (Guilbert S, et al, 2013).

Εξ ορισμού, η μεθυλίωση του DNA είναι ένας κληρονομικός επιγενετικός μηχανισμός, ο οποίος ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση και δρα με την ομοιοπολική προσθήκη μίας ομάδας μεθυλίου στον 5ο άνθρακα της κυτοσίνης σε ένα δινουκλεοτίδιο CpG. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, η συχνότητα των ακολουθιών δινουκλεοτιδίων CpG μειώθηκε σημαντικά στο 20% περίπου της προβλεπόμενης συχνότητας στο γονιδίωμα των σπονδυλωτών και μεταξύ των υπόλοιπων δινουκλεοτιδίων CpG, περισσότερο από το 70% μεθυλιώνεται (Widschwendter M, et al, 2002). Η ανάλυση του ανθρώπινου μεθυλώματος αποκάλυψε ότι η κατανομή των δινουκλεοτιδίων CpG δεν είναι τυχαία και μερικά από αυτά συγκεντρώνονται μαζί για να σχηματίσουν πλούσιες σε CpG περιοχές DNA, γνωστές ως νησίδες CpG (CpG islands). Τις περισσότερες φορές, οι νησίδες CpG βρίσκονται ανοδικά του υποκινητή και στη περιοχή του 1ου εξονίου σε πάνω από το ήμισυ των ανθρώπινων γονιδίων (Takai D, et al, 2003). Υπό κανονικές συνθήκες, στα ενεργά εκφρασμένα γονίδια είναι μη μεθυλωμένες. Ωστόσο, στη διαδικασία του νεοπλασματικού μετασχηματισμού, η μεθυλίωση του DNA στα καρκινικά κύτταρα είναι διαφορετική σε σύγκριση με τα κανονικά κύτταρα με εστιακή υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG σε πολλά γονίδια (Baylin SB, et al, 2006, Esteller M, et al, 2007) Έτσι, ένα τροποποιημένο προφίλ μεθυλίωσης του DNA είναι χαρακτηριστικό όλων σχεδόν των τύπων ανθρώπινων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του δέρματος (Kuang H, et al, 2017, Wouters J, et al, 2017, Gallagher WM, et al, 2005, Vizoso M, et al, 2015).

Η S-αδενοσυλ μεθειονίνη (SAM) λειτουργεί ως δότης μεθυλομάδας και η αντίδραση καταλύεται από μια ομάδα ενζύμων που ονομάζονται DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs) (Henning SM, et al, 2013). Το ευκαρυωτικό γονιδίωμα κωδικοποιεί δύο τύπους DNMTs, που είναι οι μεθυλοτρανσφεράσες (DNMT1) και οι de novo μεθυλοτρανσφεράσες (DNMT3A και DNMT3B). Η DNMT3A και η DNMT3B είναι απαραίτητες για την de novo μεθυλίωση στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης εμβρύου, ενώ η DNMT1 είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνη για τη διατήρηση του μοτίβου μεθυλίωσης με την προσθήκη ομάδων μεθυλίου σε θέσεις ημιμεθυλωμένου DNA (Shukla S, et al, 2014, Greenberg ES, et al, 2014). Σε καρκινικά κύτταρα, η μεταβληθείσα έκφραση των DNMTs επηρεάζει την μεταγραφική ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση πολλών γονιδίων.

Η υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG σε θέσεις υποκινητών πιστεύεται ότι συμβάλλει στην ογκογένεση μέσω της μεταγραφικής αποσιώπισης γονιδίων καταστολής όγκων (Sigalotti L, et al, 2010). Η υπερμεθυλίωση συγκεκριμένων γονιδίων καταστολής όγκων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εμπλέκονται στη ρύθμιση κυτταρικού κύκλου, τη κυτταρική σηματοδότηση, τη μεταγραφή, την επισκευή DNA και την απόπτωση, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία για το μελάνωμα (Muthusamy V, et al, 2006, Koga Y, et al, 2009). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει μεθυλίωση των σωμάτων των γονιδίων και πρότειναν ότι αυτό συσχετίζεται θετικά με τη μεταγραφή (Lister R, et al, 2009). Η ανάλυση κυτταρικών σειρών μελανώματος με μικροσυστοιχίες γονιδιακής έκφρασης έχει εντοπίσει μια μεγάλη ομάδα υπερμεθυλωμένων γονιδίων (Sigalotti L, et al, 2010). Ωστόσο, το πώς η υπερμεθυλιωμένη κατάσταση αυτών των γονιδίων συμβάλλει στην παθογένεση του μελανώματος παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη.

Μία μελέτη μεθυλίωσης σε γένωμα κυττάρων μελανώματος με BRAFV600E μετάλλαξη ταυτοποίησε πολυάριθμα λειτουργικά σημαντικά γονίδια που εμφανίζουν αλλοιωμένη μεθυλίωση και έκφραση. Knock down του BRAFV600E μείωσε την έκφραση του DNMT1. Προτάθηκε ότι BRAFV600E προωθεί γονιδιακή υπερμεθυλίωση με θετική ρύθμιση της DNMT1 (Hou P, et al, 2012). Μια παρόμοια μελέτη σε επιβεβαίωσε ότι ένα μονοπάτι κατευθυνόμενο από την BRAFV600E μετάλλαξη ήταν υπεύθυνο για την διαφορετική

μεθυλίωση των νησίδων CpG (Fang M, et al, 2014). Η BRAFV600E προωθεί την μεταγραφική σίγηση μέσω της αυξημένης από ERK κατευθυνόμενης φωσφορυλίωσης του μεταγραφικού καταστολέα MAFG, με αποτέλεσμα την μείωση της πολυουβικιτινικής και την πρωτεασοματικής αποικοδόμησης του. Τα αυξημένα επίπεδα του MAFG οδηγούν στη δέσμευση του στο DNA. Το MAFG δημιουργεί εκεί ένα μεγαλύτερο σύμπλεγμα που περιλαμβάνει τα BACH1, CHD8 και DNMT3B, οδηγώντας σε υπερμεθυλίωση υποκινητών και τη μεταγραφική σίγαση (Mirmohammadsadegh A, et al, 2006). Δεν είναι γνωστό αν αυτή η οδός υπερμεθυλίωσης των νησίδων CpG που προωθείται από την BRAFV600E λειτουργεί στο μελάνωμα, αλλά θα μπορούσε να εξηγήσει τη συσχέτιση του BRAFV600E και την σίγαση του PTEN στο μεταστατικό μελάνωμα (Dankort D, et al, 2009, Mirmohammadsadegh A, et al, 2006).

Πίνακας 3: λίστα με μερικά από τα συχνότερα υπερμεθυλωμένα γονίδια στο μελάνωμα. (Πηγή: Debina Sarkar, et al, 2015).

Gene	Gene Description	Relevance to melanoma	Ref
APC*	Adenomatous Polyposis Coli	Reduced expression increases cell proliferation without compromising invasive capacity	104
ASC/PYCARD*	PYD, an N terminal PYRIN-domain, and CARD, a C-terminal caspase-recruitment domain	Expression inhibits tumorigenesis by reducing IKKα/β phosphorylation and inhibiting NF-κB activity	105
AS3MT	Arsenic (+3 Oxidation State) Methyltransferase	Unknown	19
ADCY4	Adenylate Cyclase 4	Unknown	19
AKR7L	Aldo-Keto Reductase Family 7-Like	Unknown	19
AK3	Adenylate Kinase 3	Unknown	19
BRF1	BRF1, RNA Polymerase III Transcription Initiation Factor 90 KDa subunit	Unknown	19
BST2	Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2	Unknown	106
COL11A1*	Collagen, Type XI, Alpha 1	Promotes tumor aggressiveness via TGF-β1-MMP3; part of a 12 gene signature for melanoma diagnosis; associated with focal adhesion	19
CMTM2	CKLF-Like MARVEL Transmembrane Domain Containing 2	Unknown	19
CCKBR	Cholecystokinin B Receptor	Unknown	19
Caspase 8*	Apoptosis-Related Cysteine Peptidase	Linked to cadmium-stimulated cell growth and inhibition of cell death pathways	107
CDH1*	E-Cadherin	A cell adhesion molecule; loss correlates with high tumor grade and poor prognosis	108
CDKN2A*	p16	Arrests cell cycle in G1 by inhibiting CDK4 and CKD6 and activating pRB	110
CDKN2B	p15	Unknown	111
CDKN1C*	p57	Arrests cell cycle in G1 by inhibiting G1 cyclin-CDK complexes; expressed in proliferative melanocytes; possible role in melanomagenesis	106, 112
CDH8	Cadherin 8	Unknown	106
CIITA-PIV	Class II, Major Histocompatibility Complex Transactivator, Promoter IV	Acts on IFN-γ pathway	109
COL1A2*	Collagen, Type I, Alpha 2	Loss may compromise tissue integrity	106, 19
CYP1B1	Cytochrome P450, Family 1, Subfamily B, Polypeptide 1	Unknown	106
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) Receptor 4	Unknown	113
DLL3	Delta-Like 3	Unknown	19
DDIT4L*	DNA-Damage-Inducible Transcript 4-like	Loss results in depression of cell growth	19
DAL1	Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1-like 3	Unknown	106
DAPK*	Death Associated Protein Kinase	Methylation higher in metastases	23
DNAJC15	DNAJ (Hsp40) Homolog, Subfamily C, Member 15	Unknown	106
DPPIV*	DiPeptidyl Peptidase IV	Serine protease involved in cancer progression; decline in serum activity in melanoma patients compared to controls	114, 115
FRZB*	Frizzled-Related Protein	A metastasis suppressor; inhibits Wnt5a signaling	116, 117
GDF15	Growth Differentiation factor 15	Unknown	106
GATA4	GATA Binding Protein 4	Unknown	26
GPX7	Glutathione Peroxidase 7	Unknown	19
HOXB13	Homeobox B13	Unknown	106
HSP11	Heat Shock protein H11	Unknown	118
HMW-MAA	Human High Molecular Weight Melanoma Associated Antigen	Unknown	119
HLA-DOA	Major Histocompatibility Complex, Class II, DO Alpha	Unknown	19
HSPB6	Heat Shock Protein, Alpha-Crystallin-Related, B6	Unknown	19
HPSE2	Heparanase 2	Unknown	19
HOXA7	Homeobox A7	Unknown	19
ISG15	ISG15 Ubiquitin-Like Modifier	Unknown	19
IL34	Interleukin 34	Unknown	19
IGFBP4	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 4	Unknown	19
KCNK4	Potassium Channel, Subfamily K, Member 4	Unknown	116
KCNK6	Potassium Channel Subfamily K Member 6	Unknown	19
LOX	Lysyl Oxidase	Unknown	109
LRRC1	Leucine Rich Repeat Containing 1	Unknown	106

3.c.ii.1. RAR-b2 (υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος-b2)

Στο κακόηθες μελάνωμα η συχνότητα της ανώμαλης μεθυλίωσης και της απώλειας έκφρασης του RAR-b2 (RARβ) φτάνει ως το 70% (Hoon DS, et al, 2004). Το προϊόν αυτού του γονιδίου καταστολής όγκων προκαλεί αναστολή ανάπτυξης μέσω του all trans ρετινοϊκού οξέως (ATRA) (all-trans retinoic acid) (Fan J, et al, 2010). Το RAR-b2 καταστέλλεται επίσης σε διάφορους άλλους ανθρώπινους καρκίνους (Xu X-C, et al, 2006). Πολλά κύτταρα μελανώματος είναι ανθεκτικά στα αντιπολλαπλασιαστικά αποτελέσματα του ATRA και έχουν επιβεβαιωθεί θετικοί συσχετισμοί μεταξύ της αντιπολλαπλασιαστικής δραστηριότητας του ATRA και της έκφρασης του RARβ. Ωστόσο, δεν βρέθηκε κανένας αυστηρός συσχετισμός μεταξύ της κατάστασης μεθυλίωσης του γονιδίου RARβ και της έκφρασής του σε κυτταρικές σειρές μελανώματος. Η υπερμεθυλίωση του RARβ βρέθηκε κυρίως σε μια κυτταρική σειρά που προέκυψε από το μελάνωμα κάθετης φάσης (Fan J, et al 2010). Αυτή η μελέτη όμως, πρότεινε ότι η έκφραση RARβ σιγήθηκε μέσω άλλων μηχανισμών, όπως η υποακετυλίωση των ιστονών (Fan J, et al 2010). Αυτό δείχνει ότι οι μηχανισμοί σίγασης πολλών γονιδίων μπορεί να αλλάξουν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του μελανώματος.

3.c.ii.2. RASSF1A

Η οικογένεια γονιδίων με περιοχές σύνδεσης με το RAS 1A (Ras association domain family 1A) (RASSF1A), μεθυλιώνεται στο 55% των δειγμάτων μελανώματος (Hoon DS, et al, 2004). Ο βαθμός μεθυλίωσης του RASSF1A ποικίλει ανάλογα με το στάδιο του όγκου καθώς το υπερμεθυλιωμένο RASSF1A βρίσκεται στο στάδιο IV, αλλά όχι στο μελάνωμα σταδίου I και II. Αυτό υποδεικνύει ότι το RASSF1A μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της προόδου και της πρόγνωσης του κακοήθους μελανώματος (Tanemura A, et al 2009). Ο ρόλος αυτού του γονιδίου ως καταστολέα του ανθρώπινου όγκου και του τρόπου με τον οποίο συμβάλλει στην ανάπτυξη του μελανώματος έχει διασαφηνιστεί. Το RASSF1A ρυθμίζει θετικά την ASK1, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την p38 MAPK. Αυτό μεταβάλλει την έκφραση πολλαπλών γονιδίων της οδού απόπτωσης που εξαρτάται από μιτοχόνδριο για να προκαλέσει απόπτωση (Yi M, et al, 2011). Η σίγαση της έκφρασης RASSF1A μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή συμβάλλει στο μελάνωμα με καταστολή της απόπτωσης.

3.c.ii.3. CDKN2A / INK4A / ARF

Ένας από τους πλέον καλά μελετημένους επιγενετικούς δείκτες που εμπλέκονται στην παθογένεση του μελανώματος είναι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή INK4A. Το προϊόν INK4A αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο σε φάση G1 αναστέλλοντας τις εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες CDK4 και CKD6, ενεργοποιώντας έτσι τα κατασταλτικά αποτελέσματα της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRB). Η υπερμεθυλίωση του INK4A (Straume O, et al, 2002) είναι εμφανής σε 10-20% των μελανωμάτων κάθετης φάσης και σχετίζεται με την επιβίωση του ασθενούς (Straume O, et al, 2002). Η επιγενετική σίγαση του ARF μέσω υπερμεθυλίωσης οδηγεί σε απώλεια της απόπτωσης που προκαλείται από την p53 και στην πρόοδο του μελανώματος (Furuta J, et al, 2006). Οι Straume et al. (Straume O, et al, 2002) ανέφεραν απώλεια έκφρασης πρωτεΐνης p16 με υπερμεθυλίωση του υποκινητή του CDKN2A σε 19% πρωτογενών δερματικών μελανωμάτων και σε 33% των μεταστάσεων που μελετήθηκαν (Straume O, et al, 2002).

3.c.ii.4. MGMT

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την O⁶-μεθυλογουανινική μεθυλοτρανσφεράση του DNA (MGMT) βρίσκεται στο 10q26. Η επιγενετική απενεργοποίηση του MGMT μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή έχει αναφερθεί σε 34% των δειγμάτων μελανώματος (Hoon DS, et al, 2004). Το πρωτεύον και το μεταστατικό μελάνωμα συγκρίθηκαν προκειμένου να εντοπιστούν οι διαφορές στην κατάσταση μεθυλίωσης MGMT, αλλά δεν βρέθηκαν τέτοιες διαφορές (Hussel JC, et al, 2010). Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από τα ευρήματα διαφόρων τύπων καρκίνου, ότι η διμεθυλίωση της ιστόνης 3 λυσίνης 9 (H3K9) και η δέσμευση του MeCP2 (ένας συμπαραγόντας καταστολής γονιδίων σε μεθυλωμένες θέσεις) είναι κοινά και απαραίτητα για τη σίγαση του MGMT ανεξαρτήτως της κατάστασης μεθυλίωσης του DNA στη νησίδα CpG του υποκινητή (Zhao W, et al, 2005). Αυτό υπογραμμίζει ότι ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των υπερμεθυλωμένων γονιδίων που εντοπίζονται στο μελάνωμα είναι απαραίτητος και η κατάσταση μεθυλίωσης ενός γονιδίου μπορεί να μην χρησιμεύει απαραίτητα ως ένας κατάλληλος δείκτης για την παρακολούθηση της εξέλιξης του μελανώματος.

3.c.iii. Υπομεθυλίωση

Η απομεθυλίωση του DNA συμβαίνει με δύο τρόπους: «παθητικά» όταν η DNMT1 αποτύχει να διατηρήσει τα πρότυπα μεθυλίωσης μέσω διαδοχικών κύκλων αντιγραφής του DNA (P.W.S. Hill, et al, 2014) και «ενεργά» με την απομάκρυνση της μεθυλομάδας από 5-μεθυλοκυτοσίνη μέσω μιας σειράς επαναληπτικών αντιδράσεων οξειδωσης που εκτελούνται με την οικογένεια πρωτεϊνών TET. Ένας ενδιάμεσος στην αλυσίδα αυτή είναι η 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη (5hmC). Παρόλο που υπάρχει σε σχετικά χαμηλά επίπεδα στα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα σε σύγκριση με την 5mC (εκτός από τα υψηλά επίπεδα που παρατηρούνται στον εγκέφαλο), το μελάνωμα έχει βρεθεί ότι εμφανίζει μερική ή πλήρη απώλεια της 5hmC σε σύγκριση με τους καλοήθεις σπίλους (C.G. Lian, et al, 2012). Τα χαμηλά επίπεδα της 5hmC συσχετίστηκαν περαιτέρω με το στάδιο του όγκου (βάθος Breslow), υποδεικνύοντας ότι μπορεί να χρησιμεύσει ως προγνωστικός δείκτης (C.G. Lian, et al, 2012). Η μειωμένη ρύθμιση των ενζύμων της οικογένειας TET, με την πιο δραματική μείωση του TET2, ανιχνεύτηκε στο μελάνωμα σε σύγκριση με τους καλοήθεις σπίλους (Lian CG, et al, 2012, Gambichler T, et al, 2013). Η 5hmC είναι το πιο άφθονο ενδιάμεσο της δραστηρικής απομεθυλίωσης DNA και δρα ως θετικός μεταγραφικός ρυθμιστής στην φυσιολογική ανάπτυξη και τον καρκίνο.

Ένας πιθανός μηχανισμός απώλειας 5hmC στο μελάνωμα θα μπορούσε να είναι η μείωση της έκφρασης των τριών TET γονιδίων και του καταλυτικού συμπαραγόντα IDH2, κάτι το οποίο είναι εμφανές στο μελάνωμα σε σύγκριση με τους καλοήθεις σπίλους (C.G. Lian, et al, 2012). Αντίστροφα, η επαναφορά της TET2 σε έχει αποδειχθεί ότι αποκαθιστά το τοπίο της 5hmC (C.G. Lian, et al, 2012), υποδηλώνοντας την πιθανή χρήση του ως δείκτη όγκου και / ή θεραπευτικού στόχου. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν στην απώλεια της λειτουργίας των TET ενζύμων παρατηρούνται συχνά καθώς και το IDH1 έχει ταυτοποιηθεί στις μελέτες να μεταλλάσσεται συχνά (R. Akbani, et al, 2015).

3.c.iii.1. TBC1D16

Η απώλεια της μεθυλίωσης του DNA (υπομεθυλίωση) στον καρκίνο συμβαίνει συνήθως σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οδηγώντας σε γενωμική αστάθεια. Μπορεί

επίσης να εμφανιστεί, αν και λιγότερο συχνά, στους υποκινητές πρωτο-ογκογονιδίων, οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους και συμβάλλοντας στην εξέλιξη της κακοήθειας (M. Brait, et al, 2011, M. Rodriguez-Paredes, et al, 2011). Υπάρχει ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα αυτού στο κακόηθες μελάνωμα (M. Vizoso, et al, 2015). Το γονίδιο TBC1D16 είναι μια GAP που ενισχύει τη δραστικότητα της GTPασης RAB4A (Ras-associated protein RAB4A), η οποία απαιτείται για ταχεία ανακύκλωση υποδοχέων από πρώιμα ενδοσώματα στην κυτταρική επιφάνεια. Η θέση έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου TBC1D16 είναι υπομεθυλιωμένη σε κυτταρικές σειρές μεταστάσεων έναντι του πρωτογενούς μελανώματος, όπου το γονίδιο τυπικά υπερμεθυλιώνεται και δεν εκφράζεται. Οι συγγραφείς της μελέτης δηλώνουν ότι η αυξημένη κυκλοφορία κυστιδίων είναι σημαντική για το μελάνωμα. Η ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης αποκάλυψε ότι ο παράγοντας μεταγραφής MITF δεσμεύεται στην υπομεθυλιωμένη βραχεία ισομορφή του γονιδίου στην νησίδα CpG. Knockdown με shRNA του TBC1D16 σε μοντέλα ποντικών με όγκους προερχόμενους από κυτταρικές σειρές IGR37 είχε ως αποτέλεσμα την μη πραγματοποίηση μετάστασης, ενώ ηπατικές μεταστάσεις παρατηρήθηκαν σε όγκους προερχόμενους από scrambled shRNA, υποδεικνύοντας ότι το TBC1D16 προάγει την μετάσταση. Υπάρχουν στοιχεία που το υποστηρίζουν και σε κλινικό πλαίσιο. Σε μια ομάδα 71 ασθενών, η υπομεθυλίωση της βραχείας ισομορφής του TBC1D16 αποδείχθηκε ότι είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης της ανεπαρκούς πρόωρης ανάπτυξης και της συνολικής επιβίωσης (M. Vizoso, et al, 2015).

3.c.iv. Τροποποιήσεις ιστονών

Για περισσότερα από 50 χρόνια, γνωρίζουμε ότι οι ιστόνες μπορεί να τροποποιηθούν μετα-μεταφραστικά. Το χρωμοσωμικό DNA συσκευάζεται σε νουκλεοσώματα με DNA τυλιγμένο γύρω από οκταμερή πρωτεϊνών (ιστόνη), που αποτελούνται από υπομονάδες (H2A, H2B, H3, H4) και άλλες παραλλαγές. Οι τροποποιήσεις των ιστονών μπορούν είτε να ενεργοποιήσουν είτε να μειώσουν την μεταγραφή ανάλογα με τη φύση και τη θέση της τροποποίησης ελέγχοντας την προσβασιμότητα του DNA στο μεταγραφικό μηχανισμό καθώς και με την πρόσληψη ή τον αποκλεισμό επιπρόσθετων πρωτεϊνικών συμπλοκών (Kouzarides T, et al, 2007).

Η ανώμαλη ακετυλίωση των ιστονών, ιδιαίτερα η υποακετυλίωση, πιστεύεται ότι επηρεάζει την παθοβιολογία του μελανώματος διαταράσσοντας τις ίδιες οδούς που επηρεάζονται από τις μεταλλάξεις και την υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG (van den Hurk K, et al, 2012). Στο μελάνωμα, τα προφίλ γονιδιακής έκφρασης αποκάλυψαν απώλεια έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω αναστρέψιμης απακετυλίωσης των υπολειμμάτων λυσίνης σε τοπικές ιστόνες από τις αποακετυλάσες ιστονών (HDACs) (Florenes VA, et al, 2004). Το CDKN1A είναι ένα τέτοιο γονίδιο καταστολής όγκου και η έκφραση του προϊόντος του, p21^{cip1}, ρυθμίστηκε αρνητικά μετά την αναστολή των απακετυλασών ιστόνης. Αυτό δείχνει ότι η παρεκκλίνουσα αποακετυλίωση ιστόνης οδηγεί σε απώλεια μηχανισμών καταστολής όγκων στο μελάνωμα.

Η υποακετυλίωση των ιστονών έχει επίσης συνδεθεί με την αρνητική ρύθμιση ορισμένων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως οι Bim, Bax και Bak, που ανήκουν στην οικογένεια BCL-2. Μια πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι η 5-φωσφατάση της 4,5 διφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης A (PIB5PA) έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο και συνήθως μειώνεται στο μελάνωμα. Η υπερέκφραση του αναστέλλει την σηματοδότηση μέσω PI3K / Akt, με αποτέλεσμα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και να μειώνει την επιβίωση των κυττάρων μελανώματος *in vitro*. Η μείωση της PIB5PA, που βρίσκεται σε ένα ποσοστό των μελανωμάτων, οφειλόταν σε υποακετυλίωση των ιστονών που προκαλούνταν

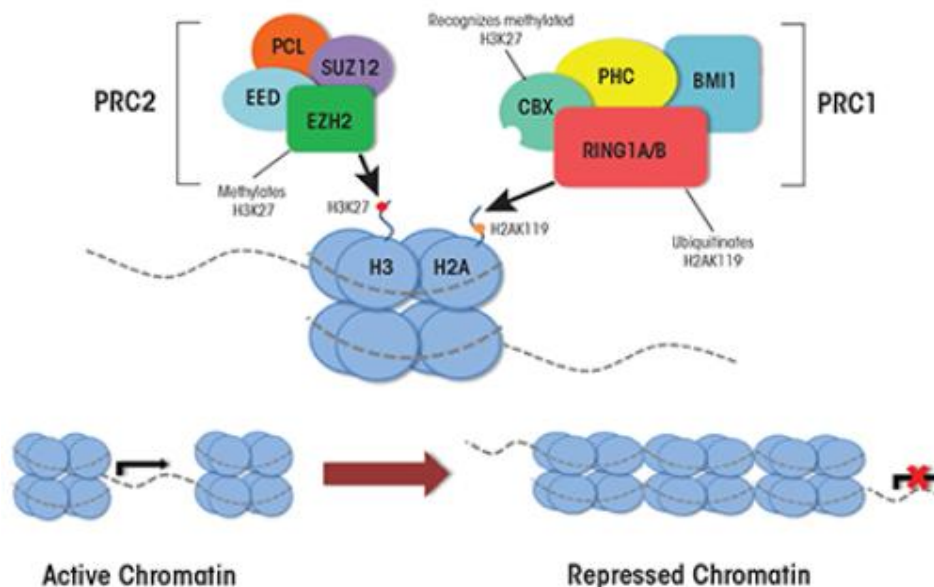
από αποακετυλάσες ιστονών μέσω δέσμευσης στον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 στον υποκινητή γονιδίου PIB5PA.

Η μεθυλοτρανσφεράση των ιστονών, περιοχών SET, Bifurcated 1 (histone methyltransferase SET Domain, Bifurcated 1) (SETDB1), ρυθμίζεται προς τα πάνω στο μελάνωμα και επιταχύνει την ανάπτυξη όγκου σε μοντέλα μελανώματος zebrafish που φέρουν τη μετάλλαξη BRAFV600E. Η SETDB1 καταλύει την τριμεθυλίωση της ιστόνης H3K9 και έτσι προάγει την καταστολή των γονιδίων στόχων (Ceol CJ, et al, 2011). Η υπερέκφραση του SETDB1 έχει δειχθεί ότι προκαλεί σημαντική αρνητική ρύθμιση μιας ομάδας γονιδίων (HOX) απαραίτητα για την ανάπτυξη (Ceol CJ, et al, 2011). Η μη σωστή ρύθμιση των HOX γονιδίων είναι γνωστό ότι σχετίζονται με έναν αριθμό αιματολογικών κακοηθειών και υποστηρίζουν την αθανατοποίηση των λευχαιμικών κυττάρων (Alharbi RA et al, 2013). Η πρωτεΐνη SETDB1 είναι αυξημένη στα ανθρώπινα μελανώματα, αλλά όχι σε καλοήθους σπίλους ή σε φυσιολογικά μελανοκύτταρα (Ceol CJ, et al, 2011).

Λαμβάνονται συνολικά, τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι η απορρύθμιση του συστήματος τροποποίησης των ιστονών συμβάλλει στην απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων και στην αυξημένη μακροζωία/πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων του μελανώματος.

3.c.v. Αναδιαμόρφωση χρωματίνης

Οι τροποποιήσεις ιστονών σχετίζονται στενά με τη λειτουργία των πρωτεϊνών πολυκλωνικής ομάδας (PcG), οι οποίες είναι μεταγραφικοί καταστολείς (Sparrmann A, et al, 2006). Αυτή η συσχέτιση οδηγεί σε δομικές αλλαγές στην οργάνωση της χρωματίνης και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων. Οι πρωτεΐνες PcG λειτουργούν μέσω του σχηματισμού των κατασταλτικών συμπλοκών polycomb, PRC1 και PRC2, αμφότερα από τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου. Αυτά τα συστήματα έχουν ενδιαφέρον για το μελάνωμα λόγω των προτεινόμενων λειτουργιών του για την κυτταρική σταθερότητα: το σύμπλεγμα PRC2 προσλαμβάνεται σε μη μεθυλιωμένες νησίδες CpG, από όπου η κύρια υπομονάδα του συμπλόκου, η μεθυλοτρανσφεράση EZH2 (ή η EZH1 σε μη κανονικά PRC2) μεθυλιώνει τρεις φορές την λυσίνη 27 της ιστόνης 3 (H3K27me3), δημιουργώντας μια μεταγραφικά κατασταλαμένη κατάσταση (D. Koldronic, et al, 2015). Είναι ενδιαφέρον ότι η EZH2 έχει δύο συμπληρωματικούς μηχανισμούς δράσης για την πραγματοποίηση της αποσιώπησης γονιδίων: η άμεση δράση της μεθυλοτρανσφεράσης σε υπολείμματα λυσίνης των ιστονών, τα οποία χρησιμεύουν ως θέση πρόσδεσης για το σύμπλοκο PRC1, προκαλώντας έτσι συμπύκνωση της χρωματίνης, και την αλληλεπίδρασή της με τις μεθυλοτρανσφεράσες του DNA, με αποτέλεσμα την υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG σε γονιδιακούς υποκινητές, που είναι σημαντικοί στη διατήρηση της σιωπηρής κατάστασης χρωματίνης (I. Comet, et al, 2016) (εικόνα 13).



Εικόνα 13: Ρύθμιση μεταγραφής από τα σύμπλοκα Polycomb. Το κατασταλτικό σύμπλοκο polycomb 1 (PRC1) αποτελείται από τέσσερις πυρηνικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν: το polyhomeotic homolog (PHC), την ring finger protein 1A or 1B (RING1A or RING1B), το B-lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog (BMI1), και το chromobox homolog (CBX). Οι υπομονάδες RING1A / RING1B είναι οι καταλυτική μηχανή του συμπλόκου PRC1 και πραγματοποιούν ουβικιτινίωση της ιστόνης 2A στη λυσίνη 119 (H2AK119ub). Το PRC2 αποτελείται από τέσσερις βασικές πρωτεΐνες οι οποίες είναι: η embryonic ectoderm development (EED), ο enhancer of zeste 2 (EZH2), ο καταστολέας του zeste 12 (SUZ12), και η polycomb like (PCL). Η EZH2 χρησιμεύει ως καταλυτική υπομονάδα PRC2 και τριμεθυλιώνει την λυσίνη 27 στην ιστόνη 3 (H3K27me3). Τα τρέχοντα μοντέλα υποδηλώνουν ότι η H3K27me3 που παράγεται από την PRC2 διευκολύνει την συμπύκνωση της χρωματίνης που οδηγεί στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Στη συνέχεια, το συμπλέγμα PRC1 αναγνωρίζει την H3K27me3 πραγματοποιεί περαιτέρω ουβικιτινιλιώσεις για τη διευκόλυνση της διατήρησης της κατασταλαμένης κατάστασης (Πηγή: Kylee J. Veazey, et al, 2014).

Μεταβολές στο γονίδιο EZH2 περιγράφονται σε πολλούς τύπους όγκων, συμπεριλαμβανομένου του μελανώματος με αποτέλεσμα την αναθεώρηση του ρόλου του EZH2 στο μελάνωμα (J. Tiffen et al, 2015). Η αυξημένη δραστηριότητα του EZH2, αποδεικνύεται από την γενική αφθονία μεθυλιώσεων H3K27me3, και είναι ένας δείκτης κακής πρόγνωσης που σχετίζεται με επιθετικές και μεταστατικές μορφές μελανώματος (D. Sengurta et al, 2016). Η μείωση της EZH2 σε κύτταρα μελανώματος οδηγεί στην απομάκρυνση των αποακετυλασών των ιστονών από την θέση του γονιδίου του CDKN1A με αποτέλεσμα την κανονική ακετυλίωση που αποκαθιστά την απόπτωση (Fan T, et al, 2011). Η αυξημένη έκφραση του EZH2 συνδέεται στενά με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό στο μελάνωμα. Οι βασικές οδοί, όπως οι RAS / RAF / MEK, AKT και E2F1, που εμπλέκονται στη βιολογία του μελανώματος, ρυθμίζουν επίσης τη δραστηριότητα του EZH2. Knockdown του BRAFV600E μείωσε τα επίπεδα έκφρασης του EZH2, υποδηλώνοντας ότι η μη ρυθμισμένη δραστηριότητα BRAF συμβάλλει στην ανώμαλη υπερέκφραση του EZH2 που παρατηρείται στο μελάνωμα (Hou P, et al, 2012). Τα υψηλά επίπεδα EZH2 συσχετίστηκαν με, παχύτερα πρωτογενή μελανώματα και αυξημένη εισβολή (Bachmann IM, et al, 2006). Σε μοντέλα ποντικού χρησιμοποιήθηκε μια μετάλλαξη του EZH2 με "knock-in", που αντιπροσωπεύει την κοινή ανθρώπινη μετάλλαξη του EZH2 (Y646F), για να διερευνηθεί η συν-λειτουργικότητα του EZH2 με την συχνά γενετικά τροποποιημένη οδό RAS-RAF-MAPK στο μελάνωμα (G.P. Souroullas, et al, 2016). Οι συγγραφείς πράγματι απέδειξαν ότι το ετερόζυγο EZH2Y641F δρα συνεργικά με την μετάλλαξη BrafV600E για να επάγει το

μελάνωμα και να προάγει την πρόοδο της νόσου. Ενδιαφέρον είναι ωστόσο, ότι αυτή η ογκογενής συν-λειτουργικότητα δεν παρατηρήθηκε με μεταλλαγμένο NRASQ61R, παρά το γεγονός ότι η BRAF βρίσκεται καθοδικώς της σηματοδότησης από το NRAS. Το EZH2Y641F απεδείχθη ότι δεν αυξάνει μόνο τα επίπεδα του H3K27me₃, αλλά αλλάζει δραματικά την κατανομή του σε όλο το γονιδίωμα, υποδηλώνοντας ότι το μεταλλαγμένο EZH2 μπορεί να ασκήσει ογκογόνο αποτέλεσμα στο μελάνωμα μέσω της τεράστιας αναδιοργάνωσης της δομής της χρωματίνης.

Ένα από τα γονίδια-κλειδιά που οι στόχοι του EZH2 είναι το CDKN2A (Wu ZL et al, 2010), το οποίο συχνά υπερμεθυλιώνεται στο μελάνωμα (Bishop JN, et al, 2007). Το γονίδιο του EZH2 ρυθμίζεται από τον E2F1, έναν παράγοντα μεταγραφής που δρα καθοδικά της p16INK4A του γονιδίου CDKN2A. Αυξητική ρύθμιση του E2F1 οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα EZH2 που καταστέλλει τον Bim, έναν προ-αποπτωτικό παράγοντα (Wu ZL, et al, 2010). Συνοπτικά, η παρεκκλίνουσα σηματοδότηση BRAF και η αυξημένη δραστηριότητα του E2F1 θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε υψηλή έκφραση του EZH2 με αποτέλεσμα αυξημένη μεθυλίωση του DNA και σίγαση των γονιδίων καταστολής όγκων (CDKN2A και CDKN1A).

Σε αντίθεση με την ενεργοποίηση του EZH2, άλλα καταλυτικά συστατικά του συμπλόκου PRC2 υπόκεινται σε συχνή γενετική αδρανοποίηση στο μελάνωμα. Για παράδειγμα, τα δεδομένα από το TCGA δείχνουν ότι τα γονίδια SUZ12 και EED μεταλλάσσονται ή απενεργοποιούνται μέσω ετεροζυγωτικής διαγραφής στο 50% των ασθενών στους 287 ασθενείς που είναι προσβάσιμοι μέσω του cBioportal. Επίσης, είναι εμφανής μια αξιοσημείωτη αλληλεπικάλυψη των παραλλαγών SUZ12 και EZH1 σε ασθενείς. Η μετάλλαξη SUZ12 έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της κατασταλτικής λειτουργίας του PRC2 και την επακόλουθη θετική ρύθμιση του δικτύου των RAS των γονιδίων (T. De Raedt et al, 2014), γεγονός που αντιπροσωπεύει έναν πιθανό ογκογόνο οδηγό και σημαντικό μηχανισμό πίσω από τη ανάπτυξη του μελανώματος.

Τα εξαρτώμενα από ATP ένζυμα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης που βρίσκονται σε σύμπλοκα πολυπρωτεϊνών μεταβάλλουν επίσης τη δομή της χρωματίνης μη ομοιοπολικά (Wang GG, et al, 2007). Αυτά τα σύμπλοκα υποτάσσονται σε διαφορετικές οικογένειες με διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες (Wang GG, et al, 2007). Τα σύμπλοκα SWI / SNF είναι ένα παράδειγμα τέτοιας οικογένειας και αποτελούνται από εξαρτώμενα από ATP ένζυμα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης. Η μη σωστή ρύθμιση αυτού του συμπλέγματος έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη μελανώματος (Vinod Saladi S, et al, 2010).

Η BRG1, μία σύνθετη υπομονάδα του συμπλόκου SWI / SNF, προάγει την επιβίωση κυττάρων μελανώματος που εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία μέσω σταθερής ενεργοποίησης του ML-IAP, ενός ισχυρού αναστολέα της απόπτωσης και ενός γονιδίου στόχου του MITF (Saladi SV, et al, 2013). Οι De la Serna, et al, πρότειναν ότι το MITF προσελκύει σύμπλοκα SWI / SNF σε ειδικούς για τα μελανοκύτταρα υποκινητές, όπου λαμβάνει χώρα αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και ενεργοποιείται η γονιδιακή έκφραση (de la Serna IL, et al, 2006). Η BRG1 βρέθηκε να αναδιαμορφώνει χρωματίνη στον υποκινητή του ML-IAP και να διευκολύνει την δέσμευση του MITF και ενός συν-ενεργοποιητή. Η έκφραση του ML-IAP σχετίζεται με αυξημένη ακετυλίωση ιστονών, με την πρόσληψη ακετυλοτρανσφερασών ιστόνης και με την μείωση των επιπέδων μεθυλίωσης των ιστονών μέσω μειωμένης πρόσληψης του EZH2. Έτσι, αυτός ο μηχανισμός προάγει τη λειτουργία προ-επιβίωσης του MITF με αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης (Saladi SV, et al, 2013).

Ο παράγοντας συναρμολόγησης χρωματίνης-1 (CAF-1), είναι ένα σύμπλοκο τριμερούς πρωτεΐνης που σχηματίζεται από τις υπομονάδες p48, p60 και p150, και προωθεί την ενσωμάτωση ιστόνης στη χρωματίνη και δρα σε αυστηρή συσχέτιση τόσο με τις διεργασίες επιδιόρθωσης DNA όσο και με την φάση S. Η υπερέκφραση της υπομονάδας p60 έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας νέος πολλαπλασιαστικός και προγνωστικός δείκτης στο μελάνωμα (Mascolo M, et al, 2010)

3.c.vi. Ο ρόλος των MicroRNAs και άλλων μη κωδικών RNAs στο μελάνωμα

Μια εναπομένουσα ερώτηση είναι πώς αυτά τα επιγενετικά σημάδια στοχεύουν σε αυτά τα γονίδια. Με βάση τα στοιχεία που συσσωρεύτηκαν την τελευταία δεκαετία, τα ncRNAs έχουν προστεθεί στον αυξανόμενο κατάλογο των μορίων που ρυθμίζουν γονίδια (Haurtman N, et al, 2013) συμβάλλοντας έτσι στην επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και η απορύθμιση τους σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του μελανώματος (Hombach S, et al, 2013). Τα ncRNAs ταξινομούνται σε 2 ευρείες κατηγορίες με βάση το μέγεθός τους: μικρά ncRNA (<200 bp) και μακρά ncRNA (lncRNA > 200 bp). Τα μικρά ncRNAs ταξινομούνται περαιτέρω σε micro RNA (miRNA), ribonucleic acid interacting RNA (riRNA), small nucleolar RNA (snoRNA) και πολλά άλλα με ακόμη μη χαρακτηρισμένες λειτουργίες (Haurtman N, et al, 2013). Μεταξύ των διαφόρων τύπων μικρών ncRNAs που αναφέρονται, τα miRNAs είναι καλύτερα μελετημένα στο μελάνωμα. Πολλά miRNAs έχουν ταυτοποιηθεί και έχουν αποδειχθεί ότι παίζουν ρόλο στην πρόοδο του μελανώματος.

Πίνακας 4: Προμεταστατικά και ογκοκατασταλτικά miRNA που αναφέρονται στο μελάνωμα (Πηγή: Jonathan J. Lee, et al, 2015).

	miRNA (mi-R)	Target/Function	Expression in malignant melanoma	Sample/Source	Clinical Utility	Publication year	Reference(s)
	miR-let-7 family	NRAS	↓	Cell lines	Detection, progression	2008	Müller and Bosserhoff, <i>Oncogene</i> (2008)
	miR-195	Wee1 kinase	↑	Cell lines	Prognosis	2013	Bhattacharya et al., <i>Oncogene</i> (2013)
	miR-221, -222	p27, c-KIT (miR-221)	↑	Cell lines, serum	Detection	2008; 2009; 2011	Felicetti et al., <i>Cancer Res</i> (2008); Igoucheva and Alexeev, <i>Biochem Biophys Res Commun</i> (2009); Kanemaru et al., <i>J Dermatol Sci</i> (2011)
Oncogenic or prometastatic	miR-193b	Mcl-1 (Bcl-2 family)	↓	Cell lines	Chemosensitization	2011	Chen et al., <i>Am J Pathol</i> (2011)
	miR-15b	BIM1	↓	Serum	Prognosis	2012	Friedman et al., <i>J Transl Med</i> (2012)
	miR-199a-5p	SWI/SNF	↑	Serum	Prognosis	2012	Friedman et al., <i>J Transl Med</i> (2012)
	miR-424	HIF-1α/HIF-2α	↑	Serum	Prognosis	2012	Friedman et al., <i>J Transl Med</i> (2012)
	miR-432-5p	unknown	↑	Serum	Prognosis	2012	Friedman et al., <i>J Transl Med</i> (2012)
	miR-1908, 199a-5-, 199a-3p	ApoE, DNAA4; loss promotes angiogenesis	↑	Tissue	Prognosis	2012	Pencheva et al., <i>Cell</i> (2012)
	miR-214	integrin-β3	↑	Tissue	Prognosis	2011	Penna et al., <i>EMBO J</i> (2011)
	miR-205	E2F	↓	Tissue	Therapeutic	2011; 2013	Dar et al., <i>J Biol Chem</i> (2011)
	miR-137	c-Met, YB1, MIF, EZH2	↓	Tissue-derived cell lines	Prognosis	2013	Luo et al., <i>J Invest Dermatol</i> (2013)
	miR-26a	SODD	↓	Cell lines	Progression, therapeutic	2013	Reuland et al., <i>J Invest Dermatol</i> (2013)
	miR-33a	Pim-1, CDK6, CCDN1	↓	Serum	Prognosis	2012	Friedman et al., <i>J Transl Med</i> (2012)
Tumor suppressive	miR-34a	PNUTS (PPP1R10)	↓	Cell lines	Detection, Therapeutic	2008	Lodygin et al., <i>Cell Cycle</i> (2008)
	miR-125b	c-Jun	↓	Cell lines	Therapeutic	2013	Kappelmann et al., <i>Oncogene</i> (2013)
	miR-9	NF-KB1	↓	Tissue	Prognosis	2012	Liu et al., <i>J Pathol</i> (2012)
	miR-18b	p53	↓	Cell lines	Therapeutic	2013	Dar et al., <i>J Natl Cancer Inst</i> (2013)
	miR-573	MCAM	↓	Cell lines	Therapeutic	2013	Wang et al., <i>Oncol Rep</i> (2013)

Η προγνωστική και η παθολογική σημασία των ncRNAs στο μελάνωμα έχει καθιερωθεί και αντιπροσωπεύει μια ενεργή περιοχή έρευνας (Πίνακας 4) (Bennett PE, et al, 2013). Πράγματι, μια σειρά miRNAs και άλλων ncRNA έχει δειχθεί ότι εμφανίζουν είτε ογκοκατασταλτικές ιδιότητες είτε προ-ογκογόνες και / ή προ-μεταστατικό δυναμικό που περιλαμβάνει πολλαπλές μοριακές οδούς. Η αντικαρκινική λειτουργία των miRNA, εν μέρει, μπορεί να διαμεσολαβείται μέσω αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες PcG. Το miR-200c αποδείχθηκε ότι είναι αρνητικά ρυθμισμένο τόσο στα πρωτογενή όσο και στα μεταστατικά μελανώματα σε σύγκριση με τους καλοήθεις μελανοκυτταρικούς σπύλους και η υπερέκφρασή του στις κυτταρικές σειρές μελανώματος φαίνεται ότι έχει ως αποτέλεσμα τον σημαντικά μειωμένο, πολλαπλασιασμό κυττάρων, μεταναστευτική ικανότητα και έκφραση βασικών μεταφορέων που εμπλέκονται σε αντίσταση σε φάρμακα κατά του μελανώματος (Liu S, et al, 2012). Το Bmi-1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog) είναι ένα συστατικό του συμπλόκου PcG 1 (PRC1), το οποίο, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, περιλαμβάνει μια σημαντική κατηγορία μεταγραφικών καταστολέων που ενορχηστρώνουν τις αλλαγές στη δομή της χρωματίνης και ρυθμίζουν τη γονιδιακή δραστηριότητα (Ringrose L, et al, 2004). Το Bmi-1, ειδικότερα, είναι ένας σημαντικός μεταγραφικός καταστολέας του γονιδιακού τύπου του Ink4a / Arf, ο οποίος κωδικοποιεί δύο διακριτά γονιδιακά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων των καταστολέων όγκου p16INK4A (p16) και p14ARF (p14) (Jacobs JJ, et al, 1999). Το p16 αναστέλλει την εξαρτώμενη από την κυκλίνη δραστηριότητα κινάσης και έτσι εμποδίζει την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο, ενώ η p14 προάγει τη σταθερότητα του p53 και με αυτό τον τρόπο αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και προάγει την απόπτωση (Jacobs JJ, et al, 1999). Είναι ενδιαφέρον ότι η υπερέκφραση του miR-200c σε κυτταρικές σειρές μελανώματος οδηγεί σε σημαντική μείωση της ρύθμισης του Bmi-1 και δείχνει έναν παρόμοιο φαινότυπο με τις κυτταρικές σειρές μελανώματος Bmi-1 knockdown (Liu S, et al, 2012). Επιπλέον, η υπερέκφραση miR-200c αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη xenograft μελανώματος και τη μετάσταση in vivo, η οποία συσχετίζεται με τη μειωμένη έκφραση του Bmi-1 καθώς και με τα μειωμένα επίπεδα της E-καντερίνης (Liu S, et al, 2012). Αρκετά άλλα miRNAs, συμπεριλαμβανομένου του miR-612, έχουν αποδειχθεί ότι καταστέλλουν την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση και μετάσταση σε άλλους ανθρώπινους καρκίνους (Tao ZH, et al, 2013). Τόσο η miR-200c όσο και η έκφραση της E-καντερίνης συνδέονται κλινικά με το αυξημένο πάχος του μελανώματος και την πρόοδο της νόσου (van Kempen LC, et al, 2012). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το miR-200c εμφανίζει ογκοκατασταλτική λειτουργία με στόχευση του Bmi-1 και επιπλέον ρυθμίζει θετικά μόρια καταστολής του όγκου και κυτταρικής προσκόλλησης. Έτσι, η αρνητική ρύθμισή του, όπως παρατηρήθηκε σε δείγματα πρωτογενών και μεταστατικών μελανωμάτων, φαίνεται να συμβάλλει στη μοριακή παθογένεση του μελανώματος.

Τα miRNAs μπορούν να δρουν ως ογκογόνα miRNAs ή ως ογκοκατασταλτικά miRNA. Η ρύθμιση του miRNA συσχετίζεται με διάφορα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της παθογένειας του μελανώματος, όπως η προώθηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης (π.χ. miR-137, miR-221), η αντοχή στον κυτταρικό θάνατο (miR-18b και miR26a), η αναπαραγόμενη αθανασία, miR-203), και εισβολή ή μετάσταση (miR-214, let-7a) (Bennett PE, et al, 2013).

Αυξημένα επίπεδα άγριου τύπου p53 ρυθμίζουν θετικά άμεσα την έκφραση του miR-149, το οποίο επίσης αυξάνεται σε φρέσκα απομονωμένα στελέχη μεταστατικού μελανώματος (Jin L, et al, 2011). Το miR-149, στην πραγματικότητα, στοχεύει και μειώνει τα επίπεδα κινάσης-3α συνθάσης γλυκογόνου, γεγονός που αυξάνει την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης οικογένειας Bcl-2, την Mcl-1, που είναι γνωστό ότι παράγει αποπτωτική αντίσταση σε κυτταρικές σειρές μελανώματος (Jin L, et al, 2011). Παρομοίως, το miRNA-21 είναι σημαντικά αυξημένο στους ιστούς του πρωτεύοντος μελανώματος σε

σύγκριση με τους καλοήθεις σπίλους και συνδέεται στενά με αυξημένο πολλαπλασιασμό και μειωμένη απόπτωση (Satzger I, et al, 2012). Επιπλέον, ένα σύνολο 14 miRNAs στο χρωμόσωμα X (miR-506-514 σύμπλεγμα) βρέθηκε ότι υπερεκφράζεται συνεχώς και σημαντικά σε σχεδόν όλα τα δείγματα βιοψίας ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα, ανεξάρτητα από την κατάσταση μετάλλαξης σε NRAS ή BRAF (Streicher KL, et al, 2012). Συγκεκριμένα, η αναστολή της έκφρασης αυτής της συστάδας σε κυτταρικές σειρές μελανώματος ή σε μία από τις υπο-συστάδες της οδήγησε σε σημαντική αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, επαγωγή απόπτωσης, μειωμένη διεισδυτικότητα και μειωμένο σχηματισμό αποικιών in vitro (Streicher KL, et al, 2012). Πράγματι, ένας αριθμός miRNAs εμφανίζει ογκογονικό δυναμικό στο μελάνωμα μέσω αναστολής της απόπτωσης. Επίσης, αναγνωρίστηκε πρόσφατα ένα δίκτυο συνεργασίας miRNAs (miRNA-1908, miR-199a-5p και miR-199a-3p) που ενδογενώς προάγει τη μεταστατική εισβολή, την αγγειογένεση και τον αποικισμό στο μελάνωμα (Pencheva N, et al, 2012). Αυτά τα miRNAs φαίνεται να στοχεύουν την απολιποπρωτεΐνη E (ApoE), η οποία κανονικά καταστέλλει την εισβολή και τη μετάσταση (Pencheva N, et al, 2012). Επιπλέον, οι ασθενείς των οποίων τα πρωτογενή μελανώματα εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα miR-199a-3p, miR-199a-5p ή miR-1908 έχουν αποδειχθεί ότι έχουν σημαντικά μικρότερο χρόνο επιβίωσης χωρίς μετάσταση από ασθενείς των οποίων τα πρωτογενή μελανώματα εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα καθενός από αυτά miRNAs (Pencheva N, et al, 2012). Είναι ενδιαφέρον ότι οι εξαιρετικά μεταστατικές κυτταρικές σειρές μελανώματος οι οποίες προεπεξεργάζονται με ένα κοκτέιλ νουκλεϊνικών οξέων που στοχεύουν αυτά τα miRNAs για μείωση δείχνουν μειωμένη ικανότητα να μετασταθούν σε πολλαπλά κατά την έγχυση τους σε ποντίκια (Pencheva N, et al, 2012).

Το miR-31 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9p21.3, το οποίο συχνά διαγράφεται στο μελάνωμα. Δρα ως ογκοκαταστολέας στο μελάνωμα ρυθμίζοντας αρνητικά την έκφραση του EZH2 και άλλων ογκογονιδίων. Το EZH2 μπορεί επιγενετικά να ρυθμίζει την έκφραση του miR-31 σε έναν αμοιβαία ανταγωνιστικό βρόχο ανάδρασης. Η μεθυλίωση του DNA στην περιοχή του υποκινητή του miR-31 έχει δείχθει σε μία κυτταρική γραμμή μελανώματος (Asangani IA, et al, 2012). Έχει επίσης αναφερθεί ότι τόσο το miR-10158 όσο και το miR-3157 ρυθμίζουν αρνητικά την EZH2 και βοηθούν στην πρόοδο του καρκίνου. Αυτές οι παρατηρήσεις παρέχουν διορατικότητα στις λειτουργικές αλληλεπιδράσεις του mRNA, του miRNA, των συμπλόκων τροποποίησης της χρωματίνης και της μεθυλίωσης του DNA και οδηγούν σε μια νέα εποχή έρευνας σε πολύπλοκα ρυθμιστικά δίκτυα στο μελάνωμα. Ορισμένα miRNAs μπορούν να χρησιμεύσουν ως δείκτες για τη διάκριση μεταξύ καλοήθων και κακοήθων κυττάρων (Bonazzi VF, et al, 2012).

Τα lncRNA, όπως τα miRNAs, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στον επιγενετικό έλεγχο, με ποικίλους τρόπους δράσης και λειτουργικές συνέπειες. Επομένως, είναι πιθανό ότι η ανώμαλη έκφραση των lncRNA θα συνέβαλε στην ανάπτυξη του μελανώματος όπως συμβαίνει με άλλους τύπους καρκίνου (Haurtman N, et al, 2013).

Τα lncRNAs λειτουργούν ως μεταγραφικοί ρυθμιστές με την πρόσληψη συμπλόκων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης (π.χ., PRC) σε τόπους στόχους σε cis ή trans στοιχεία. Οι τόποι-στόχοι είτε ενεργοποιούνται είτε σιγάζονται ανάλογα με τις τροποποιήσεις (Brockdorff N, et al, 2013). Αυτός είναι ο πιο συνηθισμένος μηχανισμός που χρησιμοποιείται από τα lncRNAs για να ασκούν έλεγχο στη γονιδιακή ρύθμιση. Ένας εναλλακτικός τρόπος δράσης περιλαμβάνει τη δέσμευση ρυθμιστικών πρωτεϊνών από τα lncRNAs, αναστέλλοντας έτσι τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Hirota K et al, 2008). Μια άλλη ομάδα lncRNAs επηρεάζει τα πρότυπα ματίσματος μέσω φυσικών αλληλεπιδράσεων με έναν ρυθμιστή του εναλλακτικού ματίσματος.

Πολλά lncRNAs είναι γνωστό ότι φιλοξενούν snoRNAs, που ονομάζονται sno-lncRNA. Οι λειτουργίες πολλών ξενιστών lncRNAs δεν είναι γνωστές, αν και μερικές από αυτές συσχετίζονται με τη διαμόρφωση του μοντέλου ματίσματος (Yin Q-F, et al, 2012). Τα snoRNAs εμπλέκονται στην τροποποίηση των rRNAs, αν και οι στόχοι πολλών από αυτά παραμένουν να εντοπιστούν. Αρκετά lncRNA έχουν αποδειχθεί ότι έχουν ενδεχόμενους ρόλους στη μετάβαση των φυσιολογικών μελανοκυττάρων στο μελάνωμα (Hombach S, et al, 2013).

3.c.vi.1. Το μη κωδικό RNA που ενεργοποιείται από το BRAF (BANCR)

Το μη κωδικό RNA που ενεργοποιείται από το BRAF (BANCR), ένα τεσσάρων εξονίων 693 bp μεταγράφομα που επάγεται μεγάλο βαθμό από την BRAFV600E σε μελανοκύτταρα. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 και υπερεκφράζεται σε ανθρώπινα μελανώματα. Το BANCR ταυτοποιήθηκε ως ένας πιθανός ρυθμιστής της μετανάστευσης κυττάρων του μελανώματος καθώς παρατηρήθηκε μεγάλη μεταναστευτική ελάττωση μετά την μείωση του BANCR (Flockhart RJ, et al, 2012). Ο μηχανισμός με τον οποίο BANCR ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Μια πρόσφατη μελέτη επιβεβαίωσε τη συμβολή του BANCR στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μελανώματος και η έκφραση του BANCR αυξήθηκε με το στάδιο του όγκου. Η μελέτη αυτή κατέδειξε επίσης ότι το BANCR μπορεί να προωθήσει τον πολλαπλασιασμό του μελανώματος ενεργοποιώντας τις οδούς ERK1 / 2 και JNK MAPK τόσο in vitro όσο και in vivo. Αυτή η σχέση μεταξύ του BANCR και των μονοπατιών MAPK καταδεικνύει έναν νέο μηχανισμό στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού του μελανώματος (Li R, et al, 2014).

3.c.vi.2. Το αντιπληροφοριακό RNA μεταγράφομα HOX (HOTAIR).

Αυτό το lncRNA προέρχεται από το σύμπλεγμα HOXC και δρα σε trans στοιχεία για να ρυθμίσει τη μεταγραφή του συμπλέγματος HOXD (Rinn JL, et al, 2007). Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι το HOTAIR έχει προ-μεταστατική δραστηριότητα σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως το στήθος (Gupta RA, et al, 2010), το παγκρεατικό (Kim K, et al, 2012) και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Yang Z, et al, 2011). Πρόσφατα, η έκφραση από 6 καλά τεκμηριωμένα lncRNAs που σχετίζονται με μετάσταση αξιολογήθηκε σε πρωτογενές μελάνωμα και αντιστοιχούσες μεταστάσεις λεμφαδένων. Το HOTAIR κατατάσσεται μεταξύ των 6 lncRNAs που εκφράζονται με στις μεταστάσεις σε σύγκριση με τους αντίστοιχους πρωτοπαθείς όγκους (Tang L, et al, 2013). Knockdown του HOTAIR ανέστειλε την κινητικότητα και την επιθετικότητα των κυττάρων μελανώματος, με μειωμένη αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας (Tang L et al, 2013).

Το HOTAIR προσλαμβάνει το σύμπλοκο PRC2 σε ειδικά γονίδια-στόχους, οδηγώντας σε τριμεθυλίωση του H3K27 και επιγενετική αποσιώπιση κατασταλικών γονιδίων της μετάστασης. Είναι απαραίτητη η περαιτέρω μηχανιστική διερεύνηση της ρύθμισης της μετάστασης από το HOTAIR. Το HOTAIR καταστέλλει την έκφραση του HOXD που παράγει το miR-7, το οποίο αναστέλλει με την σειρά του την έκφραση της SETDB1 ιστονικής μεθυλοτρανσφεράσης που απαιτείται για τη μεταγραφή του STAT3 (Zhang H, et al, 2014). Μια αναφορά επίσης δείχνει ότι το SETDB1 ενισχύεται επανειλημμένα στο μελάνωμα και επιταχύνει την ανάπτυξη όγκου σε μοντέλα μελανώματος zebrafish που φιλοξενούν την κοινή μετάλλαξη BRAFV600E (Khaitan D, et al, 2011). Αναφορές προ-μεταστατικής δραστηριότητας σε πολλαπλά προκλινικά συστήματα μοντέλων, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι αυτό το lncRNA είναι ένας πιθανός στόχος για τη θεραπεία μεταστάσεων μελανώματος.

3.c.vi.3. SPRY4-IT1

Το SPRY4-IT1 προέρχεται από ένα ιντρόνιο του γονιδίου Sprouty 4 (SPRY4) και προβλέπεται να περιέχει αρκετές μακρές φουρκέτες στη δευτεροταγή δομή του. Αυτά τα γονίδια έχουν συναφή προφίλ έκφρασης, αν και τα δύο είναι μεταγραφικά και λειτουργικά ανεξάρτητα (Mazar J, et al, 2014). Αυτό το lncRNA αναγνωρίστηκε από τους Khaitan et al, (Khaitan D, et al, 2011) που συνέκριναν τα lncRNAs σε κυτταρικές σειρές μελανώματος, μελανοκυττάρων και κερατινοκυττάρων χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες lncRNA. Το SPRY4-IT1 βρέθηκε να είναι αυξημένο στις κυτταρικές σειρές μελανώματος. Το knockdown αυτού του lncRNA προκάλεσε μείωση στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση και αυξημένα ποσοστά απόπτωσης σε κυτταρικές σειρές μελανώματος (Khaitan D, et al, 2011).

Οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους το SPRY4-IT1 επηρεάζει την εξέλιξη του μελανώματος απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση. Ανάλυση RNA-FISH έδειξε ότι αυτό το lncRNA εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων μελανώματος (van Heesch S, et al, 2014) και έχει αποδειχθεί μια συσχέτιση με τα πολυσώματα (Mazar J, et al, 2014). Το SPRY4-IT1 συσχετίζεται με την λιπιδιακή φωσφατάση λιπίνη 2, μειώνει την αφθονία της, και μπορεί να καταστείλει την απόπτωση που προκύπτει από τον μεταβολισμό των λιπιδίων και τη λιποτοξικότητα. Μια πρόσφατη μελέτη σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) έχει βρει στοιχεία που αποδεικνύουν ότι το SPRY4-IT1 ελέγχει την epithelial-mesenchymal transition (EMT) μέσω της ρύθμισης της έκφρασης της E-καντερίνης και της βιμεντίνης που οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τη μετάσταση (Sun M, et al, 2014).

3.c.vi.4. LIme23

Το ποντικίσιο lncRNA VL30-1 συνδέεται με τον παράγοντα εναλλακτικού ματίσματος PSF (PSF) και αναστέλλει τη ογκοκατασταλτική λειτουργία του PSF στον ποντικό (Wu C-F, et al, 2013). Εφόσον η πρωτεΐνη PSF είναι εξαιρετικά συντηρημένη από ανθρώπους σε ποντίκια, οι Wu et al. χρησιμοποιούν χρωματογραφία συγγένεια για την επιλογή ανθρώπινων lncRNA που δεσμεύονται με το PSF από το πυρηνικό RNA της σειράς του ανθρώπινου μελανώματος YUSAC. Αυτή η μελέτη ταυτοποίησε ένα νέο 1,600 βάσης lncRNA το οποίο ονομάστηκε LIme23, (Wu C-F, et al, 2013). Το LIme23 βρέθηκε επίσης ότι εκφράζεται αποκλειστικά σε σειρές ανθρώπινου μελανώματος. Σημαντική ελάττωση στην ανάπτυξη μετά από την αποσιώπιση του LIme23 υποδηλώνουν ότι το LIme23 διαδραματίζει έναν ογκογόνο ρόλο στο ανθρώπινο μελάνωμα (Wu C-F, et al, 2013).

Το PSF προάγει καταστολή όγκου με δέσμευση στον υποκινητή του πρωτοογκογονιδίου Rab23, ο οποίος κωδικοποιεί μια μικρή GTPάση συναφή με την RAS. Το VL30-1 αναστέλλει αυτή τη λειτουργία σε ποντικούς όταν δεσμεύεται με στην περιοχή δέσμευσης RNA στο PSF. Η αναγνώριση μιας διατηρούμενης αλληλουχίας στόχευσης για το PSF ενσωματωμένη στην περιοχή υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου Rab23 πρότεινε ότι το Rab23 μπορεί να είναι ένας στόχος του PSF σε ανθρώπινα κύτταρα. Οι μελέτες αυτές μαζί έδειξαν ότι το LIme23 εμπλέκεται στην αιτιολογία του ανθρώπινου μελανώματος.

3.c.vi.5. Το αντιπληροφοριακό μη κωδικοποιητικό RNA στη θέση INK4 (ANRIL)

Πριν μερικά χρόνια ταυτοποιήθηκε ένα antisense lncRNA, το ANRIL (Pasmant E, et al, 2007). Το ANRIL αποτελείται από 19 εξόνια, καλύπτει μια περιοχή των 126,3 kb και μεταγράφεται ως 3,834-bp lncRNA στον αντιπληροφοριακό προσανατολισμό σε σχέση με το σύμπλεγμα γονιδίων p15 / CDKN2B-p16 / CDKN2A/p14 / ARF. Έχουν αναφερθεί αρκετές ισομορφές του ANRIL, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων βραχέων και μακρών ισομορφών, και της πρόσφατης ανακάλυψης κυκλικής ισομορφής (Burd CE, et al, 2010). Διαφορετικά εξόνια του ANRIL εκφράζονται διαφορετικά σε κυτταρικές σειρές μελανώματος και υπάρχουν στοιχεία για την ύπαρξη κυκλικής ANRIL σε ορισμένα από αυτά τα κύτταρα. Αυτή η ανακάλυψη πρότεινε ότι το εναλλακτικό μάτισμα τροποποιεί τη δομή του ANRIL (Burd CE, et al, 2010). Αυτός ο μηχανισμός έχει μελετηθεί στην αθηροσκλήρωση και απαιτείται περαιτέρω εργασία για να χαρακτηριστεί αυτός ο μηχανισμός στο μελάνωμα. Είναι ενδιαφέρον ότι εντοπίστηκε μια μοναδική νουκλεοτιδική παραλλαγή rs1011970 (στο ιντρόνιο 9 της ισομορφής ANRIL με 19 εξόνια) που σχετίζεται με κίνδυνο μελανώματος, αλλά μόνο για τον ομόζυγη αλληλική μετάλλαξη σε T.

Έχει προταθεί ένας μηχανισμός σίγασης που λειτουργεί με cis, με τη μεσολάβηση ειδικών μεταγράφων ANRIL, να ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του CDKN2A / 2B μέσω αναδιαμόρφωσης χρωματίνης (Yap KL, et al, 2010, Sato K et al, 2010). Το ANRIL συνδέεται με το PRC1 με περιοχές δέσμησης RNA του CBX7 του PRC1, ένα συστατικό που απαιτείται για την καταστολή της γονιδιακής μεταγραφής, και έτσι καταστέλλει την δραστηριότητα γονιδίου CDKN2A / B με μεθυλίωση H3K27. Ανταγωνιστική αναστολή της δεσμεύσεως του ANRIL, με την έκφραση μίας αντινοσηματικής αλληλουχίας παρεμποδίζει την καταστολή του CDKN2A από το CBX7 και προκαλεί τη συντόμηση της κυτταρικής διάρκειας ζωής. Αρκετές δομές βρόγχου RNA που σχηματίζονται από το ANRIL δεσμεύονται ειδικά στο CBX7, και τουλάχιστον ένας από αυτούς συμμετέχει στην αναγνώριση του H3K27. Η αναγνώριση της H3K27 είναι απαραίτητη για την μονοουβικιτινίωση της ιστόνης H2A στην λυσίνη 119 (H2A-K119), η οποία με τη σειρά της οδηγεί στη διατήρηση της καταστολής (Yap KL, et al, 2010). Η σύνδεση του SUZ12 (ένα συστατικό PRC2) έχει ως αποτέλεσμα μεταγραφική καταστολή του CDKN2B και επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή την αναστέλλει την πρόωρη γήρανση των κυττάρων (Kotake Y, et al, 2011). Σε μια πρόσφατη μελέτη, βρέθηκε ότι το ANRIL ρυθμίζεται προς τα πάνω στον καρκίνο του γαστρικού ιστού σε σχέση με τον μη καρκινικό ιστό και ως εκ τούτου θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για τη συνολική επιβίωση στον καρκίνο του στομάχου.

Η ρύθμιση του τόπου CDKN2A/B από το ANRIL υποδεικνύει ότι έχει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διευκολύνει επίσης τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μετά την επιδιόρθωση της βλάβης του DNA (DDR) (Wan G, et al, 2013). Το ANRIL επάγεται από τον παράγοντα μεταγραφής E2F1 κατά εξαρτώμενο τρόπο μετά από βλάβη στο DNA. Σε αυτή την περίπτωση, αυξημένα επίπεδα έκφρασης του ANRIL σε μεταγενέστερα στάδια της DDR καταστέλλουν έκφραση CDKN2A / B (Wan G, et al, 2013). Το ANRIL εμπλέκεται στην πρόοδο του καρκίνου επίσης μέσω επαγωγής του E2F1. Η επαγωγή της ανάπτυξης από ANRIL οφείλεται εν μέρει στην επιγενετική καταστολή των miR-99a και miR-449a (έλεγχο των μονοπατιών mTOR και CDK6 / E2F1) με δέσμηση στο PRC2, σχηματίζοντας έτσι έναν βρόχο θετικής ανάδρασης που προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η υψηλή έκφραση του miR-449a μειώνει την έκφραση διάφορων αποακετυλασών ιστόνης και κατά συνέπεια αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ η μείωση του miR-449 σχετίζεται με την κυτταρική ανάπτυξη. Η ANRIL ρυθμίζει επίσης τα βασικά γονίδια του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων (Bochenek G, et al, 2013) και, δεδομένου ότι ρυθμίζεται από τη σηματοδότηση STAT1 ιντερφερόνης-γάμμα, προβλέπεται ότι θα έχει πιθανό ρόλο σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις (Harismendy O, et al, 2011).

3.c.vi.6. Το RNA συσχετιζόμενο με ουροθηλιακό καρκίνωμα 1 (UCA1)

Αυτό το lncRNA αποτελείται από 3 εξόνια μήκους 1,4 kb. Ακολούθως, μια άλλη ισομορφή (2,2 kb) ταυτοποιήθηκε από μια διαφορετική ομάδα ως γονίδιο ανθεκτικότητας σε φάρμακα (CUDR) επαγόμενο από τον καρκίνο. Σε μια πρόσφατη μελέτη που διερεύνησε τους ρόλους 6 σχετιζόμενων με τον καρκίνο lncRNAs στο μελάνωμα και γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση UCA1, ειδικά σε προχωρημένα στάδια (Tian Y, et al, 2014). Η αποσιώπηση του UCA1 κατέστειλε τη μετανάστευση κυττάρων μελανώματος *in vitro*, υποδηλώνοντας ότι το UCA1 μπορεί να συνεισφέρει στη μετάσταση του όγκου (Tian Y, et al, 2014). Οι λειτουργικές μελέτες που διεξήχθησαν για τον προσδιορισμό του μηχανισμού δράσης αυτού του lncRNA αποκάλυψαν ότι το UCA1 αρνητικά ρυθμίζει το p27 (γονίδιο καταστολής όγκου) στον καρκίνο του μαστού (Huang J, et al, 2014). Η φωσφορυλιωμένη ετερογενής πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη 1 (hnRP1) που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με την UCA1 και αυξάνει την σταθερότητα της UCA1. Το hnRP1 ενισχύει τη μετάφραση του mRNA του p27 αλληλεπιδρώντας με την 5'-αμετάφραση περιοχή του και η αλληλεπίδραση του UCA1 με hnRNP1 καταστέλλει τα επίπεδα της πρωτεΐνης p27 μέσω ανταγωνιστικής αναστολής (Huang J, et al, 2014). Ωστόσο, οι μηχανισμοί με τους οποίους το UCA1 προάγει την πρόοδο του μελανώματος παραμένουν προς αναγνώριση.

3.c.vi.7. Το μετάγραφο 1 του πνευμονικού αδενοκαρκινώματος που σχετίζεται με τη μετάσταση (MALAT1)

Αυτό το lncRNA είναι επίσης γνωστό ως πυρηνικά εμπλουτισμένο μεταγράφημα 2 (NEAT2). Ανακαλύφθηκε ως προγνωστικός δείκτης για τη μετάσταση καρκίνου του πνεύμονα αλλά έχει συνδεθεί με διάφορους άλλους τύπους ανθρώπινου όγκου (Gutschner T, et al, 2013). Το MALAT1 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο μελάνωμα σε σύγκριση με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς (Tian Y, et al, 2014). Μελέτες knockdown δείχνουν μια δράση του MALAT1 στη μετανάστευση κυττάρων μελανώματος υποστηρίζεται ότι το MALAT1 μπορεί να προωθήσει την εξάπλωση του μελανώματος (Tian Y, et al, 2014).

Συνολικά, υπάρχουν σημαντικές προκαταρκτικές ενδείξεις που υποδηλώνουν ότι και τα lncRNA, εκτός από τα miRNAs, απόρρυθμίζονται σταδιακά και μπορούν να προάγουν τη μελανογένεση μέσω της απώλειας είτε της λειτουργίας καταστολής των όγκων είτε της προώθησης ογκογόνων ή προμεταστατικών μοριακών οδών. Παρόλο που πολλά στοιχεία παραμένουν ασαφή, συμπεριλαμβανομένων των ακριβών μηχανισμών ή οδών που αποτελούν τη βάση της δυσλειτουργίας τους, καθώς και των βασικών ρυθμιστικών μηχανισμών τους, τα ncRNA παρέχουν μια νέα περιοχή περαιτέρω έρευνας στη παθογένεση του μελανώματος και τη θεραπεία του καρκίνου.

4. Χαρακτηριστικά της εξέλιξης του όγκου

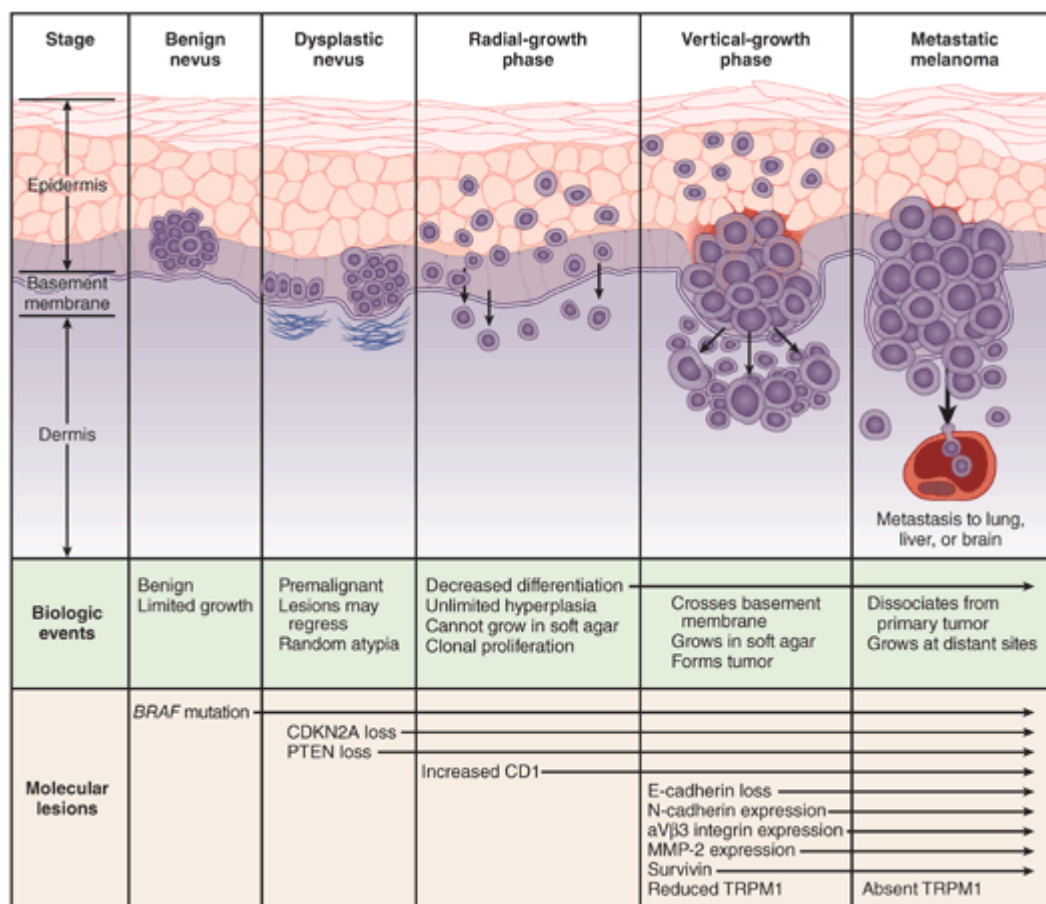
Η εξέλιξη του όγκου περιγράφηκε αρχικά μάλλον από τον Rous, ο οποίος το 1935 καθόρισε την έννοια ως έναν από τους όγκους που πηγαίνει «από το κακό στο χειρότερο» (Rous P, et al, 1935). Η εξέλιξη με αυτή την έννοια είναι ουσιαστικά μια κλινική έννοια, υπογραμμίζοντας την αυξανόμενη θανατηφόρα δυνατότητα ενός δεδομένου νεοπλασματος με την πάροδο του χρόνου. Πειραματικές μελέτες σε ποντίκια από τον Foulds και άλλους

έδειξαν ότι η αρχική απόκριση σε ένα καρκινογόνο δεν είναι συνήθως σε μια πλήρως ανεπτυγμένη κακοήθεια, αλλά μάλλον ένας καλοήθης όγκος, όπως ένα θήλωμα (Foulds L, et al, 1969). Οι καλοήθεις αυτοί όγκοι είναι συχνά πολλαπλοί και οι περισσότεροι από αυτούς είναι αδρανείς. Με την πάροδο του χρόνου, ένα μικρό υποσύνολο αυτών των αλλοιώσεων μπορεί να αναπτύξει αλλαγές στη μορφολογία και τη συμπεριφορά του, συμπεριλαμβανομένου του αυξανόμενου μεγέθους, της άτυπης και τελικά της ικανότητας μεταστάσεων. Αυτές οι αλλαγές δεν αντιπροσωπεύουν μια ολική αλλαγή στην προϋπάρχουσα αλλοίωση, αλλά μάλλον την ανάπτυξη νέων μοντέλων διάδοσης. Αυτά τα πρότυπα τείνουν να εμφανίζονται σε ξεχωριστά βήματα, προχωρώντας από την αρχική καλοήθη βλάβη σε μια πλήρως κακοήθη βλάβη μέσω ενδιάμεσων βημάτων που χαρακτηρίζονται από την αύξηση της ατυπίας των κυττάρων. Σε κάποιο σημείο, μια ενδιάμεση αλλοίωση μπορεί να αποκτήσει δυναμικό για συνεχή ανάπτυξη και στη συνέχεια για μετάσταση. Σε αυτό το σημείο, η θεραπεία γίνεται πιο δύσκολη ή αδύνατη. Αν και οι αρχικές βλάβες μπορούν να θεωρηθούν ως «πρόδρομοι», η πρόοδος σε οποιαδήποτε βλάβη δεν είναι αναπόφευκτη, αλλά αντιπροσωπεύει ένα σπάνιο γεγονός, με τις περισσότερες αλλοιώσεις να παραμένουν σταθερές ή να υποχωρούν. Με την αυξανόμενη κατανόηση της γενετικής βάσης του καρκίνου, έχει καταστεί σαφές ότι αυτά τα «σπάνια συμβάντα» αντιπροσωπεύουν σωματικές μεταβολές στο γονιδίωμα των αλλοιωμένων κυττάρων, όπως ενεργοποιητικές μεταλλάξεις ογκογονιδίων, απενεργοποιητικές μεταλλάξεις γονιδίων καταστολής, παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (Bastian BC, et al, 2014) και άλλες.

4.a. Γενετική βάση της νεοπλασματικής εξέλιξης στο μελάνωμα

Όπως συζητήθηκε εν συντομία παραπάνω, η εξέλιξη του όγκου στα μελανοκυτταρικά και άλλα καρκινικά συστήματα είναι γνωστό ότι περιλαμβάνει γενετικά γεγονότα. Η ομάδα του Bastian δημοσίευσε πρόσφατα μια μελέτη ορόσημο των γενετικών αλλαγών στη διαδικασία της εξέλιξης του μελανώματος από πρόδρομες βλάβες (Shain AH, et al, 2015). Σε αυτή τη μελέτη, τα 293 γονίδια που σχετίζονται με το μελάνωμα και τον καρκίνο αλληλουχήθηκαν σε 150 διαφορετικές περιοχές 37 πρωτογενών μελανωμάτων και των παρακείμενων πρόδρομων αλλοιώσεων. Το ιστολογικό φάσμα αυτών των περιοχών περιελάμβανε αναμφισβήτητα καλοήθεις και ενδιάμεσες αλλοιώσεις, καθώς και *in situ* και κακοήθεις μελανώματα. Οι πρόδρομες αλλοιώσεις συμπεριλάμβαναν καλοήθεις και δυσπλαστικούς σπίλους. Αυτές οι βλάβες βρέθηκαν να περιέχουν μεταλλάξεις «οδηγού» που είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν την οδό των MAP κινασών. Υπήρξαν σημαντικές διαφορές στις γενετικές αλλοιώσεις στα στάδια της εξέλιξης. Οι αναμφισβήτητα καλοήθεις βλάβες περιείχαν αποκλειστικά τη μετάλλαξη BRAFV600E που είναι κοινή στα μελανώματα. Οι ενδιάμεσες περιοχές είχαν ένα ευρύτερο φάσμα εναρκτήριων ογκογόνων από τις αναμφισβήτητα καλοήθεις αλλοιώσεις, συμπεριλαμβανομένων των BRAFV600K, BRAFK601E και NRAS μεταλλάξεων. Οι διάφορες μεταλλάξεις οδηγού παρατηρήθηκαν επίσης στα *in situ* και διηθητικά μελανώματα. Επιπλέον, η πλειονότητα των ενδιάμεσων και των περιοχών *in situ* μελανώματος φιλοξένησε μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου της τελομεράσης TERT. Η απώλεια γονιδίων καταστολής παρουσιάστηκε σταδιακά, με τη διπλή αδρανιοποίηση του γονιδίου CDKN2A που κωδικοποιεί τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p16 και p14, να ταυτοποιείται κυρίως σε διηθητικά μελανώματα. Οι ενδιάμεσες αλλοιώσεις εμφάνισαν ετεροζυγωτική απώλεια σε ορισμένες περιπτώσεις. Μεταλλάξεις των ογκοκατασταλτικών γονιδίων PTEN και TP53 βρέθηκαν μόνο σε προχωρημένα πρωτογενή μελανώματα. Το βάρος των σημειακών μεταλλάξεων αυξήθηκε από τις καλοήθεις έως τις ενδιάμεσες βλάβες στο μελάνωμα, με εμφανείς της μεταλλάξεις υπογραφής UV ακτινοβολίας σε όλα τα στάδια εξέλιξης. Οι αλλοιώσεις στον αριθμό των

αντιγράφων κυριάρχησαν μόνο στα επιθετικά μελανώματα. Καθώς οι βλάβες προχώρησαν, η ετερογένεια των όγκων έγινε εμφανής με τη δημιουργία γενετικά διακριτών υποπληθυσμών (Shain AHm et al, 2015). Αυτά τα αποτελέσματα περιγράφουν μια προβλέψιμη σειρά γενετικών αλλαγών που παραλληλίζουν τα στάδια εξέλιξης που περιγράφονται από τον Clark. Όπως προαναφέρθηκε, κάποια από αυτά τα βήματα μπορούν να παραλειφθούν (εικόνα 14).



Εικόνα 14: Βιολογικές και μοριακές αλλαγές που οδηγούν στην εξέλιξη του μελανώματος (Πηγή: Arlo j. Miller, et al, 2006).

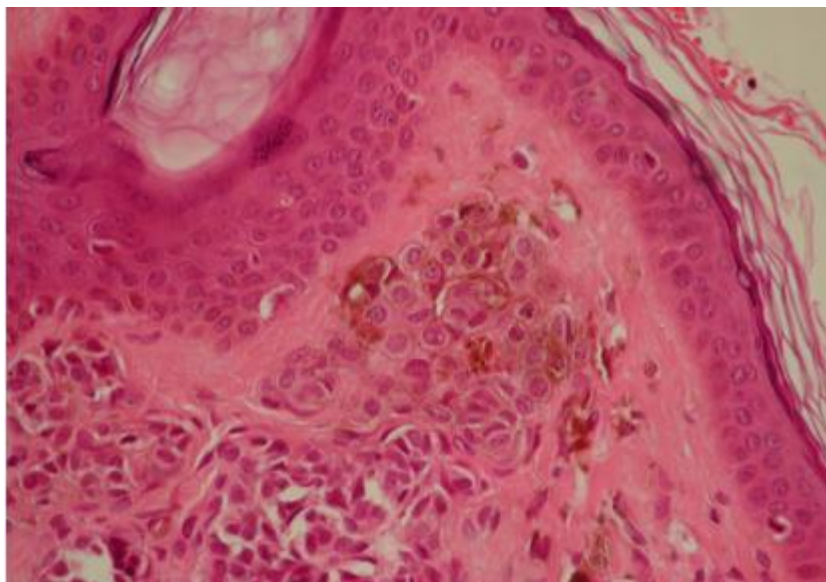
4.b. Κοινοί μελανοκυτταρικοί σπίλοι

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε πειραματικές μελέτες καρκινογένεσης, η συνηθέστερη απάντηση σε κάποιο καρκινογόνο είναι μια καλοήθης αλλοίωση. Οι κοινοί μελανοκυτταρικοί σπίλοι είναι καλοήθεις εντοπισμένοι πολλαπλασιασμοί μελανοκυττάρων που υπάρχουν σε μεγάλους αριθμούς σε πολλά άτομα διαφορετικών εθνοτήτων. Ένα σπίλος είναι μια αλλοίωση που αποτελείται από μελανοκύτταρα (Whimster IW, et al, 1965), τα οποία ορίζονται από τρεις κύριες ιδιότητες σε σύγκριση με φυσιολογικά μελανοκύτταρα:

1. Απώλεια της αναστολής που τους διατηρεί ως απομονωμένα κύτταρα στη βασική στοιβάδα της επιδερμίδας και μια τάση να πολλαπλασιάζονται και να σχηματίζουν συστάδες,.
2. Απώλεια των δενδριτών.
3. Τάση να διατηρείται η χρωστική ουσία στο κυτοπλάσμα τους.

Οι σπίλοι εξελίσσονται μέσω σταδίων εξέλιξης, από έναν αρχικά εντοπισμένο πολλαπλασιασμό των μελανοκυττάρων στην επιδερμίδα, σε μία κατάσταση στην οποία τα αλλοιωμένο κύτταρα είναι επίσης παρόντα στο δέρμα. Τα κύτταρα αυτά περιορίζονται στο χόριο και η χρώση συνήθως μειώνεται ή χάνεται. Ως εκ τούτου, τα μελανοκύτταρα έχουν την ιδιότητα να είναι σε θέση να μεταναστεύουν από την επιδερμίδα προς το χόριο, μια διαδικασία παρόμοια με την ιδιότητα της «διήθησης» στην οριζόντια φάση ανάπτυξης. Τα μελανοκύτταρα έχουν επίσης την ιδιότητα να είναι σε θέση να επιβιώσουν στο δέρμα, αλλά δεν έχουν την ιδιότητα του συνεχούς πολλαπλασιασμού, η οποία από την άλλη πλευρά είναι μια σημαντική ιδιότητα ενός κυττάρου μελανώματος. Τα μελανοκύτταρα γενικά έχουν μικρούς πυρήνες χωρίς εμφανή πλειομορφία. Οι μιτωτικές μορφές παρατηρούνται μόνο πολύ σπάνια. Η ανάπτυξη των σπύλων έχει μοντελοποιηθεί σε ένα πρόγραμμα προσομοίωσης υπολογιστή, όπου μελανοκύτταρα που έχουν τις ιδιότητες τοπικής διήθησης και επιβίωσης, αλλά όχι του συνεχούς πολλαπλασιασμού, μπορεί να αναπαράγει τα πρότυπα της διείσδυσης του δικτυωτού χορίου που εμφανίζονται σε συγγενείς σπύλους και σε σπύλους από ατρακτόμορφα και επιθηλιοειδή κύτταρα (Smolle J, et al, 1992).

Τα περισσότερα μελανοκύτταρα στο χόριο εμφανίζονται να είναι σε κατάσταση γήρανσης, τυπικά εκφράζοντας έντονα την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p16, (Michaloglou C, et al, 2005, Bennett DC, et al, 2003) αν και μερικά είναι ικανά για περιστασιακό πολλαπλασιασμό (Tran S, et al, 2013). Στις γενετικές μελέτες γονιδιώματος της ομάδας του Bastian, οι καλοήθεις πρόδρομες βλάβες των μελανοκυττάρων χαρακτηρίστηκαν από απλές αλλαγές, που τυπικά περιορίστηκαν σε ενεργοποίηση μετάλλαξης ενός ογκογονιδίου οδηγού που οδηγεί στην ενεργοποίηση της οδού κινάσης MAP. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε 13 από 150 περιοχές βλαβών που θεωρήθηκαν ομόφωνα ως καλοήθεις (δηλαδή μη ενδιάμεσες ή κακοήθεις), η μετάλλαξη BRAFV600E ήταν η μόνη εμφανής παθογόνος μετάλλαξη. Δεν παρατηρήθηκαν ανωμαλίες αριθμού αντιγράφων (CNA), όπως η απώλεια της θέσης CDKN2A του καταστολέα p16 (εικόνα 15).

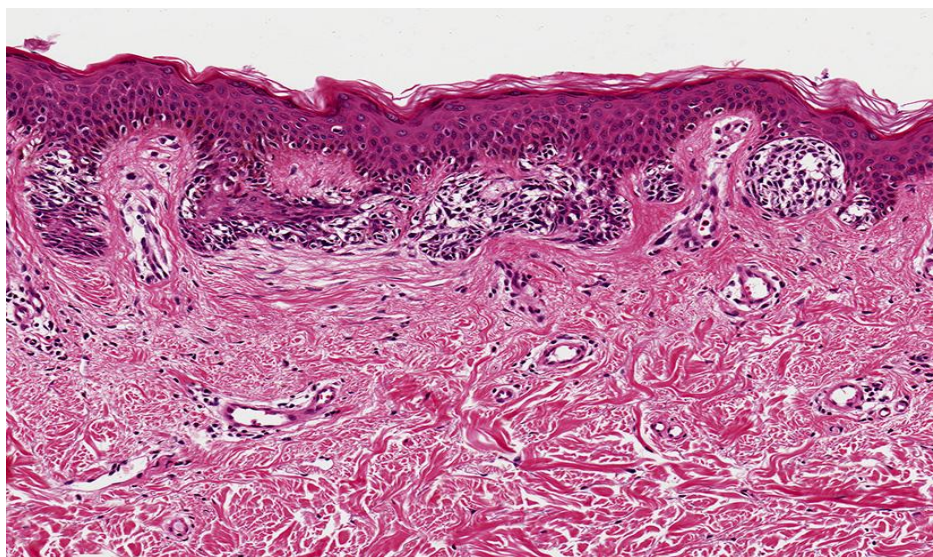


Εικόνα 15: Καλοήθης μελανοκυτταρικός σπίλος. Παρουσιάζονται φωλιές μελανοκυττάρων μόνο στο χόριο και δεν υπάρχουν μιτώσεις. Επίσης δεν υπάρχει καμία καταστροφή των περιβαλλόντων δομών καθώς και καμία σημαντική μεγέθυνση μελανοκυττάρων.

4.c. Δυσπλαστικοί σπίλοι

Οι μελαγχρωματικές αλλοιώσεις που ονομάζονται δυσπλαστικοί σπίλοι (DMN) αναγνωρίστηκαν αρχικά σε μέλη κληρονομικά επιρρεπών οικογενειών στο μελάνωμα ως βλάβες που χαρακτηρίζονται από κλινική και ιστολογική ατυπία, οι οποίες περιλαμβάνουν αρχιτεκτονικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά μελανώματος (Clark Jr WH, et al, 1978). Αναγνωρίστηκαν αργότερα σε τυχαία μέλη του πληθυσμού και ονομάζονται «δυσπλαστικοί», σε αναλογία με τη δυσπλασία σε άλλα συστήματα, όπως ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας (Elder DE, et al, 1980, Greene MH, et al, 1980). Έχουν επίσης χαρακτηριστεί ως «άτυπα μελανοκύτταρα» (Lynch HT, et al, 1978), αν και ο όρος αυτός μπορεί να περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα ασυνήθιστων βλαβών που δεν είναι δυσπλασίες.

Οι δυσπλαστικοί μελανοκυτταρικοί σπίλοι αποτελούν παράδειγμα για όλα τα χαρακτηριστικά των ενδιάμεσων αλλοιώσεων (εικόνα 16). Είναι κλινικά και ιστολογικά άτυποι και, ως εκ τούτου, προκαλούν ανησυχία ως πιθανές προσομοιώσεις μελανώματος. Είναι δυνητικοί πρόδρομοι του κακοήθους μελανώματος, αν και οι περισσότεροι είναι σταθεροί ή θα υποχωρήσουν με την πάροδο του χρόνου (Halpern AC, et al, 1993). Είναι επίσης σημαντικοί δείκτες κινδύνου για το μελάνωμα. Αυτά τα χαρακτηριστικά συνδέονται με υποκείμενες βιολογικές και επιδημιολογικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, η άτυπη μορφολογία φαίνεται να αντιπροσωπεύει μια σταδιακή απόκτηση διαδοχικών γενετικών ανωμαλιών. Αυτές οι ανωμαλίες είναι οι ίδιες που παρατηρούνται σε μελανώματα. Επομένως, ένας δυσπλαστικός σπίλος μπορεί να είναι επιρρεπής στην εξέλιξη ως πρόδρομος ενός μελανώματος και ένα άτομο που έχει αυτές τις αλλοιώσεις στο δέρμα του θα διατρέχει αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος στο μέλλον. Δεν αναπτύσσονται όλα τα μελανώματα με κλινικά ή ιστολογικά εμφανή πρόδρομα. Ωστόσο, σε αρκετές μελέτες, η ύπαρξη ενός παρακείμενου υποτιθέμενου προδρόμου έχει τεκμηριωθεί σε περίπου ένα τρίτο των περιπτώσεων (Clark Jr WH, et al, 1984, Rhodes AR, et al 1983, Urso C, et al, 1991). Τα άλλα μελανώματα μπορεί να έχουν εξαλείψει τον πρόδρομο ή να έχουν προκύψει de novo.



Εικόνα 16: Δυσπλαστικός σπίλος. Συνδετικό συστατικό μίας βλάβης που χαρακτηρίζεται από αυξημένα μεμονωμένα και ομάδες μελανοκυττάρων διατεταγμένες, κυρίως κοντά στον σύνδεσμο δέρματος-επιδερμίδας με μερικές φωλιές γεφυρώνοντας μεταξύ γειτονικών επιμήκων διαστημάτων. Στο χόριο, υπάρχει εστιακή ελασματοειδής ινωπλασία και μία αποσπασματική λεμφοκυτταρική διήθηση (Πηγή: David E. Elder, 2016).

Πολλές μελέτες έχουν τεκμηριώσει ότι οι σπίλοι που είναι κλινικά δυσπλαστικοί («κλινικά DMN») είναι παράγοντες κινδύνου για το μελάνωμα. Στη μεγάλη μελέτη του Tucker et al, ο κίνδυνος για το μελάνωμα συσχετίζεται έντονα με τον αριθμό των μικρών καλοήθων μελανοκυτταρικών σπίλων, των μεγάλων μη δυσπλαστικών καλοήθων μελανοκυτταρικών σπίλων και των δυσπλαστικών σπίλων (Tucker MA, et al, 1997). Απουσία δυσπλασίας, οι αυξημένοι αριθμοί μικρών σπίλων συσχετίστηκαν με περίπου 2 φορές αύξηση του κινδύνου και αύξηση του αριθμού τόσο των μικρών όσο και των μεγάλων μη δυσπλαστικών σπίλων συσχετίστηκαν με 4 φορές αύξηση του κινδύνου. Ένας κλινικά δυσπλαστικός σπίλος συσχετίστηκε με μια διπλάσια αύξηση του κινδύνου, ενώ 10 ή περισσότεροι αντιστοιχούν σε 12 φορές αυξημένο κίνδυνο. Συμπεραίνουμε ότι αν και οι μη δυσπλαστικοί σπίλοι προσδίδουν μικρό κίνδυνο, οι δυσπλαστικοί σπίλοι αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για το μελάνωμα (Tucker MA, et al, 1997). Οι κίνδυνοι αυτοί αλληλεπιδρούν με άλλους παράγοντες. Σε μια μελέτη από την Penn Pigmented Lesion Clinic, βρέθηκαν οι συχνότητες για την ανάπτυξη κακοήθους μελανώματος να αντιστοιχούν σε 154/100 000 σε ασθενείς με κλινικά δισπλαστικούς σπίλους και κανένα οικογενειακό ή προσωπικό ιστορικό μελανώματος, ενώ ο ρυθμός αυξήθηκε σε 968 σε άτομα μόνο με προσωπικό ιστορικό, σε 1955 σε άτομα μόνο με οικογενειακό ιστορικό και μια εκπληκτική αύξηση στα 12,313 / 100,000 άτομα και με τα δύο ιστορικά (Halpern AC, et al, 1993). Σε ασθενείς με αυτούς τους πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου, ο κίνδυνος για μελάνωμα κατά τη διάρκεια ζωής προσεγγίζει το 100% (Tucker MA, et al, 1993).

Τουλάχιστον δύο μελέτες έχουν τεκμηριώσει μια σχέση των σπίλων που είναι ιστολογικά δυσπλαστικοί με κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Σε μια αναδρομική μελέτη, η σοβαρή δυσπλασία συσχετίστηκε με 4,08 φορές αύξηση στον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε σύγκριση με την ήπια δυσπλασία, και η μέτρια δυσπλασία συσχετίστηκε με 1,45 φορές αύξηση στον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε σύγκριση με την ήπια δυσπλασία. Το συμπέρασμα ήταν ότι «ο κίνδυνος μελανώματος είναι μεγαλύτερος για τα άτομα που τείνουν να έχουν σπίλους με υψηλή ιστολογική ατυπία» (Agumi-Uria M, et al, 2003).

Σε μελέτες σχετιζόμενων με το μελάνωμα προδρομικών βλαβών, οι Shain, et al, χαρακτήρισαν τις περιοχές των βλαβών ως προς τους βαθμούς των «καλοήθων» ή «κακοήθων» ιστολογικών χαρακτηριστικών και αναγνώρισαν μια γκρίζα ζώνη των ενδιάμεσων βλαβών που χαρακτηρίζεται από «αλληλοεπικαλυπτόμενα μορφολογικά κριτήρια και χαμηλότερη συμφωνία μεταξύ των παρατηρητών» (Shain AH, et al, 2015). Βάση της συζήτησης φαίνεται ότι πολλές από αυτές τις αλλοιώσεις παρουσίαζαν υπολείμματα δυσπλασίας. Σε 19 από τις 21 περιοχές που ταξινομήθηκαν ως «ενδιάμεσες» από τουλάχιστον δύο παρατηρητές υπήρχαν πολλαπλές παθογόνες μεταλλάξεις. Οι ενδιάμεσες περιοχές είχαν ένα ευρύτερο φάσμα εναρκτήριων ογκογόνων από τις αναμφισβήτητα καλοήθεις αλλοιώσεις, συμπεριλαμβανομένων των BRAFV600K, BRAFK601E και NRAS μεταλλάξεων. Μεταλλάξεις στον υποκινητή τελομεράσης TERT παρατηρήθηκαν σε ενδιάμεσες βλάβες και σε μελάνωμα *in situ*. Οι ενδιάμεσες βλάβες είχαν επίσης σημαντικά υψηλότερο φορτίο μετάλλαξης από ότι οι καλοήθεις αλλοιώσεις. Η ομόζυγη απώλεια CDKN2A παρατηρήθηκε μόνο σε διηθητικό μελάνωμα. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ετεροζυγωτική απώλεια σε μερικές ενδιάμεσες βλάβες και *in situ* μελανώματα. Τα ευρήματα έδειξαν ότι «η πλειοψηφία των ενδιάμεσων βλαβών που κατατάσσονται βάση μορφολογίας έχουν επίσης και γενετικά χαρακτηριστικά που βρίσκονται μεταξύ καλοήθων και κακοήθων νεοπλασμάτων», δηλαδή «η παρουσία περισσότερων από μια παθογόνα γενετική αλλαγή» (Shain AH, et al, 2015) (εικόνα 14).

4.d. Μελάνωμα οριζόντιας φάσης ανάπτυξης

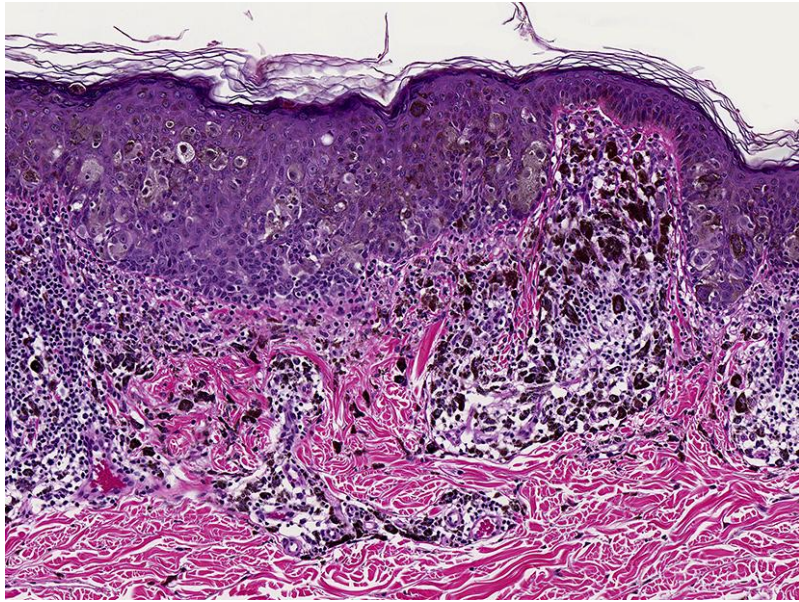
Το επόμενο βήμα στην εξέλιξη του μελανώματος στο μοντέλο του Clark είναι η φάση οριζόντιας ανάπτυξης (RGP) του πρωτογενούς μελανώματος (Clark Jr WH, et al, 1967, Clark Jr WH, et al, 1975) (εικόνα 14). Ο όρος αυτός, συχνά χρησιμοποιούμενος ιστολογικά, στην πραγματικότητα ήταν εμπνευσμένος από κλινικές παρατηρήσεις των αλλοιώσεων που επεκτείνονταν από την ανάπτυξη κατά μήκος των ακτίνων ενός ολοένα και αυξανόμενου ατελούς κύκλου, σχηματίζοντας μια πλάκα στο δέρμα. Καθώς η βλάβη εξελίσσεται, αναπτύσσονται όλο και περισσότερο οι γνωστές ιδιότητες ABCDE της ασυμμετρίας, η ανωμαλία των ορίων, η ποικιλία των χρωμάτων, η αύξηση της διαμέτρου και η εξέλιξη ή η προοδευτική αλλαγή και η αλλοίωση γίνεται όλο και πιο άτυπη και επιδεικτική διάγνωσης. Ιστολογικά και κλινικά, η οριζόντια φάση ανάπτυξης πρέπει να διακρίνεται από την επόμενη φάση της εξέλιξης, την κάθετη φάση ανάπτυξης (VGP), που θα συζητηθεί παρακάτω (Εικόνα 17).



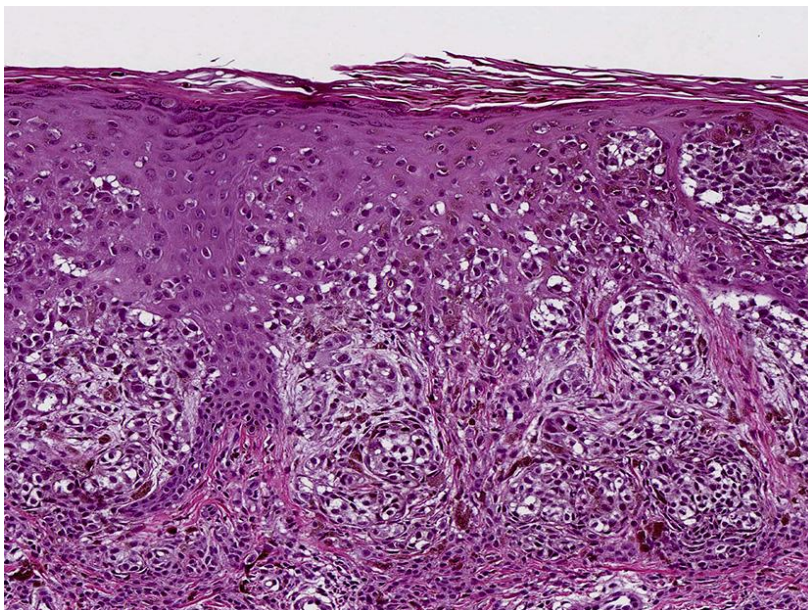
Εικόνα 17: Μελάνωμα οριζόντιας και κάθετης φάσης ανάπτυξης. Κλινική εικόνα μιας ευρείας ποικίλης ασύμμετρης πλάκας οριζόντιας φάσης ανάπτυξης, με εστιακή ογκογόνο φάση κάθετης ανάπτυξης, που αντιπροσωπεύει ένα ποιοτικά διαφορετικό πρότυπο ανάπτυξης (εικόνα από David E. Elder, 2016).

Η οριζόντια φάση ανάπτυξης του μελανώματος μπορεί να ταξινομηθεί ως *in situ* (εικόνα 18) ή διηθητική (εικόνα 19). Στην τελευταία περίπτωση, τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί να έχουν αποκτήσει την ικανότητα να εισβάλλουν στο χόριο (μια ικανότητα που μοιράζεται με τα καλοήγη μελανοκύτταρα) και να επιβιώνουν στο χόριο. Ωστόσο, δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν εκεί, ώστε να μην σχηματιστεί μια μαζική βλάβη ή «όγκος». Σε μελέτες από την Penn Pigmented Lesion Group, ένα μεγάλο ποσοστό όγκων εμφάνισε αυτό το στάδιο στην εξέλιξη του όγκου σε μια βάση δεδομένων 624 ασθενών, όπου τουλάχιστον το 87% των μελανωμάτων εμφάνισε οριζόντια φάση ανάπτυξης. Η μη κακοήθης συμπεριφορά αυτής της βλάβης επιβεβαιώθηκε από την επιβίωση των 161 ασθενών που έλαβαν θεραπεία και παρακολούθηθηκαν για μέσο όρο 13,7 ετη (σε μεταγενέστερες μελέτες παρατηρήθηκε πολύ χαμηλό ποσοστό μετάστασης, μικρότερο από 1%). Οι ασθενείς που είχαν μόνο οριζόντια φάση ανάπτυξης ήταν κατά μέσο όρο 4,3 έτη νεώτεροι από αυτούς που είχαν επιπρόσθετα κάθετη φάση ανάπτυξης ($p < 0,05$). Αυτά τα χαρακτηριστικά της οριζόντιας φάσης ανάπτυξης του πρωτογενούς μελανώματος καθιστούν μια «βασική βλάβη στην εξελικτική βιολογία της μελανοκυτταρικής νεοπλασίας

και επιβεβαιώνουν την κεντρική θέση της στα προγράμματα δημόσιας υγείας για τον έλεγχο της θνησιμότητας του μελανώματος» (Elder DE, et al, 1984, Guerry DIV, et al, 1993).



Εικόνα 18: *In situ* μελάνωμα, επιφανειακά εξαπλωμένου τύπου. Υπάρχει παζετοειδής διασπορά ομοιόμορφων άτυπων επιθηλιοειδών μελανοκυττάρων, που αναγνωρίζονται σε όλα τα επίπεδα της επιδερμίδας. Στο χόριο υπάρχει μια λεμφοκυτταρική ταινιοειδή διήθηση με διάσπαρτα μελανοφάγα. Δεν υπάρχει νεοπλασματική διήθηση του χορίου (Πηγή: David E. Elder, 2016).



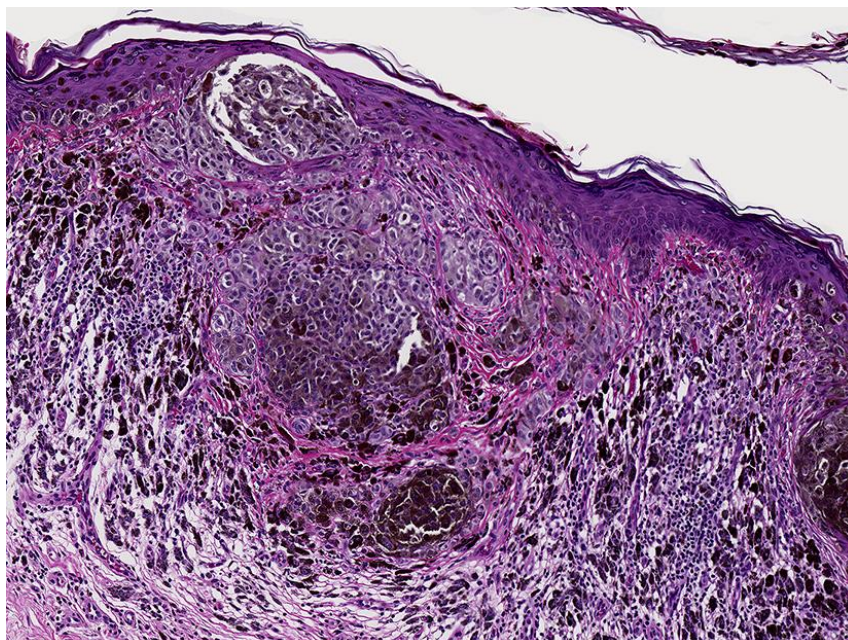
Εικόνα 19: Μελάνωμα οριζόντιας φάσης ανάπτυξης, επιφανειακά εξαπλωμένου τύπου. Υπάρχει παζετοειδής διασπορά ομοιόμορφων άτυπων επιθηλιοειδών μελανοκυττάρων που αναγνωρίζονται σε όλα τα επίπεδα της επιδερμίδας, η οποία είναι υπερπλαστική. Στο χόριο, υπάρχουν μερικές συστάδες παρόμοιων κυττάρων (π.χ., κάτω αριστερά). Αυτά είναι μικρότερα από τη μεγαλύτερη φωλέα στην κοντινή επιδερμίδα, αποτελώντας διηθητική μη ογκογόνο φάση οριζόντιας ανάπτυξης. Υπάρχει επίσης λεμφοκυτταρική διήθηση (Πηγή: David E. Elder, 2016).

Περιπτώσεις που έχουν διαγνωσθεί εσφαλμένα και δεν έχουν αφαιρεθεί έδειξαν ότι οι μελανοκυτταρικές αλλοιώσεις σε οριζόντια φάση ανάπτυξης, έχουν την τάση να επιμένουν τοπικά και να παρουσιάζουν κλινική υποτροπή και εξέλιξη σε αλλοιώσεις υψηλότερου κινδύνου (Lin MJ, et al, 2014). Συνεπώς, είναι υποχρεωτικό όλες αυτές οι αλλοιώσεις να αντιμετωπίζονται με πλήρη εκτομή.

4.e. Μελάνωμα σε κάθετη φάση ανάπτυξης

Στην φάση της κάθετης ανάπτυξης, η κατεύθυνση της ανάπτυξης μεταβάλλεται από εκείνη μιας πλάκας σε ένα κλινικό οζίδιο, συχνά τοποθετημένο μέσα σε ένα προηγούμενο μελάνωμα οριζόντιας φάσης ανάπτυξης (εικόνα 17). Όπως και όλα τα στάδια της εξέλιξης, η φάση της οριζόντιας ανάπτυξης μπορεί να παραλειφθεί. Ένα τέτοιο de novo μελάνωμα κάθετης φάσης ανάπτυξης παρουσιάζεται ως ένα διακριτό οζίδιο και ονομάζεται «οζώδες μελάνωμα» ή «ογκογόνο μελάνωμα». Ο σχηματισμός του οζιδίου ή του όγκου που σχηματίστηκε δεν διαφέρει προγνωστικά από εκείνο που εξελίσσεται από ένα προηγούμενο μελάνωμα μετά την οριζόντια φάση ανάπτυξης, αλλά μπορεί να παρουσιάζει μεγαλύτερες δυσκολίες διάγνωσης, επειδή το οζίδιο είναι συχνά συμμετρικό και ομοιογενές σε χρώμα, μη σύμφωνο με το μοντέλο ABCDE που θα δούμε παρακάτω (Mar V, et al, 2012).

Ένα ογκώδες οζίδιο μελανώματος, είτε υπάρχει σε πλάκα οριζόντιας φάσης ανάπτυξης είτε αναπτύσσεται de novo, αναγνωρίζεται εύκολα ως όγκος στην κλασική έννοια της μάζας. Τα χαρακτηριστικά του νεοπλασματος που συσχετίζονται με το σχηματισμό ενός οζιδίου θα πρέπει να περιλαμβάνουν πρώτα την ικανότητα επιβίωσης στο χόριο (μια ιδιότητα που μοιράζεται με τα δερματικά μελανοκύτταρα και τα κύτταρα οριζόντιας φάσης ανάπτυξης) και δεύτερον, την ικανότητα πολλαπλασιασμού στο χόριο. Υπάρχουν στοιχεία από μελέτες με τον δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67, ότι σε μελανώματα οριζόντιας φάσης ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων γίνεται στην βασική μεμβράνη και όχι σε εκείνα τα ελάχιστα μεμονωμένα κύτταρα ή συστάδες κυττάρων που υπάρχουν στο χόριο. Η κάθετη φάση ανάπτυξης συμβαίνει όταν ένα από αυτά τα μικρά συμπλέγματα κυττάρων αποκτά την ικανότητα πολλαπλασιασμού, μια ιδιότητα που μπορεί να ταυτοποιηθεί χρησιμοποιώντας τον δείκτη Ki-67 (Gimotty PA, et al, 2005), ή με την αναγνώριση των μιτωτικών μορφών μορφολογικά (Elder DE, et al, 1984, Guerry DIV, et al, 1993, Clark Jr WH, et al, 1989). Μετά από μια περίοδο πολλαπλασιασμού, το σύμπλεγμα κυττάρων στο χόριο θα γίνουν μεγαλύτερο από άλλα στο χόριο και στην υπερκείμενη επιδερμίδα (εικόνα 20). Επομένως, τα κριτήρια για τη μορφολογική αναγνώριση των πρώιμων μελανωμάτων στην κάθετη φάση ανάπτυξης περιλαμβάνουν: (1) την παρουσία μιας συστάδας κυττάρων στο χόριο που είναι μεγαλύτερη από τη μεγαλύτερη συστάδα στην επιδερμίδα, ορίζοντας την ιδιότητα της ογκογονικότητας ή (2) την παρουσία μίτωσης σε μελανοκύτταρο στο χόριο, καθορίζοντας τη μιτογόνο δράση. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι όγκοι που δεν έχουν κάθετη φάση ανάπτυξης επίσης δεν θα είχαν την ικανότητα να σχηματίζουν μεταστάσεις επειδή τα μεταστατικά κύτταρα, όπως τα οζίδια κάθετης φάσης ανάπτυξης, έχουν επίσης την ικανότητα να επιβιώνουν, να πολλαπλασιάζονται και να σχηματίζουν μάζες. Επιπλέον, τα μεταστατικά κύτταρα μελανώματος έχουν την ικανότητα να εξαπλώνονται σε μακρινά όργανα, να επιβιώνουν και να προχωρούν περαιτέρω στη νέα τους θέση.



Εικόνα 20: Μελάνωμα πρώιμης κάθετης φάσης ανάπτυξης. Αυτή η αλλοίωση χαρακτηρίζεται ιστολογικά από μια ευρεία ασύμμετρη πλάκα μιας φάσης ακτινικής ανάπτυξης. Στην τομή αυτή υπάρχει μια συστάδα κυττάρων στο χόριο που είναι μεγαλύτερη από τις μεγαλύτερες συστάδες στην επιδερμίδα, υποδεικνύοντας ότι τα κύτταρα σε αυτό το σύμπλεγμα έχουν την ικανότητα όχι μόνο να επιβιώσουν αλλά και να πολλαπλασιαστούν στο χόριο. Άλλες μικρότερες ομάδες που είναι επίσης παρούσες σε αυτή την περιοχή δεν θα θεωρηθούν ως ογκογονική κάθετη φάση ανάπτυξης. Το μεγαλύτερο σύμπλεγμα αντιπροσωπεύει ένα παράδειγμα ελάχιστης ή «πρώιμης» ογκογονικής φάσης κάθετης ανάπτυξης (Πηγή: David E. Elder, 2016).

4.f. Μεταστατικό μελάνωμα

Αν και το μεταστατικό μελάνωμα είναι η τελική φάση της εξέλιξης του όγκου, η εξέλιξη δεν διακόπτεται με την έναρξη της μεταστατικής νόσου. Οι μεταστάσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε τοπικές, περιφερειακές και απομακρυσμένες. Οι τοπικές μεταστάσεις περιλαμβάνουν μεταστάσεις του δέρματος που ταξινομούνται ποικιλοτρόπως ως δορυφόροι ή σε «in transit» μεταστάσεις ανάλογα με το εάν έχουν εξαπλωθεί 5 cm ή περισσότερο από την περιοχή του πρωτεύοντος όγκου. Οι περιφερειακές μεταστάσεις περιλαμβάνουν μεταστάσεις λεμφαδένων που ανακαλύπτονται είτε σε μια διαδικασία βιοψίας («μικρομεταστάσεις») είτε σε παρακολούθηση ως κλινικές «μακρομεταστάσεις». Οι απομακρυσμένες μεταστάσεις μπορούν να ταξινομηθούν ανά όργανο, που περιλαμβάνουν συνήθως απομακρυσμένο δέρμα, πνεύμονα, εγκέφαλο και άλλες θέσεις. Η μεταστατική νόσος είναι η φάση του μελανώματος που είναι υπεύθυνη για τη θνησιμότητα του μελανώματος, στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων. Οι γονιδιωματικές μελέτες που βασίζονται στο σύνολο γονιδιακών δεδομένων του Cancer Genome Atlas dataset, το οποίο επικεντρώνεται σε μεταστατικές περιπτώσεις, έχουν εντοπίσει νέα γονίδια μελανώματος, ενώ επιβεβαιώνεται η κυριαρχία των σωματικών BRAF μεταλλάξεων. Επιπλέον, εντοπίζονται πολυάριθμες σημαντικές ενισχύσεις και διαγραφές γονιδίων. Μεταξύ αυτών των αποτελεσμάτων, ανακαλύφθηκαν ευρέως οι ενισχύσεις του BRAF, καθώς και οι μειώσεις των CDKN2A, NRAS, PTEN και άλλων τόπων (Guan J, et al, 2015).

Η γονιδιωματική εξέλιξη συνεχίζεται στη μεταστατική νόσο. Σε μία μελέτη της κλωνικής αρχιτεκτονικής του μελανώματος και των σχετικών μεταλλάξεων του οδηγού που χρησιμοποίησαν ολόκληρο το γονιδίωμα και την στοχοθετημένη αλληλουχία, εντοπίστηκαν σωματικές μεταλλάξεις σε γνωστά γονίδια μελανώματος όπως BRAF, NRAS και CDKN2A και

σε ένα νέο γονίδιο, το ERHA3 (Ding L, et al, 2014). Μεταλλάξεις αποσιώπισης παρατηρήθηκαν σε γνωστά ογκοκατασταλτικά γονίδια (π.χ. TP53 και RB1 και PTEN) και σε πρωτεϊνικές φωσφατάσες και σε γονίδια αναμόρφωσης χρωματίνης. Οι μεταλλάξεις έδειξαν κυρίαρχη υπογραφή υπερϊώδους ακτινοβολίας.

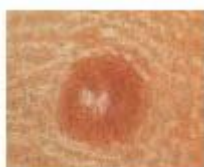
5. Πρόληψη- Διάγνωση

Η πλειονότητα των μελανοκυτταρικών όγκων διαγιγνώσκεται εύκολα από τους ιστοπαθολόγους ως καλοήθεις ή κακοήθεις με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Το κλειδί για την πρόληψη των θανάτων λόγω του μελανώματος παραμένει η έγκαιρη ανίχνευση της νόσου, σε ένα στάδιο όπου η χειρουργική εκτομή του όγκου είναι ακόμα θεραπευτική. Η δερματοσκόπηση είναι η πιο κοινή διαγνωστική τεχνική (Wurm EM, et al, 2010). Σπίλοι που έχουν ακανόνιστο χρώμα ή σχήμα αντιμετωπίζονται συνήθως ως υποψήφιοι για μελάνωμα. Για να ανιχνευτεί, οι γιατροί έχουν αναπτύξει δύο συγκεκριμένες στρατηγικές για την έγκαιρη αναγνώριση της νόσου: την ABCDE και την «ασχημόπαπο». Ωστόσο, σε μερικές περιπτώσεις, οι μελανοκυτταρικοί όγκοι παρουσιάζουν μια διφορούμενη ιστολογική εικόνα και παρουσιάζουν χαρακτηριστικά γνωρίσματα τόσο καλοήθων όσο και κακοήθων όγκων. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα βοηθητικά γενετικά τεστ μπορούν να βοηθήσουν στον προσδιορισμό του κατά πόσο ένας όγκος πρέπει να κατηγοριοποιηθεί ως καλοήθης (σπίλος) ή κακοήθης (μελάνωμα).

5.a. Μέθοδος ABCDE

Στην μνημονική μέθοδο του «ABCDE» το κάθε γράμμα αντιστοιχεί σε μια λέξη και αντικατοπτρίζει μια αλλαγή στην μορφολογία του σπίλου:

A: εκφράζει την ασυμμετρία (ASYMMETRY)



Συμμετρικός



Μη Συμμετρικός

B: εκφράζει τα όρια (BORDER)



Με ομαλά όρια



Με ανώμαλα όρια

C: εκφράζει το χρώμα (COLOR)



Μονοχρωματικός



Πολυχρωματικός

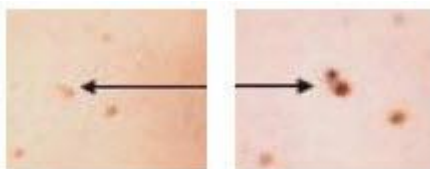
D: εκφράζει τη διάμετρο (DIAMETER)



Μικρότερος από
1/4 της ίντσας

Μεγαλύτερος από
1/4 της ίντσας

E: εκφράζει την εξέλιξη ή την αλλαγή (EVOLVING)



Συνηθισμένος
σπίλος

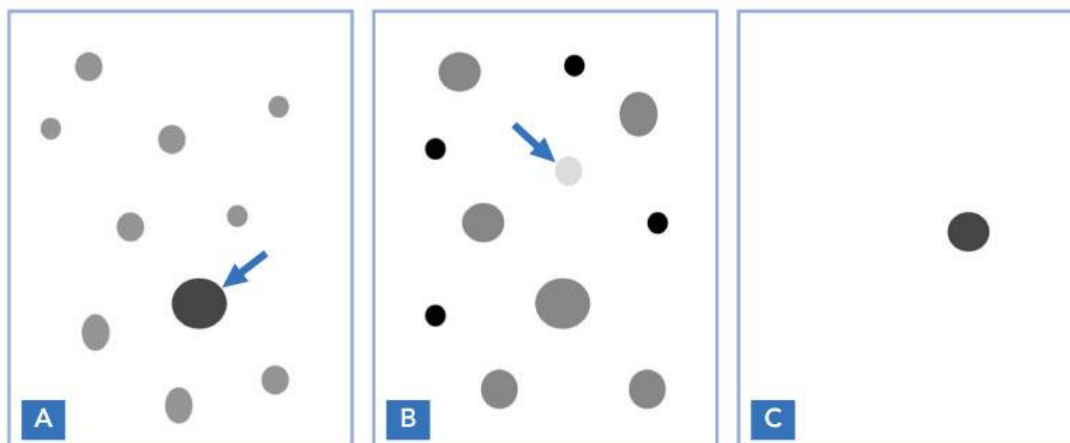
Αλλαγμένος σε
μέγεθος, σχήμα,
χρώμα

(Πηγή: skincancer.org)

Οι γιατροί εξετάζουν τυπικά όλους τους σπίλους. Επίσης κάποιος σπίλος μπορεί να ικανοποιήσει μερικά ή όλα τα κριτήρια ABCD και μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή συναγερμό.

5.b. Μέθοδος "ασχημόπαπον"

Δεδομένων ορισμένων περιορισμών της καθιερωμένης μεθόδου ABCDE για την αναγνώριση του πρώιμου μελανώματος, προτάθηκε ένας νέος τρόπος σκέψης σχετικά με την ανίχνευση του μελανώματος. Το 1998, οι Grob et al. (Grob JJ, et al, 1998), εισήγαγαν την έννοια του "ugly duckling" με την παρατήρηση ότι οι σπίλοι στο ίδιο άτομο τείνουν να μοιάζουν μεταξύ τους και ότι το μελάνωμα συχνά αποκλίνει από αυτό το τυπικό σχήμα τους. Αυτό έδειξε τη σημασία του όχι μόνο να αξιολογηθεί η μορφολογία της συγκεκριμένης βλάβης, αλλά και να συγκριθεί με εκείνη των άλλων σπίλων, αναζητώντας μια απόκλιση. Για παράδειγμα, η εξωτερική βλάβη μπορεί να είναι μεγαλύτερη και πιο σκούρα από τους γύρω σπίλους (εικόνα 21 A), ή αντίστροφα, (εικόνα 21 B). Τέλος, αν ο ασθενής έχει λίγους ή καθόλου άλλους σπίλους (εικόνα 21 C), οποιαδήποτε μεταβαλλόμενη βλάβη θα πρέπει να θεωρείται ύποπτη.



Εικόνα 21: Η μέθοδος «ugly duckling». Υπάρχουν τρία διαφορετικά κλινικά σενάρια όπου οι αλλοιώσεις θα πρέπει να προκαλέσουν καχυποψία. Τα τετράγωνα A, B και C αντιπροσωπεύουν το καθένα μια περιοχή σώματος όπως η πλάτη. Στο A, ο ασθενής έχει ένα κυρίαρχο μοριακό μοτίβο με μικρές μεταβολές στο μέγεθος. Η σημειωμένη βλάβη είναι σαφώς σκοτεινότερη και μεγαλύτερη συγκριτικά με τους υπόλοιπους σπίλους. Στο B, ο ασθενής έχει δύο κυρίαρχα μοτίβα, ένα με μεγαλύτερους σπίλους και ένα με μικρότερους και πιο σκούρους. Η ύποπτη αλλοίωση είναι μικρή αλλά στερείται χρωματισμού. Στο Γ, ο ασθενής εμφανίζει μόνο μία βλάβη στο πίσω μέρος. Εάν αυτή η βλάβη αλλάξει, ή θεωρείται άτυπη, πρέπει να αφαιρεθεί (Πηγή: skincancer.org).

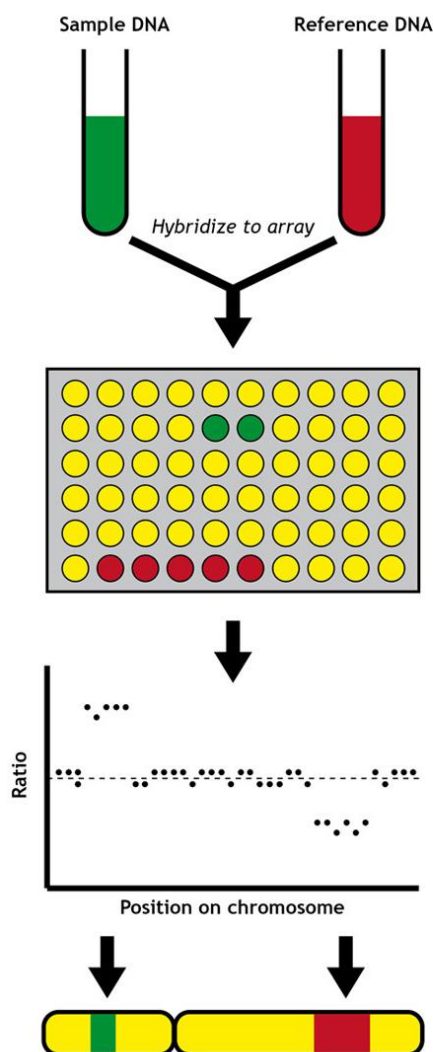
6. Βιοψία

Μετά από μια οπτική εξέταση και μια δερματοσκοπική εξέταση ("Introduction to Dermoscopy", 2009), ο γιατρός μπορεί να πάρει βιοψία του ύποπτου σπίλου. Μια βιοψία δέρματος που εκτελείται με τοπική αναισθησία και απαιτείται συχνά για να βοηθήσει ή να επιβεβαιώσει τη διάγνωση και τον καθορισμό της κατάστασης του σπίλου. Οι βιοψίες εκτομής μπορούν να αφαιρέσουν τον όγκο, ακολουθούμενες από ιστολογική εκτίμηση και βαθμολογία Breslow. Οι τμηματικές βιοψίες, συνήθως αντενδείκνυνται σε ύποπτα μελανώματα, λόγω της πιθανότητας σφάλματος δειγματοληψίας (Montgomery BD, et al, 2009) ή τοπικής εμφύτευσης που προκαλεί εσφαλμένη εκτίμηση του πάχους του όγκου (Luk PP, et al, 2015, Lin SW et al, 2012). Ωστόσο, οι φόβοι ότι τέτοιες βιοψίες μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο μεταστατικής νόσου φαίνονται αβάσιμες (Martin RC 2nd, et al, 2012, Yamashita Y, et al, 2014).

Οι κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται κατά κόρον σήμερα για τον προσδιορισμό της κακοήθειας ενός όγκου μέσω ανίχνευσης βλαβών στο DNA είναι η συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση και ο *in situ* υβριδισμός.

6.a. Συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση

Η CGH επιτρέπει την αξιολόγηση των αλλαγών αριθμού χρωμοσωματικών αντιγράφων σε όλο το γονιδίωμα (Bastian BC et al, 1998). Η τεχνική έχει βελτιωθεί με την πάροδο των ετών και αυτή τη στιγμή βασίζεται σε πίνακες, με υψηλής ανάλυσης και τυποποιημένο φιλικό προς το χρήστη λογισμικό (εικόνα 22). Μία από τις κύριες δυσκολίες είναι ότι ο πληθυσμός κυττάρων όγκου που αναλύεται πρέπει να είναι σχετικά καθαρός. Σε περίπτωση που υψηλότερα ποσοστά περιβάλλομενου μη καρκινικού ιστού μολύνουν το δείγμα, ενδέχεται να μη φανούν οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις. Στις περιπτώσεις όπου είναι διαθέσιμος ένας μικρός όγκος ιστού ή όταν είναι έντονα αναμεμιγμένος με φυσιολογικό ιστό, ο υβριδισμός *in situ* φθορισμού (FISH) μπορεί να είναι χρήσιμη εναλλακτική λύση.



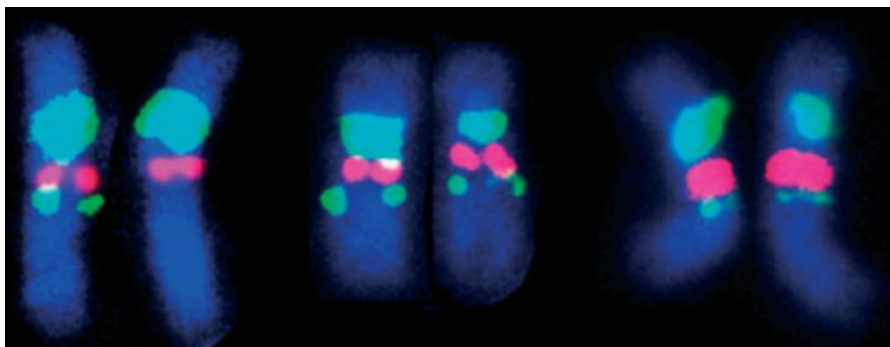
Εικόνα 22: Συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση. Το χρωμοσωμικό DNA των καρκινικών κυττάρων σημαίνεται με κάποια φθορίζουσα χρωστική (πχ. πράσινο) και το ολικό DNA ενός δεύτερου δείγματος ελέγχου, σημαίνεται με κάποια άλλη χρωστική (πχ. κόκκινο). Τα δύο σημασμένα δείγματα αναμιγνύονται σε ίσες ποσότητες και υβριδοποιούνται σε μία μικροσυστοιχία που περιέχει στην επιφάνεια τις μονιαδιαίες αλληλουχίες του γονιδιώματος τους ανθρώπου. Όταν υπάρχει ίση ποσότητα μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας και στα δύο δείγματα (του καρκινικού και του ελέγχου) τότε ο λόγος του πράσινου φθορισμού προς τον κόκκινο φθορισμό είναι 1:1. Αν το καρκινικό DNA (πράσινη χρωστική) έχει κάποια ανωμαλία πχ περισσότερα αντίγραφα μίας γονιδιωματικής περιοχής από το φυσιολογικό DNA ελέγχου (κόκκινη χρωστική) τότε θα υβριδοποιηθεί με περισσότερες αλληλουχίες στην μικροσυστοιχία, και ο πράσινος φθορισμός θα αυξηθεί, επομένως ο λόγος πράσινου-κόκκινου θα μετατοπιστεί σε πχ 1,5:1. (εικόνα από Pasini, 2015, *trkmutations in Cancer Cells*)

6.b. Φθορίζον in situ υβριδισμός (FISH)

Το FISH ως διαγνωστικό εργαλείο στο μελάνωμα βασίζεται στην εκτίμηση των τόπων που είναι γνωστό ότι φέρουν χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που αναγνωρίστηκαν από το CGH. Οι ανιχνευτές που ανιχνεύουν τους συνήθως τροποποιημένους τόπους δοκιμάστηκαν σε διάφορους συνδυασμούς σε ομάδες μελανοκυτταρικών όγκων με γνωστά αποτελέσματα (Gerami P, et al, 2009). Η τεχνική βασίζεται στην έκθεση των χρωμοσωμάτων σε μια μικρή αλληλουχία DNA που ονομάζεται ανιχνευτής (probe), και ένα φθορίζον μόριο το οποίο

επισυνάπτεται σε αυτήν. Η αλληλουχία του ανιχνευτή (probe) συνδέεται με την αντίστοιχη συμπληρωματική αλληλουχία του DNA στο χρωμόσωμα (εικόνα 23).

Το κύριο πλεονέκτημα του FISH είναι ότι γίνεται σε ιστολογικές τομές, επιτρέποντας την αξιολόγηση της μορφολογίας, η οποία σε αντίθεση με την CGH καθιστά δυνατή την ανάλυση μικρών ή διασκορπισμένων ποσοτήτων νεοπλασματικού ιστού. Το αρχικό σύνολο εμπορικά διαθέσιμων ανιχνευτών κατευθύνθηκε στα 6p25 (RREB1), 6q23 (MYB), Serp6 (κεντρομερές 6) και 11q13 (CCND1).



Εικόνα 23: Τα χρωμοσώματα μονιμοποιούνται σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα και αποδιατάσσονται σε αυτή την θέση (*in situ*) ώστε να καταστούν προσβάσιμες οι δύο αλυσίδες του DNA για να υβριδοποιηθούν στη συνέχεια με τον ανιχνευτή. Μια χημική ουσία που φθορίζει συνδέεται με μια συγκεκριμένη ακολουθία DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής (probe). Όταν αυτοί οι ανιχνευτές (probes) αναμειγνύονται με τα χρωμοσώματα από ένα ανθρώπινο κύτταρο, οι ανιχνευτές (probes) υβριδοποιούνται, ή συνδέονται με το DNA στα χρωμοσώματα. Ο σημασμένος ανιχνευτής DNA που είναι συνδεδεμένος με το χρωμόσωμα φθορίζει όταν τα χρωμοσώματα εκτίθενται σε φως μήκους κύματος που διεγείρει την φθορίζουσα χρωστική, δηλώνοντας την παρουσία και τη θέση του ανιχνευτή-δεσμευμένου στην αλληλουχία του DNA. Έτσι καθίσταται ορατή με το μικροσκόπιο η θέση του ανιχνευτή, άρα και η θέση του τμήματος DNA με το οποίο αυτός έχει υβριδοποιηθεί. Εάν μπορούσαμε να δούμε φθορισμό στον ανιχνευτή, τότε το γονίδιο είναι παρόν. Αν όχι, το γονίδιο λόγω μετάλλαξης έχει διαγραφεί (Πηγή: Aaron Theisen, 2008).

Περαιτέρω μελέτες συνέστησαν είτε να προστεθεί ένας ανιχνευτής 9p21 (ο οποίος φιλοξενεί τον τόπο CDKN2A) (Gammon B, et al, 2012) είτε να τροποποιήσει το σετ διερευνητών σε συνδυασμό των 9p21, 6p25, 11q13 και 8q24 (Gerami P, et al, 2012) για την αύξηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας. Συνοπτικά, το FISH είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση των μελανοκυτταρικών όγκων και υπάρχουν συνεχείς προσπάθειες από διαφορετικές ομάδες για περαιτέρω βελτίωση της ευαισθησίας και της ειδικότητας της τεχνικής (Gammon B, et al, 2012, Gerami P, et al, 2012, Kerl K, et al, 2012).

Τα CGH και FISH είναι χρήσιμα συμπληρωματικά διαγνωστικά εργαλεία για την εκτίμηση των οριακών μελανοκυτταρικών βλαβών. Μπορούν να είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για παιδιατρικές μελανοκυτταρικές βλάβες, όπου η διάκριση μεταξύ καλοήθους αλλοίωσης και μελανώματος μπορεί να είναι πολύ δύσκολη (Brenn T, et al, 2008, Requena C, et al, 2012). Αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούνται σε πολλά κέντρα παγκοσμίως. Σε ορισμένους ιστολογικά αμφίσημους όγκους που θεωρούνται οριακοί ("αβέβαιοι κακοήθους δυναμικού"), το CGH ή το FISH αποκαλύπτει ένα προφίλ γενετικών αλλαγών που επιτρέπει την εκτίμηση του εάν ο όγκος είναι καλοήθης ή κακοήθης και βοηθά στη διαχείριση των ασθενών. Για παράδειγμα, η απουσία αλλαγών αριθμού αντιγράφων υποδεικνύει έναν καλοήθη όγκο, ενώ η παρουσία πολυάριθμων αλλαγών ευνοεί την κακοήθεια (Bastian BC, et al, 1998). Ωστόσο, άλλες περιπτώσεις παρουσιάζουν ένα διφορούμενο προφίλ γενετικών αλλαγών, πράγμα που αποκλείει την οριστική διάκριση καλοήθων και κακοήθων όγκων.

7. Κλινικοί βιοδείκτες στο μελάνωμα: Τρέχουσα κατάσταση

Υπάρχουν πολλοί προγνωστικοί και προβλεπτικοί βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται κλινικά στο μελάνωμα και αυτοί περιλαμβάνονται στην πρόσφατη 8^η έκδοση του εγχειριδίου αμερικανικής Μεικτής Επιτροπής για τον Καρκίνο (AJCC) (Balch CM, et al, 2009). Αυτό το σύστημα σταδιοποίησης βασίζεται στα ιστολογικά χαρακτηριστικά του μελανώματος, συμπεριλαμβανομένου του πάχους του όγκου, της παρουσίας εξέλκωσης και του μитωτικού δείκτη (Πίνακας 5). Ο μόνος βιολογικός δείκτης κυκλοφορούντων πρωτεϊνών με σημαντική προγνωστική αξία στο σύστημα σταδιοποίησης AJCC είναι η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) (Balch CM, et al, 2009). Η αυξημένη LDH συσχετίζεται με κακή επιβίωση στο μελάνωμα του σταδίου IV (Agarwala SS, et al, 2009) και είναι ένας ανεξάρτητος προβλεπτικός δείκτης της κακής έκβασης σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με συνδυασμό dabrafenib και trametinib (Long GV, et al, 2016). Επιπλέον, σημαντική μείωση της LDH (δηλ. Μέση μείωση LDH κατά 27,3% από την αρχική τιμή) σχετίζεται με την ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία κατά την πρώτη CT ανίχνευση (Diem S, et al, 2015). Πολλές άλλες κυκλοφορούσες πρωτεΐνες έχουν δείξει διαγνωστική και προγνωστική αξία για το μελάνωμα, συμπεριλαμβανομένης της S100B, της C αντιδραστικής πρωτεΐνης (CRP) και της πρωτεΐνης ανασταλτικής δράσης του μελανώματος (MIA) (Vereecken P, et al, 2012), αλλά όλες έχουν περιορισμούς στην κλινική χρήση ρουτίνας.

Πίνακας 5: Κλινικοί βιοδείκτες για την πρόγνωση και πρόβλεψη στο μελάνωμα (Πηγή: Su Yin Lim, et al, 2018).

	Characteristics	Associated with worse outcomes	Reference
Prognostic biomarkers			
Primary melanoma	Thickness	Thick melanomas	[147]
	Ulceration	Present	[147]
	Histology	Nodular and acral subtype	[148]
	Mitotic rate	Presence of mitosis	[149]
	Age	> 60	[147, 149]
	Site	Trunk, head and neck	[147, 149]
	Mutation status	BRAF or NRAS positive	[150]
Stage III melanoma	Lymph node stage (AJCC)	IIIC	[151]
	Nodal status	Increased number of positive lymph nodes	[147]
	Tumor burden	Macroscopic disease	[147]
	Ulceration on primary melanoma	Present	[147]
	Extracapsular extension	Present	[151]
Metastatic melanoma	Distant metastatic site	Visceral metastasis	[147, 152]
	Number of visceral metastasis	≥ 2	[152, 153]
	LDH	Above upper limit of normal	[152, 153]
	Serum albumin	< 3.5 g/deciliter	[153]
	ECOG performance status	≥ 1	[152]
	Hematological parameters	Abnormal platelets	[152]
Predictive biomarkers			
MAPK therapy	BRAF Status	No BRAF V600 mutation	[131]
	LDH	Above upper limit of normal	[19]
	ECOG performance status	≥ 1	[19]
	Number of organ sites containing metastases	≥ 3	[19]
	Sites of disease	Visceral only	[19]
	Baseline disease stage	IVM1c	[19]
	Sum of lesion diameter	≥ median (58 mm)	[19]
Immunotherapy	LDH	Above upper limit of normal	[154]
	Baseline tumor size	≥ median (102 mm)	[154]
	Stage	IVM1a or IVM1c	[154]

Έχουν μελετηθεί οι δείκτες της εξέλιξης του όγκου από την οριζόντια στην κάθετη φάση ανάπτυξης στο μελάνωμα, που περιλαμβάνουν πρωτίστως τις ιδιότητες της ογκογονικότητας και της μιτογόνου δράσης. Οι δείκτες εξέλιξης είναι σημαντικοί για τη διάγνωση, διότι εξ ορισμού υπερεκφράζονται σε μεταγενέστερα στάδια εξέλιξης. Η διαγνωστική αξία περιορίζεται από θέματα ευαισθησίας και ειδικότητας. Η ειδικότητα είναι το πιο σημαντικό διαγνωστικό χαρακτηριστικό, αλλά λείπει από τους περισσότερους δείκτες. Συνεπώς, δεν έχουν αναπτυχθεί αξιόπιστες διαγνωστικές εξετάσεις κακοήθειας. Επιπλέον, οποιοσδήποτε δυνητικός διαγνωστικός δείκτης χρειάζεται να δοκιμαστεί σε δύσκολες περιπτώσεις. Μέθοδοι για την επίδειξη έκφρασης δείκτη σε συμπαγείς όγκους περιλαμβάνουν κλινική και μικροσκοπική μορφολογία, ανοσοϊστοχημεία και μοριακές τεχνικές που συμπεριλαμβάνουν συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό, υβριδισμό *in situ* φθορισμού και προφίλ γονιδιακής έκφρασης.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της εξέλιξης του όγκου κάθετης φάσης ανάπτυξης έχουν συζητηθεί παραπάνω, και αυτά περιλαμβάνουν κυρίως τις ιδιότητες της μιτογονικότητας και της ογκογονικότητας. Επιπλέον, οι ιδιότητες που σχετίζονται με την πρόγνωση μπορούν να θεωρηθούν δείκτες προόδου. Αυτοί περιλαμβάνουν το επίπεδο διήθησης, όπως ορίζεται από τον Clark, το πάχος όπως ορίζεται από το δείκτη Breslow, την παρουσία εξέλκωσης, τον μιτωτικό ρυθμό, την ανταπόκριση των λεμφοκυττάρων στον όγκο (TIL), την λεμφοαγγειακή διήθηση και τους μικροσκοπικούς και κλινικούς δορυφόρους. Τα επίπεδα εισβολής του Clark έχουν αντικατασταθεί από το πάχος κατά Breslow σε τρέχοντα τυποποιημένα μοντέλα, από την American Joint Committee on Cancer (AJCC) και την Union for International Cancer Control (UICC) με έδρα τη Γενεύη. Ωστόσο, το επίπεδο εισβολής έχει προγνωστική αξία ως μία μόνο μεταβλητή, εάν το πάχος δεν είναι γνωστό και μπορεί να συμβάλει σε συγκεκριμένα προγνωστικά μοντέλα. Το πάχος κατά Breslow είναι η μοναδική ισχυρότερη προγνωστική μεταβλητή. Είναι αξιοσημείωτο ότι αυτό το προγνωστικό χαρακτηριστικό αναπτύχθηκε σε μια μελέτη μόνο 98 περιπτώσεων στις οποίες ο Breslow παρατήρησε ότι κανένας όγκος μικρότερος από 0,76 mm σε πάχος δεν παρουσίασε μεταστάσεις, 41 χιλιάδες μετέπειτα μελέτες επιβεβαιώνουν τα αρχικά ευρήματα.

Οι δείκτες εξέλιξης που έχουν μελετηθεί με ανοσοϊστοχημεία περιλαμβάνουν μόρια που έχουν καταδειχθεί ή υποτεθεί ότι παίζουν ρόλο στη μεταστατική διαδικασία. Αυτοί περιλαμβάνουν αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, τους υποδοχείς τους και τις οδούς τους, αγγειογόνους και ινογενείς παράγοντες, χημειοτακτικούς παράγοντες και παράγοντες κινητικότητας, μόρια που σχετίζονται με την ανοσολογική αντίδραση, μόρια προσκόλλησης και δείκτες κυτταρικού κύκλου. Μια πρόσφατη μελέτη εντόπισε 21 δείκτες που μπορούν να αποβούν χρήσιμοι για τη διάγνωση μελανώματος » (Abbas O, et al, 2014), οι περισσότεροι από τους οποίους δεν χρησιμοποιούνται. Οι πιο αξιόπιστοι δείκτες είναι δείκτες κυτταρικού κύκλου και το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο από αυτά είναι το αντίσωμα Ki-67 το οποίο είναι ένας δείκτης κυττάρων στη φάση G1-S του κυτταρικού κύκλου (Gerdes J, et al, 1983). Όπως ήδη αναφέρθηκε, η έκφραση αυτού του δείκτη είναι κατά κύριο λόγο στην επιδερμίδα σε μη ογκογονικά μελανώματα, ενώ σε ογκογονικά μελανώματα υπάρχει έκφραση στο χόριο και σχετίζεται με την πρόγνωση. Σε μία μελέτη της έκφρασης του Ki-67 σε μια μεγάλη ομάδα ασθενών με λεπτά μελανώματα, η έκφραση του στο δέρμα ήταν χαμηλότερη από την επιδερμική έκφραση σε μελανώματα οριζόντιας φάσης ανάπτυξης, και η έκφραση Ki-67 στο δέρμα και ο μιτωτικός ρυθμός (MR) ήταν υψηλότερα σε μελανώματα κάθετης φάσης ανάπτυξης σε σχέση με μελανώματα οριζόντιας φάσης ανάπτυξης. Η δερματική έκφραση του Ki-67, ο μιτωτικός ρυθμός μεγαλύτερος από 0, η φάση ανάπτυξης, το πάχος, το έλκος, τα λεμφοκύτταρα διηθούντα του όγκου (TIL) και το φύλο συσχετίστηκαν με μετάσταση σε 10 χρόνια. Ωστόσο, μόνο η έκφραση του K-67, η δερματική έκφραση μεγαλύτερη από 0 και το φύλο ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες. Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι ο πολλαπλασιασμός επιβραδύνεται καθώς τα κύτταρα

μελανώματος εισέρχονται στο χόριο και στη συνέχεια αυξάνεται με την έναρξη της ογκογονικής κάθετης φάσης ανάπτυξης και ότι η έκφραση του K1-67 και ο δερματικός μιτωτικός ρυθμός παρέχουν ανεξάρτητες προγνωστικές πληροφορίες που μπορούν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν στη διαχείριση με βάση τον κίνδυνο των ασθενών (Gimotty PA, et al, 2005). Οι δείκτες που μπορεί να έχουν χρησιμότητα στην ερμηνεία των άτυπων δερματικών μελανοκυτταρικών πολλαπλασιασμών είναι ο HMB45, για τον οποίο η απώλεια της έκφρασης φαίνεται να σχετίζεται με την «ωρίμανση» και ο p16, για τον οποίο η απώλεια της έκφρασης μπορεί να χρησιμεύσει ως υποκατάστατο για την ομόζυγη απώλεια 9p21 (Yazdan P, et al, 2014) που σχετίζεται με κακοήθεια (Karim RZ, et al, 2009). Το γονίδιο CDKN2B, που υπάρχει στον ίδιο τόπο, έχει επίσης πρόσφατα αποδειχθεί ότι χάνεται στην εξέλιξη του μελανώματος και θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως ένας άλλος χρήσιμος δείκτης μετά από κατάλληλη επικύρωση (McNeal AS, et al, 2015).

Στις μελέτες προόδου του Shain et al., Τα «επιθετικά» (προφανώς κάθετης φάσης ανάπτυξης) μελανώματα είχαν το μεγαλύτερο βάρος των μεταλλάξεων (Shain AH, et al, 2015). Όπως και στα προηγούμενα στάδια της εξέλιξης, αυτές οι μεταλλάξεις έφεραν μια υπογραφή UV ακτινοβολίας. Οι τροποποιήσεις αριθμού αντιγράφων (CNA) ήταν σπάνιες σε πλήρως καλοήθεις περιοχές και παρατηρήθηκαν περιστασιακά στις ενδιάμεσες και in situ αλλοιώσεις. Αντίθετα, οι τροποποιήσεις του αριθμού αντιγράφων παρατηρήθηκαν σε όλα τα διηθητικά μελανώματα και επηρέαζαν μεγαλύτερα τμήματα του γονιδιώματος. Περίπου το 50% των διηθητικών μελανωμάτων είχαν ομόζυγη απώλεια CDKN2A, η οποία δεν παρατηρήθηκε στους χαμηλότερους βαθμού όγκους. Επίσης παρουσιάστηκαν διαγραφές των PTEN, κέρδη του χρωμοσώματος 7q με αποτέλεσμα να αυξάνουν τη δοσολογία του μεταλλαγμένου BRAF και οι ενισχύσεις των MDM2, TERT και YAP1. Σημειώθηκε ότι «η κατανομή των γενετικών αλλαγών, των σημειακών μεταλλάξεων και των αλλαγών του αριθμού των αντιγράφων μεταξύ των διαφόρων περιοχών μεμονωμένων περιπτώσεων αποκάλυψε το φυλογενετικό ιστορικό κάθε νεοπλασματος. Τα μελανοκυτταρικά νεοπλασματα εξελίσσονται γραμμικά κατά τα πρώτα στάδια, ενώ εμφανίζουν πολύπλοκη εξέλιξη καθώς γίνονται πιο προχωρημένα ».

8. Θεραπεία

8.a. Χειρουργική επέμβαση

Οι βιοψίες εκτομής μπορεί να απομακρύνουν τον όγκο, αλλά συχνά απαιτείται ευρύτερη χειρουργική επέμβαση για τη μείωση του κινδύνου επανεμφάνισης και εκτίμηση της παρουσίας ανιχνεύσιμης μεταστατικής νόσου μαζί με βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη παρακολούθηση. Συχνά αυτό γίνεται με ευρεία τοπική εκτομή (WLE) με περιθώρια 1 έως 2 cm. Τα in situ και εφηλιδοειδή μελανώματα αντιμετωπίζονται με στενότερα χειρουργικά περιθώρια, συνήθως 0,2 έως 0,5 cm. Πολλοί χειρουργοί θεωρούν ότι τα όρια 0,5 cm είναι τα πιο κατάλληλα για εκτομή μελανώματος in-situ (Clark GS et al, 2008), αλλά και το περιθώριο 0,2 cm μπορεί να είναι αποδεκτό. Η ευρεία εκτομή στοχεύει στη μείωση του ρυθμού επανεμφάνισης του όγκου στη θέση της αρχικής αλλοίωσης. Μεγάλη έρευνα στόχευε στην αποσαφήνιση των κατάλληλων ορίων για εκτομή με γενική τάση προς λιγότερο επιθετική θεραπεία κατά τις τελευταίες δεκαετίες (Balch C, et al, 1993).

Τα μελανώματα που εξαπλώνονται συνήθως το κάνουν στους λεμφαδένες στην περιοχή του όγκου πριν εξαπλωθούν αλλού. Οι προσπάθειες βελτίωσης της επιβίωσης με την απομάκρυνση των λεμφαδένων χειρουργικά (λεμφαδενεκτομή) συσχετίστηκαν με πολλές επιπλοκές, αλλά χωρίς οφέλη γενικής επιβίωσης. Πρόσφατα, αναπτύχθηκε η τεχνική της βιοψίας «λεμφαδένα φρουρού» για τη μείωση των επιπλοκών της χειρουργικής επέμβασης των λεμφαδένων, επιτρέποντας παράλληλα την αξιολόγηση της προσβολής λεμφαδένων (The Screening and Surveillance of Ultrasound in Melanoma trial, 2009). Η

βιοψία του «λεμφαδένα φρουρού» είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη διαδικασία κατά τη θεραπεία δερματικού μελανώματος (Crowson, AN, et al, 2013, Ross, MI, et al, 2013). Εάν ένας λεμφαδένας είναι θετικός, ανάλογα με την έκταση της νεοπλασματικής διήθησης μπορεί να ακολουθήσει αφαίρεση των λεμφαδένων και ο ασθενής στην συνέχεια θα ακολουθήσει επικουρική θεραπεία.

8.b. Επικουρική θεραπεία

Τα υψηλού κινδύνου μελανώματα μπορεί να απαιτούν επικουρική θεραπεία, παρόλο που η στάση απέναντί τους ποικίλλει σε διαφορετικές χώρες. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι περισσότεροι ασθενείς με καλή υγεία θα αρχίσουν έως και ένα χρόνο θεραπείας με ιντερφερόνη υψηλής δόσης, η οποία έχει σοβαρές παρενέργειες, αλλά μπορεί να βελτιώσει ελαφρώς την πρόγνωση του ασθενούς. Ωστόσο, οι οδηγίες του Βρετανικού Συνδέσμου Δερματολόγων σχετικά με το μελάνωμα αναφέρουν ότι η ιντερφερόνη δεν συνιστάται ως τυπική ανοσοενισχυτική θεραπεία για το μελάνωμα (Neil H, et al, 2010) Μετα-ανάλυση το 2011 έδειξε ότι η ιντερφερόνη θα μπορούσε να επιμηκύνει το χρόνο πριν επανεμφανιστεί ένα μελάνωμα, αλλά αύξησε την επιβίωση μόνο κατά 3% σε 5 χρόνια. Οι δυσάρεστες παρενέργειες μειώνουν επίσης σημαντικά την ποιότητα ζωής (Wheatley K, et al, 2007).

8.c. Χημειοθεραπεία και ανοσοθεραπεία

Διάφορες χημειοθεραπευτικές ουσίες, όπως η τεμοζολομίδη, η δακαρβαζίνη (επίσης ονομαζόμενη DTIC), και η ανοσοθεραπεία με ιντερλευκίνη-2 (IL-2) ή ιντερφερόνη (IFN), χρησιμοποιούνται. Σήμερα η συνολική επιτυχία στο μεταστατικό μελάνωμα είναι αρκετά περιορισμένη (Bajetta E, et al, 2002). Τα συμβατικά κυτταροτοξικά φάρμακα είναι σε μεγάλο βαθμό αναποτελεσματικά στο μελάνωμα. Η IL-2 (Proleukin) ήταν η πρώτη εγκριθείσα θεραπεία (1990 Ευρώπη, 1992 ΗΠΑ) για τη θεραπεία του μεταστατικού μελανώματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι η IL-2 προσφέρει τη δυνατότητα πλήρους και μακροχρόνιας ύφεσης σε αυτή τη νόσο, αν και μόνο σε μικρό ποσοστό ασθενών (Buzaid A, et al, 2004).

Πρόσφατα, έχουν εισαχθεί ένας αριθμός παραγόντων που ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα και αυξάνουν τις αντι-ογκικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Η αρχική επιτυχία παρουσιάστηκε με το αντίσωμα CTL-4 ipilimumab, το οποίο οδήγησε σε μακροχρόνιες αποκρίσεις σε ένα μικρό ποσοστό (περίπου 20%) ασθενών με μελάνωμα (Griewank KG et al, 2013, Scheuermann JC, et al, 2012). Τα αντισώματα PD-1 και PDL-1 (BMS-936558 και BMS-936559, αντίστοιχα) έχουν επίσης βρεθεί ότι είναι αποτελεσματικά σε μελάνωμα και άλλους καρκίνους (Brahmer JR, et al, 2012, Toralian SL, et al, 2012). Τα πρώτα δημοσιευμένα αποτελέσματα του MK-3475 (PD-1, επίσης παλαιότερα γνωστό ως lambrolizumab) ανέφεραν αντικειμενικές αποκρίσεις στο 38,5% των ασθενών που έλαβαν θεραπεία για το μελάνωμα (Toralian SL, et al, 2012). Ένας συνδυασμός nivolumab (PD-1, πρώην BMS-936558) και ipilimumab (CTLA-4) ανέφερε αντικειμενικές αντιδράσεις στο 53% των ασθενών. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες όλων αυτών των ανοσορρυθμιστικών παραγόντων είναι πρωτίστως φλεγμονώδεις νόσοι (π.χ. κολίτιδα, θυρεοειδίτιδα, πνευμονίτιδα, κλπ.). Τα αρχικά αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η έκταση αυτών των ανεπιθύμητων ενεργειών είναι λιγότερο σοβαρή για τη μονοθεραπεία PD-1 (Wolchok JD, et al, 2013).

Σήμερα εφαρμόζονται ανοσοθεραπείες χωρίς καμία διαστρωμάτωση. Ωστόσο, είναι σε εξέλιξη πολλή δουλειά για τον εντοπισμό μεθόδων που θα επιτρέψουν την ταυτοποίηση των ασθενών που είναι πιθανότερο να ανταποκριθούν καλά σε αυτές τις θεραπείες με την χρήση γονιδιακών υπογραφών που προβλέπουν την ανταπόκριση των ασθενών στην

ανοσοθεραπεία. Μια τέτοια υπογραφή παρουσιάστηκε πρόσφατα για ασθενείς που έλαβαν MAGE-A3 ανοσοθεραπεία (Ulloa-Montoya F, et al, 2013). Οι ογκογονιδιακές (δηλ. BRAF, NRAS, κ.λπ.) υποδεικνυόμενες υπογραφές θα μπορούσαν επίσης να συσχετιστούν με αποκρίσεις σε ανοσοθεραπείες. Αυτό θα μπορούσε να γίνει σημαντικό, δεδομένων των πρόσφατων δεδομένων που δείχνουν ότι οι μεταλλαγμένοι όγκοι NRAS ανταποκρίνονται καλά στη θεραπεία με ιντερλευκίνη (Joseph RW, et al, 2012). Αν και τα δεδομένα εξακολουθούν να είναι πολύ περιορισμένα, δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η αναγνώριση των υπογραφών γονιδίων ή άλλων βιολογικών δεικτών που προβλέπουν αποκρίσεις σε ανοσοθεραπείες θα μπορούσε να έχει τεράστια αξία στην κλινική διαχείριση των ασθενών με μελάνωμα.

Τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα, τόσο όσον αφορά στα ποσοστά ανταπόκρισης όσο και στις ανεπιθύμητες ενέργειες, δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί για πολλές ανοσοθεραπείες. Στη θεραπεία αντισωμάτων CTLA-4 (ipilimumab), οι απαντήσεις μακράς διάρκειας (για περισσότερο από 2 χρόνια) μπορούν να επιτευχθούν σε μικρό ποσοστό (10%-20%) των ασθενών (Robert C, et al, 2011). Αν και στοχευμένες μικρές θεραπείες αναστολής όπως οι αναστολείς BRAF δείχνουν υψηλά αρχικά ποσοστά ανταπόκρισης μεγαλύτερα από 80%, οι απαντήσεις μακράς διάρκειας φαίνεται να είναι σπάνιες. Ο συνδυασμός ανοσοθεραπειών και θεραπειών με αναστολείς θα μπορούσε ενδεχομένως να ανακουφίσει τα μειονεκτήματα των επιμέρους παραγόντων, οδηγώντας σε πιο ανθεκτικές απαντήσεις σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών. Ιδιαίτερα σε ασθενείς με μελανώματα που φιλοξενούν σπάνιες γενετικές αλλοιώσεις για τις οποίες δεν είναι διαθέσιμες συγκεκριμένες στοχευμένες θεραπείες, οι ανοσοθεραπείες μπορεί να είναι ελπιδοφόρες θεραπευτικές επιλογές.

8.d. Στοχεύουσες θεραπείες

Οι νέες θεραπείες για το μεταστατικό μελάνωμα περιλαμβάνουν τους βιολογικούς ανοσοθεραπευτικούς παράγοντες ipilimumab, pembrolizumab και nivolumab (Syn, Nicholas L, et al, 2017), BRAF αναστολείς, όπως vemurafenib και dabrafenib και αναστολείς MEK, όπως το trametinib (Maverakis E, et al, 2015) (Πίνακες 6 και 7).

8.d.i. Αναστολείς BRAF

Η εμφάνιση ειδικών, κλινικά αποτελεσματικών αναστολέων του μεταλλαγμένου BRAF με την μετάλλαξη V600 είναι ένα σημαντικό ορόσημο στον τομέα της εξατομικευμένης ιατρικής. Η κλινική αποτελεσματικότητα της πρώτης ένωσης (τώρα γνωστή ως vemurafenib) αναφέρθηκε το 2010 (Flaherty KT, et al, 2010, Bollag G, et al, 2010), μόλις 8 χρόνια μετά την αναγνώριση των BRAF μεταλλάξεων στο μελάνωμα (Davies H, et al, 2002). Σε αρκετές κλινικές δοκιμές, το vemurafenib έδειξε αξιόλογες πρώιμες αντιδράσεις σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα μετάλλαξης BRAF. Μια δοκιμή φάσης III (σε μελάνωμα οδηγούμενο από την BRAF μετάλλαξη) συνέκρινε το vemurafenib με την τυποποιημένη χημειοθεραπεία με δακαρβαζίνη. Τα ποσοστά ανταπόκρισης ήταν 48%, ενώ η μέση επιβίωση χωρίς εξέλιξη (PFS) ήταν 5,3 μήνες στην ομάδα του vemurafenib, σε σύγκριση με ποσοστό ανταπόκρισης 5% και μέση PFS 1,6 μηνών για τη δακαρβαζίνη (Chapman PB, et al, 2011). Έχοντας πολύ μεγάλο κληνικό όφελος, η μελέτη σταμάτησε νωρίτερα από το χρονοδιάγραμμα και το vemurafenib εγκρίθηκε από την αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) το 2011. Το Dabrafenib είναι ένας άλλος εκλεκτικός αναστολέας της μετάλλαξης BRAF V600, που έχει επίσης εγκριθεί από το FDA για

τη θεραπεία του BRAF V600 μεταλλαγμένου μελανώματος (Falchook GS, et al, 2012). Μια δοκιμή φάσης III του dabrafenib στο μελάνωμα ανέφερε θεραπευτικές αποκρίσεις παρόμοιες με τη δοκιμή του vemurafenib, με διάμεση PFS 5,1 μηνών στην ομάδα που έλαβε dabrafenib και 2,7 μήνες στην ομάδα που έλαβε dacarbazine (Hauschild A, et al, 2012).

Οι παρενέργειες και των δύο αυτών αναστολέων BRAF είναι παρόμοιες, αν και η φωτοευαισθησία φαίνεται να είναι πιο σοβαρή με το vemurafenib. Ένα συχνό γεγονός είναι η ανάπτυξη θηλωειδών υπερκερατώσεων (μέχρι 49%) και καρκινωμάτων επιθηλιακών κυττάρων, ιδιαίτερα του τύπου κερατοακανθώματος (περίπου 25%) (Charman P, et al, 2011, Anforth RM et al, 2012, Sosman JA, et al, 2012). Επιπρόσθετα μπορεί να εμφανιστεί κνησμός, εξανθήματα ακμής και υπερκεράτωση των χεριών και των ποδιών (συνολικά περίπου 31%). Οι μη δερματικές ανεπιθύμητες παρενέργειες που αναφέρθηκαν είναι η αρθραλγία (περίπου 21%), η αύξηση των ηπατικών ενζύμων (περίπου 6%) και η ναυτία (περίπου 8%) (Charman PB, et al, 2011, Sosman JA, et al, 2012).

Πίνακας 6: Νέες θεραπείες για το μελάνωμα (Πηγή: Klaus G. Griewank, et al, 2014).

Inhibitor	Melanoma mutation profile	Medication	Side effects
BRAF	<i>BRAF</i> V600	Vemurafenib Dabrafenib	Development of proliferative cutaneous lesions (eg, verruciform keratoses, keratoacanthomas, squamous cell carcinomas, acneform eruptions, other skin rashes, arthralgias, photosensitivity, panniculitis, elevated liver enzymes, nausea)
MEK	<i>BRAF</i> <i>NRAS</i> WT	Trametinib MEK162	Diarrhea, acneform dermatitis and other skin rashes, peripheral and facial edema, ocular toxicities (e.g. dry eyes, blurred vision, and reversible central serous retinopathies, creatine phosphokinase increases)
KIT	<i>KIT</i>	Imatinib Nilotinib Sunitinib Danatinib	Blood formation deficits (including neutropenia, thrombocytopenia, anemia), gastro-intestinal symptoms, edemas, liver enzyme and bilirubin level increases, skin rashes
CTLA-4	All melanomas	Ipilimumab (Tremelimumab)	In particular autoimmune diseases (eg, colon [diarrhea, colitis], endocrine [thyroiditis, hypophysitis, adrenal gland insufficiency, hypopituitarism], hepatic, renal, lung, cutaneous [pruritus, rash, vitiligo], ocular)
PD-1 PD-L1	All melanomas	Nivolumab MK-3475 BMS-936559	Autoimmune diseases Comparable spectrum to CTLA-4 antibodies, but potentially milder

Πίνακας 7: Στοιχευμένοι παράγοντες πουεφαρμόζονται σε κλινικές δοκιμές μεμονωμένοι ή σε συνδιασμό με άλλους παράγοντες στο μελάνωμα (Πηγή: Klaus G. Griewank, et al, 2014).

Agent(s)	Melanoma mutation profile	Target(s)	Study phase	Status	Trial No.
Vemurafenib Bevacizumab	<i>BRAF</i>	BRAF VEGF	Phase II	Enrolling	NCT01495988
Vemurafenib PX-866	<i>BRAF</i>	BRAF PI3K	Phase I+II	Enrolling	NCT01616199
Vemurafenib XL888	<i>BRAF</i>	BRAF HSP90	Phase I	Enrolling	NCT01657591
LGX818 vs LGX818 MEK162 vs Vemurafenib	<i>BRAF</i>	BRAF BRAF MEK BRAF	Phase III	Enrolling	NCT01909453
LGX818 + MEK162 or LEE011 or BGJ398 or BKM120 or INC280	<i>BRAF</i>	BRAF MEK CDK4/6 FGFR Pi3K c-Met	Phase II	Not yet enrolling	NCT01820364
Tramatenib GSK2141795	<i>BRAF</i> wild-type	MEK AKT	Phase II	Not yet enrolling	NCT01941927
Tramatenib GSK2141795	<i>BRAF</i> wild-type	MEK AKT	Phase II	Not yet enrolling	NCT01941927
Pimasertib vs DTIC	<i>NRAS</i>	MEK	Phase II	Enrolling	NCT01693068
MEK162 LEE011	<i>NRAS</i>	MEK CDK4/6	Phase I+II	Enrolling	NCT01781572
MEK162 BKM120	<i>NRAS</i> or <i>BRAF</i> Solid tumors	MEK PI3K	Phase I	Enrolling	NCT01363232
Nilotinib	<i>KIT</i>	KIT	Phase II	Enrolling	NCT01099514
Masitinib vs DTIC	<i>KIT</i>	TKI KIT	Phase III	Enrolling	NCT01280565

Agent(s)	Melanoma mutation profile	Target(s)	Study phase	Status	Trial No.
SU011248	Mucosal + acral melanoma	TKI KIT	Phase II	Enrolling	NCT00577382
MK-3475 vs chemotherapy*	All melanoma	PD-1	Phase II	Enrolling	NCT01704287
Vemurafenib Ipilimumab*	<i>BRAF</i>	BRAF CTLA-4	Phase I	Halted†	
Dabrafenib Ipilimumab +/-Tramatenib*	<i>BRAF</i>	BRAF CTLA-4 MEK	Phase I	Enrolling	NCT01767454
Vemurafenib MPDL3280A*	<i>BRAF</i>	BRAF PD-L1	Phase I	Enrolling	NCT01656642
Imatinib Ipilimumab*	<i>KIT</i>	KIT CTLA-4	Phase I	Enrolling	NCT01738139
Nivolumab Lirilumab*	Advanced solid tumors	PD-1 KIT	Phase I	Enrolling	NCT01714739
IL-2 Ipilimumab*	All melanoma	IL-2 CTLA-4	Phase IV	Enrolling	NCT01856023
Ipilimumab Imatinib*	<i>KIT</i> (advanced cancers)	CTLA-4 KIT	Phase I	Enrolling	NCT01738139
Ipilimumab*	All uveal melanoma	CTLA-4	Phase I+II	Enrolling	NCT01585194
Sorafenib	All uveal melanoma	CRAF BRAF VEGF PDGFR	Phase II	Enrolling	NCT01377025
AEB071 MEK162	All uveal melanoma	PKC MEK	Phase I+II	Enrolling	NCT01801358

8.d.ii. Αναστολείς MEK

Η MEK βρίσκεται στα καθοδικά του BRAF και του RAS και έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός αναστολέων που εμποδίζουν την ενεργοποίηση της MEK. Ένα πολλά υποσχόμενο φάρμακο είναι το trametinib (Infante JR, et al, 2012, Falchook GS, et al, 2012, Kim KB, et al, 2013). Μια δοκιμή φάσης III σε ασθενείς μεταστατικού μελανώματος με μετάλλαξη BRAF εμφάνισε διάμεσο PFS 4,8 μηνών στην ομάδα του trametinib σε σύγκριση με 1,5 μήνες για χημειοθεραπεία (paclitaxel ή dacarbazine) (Si L, et al, 2012). Ο περιορισμός των παρενεργειών ήταν η διάρροια, τα δερματικά εξανθήματα και η οφθαλμική τοξικότητα, ιδιαίτερα η ορώδης αμφιβληστροειδοπάθεια (Infante JR, et al, 2012, Falchook GS, et al, 2012). Με βάση αυτά τα ευρήματα, ο Αμερικανικός Οργανισμός Φαρμάκων (FDA) ενέκρινε το trametinib για μη ανιχνεύσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα που δεν έχει προηγουμένως λάβει θεραπεία με αναστολέα BRAF. Η συνδυασμένη θεραπεία, που συνδυάζει το trametinib με τον αναστολέα BRAF dabrafenib, έχει αποδειχθεί ακόμη πιο ελπιδοφόρα με βάση τη βελτιωμένη αποτελεσματικότητα καθώς και την καταστολή ορισμένων φαινομένων που σχετίζονται με αναστολέα BRAF (Flaherty KT, et al, 2012). Το διάμεσο PFS για ασθενείς που λάμβαναν και dabrafenib και trametinib ήταν 9,4 μήνες σε σύγκριση με 5,8 μήνες για το dabrafenib μόνο. Μια πλήρης ή μερική απόκριση παρατηρήθηκε στο 76% των ασθενών που λάμβαναν αμφότερους τους παράγοντες, σε σύγκριση με το 54% για εκείνους που λάμβαναν μόνο dabrafenib. Αυτό αντιπροσωπεύει το καλύτερο αποτέλεσμα για στοχεύουσες θεραπείες στο μελάνωμα μέχρι σήμερα. Η ομάδα θεραπείας συνδυασμού εμφάνισε συχνότερες συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως ο πυρετός (71%), ρίγη (58%), κόπωση (53%) και έμετο (40%) από τη μονοθεραπεία (26%, 17% και 15%, αντίστοιχα), αλλά οι δερματικές παρενέργειες, συμπεριλαμβανομένης της υπερκεράτωσης, της αλωπεκίας και του καρκίνου του δέρματος από πλακωδή κύτταρα, ήταν λιγότερο συχνές (9% έναντι 30%, 5% έναντι 34% και 7% έναντι 19% αντιστοίχως).

Τα αποτελέσματα μιας δοκιμής φάσης II ενός άλλου MEK αναστολέα, του MEK162 δημοσιεύθηκαν πρόσφατα (Ascierto PA, et al, 2013). Η διάμεση τιμή PFS ήταν 3,7 μήνες για την ομάδα μεταλλάξεων NRAS και 3,6 μήνες για την ομάδα μετάλλαξης BRAF, αλλά και στις δύο ομάδες επιτεύχθηκε μερική απόκριση (PR) στο 20% των ασθενών. Στο μεταλλαγμένο μελάνωμα BRAF, οι αναστολείς MEK εμφανίζουν κάπως κατώτερα αποτελέσματα σε σχέση με εκείνα για τους αναστολείς BRAF. Ωστόσο, η μελέτη MEK162 έδειξε επίσης την αποτελεσματικότητα ενός αναστολέα MEK σε όγκους με μεταλλάξεις στο NRAS (Ascierto PA, et al, 2013).

Συνοπτικά, φαίνεται ότι για τους όγκους με BRAF μεταλλάξεις, οι αναστολείς MEK λειτουργούν λιγότερο καλά από τους αναστολείς BRAF όταν χρησιμοποιούνται μόνοι τους και παρουσιάζουν μεγαλύτερο όφελος όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με αναστολείς BRAF. Ωστόσο, οι αναστολείς MEK αντιπροσωπεύουν επί του παρόντος τους πρώτους στοχευόμενους θεραπευτικούς παράγοντες που δείχνουν όφελος σε όγκους NRAS με μεταλλάξεις.

8.d.iii. Αναστολείς KIT

Οι αρχικές δοκιμές που χρησιμοποίησαν αναστολείς KIT αφορούσαν μη επιλεγμένους πληθυσμούς ασθενών και, αναπάντεχα, έδειξαν αρνητικά αποτελέσματα (Ugurel S, et al, 2005, Wyman K, et al, 2005-2001 Kluger HM, et al, 2011). Μελέτες που στοχεύουν επιλεκτικά σε ασθενείς των οποίων οι όγκοι έχουν μεταβολές KIT έδειξαν σημαντικά περισσότερες υποσχέσεις. Ο συχνότερα χρησιμοποιούμενος παράγοντας για τη θεραπεία μελανώματος με αλλοιώσεις του KIT ήταν το imatinib. Αν και οι αρχικές

περιπτωσιολογικές μελέτες ανέφεραν δραματικές απαντήσεις στο imatinib (Lutzky J, et al, 2008, Hodi FS, et al, 2008), οι μεγαλύτερες μελέτες έχουν δείξει λιγότερο ελπιδοφόρα αποτελέσματα (Guo J, et al, 2011, Carvajal RD, et al, 2011). Τρεις δοκιμές φάσης II έδειξαν διάμεση PFS περίπου 3 μηνών (Guo J, et al, 2011), 3,7 μηνών (Hodi FS, et al, 2013) και 12 εβδομάδων (Carvajal RD, et al, 2011)]. Σε μία μελέτη υπήρχαν δύο ολικές απαντήσεις και δύο παροδικές απαντήσεις σε 25 ασθενείς (Carvajal RD, et al, 2011). Σε άλλες μελέτες, υπήρχαν 10 άτομα με μερική απόκριση και 13 περιπτώσεις που έδειξαν κάποια μη σημαντική απόκριση σε 43 ασθενείς (Guo J, et al, 2011) και πέντε περιπτώσεις χωρίς σημαντική απόκριση και επτά με μερική απόκριση σε 24 ασθενείς (Hodi FS, et al, 2013), με συνολικό PFS μόνο 3,5 ή 3,7 μήνες, αντίστοιχα. Ωστόσο, η μελέτη έδειξε ότι σε ασθενείς με μερική απόκριση, σημαντική ή όχι, η επιβίωση χωρίς ανάπτυξη του όγκου (PFS) ήταν 9 μήνες και 15 μήνες, αντίστοιχα, σε σύγκριση με 1,5 και 9 μήνες, αντίστοιχα σε ασθενείς που δεν παρουσίασαν κάποια απόκριση (Guo J, et al, 2011). Σε όλες τις μελέτες, η πλειονότητα των ασθενών που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία είχαν όγκους που χαρακτηρίστηκαν από μεταλλάξεις εξωνίων 11 και 13 (δηλαδή L576P και K642E). Άλλοι αναστολείς που στοχεύουν το KIT που χρησιμοποιήθηκαν είναι το sorafenib, το sunitinib (Minor DR, et al, 2012), το dasatinib (Woodman SE, et al, 2009) και το nilotinib (Cho JH, et al, 2012). Όλες οι μελέτες μέχρι σήμερα έχουν παρουσιάσει περιορισμένη επιτυχία, με θεραπευτικά οφέλη μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις. Οι όγκοι με αυξημένο αριθμό αντιγράφων KIT, αλλά χωρίς μεταλλάξεις γενικά αποκρίνονται ελάχιστα. Ελπίζεται ότι η ανάπτυξη νέων παρεμποδιστών που εμφανίζουν επιδράσεις σε όγκους που φέρουν μεταλλάξεις KIT καθώς και αυξήσεις αριθμού αντιγράφων θα βελτιώσει τις θεραπευτικές επιλογές για ασθενείς με εκφυλισμένα με KIT μελανώματα. Παρόλο που τα αποτελέσματα ποικίλλουν, το imatinib αποτελεί σήμερα μια θεραπευτική επιλογή που πρέπει να εξεταστεί για ασθενείς με μεταστατικά μεταλλαγμένα μελανώματα KIT, ιδιαίτερα εκείνα που φέρουν μεταλλάξεις L576P ή K642E.

9. Μελλοντικές προοπτικές

Η εισαγωγή νέων γενετικών τεχνικών οδήγησε σε πολύ καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεση του μελανώματος. Οι αναγνωρισμένες γενετικές αλλοιώσεις, ιδίως οι μεταλλάξεις ενεργοποίησης "οδηγού" (BRAF, NRAS και KIT) έχουν οδηγήσει στην εισαγωγή των πρώτων αποτελεσματικών θεραπειών που στοχεύουν στις μη φυσιολογικά ενεργοποιημένες κυτταρικές ενδογενείς οδούς σηματοδότησης. Εκτός από ορισμένες αλλαγές γονιδίων που είναι ιδιαίτερα συχνές (π.χ. BRAF, NRAS, PTEN, CDKN2A), έχουν πρόσφατα φθάσει στο φως πολλά άλλα γενετικά συμβάντα στο μελάνωμα, οι κλινικές επιπτώσεις των οποίων δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί. Οι γενετικές ανιχνεύσεις του αριθμού αντιγράφων DNA χρησιμοποιούνται σήμερα συνήθως για την υποβοήθηση της διαφορικής διάγνωσης μεταξύ καλοήθων και κακοήθων μελανοκυτταρικών νεοπλασμάτων. Μέχρι σήμερα, μεμονωμένες στοχευμένες θεραπείες έχουν οδηγήσει σε πολλά υποσχόμενες έγκαιρες απαντήσεις, αλλά αυτά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα μετριάζονται από τη συχνή εμφάνιση ανθεκτικότητας των κυττάρων. Έχουν ξεκινήσει σημαντικές έρευνες για τη διερεύνηση μηχανισμών αντίστασης και για την ανάπτυξη στρατηγικών πρόληψης ή καταστρατήγησης αυτών. Λεπτομερής γενετική ανάλυση από την άποψη της μαζικά παράλληλης αλληλούχησης εξελίσσεται ταχέως από ένα ερευνητικό εργαλείο σε ένα δυνητικά χρήσιμο και ευρέως διαδεδομένο κλινικό πρότυπο για τη διαχείριση καρκινοπαθών, ιδιαίτερα καθώς αυξάνεται ο αριθμός των διαθέσιμων στοχευμένων παραγόντων.

Μία από τις πολλά υποσχόμενες συνεχιζόμενες ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνεται στη βελτίωση των στοχευμένων επιλογών θεραπείας για ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα με όγκους BRAF άγριου τύπου. Η πρωτοβουλία Stand Up To Cancer

στοχεύει να επιτύχει μαζικά παράλληλη αλληλούχιση των μελανώματος άγριου τύπου BRAF και δοκιμή μιας ομάδας στοχευμένων φαρμάκων σε κυτταρικές σειρές *in vitro* και *in vivo* (Ku GY, et al, 2010). Ο στόχος είναι να μεταφραστούν γρήγορα επιτυχημένες πειραματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις στην κλινική, με τους ασθενείς να λαμβάνουν εξατομικευμένη επιλογή των δοκιμασμένων θεραπευτικών μεθόδων με βάση τα προφίλ αλληλουχίας των όγκων τους.

Μεγάλες μελέτες αλληλουχίας έχουν εντοπίσει αρκετές νέες γενετικές μεταβολές στο μελάνωμα (Krauthammer M, et al, 2012, Hodis E, et al, 2012), και επιπρόσθετες μεταλλάξεις θα αναγνωριστούν αναπόφευκτα. Παρ'όλα αυτά, πολλά πρέπει να γίνουν κατανοητά για τη γενετική του μελανώματος. Για παράδειγμα, οι περισσότερες δημοσιευμένες γενετικές μελέτες μέχρι σήμερα βασίζονται σε ακολουθία όλων των εξονίων. Η πρόσφατη ταυτοποίηση των μεταλλάξεων του υποκινητή TERT που οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της τελομεράσης σε έως και 71% των μελανώματος του δέρματος (Horn S, et al, 2013, Huang FW, et al, 2013) δείχνει ότι οι εξαιρετικά σχετικές παθογενετικές μεταλλάξεις δεν πρέπει να επηρεάζουν τις περιοχές κωδικοποίησης πρωτεΐνης αλλά μπορούν επίσης να βρεθούν αλλού (π.χ. ρυθμιστικές περιοχές μεταγραφής).

Ο ρόλος των επιγενετικών παραγόντων στην παθογένεση του μελανώματος δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως. Μεταλλάξεις, αλλοιώσεις στον αριθμό αντιγράφων, ή μεταβληθέντα επίπεδα έκφρασης γονιδίων, η αναδιαμόρφωση της χρωματινής από πρωτεϊνικά σύμπλοκα όπως τα SWI / SNF και polycomb έχουν ταυτοποιηθεί στο μελάνωμα (Hodis E, et al, 2012, Vinod Saladi S, et al, 2010, Vachtenheim J, et al, 2010, Fan T, et al, 2011, Roesch A, et al, 2010, Bachmann IM, et al, 2008). Οι μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA έχουν περιγραφεί και περιλαμβάνουν την υπομεθυλίωση, οδηγώντας σε αποκλίνουσα γονιδιακή έκφραση (Rubinstein JC, et al, 2010) και την εστιακή υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG, η οποία γενικά συσχετίζεται με τη μείωση την έκφρασης των γονιδίων (van den Hurk K, et al, 2012, Greenberg ES, et al, 2014). Τα μη κωδικοποιημένα RNAs, τόσο τα μικρά (π.χ., microRNAs) (Stark MS, et al, 2012, Xu Y, et al, 2012) όσο και τα μακριά (Pasmant E, et al, 2007, Flockhart RJ, et al, 2012), είναι γνωστό ότι δεν εκφράζονται σωστά στο μελάνωμα και παίζουν καθορισμένους ρόλους στην παθογένεση.

Πλήρης ανάλυση DNA και RNA έχει γίνει άμεσα διαθέσιμη, αλλά η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών, τροποποιήσεων και αλληλεπιδράσεων εξακολουθεί να είναι δύσκολη. Οι τρέχουσες πειραματικές προσεγγίσεις που διασαφηνίζουν τις λειτουργικές συνέπειες των μεμονωμένων γενετικών γεγονότων αποδείχθηκαν εξαιρετικά χρήσιμες, αλλά είναι συχνά επίπονες και χρονοβόρες. Η κατανόηση του ρόλου των πρόσφατα αναγνωρισμένων γενετικών γεγονότων στην μελανοκυτταρική νεοπλασία θα είναι σημαντική για την ανάπτυξη ικανοποιητικών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Ως συνέπεια των προαναφερθέντων εξελίξεων, υπάρχει μεγάλη αισιοδοξία για τις μελλοντικές προοπτικές των ασθενών με μελάνωμα. Οι γενετικές προόδοι έχουν καταστήσει δυνατή την αναγνώριση πολλών σχετικών παθογενετικών συμβάντων και έχουν ήδη οδηγήσει στην επιτυχή εισαγωγή στοχευμένων θεραπειών, που αντιπροσωπεύουν τους πρώτους αποτελεσματικούς παράγοντες σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα. Αν και η αντίσταση σε μονοθεραπευτικές θεραπείες σχεδόν πάντα αναπτύσσεται γρήγορα, νέες ενώσεις που στοχεύουν σε διάφορες οδούς σηματοδότησης βρίσκονται σε εξέλιξη. Η εξατομικευμένη γενετική ανάλυση των όγκων και η εξατομικευμένη επιλογή θεραπευτικών μορφών με βάση αυτά τα αποτελέσματα είναι ήδη πραγματικότητα. Είναι πολύ πιθανό ότι μέσα στα επόμενα χρόνια η επιλογή πολλαπλών θεραπευτικών παραγόντων από μια βιβλιοθήκη ενώσεων με βάση τη γενετική σύνθεση των μεμονωμένων όγκων θα γίνει πραγματικότητα, εφαρμόζοντας έτσι τις δυνατότητες της εξατομικευμένης ιατρικής.

References

- Aaron Theisen, (2008) Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Nature Education* 1(1):45
- Abbas O, Miller DD, Bhawan J, (2014) Cutaneous malignant melanoma: update on diagnostic and prognostic biomarkers. *Am J Dermatopathol* 36: 363–79.
- Agar N, Young AR (2005) "Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage?". *Mutation Research* 571 (1–2): 121–32.
- Agar NS, Halliday GM, Barnetson RS, et al, (2004) The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4954–4959.
- Agarwala SS, Keilholz U, Gilles E, Bedikian AY, Wu J, Kay R, Stein CA, et al, (2009) LDH correlation with survival in advanced melanoma from two large, randomised trials (Oblimersen GM301 and EORTC 18951). *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)* 45:1807–14.
- Albino AP, Le Strange R, Oliff AI, et al, (1984) Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity?. *Nature* 308(5954):69–72.
- Albino, A.P., Nanus, D.M., Mentle, I. R., Cordon-Cardo, C., Mcnutt, N. S., Bressler, J., et al, (1989) Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene* 4: 1363–1374.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., et al, (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15, 6541–6551.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C. B., et al, (1997) Characterization of a3-phosphoinositide -dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Curr.Biol.* 7, 261–269.
- Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al, (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500: 415–421.
- Alharbi RA, Pettengell R, Pandha HS, Morgan R, (2013) The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia* 27(5):1000–8.
- Anforth RM, Blumetti TC, Kefford RF, et al, (2012) Cutaneous manifestations of dabrafenib (GSK2118436): a selective inhibitor of mutant BRAF in patients with metastatic melanoma. *Br J Dermatol* 167(5):1153–1160.
- Aoude LG, Heitzer E, Johansson P, et al, (2015) POLE mutations in families predisposed to cutaneous melanoma. *Familial cancer* 14(4):621–628.

Aoude LG, Pritchard AL, Robles-Espinoza CD, et al, (2015) Nonsense mutations in the shelterin complex genes ACD and TERF2IP in familial melanoma. *Journal of the National Cancer Institute* 107.

Appelqvist F, Yhr M, Erlandson A, Martinsson T, Enerback C, (2014) Deletion of the MGMT gene in familial melanoma. *Genes, chromosomes & cancer* 53(8):703-711.

Arboleda, M.J., Lyons, J.F., Kab- binavar, F.F., Bray, M.R., Snow, B.E., Ayala, R., et al, (2003) Overexpression of AKT2/ protein kinase B beta leads to upregulation of beta1 integrins, increase invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 63, 196–206.

Arlo J. Miller, M.D., Ph.D., and Martin C. Mihm, Jr., M.D. (2006) Melanoma. *N Engl J Med* 355:51-65.

Arumi-Uria M, McNutt NS, Finnerty B. (2003) Grading of atypia in nevi: correlation with melanoma risk. *Mod Pathol* 16: 764–71.

Asangani IA, Harms PW, Dodson L, Pandhi M, Kunju LP, Maher CA, Fullen DR, Johnson TM, Giordano TJ, Palanisamy N, et al, (2012) Genetic and epigenetic loss of microRNA-31 leads to feed-forward expression of EZH2 in melanoma. *Oncotarget* 3:1011-25

Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, et al, (2013) MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a nonrandomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol* 14(3):249–256.

Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, Salvesen HB, Otte AP, Akslen LA, (2006) EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol* 24:268-73.

Bachmann IM, Puntervoll HE, Otte AP, et al, (2008) Loss of BMI-1 expression is associated with clinical progress of malignant melanoma. *Mod Pathol* 21(5):583–590.

Bainbridge MN, Armstrong GN, Gramatges MM, et al, (2015) Germline mutations in shelterin complex genes are associated with familial glioma. *Journal of the National Cancer Institute* 107(1):384.

Bajetta E, Del Vecchio M, Bernard-Marty C, Vitali M, Buzzoni R, Rixe O, Nova P, Aglione S, Taillibert S, Khayat D (2002) "Metastatic melanoma: chemotherapy". *Semin Oncol* 29 (5): 427–45.

Balch C, Buzaid A, Soong S, Atkins M, Cascinelli N, Coit D, Fleming I, Gershenwald J, Houghton A, Kirkwood J, McMasters K, Mihm M, Morton D, Reintgen D, Ross M, Sober A, Thompson J, Thompson J (2001) "Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma". *J Clin Oncol* 19 (16): 3635–48.

Balch C, Urist M, Karakousis C, Smith T, Temple W, Drzewiecki K, Jewell W, Bartolucci A, Mihm M, Barnhill R (1993) "Efficacy of 2-cm surgical margins for intermediate-thickness

melanomas (1 to 4 mm). Results of a multi-institutional randomized surgical trial". *Ann Surg* 218 (3): 262–67; discussion 267–9.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009;27:6199–206.

Balch, CM; Soong, SJ; Gershenwald, JE; Thompson, JF; Reintgen, DS; Cascinelli, N; Urist, M; McMasters, KM; et al, (2001) "Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system". *Journal of Clinical Oncology* 19 (16): 3622–34.

Bald T, Quast T, Landsberg J, et al, (2014) Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiotropism and metastasis in melanoma. *Nature* 507: 109–113.

Ball, N.J., Yohn, J.J., Morelli, J.G., Norris, D.A., Golitz, L.E., and Hoeffler, J. P. (1994) Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *J. Invest. Dermatol.* 102, 285–290.

Bardeesy, N., Bastian, B.C., Hezel, A., Pinkel, D., DePinho, R.A., and Chin, L. (2001) Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS- induced melanomas. *Mol Cell Biol* 21: 2144–2153.

Barden H, Levine S (1983) "Histochemical observations on rodent brain melanin". *Brain Research Bulletin*. 10 (6): 847–851.

Bastian BC (2014) The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol* 9: 239–271.

Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, et al, (1998) Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 58(10):2170–2175.

Bastian, B.C., Leboit, P.E., and Pinkel, D. (2000) Mutations and copy number increase of HRAS in Spitz nevi with distinctive histopathological features. *Am J Pathol* 157, 967–972.

Bastian, B.C., Leboit, P.E., Hamm, H., Brocker, E.B., and Pinkel, D. (1998) Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 58: 2170–2175.

Bataille V, Sasieni P, Grulich A, et al, (1998) Solar keratoses: a risk factor for melanoma but negative association with melanocytic naevi. *Int J Cancer* 78: 8–12.

Bauer J, Büttner P, Wiecker TS, et al, (2005) Risk factors of incident melanocytic nevi: a longitudinal study in a cohort of 1,232 young German children. *Int J Cancer* 115: 121–126.

Baylin SB, Ohm JE (2006) Epigenetic gene silencing in cancer –a mechanism for early oncogenic pathway addiction?. *Nat Rev Cancer* 6:107-116.

Bellacosa, A., DeFeo, D., Godwin, A.K., Bell, D.W., Cheng, J.Q., Altomare, D. A., et al (1995) Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* 64: 280–285.

Bennett DC (2003) Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene* 22: 3063–9.

Bennett DC (2008) How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events?. *Pigment Cell Melanoma Res* 21(1):27–38.

Bennett PE, Bemis L, Norris DA, Shellman YG. (2013) miR in melanoma development: miRNAs and acquired hallmarks of cancer in melanoma. *Physiol Genomics* 45:104959.

Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, et al, (2012) Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 485: 502–506.

Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, et al, (2011) A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* 480(7375):94-98.

Berwick M, MacArthur J, Orlow I, et al, (2014) MITF E318K's effect on melanoma risk independent of, but modified by, other risk factors. *Pigment cell & melanoma research* 27(3):485-488.

Bishop JN, Harland M, Randerson-Moor J, Bishop DT (2007) Management of familial melanoma. *Lancet Oncol* 8:46-54.

Bochenek G, H€asler R, El Mokhtari N-E, K€onig IR, Loos BG, Jepsen S, Rosenstiel P, Schreiber S, Schaefer AS, (2013) The large non-coding RNA ANRIL, which is associated with atherosclerosis, periodontitis and several forms of cancer, regulates ADIPOR1, VAMP3 and C11ORF10. *Hum Mol Genet* 22:4516- 27.

Bollag G, Hirth P, Tsai J, et al, (2010) Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*467(7315):596–599.

Bonazzi VF, Stark MS, Hayward NK, (2012) MicroRNA regulation of melanoma progression. *Melanoma Res* 22:101-13.

Bott M, Brevet M, Taylor BS, et al, (2011) The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat Genet* 43(7):668–672.

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al, (2012) Safety and activity of anti- PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366(26):2455–2465.

Brash DE (2015) UV signature mutations. *Photochem Photobiol* 91: 15–26.

The Breast Cancer Linkage Consortium (1999) Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute* 91(15):1310-1316.

Brenn T, McKee PH, (2008) Melanoma in children and adolescents. *Diagnostic Histopathol* 14(1):18–27.

Brenner M, Hearing VJ (2008) The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol* 84; 539–549.

Breslow, Alexander (1970) "Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma". *Annals of Surgery*. 172 (5):902–8.

Brockdorff N (2013) Noncoding RNA and polycomb recruitment. *RNA* 19:429–42.

Brose, M.S., Volpe, P., Feldman, M., Kumar, M., Rishi, I., Gerrero, R., et al, (2002) BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 62, 6997–7000.

Budden T, Bowden NA (2013) The role of altered nucleotide excision repair and UVB-induced DNA damage in melanomagenesis. *Int J Mol Sci* 14: 1132–1151.

Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE, (2010) Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA Correlates with atherosclerosis risk. *PLoS Genet* 6:e1001233.

Burke LS, Hyland PL, Pfeiffer RM, et al, (2013) Telomere length and the risk of cutaneous malignant melanoma in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations. *PloS one* 8(8):e71121.

Buzaid A (2004) "Management of metastatic cutaneous melanoma". *Oncology (Williston Park)*. 18 (11): 1443–50; discussion 1457–59.

C.G. Lian, Y. Xu, C. Ceol, F. Wu, A. Larson, K. Dresser, W. Xu, L. Tan, Y. Hu, Q. Zhan, C. Lee, D. Hu, B.Q. Lian, S. Kleffel, Y. Yang, J. Neiswender, A.J. Khorasani, R. Fang, C. Lezcano, L.M. Duncan, R.A. Scolyer, J.F. Thompson, H. Kakavand, Y. Houvras, L.I. Zon, M.C. Mihm, U.B. Kaiser, T. Schatton, B.A. Woda, G.F. Murphy, Y.G. Shi, (2012) Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma, *Cell* 150: 1135–1146.

Cales, C. ,Hancock, J.F. ,Marshall, C. J. , and Hall, A .(1988) The cytoplasmic protein GAP is implicated as the target for regulation by the ras gene product. *Nature* 332: 548–551.

Cancer Genome Atlas Network (2015) Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 161: 1681–1696.

Cancer Genome Atlas Research Network (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455(7216): 1061–1068.

Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, et al, (1992) Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science* 258(5085):1148–1152.

Carbone M, Yang H, Pass HI, et al, (2013) BAP1 and cancer. *Nat Rev Cancer* 13(3):153–159.

Carli P, Palli D. (2003) Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst* 95: 1801.

Carlino MS, Haydu LE, Kakavand H, et al, (2014) Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 111: 292–299.

Carr J, Mackie RM, (1994) Point mutations in the N-ras oncogene in malignant melanoma and congenital naevi. *Br J Dermatol* 131: 72–77.

Carracedo, A., and Pandolfi, P.P. (2008) The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 27: 5527–5541.

Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, et al (2011) KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA* 305(22):2327–2334.

Cawthon RM, Weiss R, Xu GF, et al, (1990) A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* 62 (1):193–201.

Ceol CJ, Houvras Y, Jane-Valbuena J, Bilodeau S, Orlando DA, Battisti V, et al, (2011) The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. *Nature* 471(7339):513–7.

Chang, Y. S., Adnane, J., Trail, P. A., Levy, J., Henderson, A., Xue, D., et al, (2007) Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* 59: 561–574.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al., (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364(26):2507–2516.

Charles C. Matouk, Phillip A. Marsden (2008) Epigenetic Regulation of vascular endothelial gene expression. *Circulation research* 102:873-877.

Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W. M., Sonoda, G., Altomare, D.A., Watson, D.K., et al, (1996) Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 93: 3636–3641.

Cheung, M., Sharma, A., Madhupantula, S.V., and Robertson, G. P. (2008) Akt3 and mutant V600E B-Raf cooperate to promote early melanoma development. *Cancer Res* 68: 3429–3439.

Chiba K, Lorbeer FK, Shain AH, et al, (2017) Mutations in the promoter of the telomerase gene TERT contribute to tumorigenesis by a two-step mechanism. *Science* 357: 1416–1420.

Chin, L., Tam, A., Pomerantz, J., Wong, M., Holash, J., Bardeesy, N., et al, (1999) Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 400, 468–472.

Cho JH, Kim KM, Kwon M, et al. (2012) Nilotinib in patients with metastatic melanoma harboring KIT gene aberration. *Invest New Drugs* 30(5):2008–2014.

Christiaens FJ, Chardon A, Fourtanier A, et al, (2005) Standard ultraviolet daylight for nonextreme exposure conditions. *Photochem Photobiol* 81: 874–878.

Clark GS, Pappas-Politis EC, Cherpelis BS, et al, (2008) "Surgical management of melanoma in situ on chronically sun-damaged skin". *Cancer Control* 15 (3): 216–24.

Clark Jr WH, (1967) A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biologic behavior. In: Montagna W, Hu F, editors. *Advances in the Biology of the Skin*. Volume VIII. New York: Pergamon Press 621–47.

Clark Jr WH, Ainsworth AM, Bernardino EA, Yang Jr CH, Reed RJ (1975) The developmental biology of primary human malignant melanomas. *Semin Oncol* 2: 83–103.

Clark Jr WH, Elder DE, Guerry DIV, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M, (1984) A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 15: 1147–65.

Clark Jr WH, Elder DE, Guerry DIV, et al, (1989) Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *JNCI* 81: 1893–904.

Clark Jr WH, Reimer RR, Greene MH, Ainsworth AA, Mastrangelo MJ, (1978) Origin of familial melanomas from heritable melanocytic lesions. 'The B-K mole syndrome'. *Arch Dermatol* 114: 732–8.

Comet, E.M. Riising, B. Leblanc, K. Helin, (2016) Maintaining cell identity: PRC2-mediated regulation of transcription and cancer. *Nat Rev Cancer* 16 803–810.

Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, et al, (2005) Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst)* 4: 836–844.

Cramer, SF (1991) "The origin of epidermal melanocytes. Implications for the histogenesis of nevi and melanomas". *Archives of pathology & laboratory medicine* 115(2): 115–9.

Cross, D.A., Alessi D.R., Cohen, P., And jelkovich, M., and Hemmings, B.A (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785–789.

Crowson, AN; Haskell, H (2013) "The role of sentinel lymph-node biopsy in the management of cutaneous melanoma". *Giornale italiano di dermatologia e*

venereologia : organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia. 148 (5): 493–99.

Cully, M., You, H., Levine, A.J., and Mak, T.W. (2006) Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 6: 184–192.

Curiel-Lewandrowski C, Speetzen LS, Cranmer L, Warneke JA, Loescher LJ, (2011) Multiple primary cutaneous melanomas in Li-Fraumeni syndrome. *Archives of dermatology* 147(2):248-250.

Currie, R.A., Macleod, B.M., and Downes, C.P. (1997) The lipid transfer activity of phosphatidylinositol transfer protein is sufficient to account for enhanced phospholipase C activity in turkey erythrocyte ghosts. *Curr Biol* 7: 184–190.

Curtin JA, Busam K, Pinkel D, et al, (2006) Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 24(26):4340–4346.

Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al (2005) Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 353(20):2135–2147.

D. Koludrovic, P. Laurette, T. Strub, C. Keime, M. Le Coz, S. Coassolo, G. Mengus, L. Larue, I. Davidson, (2015) Chromatin-remodelling complex NURF is essential for differentiation of adult melanocyte stem cells. *PLoS Genet.* 11 e1005555.

D. Sengupta, S.D. Byrum, N.L. Avaritt, L. Davis, B. Shields, F. Mahmoud, M. Reynolds, L.M. Orr, S.G. Mackintosh, S.C. Shalin, A.J. Tackett, (2016) Quantitative histone mass spectrometry identifies elevated histone H3 lysine 27 (Lys27) trimethylation in melanoma. *Mol Cell Proteom MCP* 15 (2016) 765–775.

Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky Jr WE, You MJ, DePinho RA, McMahon M, Bosenberg M, (2009) Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* 41:544-52.

Dankort, D., Curley, D.P., Cartlidge, R. A., Nelson, B., Karnezis, A.N., Damsky, W.E.Jr., et al, (2009) Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* 41: 544–552.

Dasgupta B, Yi Y, Chen DY, et al, (2005) Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors. *Cancer Res* 65(7):2755–2760.

Datta, K., Franke, T.F., Chan, T.O., Makris, A., Yang, S.I., Kaplan, D. R., et al, (1995) AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation. *Mol Cell Biol* 15:2304–2310.

David E. Elder, Pathology and Laboratory Medicine, Hospital of the University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, (2016) Melanoma Progression. *United States Pathology* 48(2), pp. 147–154.

Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, et al, (2001) Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Molecular cell* 7(2):273-282.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., et al, (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949–954.

De la Serna IL, Ohkawa Y, Higashi C, Dutta C, Osias J, Kommajosyula N, Tachibana T, Imbalzano AN (2006) The microphthalmia-associated transcription factor requires SWI/SNF enzymes to activate melanocytespecific genes. *J Biol Chem* 281:20233-41

Debina Sarkar, Euphemia Y Leung, Bruce C Baguley, Graeme J Finlay, and Marjan E Askarian-Amiri (2015) Epigenetic regulation in human melanoma: past and future. *Epigenetics* 10:2 , 103—121.

Demerais F, Mohamdi H, Chaudru V, et al, (2012) Association of MC1R variants and host phenotypes with melanoma risk in CDKN2A mutation carriers: a GenoMEL study. *Journal of the National Cancer Institute* 102(20):1568-1583.

Demunter, A., Ahmadian, M.R., Libbrecht, L., Stas, M., Baens, M., Schef-fzek, K., et al, (2001) A novel N-ras mutation in malignant melanoma is associated with excellent prognosis. *Cancer Res* 61: 4916–4922.

Der, C.J., Finkel, T., and Cooper, G. M, (1986) Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. *Cell* 44: 167–176.

Dhawan, P., Singh, A.B., Ellis, D.L., and Richmond, A., (2002) Constitutive activation of Akt/ protein kinase B in melanoma leads to upregulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression. *Cancer Res* 62: 7335– 7342.

Dhomen N, Marais R, (2007) New insight into BRAF mutations in cancer. *Curr Opin Gebet Devel* 17: 31–39.

Dhomen, N., Reis-Filho, J.S., DaRocha Dias, S., Hayward, R.,Savage, K., Del- mas, V., et al, (2009) Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 15: 294–303.

Diem S, Kasenda B, Martin-Liberal J, Lee A, Chauhan D, Gore M, Larkin J, (2015) Prognostic score for patients with advanced melanoma treated with ipilimumab. *Eur J Cancer* 51:2785–91.

Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al, (2008) Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455(7216):1069–1075.

Ding L, Kim M, Kanchi KL, et al, (2014) Clonal architectures and driver mutations in metastatic melanomas. *PLoS One* 9: e111153.

Domchek, S.M., Auger, K.R., Chatterjee, S., Burke, T.R.Jr., and Shoelson, S.E., (1992) Inhibition of SH2 domain/ phosphoprotein association by a non hydrolysable phospho-no peptide. *Biochemistry* 31: 9865– 9870.

- Dong, L.Q., Zhang, R.B., Langlais, P., He, H., Clark, M., Zhu, L., et al, (1999) Primary structure, tissue distribution, and expression of mouse phosphoinositide-dependent protein kinase- 1, a protein kinase that phosphorylates and activates protein kinase C zeta. *J Biol Chem* 274: 8117–8122.
- Dorsam RT, Gutkind JS, (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7(2):79–94.
- Downward, J. (1996) Control of ras activation. *Cancer Surv* 27:, 87–100.
- Dumaz, N., Hayward, R., Martin, J., Ogilvie, L., Hedley, D., Curtin, J.A., et al, (2006) In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res* 66: 9483– 9491.
- Edinger, A.L., and Thompson, C. B, (2002) Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR- dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell* 13: 2276–2288.
- Elder DE, Goldman LI, Goldman SC, Greene MH, Clark Jr WH (1980) Dysplastic nevus syndrome: a phenotypic association of sporadic cutaneous melanoma. *Cancer* 46: 1787–94.
- Elder DE, Guerry D, Epstein MN, et al, (1984) Invasive malignant melanomas lacking competence for metastasis. *Am J Dermatopathol* 6(Suppl): 55–61.
- Eliason MJ, Larson AA, Florell SR, et al, (2006) Population-based prevalence of CDKN2A mutations in Utah melanoma families. *J Invest Dermatol* 126(3):660–666.
- Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, et al, (2011) Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res* 17(2):229–235.
- Erice O, Smith MP, White R, et al, (2015) MGMT Expression Predicts PARPMediated Resistance to Temozolomide. *Molecular cancer therapeutics* 14(5):1236-1246.
- Eskandarpour, M., Kiaii, S., Zhu, C., Castro, J., Sakko, A.J., and Hansson, J, (2005) Suppression of oncogenic NRAS by RNA interference induces apoptosis of human melanomacells. *Int.J.Cancer* 115: 65–73.
- Esteller M, (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8:286-298.
- Estep, A.L., Palmer, C., McCormick, F., and Rauen, K.A, (2007) Mutation analysis of BRAF, MEK1 and MEK2 in 15 ovarian cancer cell lines: implications for therapy. *PLoS ONE* 2:e1279.
- Falchook GS, Lewis KD, Infante JR, et al, (2012) Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* 13(8):782–789.

Falchook GS, Long GV, Kurzrock R, et al, (2012) Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 379(9829):1893–1901.

Fan J, Eastham L, Varney ME, Hall A, Adkins NL, Sollars VE, Georgel P, Niles RM, (2010) Silencing and reexpression of retinoic acid receptor beta2 in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 23:419-29.

Fan T, Jiang S, Chung N, Alikhan A, Ni C, Lee CCR, Hornyak TJ, (2011) EZH2-dependent suppression of a cellular senescence phenotype in melanoma cells by inhibition of p21/CDKN1A expression. *Mol Cancer Res* 9:418-29.

Fan T, Jiang S, Chung N, et al, (2011) EZH2-dependent suppression of a cellular senescence phenotype in melanoma cells by inhibition of p21/CDKN1A expression. *Mol Cancer Res* 9(4):418–429.

Fang M, Ou J, Hutchinson L, Green Michael R, (2014) The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFK to mediate the CpG island methylator phenotype. *Mol Cell* 55:904-15.

Flaherty KT, Infante JR, Daud A, et al, (2012) Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 367(18):1694–1703.

Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al, (2010) Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363(9):8.

Fletcher O, Easton D, Anderson K, Gilham C, Jay M, Peto J, (2004) Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *Journal of the National Cancer Institute* 96(5):357-363.

Flockhart RJ, Webster DE, Qu K, et al, (2012) BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANCR to regulate melanoma cell migration. *Genome Res* 22(6):1006–10014.

Flockhart RJ, Webster DE, Qu K, Mascarenhas N, Kovalski J, Kretz M, Khavari PA, (2012) BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANCR to regulate melanoma cell migration. *Genome Res* 22:1006-14.

Florenes VA, Skrede M, Jorgensen K, Nesland JM, (2004) Deacetylase inhibition in malignant melanomas: impact on cell cycle regulation and survival. *Melanoma Res* 14:173-81.

Foulds L, (2014) Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol* 9: 239–71.

Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., et al, (1995) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol3-kinase. *Cell* 81: 727–736.

Furuta J, Nobeyama Y, Umebayashi Y, Otsuka F, Kikuchi K, Ushijima T, (2006) Silencing of peroxiredoxin 2 and aberrant methylation of 33 CpG islands in putative promoter regions in human malignant melanomas. *Cancer Res* 66:6080-6.

G.P. Souroullas, W.R. Jeck, J.S. Parker, J.M. Simon, J.-Y. Liu, J. Paulk, J. Xiong, K.S. Clark, Y. Fedoriw, J. Qi, C.E. Burd, J.E. Bradner, N.E. Sharpless, (2016) An oncogenic Ezh2 mutation induces tumors through global redistribution of histone 3 lysine 27 trimethylation. *Nat Med* 22: 632–640.

Gallagher WM, Bergin OE, Rafferty M, et al, (2005) Multiple markers for melanoma progression regulated by DNA methylation: insights from transcriptomic studies. *Carcinogenesis* 26:1856-1867.

Gambichler T, Sand M, Skrygan M, (2013) Loss of 5- hydroxymethylcytosine and ten-eleven translocation 2 protein expression in malignant melanoma. *Melanoma Res* 23:218-20.

Gammon B, Beilfuss B, Guitart J, et al, (2012) Enhanced detection of spitzoid melanomas using fluorescence in situ hybridization with 9p21 as an adjunctive probe. *Am J Surg Pathol* 36(1):81–88.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al, (2005) Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *European journal of cancer* 41(14):2040-2059.

Garcia-Borron JC, Abdel-Malek Z, Jimenez-Cervantes C, (2014) MC1R, the cAMP pathway, and the response to solar UV: extending the horizon beyond pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 27: 699–720.

Garnett, M.J., and Marais, R, (2004). Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 6: 313–319.

Gast A, Scherer D, Chen B, et al, (2010) Somatic alterations in the melanoma genome: a high-resolution array-based comparative genomic hybridization study. *Genes Chromosomes Cancer* 49(8):733–745.

GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence, Collaborators (2016). "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015". *Lancet*. 388 (10053): 1545–1602.

GBD 2015 Mortality and Causes of Death, Collaborators. (2016). "Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015". *Lancet*. 388 (10053): 1459–1544.

Gembaraska A, Luciani F, Fedele C, et al, (2012) MDM4 is a key therapeutic target in aneuous melanoma. *Nat Med* 18: 1239–1247.

Gerami P, Jewell SS, Morrison LE, et al, (2009) Fluorescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Am J Surg Pathol.* 33(8):1146–1156.

Gerami P, Li G, Pouryazdanparast P, et al, (2012) A highly specific and discriminatory FISH assay for distinguishing between benign and malignant melanocytic neoplasms. *Am J Surg Pathol* 36(6):808–817.

Gerami P, Mafee M, Lurtsbarapa T, et al, (2010) Sensitivity of fluorescence in situ hybridization for melanoma diagnosis using RREB1, MYB, Cep6, and 11q13 probes in melanoma subtypes. *Arch Dermatol* 146(3):273–278.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H, (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31: 13–20.

Ghiorzo P, Pastorino L, Queirolo P, et al, (2013) Prevalence of the E318K MITF germline mutation in Italian melanoma patients: associations with histological subtypes and family cancer history. *Pigment cell & melanoma research* 26(2):259-262.

Gimotty PA, Van BP, Elder DE, et al, (2005) Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 23: 8048–56.

Goel, V.K., Lazar, A.J., Warneke, C. L., Redston, M.S., and Haluska, F. G., (2006) Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 126, 154–160.

Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell.* 128(4):635–8.

Goldenhersh MA, Koslowsky M, (2011) Increased melanoma after regular sunscreen use? *J Clin Oncol* 29: e557–558; author reply e859.

Goldstein AM, Chan M, Harland M, et al, (2007) Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet* 44(2):99–106.

Goldstein AM, Fraser MC, Struewing JP, et al, (1995) Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations. *The New England journal of medicine* 333(15):970-974.

Goldstein AM, Struewing JP, Chidambaram A, Fraser MC, Tucker MA, (2000) Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *Journal of the National Cancer Institute* 92(12):1006-1010.

Gordon D, Hansson J, Eloranta S, et al, (2017) Primary tumor sites in relation to ultraviolet radiation exposure and skin visibility correlate with survival in cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 141: 1345–1354.

Gray-Schopfer ,V., Wellbrock, C., and Marais, R. (2007) Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445: 851–857.

Gray-Schopfer, V.C., Cheong, S.C., Chong, H., Chow, J., Moss, T., Abdel- Malek, Z.A., et al, (2006) Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer* 95: 496–505.

Green A, Williams G, Neale R, et al, (1999) Daily sunscreen application and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamous-cell carcinomas of the skin: a randomised controlled trial. *Lancet* 354: 723–729.

Green AC, Wallingford SC, McBride P, (2011) Childhood exposure to ultraviolet radiation and harmful skin effects: epidemiological evidence. *Prog Biophys Mol Biol* 107: 349–355.

Green AC1, Williams GM, Logan V, et al, (2011) Reduced melanoma after regular sunscreen use: randomized trial follow-up. *J Clin Oncol* 29: 257–263.

Greenberg ES, Chong KK, Huynh KT, Tanaka R, Hoon DS, (2014) Epigenetic biomarkers in skin cancer. *Cancer Lett* 342:170-177.

Greene MH, Clark Jr WH, Tucker MA, et al, (1980) Precursor naevi in cutaneous malignant melanoma: a proposed nomenclature. *Lancet* 2: 1024.

Greinert R, Volkmer B, Henning S, et al, (2012) UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic Acids Res* 40: 10263–10273.

Griewank KG, Murali R, Puig-Butille JA, et al, (2014) TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma. *J Nat Cancer Inst* 106: pii: dju246.

Griewank KG, Murali R, Schilling B, et al, (2013) TERT promoter mutations in ocular melanoma distinguish between conjunctival and uveal tumours. *Br J Cancer* 109(2):497–501.

Grob JJ, Bonerandi JJ, (1998) The 'ugly duckling' sign: identification of the common characteristics of nevi in an individual as a basis for melanoma screening. *Arch Dermatol* 134(1):103-104.

Guan J, Gupta R, Filipp FV, (2015) Cancer systems biology of TCGA SKCM: efficient detection of genomic drivers in melanoma. *Sci Rep* 5: 7857.

Guerry DIV, Synnestvedt M, Elder DE, Schultz D, (1993) Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. *J Invest Dermatol* 100: 342S–5S.

Guerry DIV, Synnestvedt M, Elder DE, Schultz D, (2014) Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable Lin MJ, Mar V,

McLean C, Kelly JW. An objective measure of growth rate using partial biopsy specimens of melanomas that were initially misdiagnosed. *J Am Acad Dermatol* 71: 691–7.

Guibert S, Weber M, (2013) Functions of DNA methylation and hydroxymethylation in mammalian development. *Current topics in developmental biology* 104:47–83.

Guldberg P, Straten P, Birck A, et al, (1997) Disruption of the MMAC1/ PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res* 57(17):3660–3663.

Guo J, Si L, Kong Y, et al, (2011) Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol* 29(21):2904–2909.

Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai M-C, Hung T, Argani P, Rinn JL, et al, (2010) Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 464:1071-6.

Gutschner T, Hammerle M, Diederichs S, (2013) MALAT1 – a paradigm for long noncoding RNA function in cancer. *J Mol Med (Berl)* 91:791-801.

Guy GP, Machlin SR, Ekwueme DU, Yabroff KR, (2015) Prevalence and costs of skin cancer treatment in the U.S., 2002-2006 and 2007-2011. *Am J Prev Med* 48:183-187.

Hacker, E., Irwin, N., Muller, H.K., Powell, M.B., Kay, G., Hayward, N., et al, (2005) Neonatal ultraviolet radiation exposure is critical for malignant melanoma induction in pigmented T pras transgenic mice. *J Invest Dermatol* 125: 1074–1077.

Hall A, Marshall CJ, Spurr NK, et al, (1983) Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature* 303(5916):396–400.

Halpern AC, Guerry D, Elder DE, Trock B, Synnestvedt M, (1993) A cohort study of melanoma in patients with dysplastic nevi. *J Invest Dermatol* 100: 346S–9S

Halpern AC, Guerry D, Elder DE, Trock B, Synnestvedt M, Humphreys T, (1993) Natural history of dysplastic nevi. *J Am Acad Dermatol* 29: 51–7.

Handoko HY, Rodero MP, Boyle GM, et al, (2013) UVB-induced melanocyte proliferation in neonatal mice driven by CCR2-independent recruitment of Ly6c(low)MHCII(hi) macrophages. *J Invest Dermatol* 133: 1803–1812.

Handolias D, Salemi R, Murray W, et al, (2010) Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. *Pigment Cell Melanoma Res* 23(2):210–215.

Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, et al (2010) Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* 330(6009):1410–1413.

Harismendy O, Notani D, Song X, Rahim NG, Tanasa B, Heintzman N, Ren B, Fu X-D, Topol EJ, Rosenfeld MG, et al, (2011) 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon- γ signaling response. *Nature* 470:264-8.

Harland M, Petljak M, Robles-Espinoza CD, et al, (2016) Germline TERT promoter mutations are rare in familial melanoma. *Familial cancer* 15(1):139- 144.

Haslam, R.J., Koide, H.B., and Hemmings, B.A, (1993) Pleckstrin domain homology. *Nature* 363: 309–310.

Hassel JC, Sucker A, Edler L, Kurzen H, Moll I, Stresemann C, Spieth K, Mauch C, Rass K, Dummer R, et al, (2010) MGMT gene promoter methylation correlates with tolerance of temozolomide treatment in melanoma but not with clinical outcome. *Br J Cancer* 103:820-6.

Hauptman N, Glava_c D, (2013) Long non-coding RNA in cancer. *Int J Mol Sci* 14:4655-69.

Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, et al, (2012) Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 380(9839):358–365.

Hay, N.,and Sonenberg, N, (2004) Upstream and downstream of mTOR. *GenesDev* 18: 1926–1945..

Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N, et al, (2017) Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* 545: 175–180.

Helgadottir H, Hoiom V, Jonsson G, et al, (2014) High risk of tobacco-related cancers in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *Journal of medical genetics* 51(8):545-552.

Hennessey RC, Holderbaum AM, Bonilla A, et al, (2017) Ultraviolet radiation accelerates NRas-mutant melanomagenesis: A cooperative effect blocked by sunscreen. *Pigment Cell Melanoma Res* 30: 477–487.

Henning SM, Wang P, Carpenter CL, Heber D, (2013) Epigenetic effects of green tea polyphenols in cancer. *Epigenomics* 5:729-741.

Herrmann, C., Horn, G. ,Spaargaren, M., and Witting hofer, A, (1996) Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral- guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 271: 6794–6800.

Hirota K, Miyoshi T, Kugou K, Hoffman CS, Shibata T, Ohta K, (2008) Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature* 456:130-4.

Hocker T, Tsao H, (2007) Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat* 28: 578–588.

Hodi FS, Corless CL, Giobbie-Hurder A, et al, (2013) Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J Clin Oncol* 31(26):3182–3190.

Hodi FS, Corless CL, Giobbie-Hurder A, et al, (2013) Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J Clin Oncol* 31(26):3182–3190.

Hodi FS, Friedlander P, Corless CL, et al, (2008) Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J Clin Oncol* 26(12):2046–2051.

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, et al, (2012) A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150(2):251–263

Holliday R, (1987) The inheritance of epigenetic defects. *Science* 238(4824):163–70.

Holliday R, (2006) Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 1(2):76–80.

Holliday R, Pugh JE, (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187(4173):226–32.

Holzel M, Huang S, Koster J, et al, (2010) NF1 is a tumor suppressor in neuroblastoma that determines retinoic acid response and disease outcome. *Cell* 142(2):218–229.

Hombach S, Kretz M, (2013) The non-coding skin: Exploring the roles of long non-coding RNAs in epidermal homeostasis and disease. *BioEssays* 35:1093- 100.

Hoon DS, Spugnardi M, Kuo C, Huang SK, Morton DL, Taback B, (2004) Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. *Oncogene* 23:4014-22.

Horn S, Figl A, Rachakonda PS, et al, (2013) TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 339(6122):959–961.

Hou P, Liu D, Dong J, Xing M, (2012) The BRAFV600E causes widespread alterations in gene methylation in the genome of melanoma cells. *Cell Cycle* 11:286-95;

Hou P, Liu D, Dong J, Xing M, (2012) The BRAFV600E causes widespread alterations in gene methylation in the genome of melanoma cells. *Cell Cycle* 11:286-95.

Houben, R., Becker, J.C., Kappel, A., Terheyden, P., Brocker, E.B., Goetz, R., et al (2004) Constitutive activation of the Ras–Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *J Carcinog* 3, 6.

Huang FW, Hodis E, Xu MJ, et al, (2013) Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science* 339(6122):957–959.

Huang J, Zhou N, Watabe K, Lu Z, Wu F, Xu M, Mo YY (2014) Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1). *Cell Death Dis* 5:e1008.

Hubbard KB, Hepler JR, (2006) Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal* 18(2):135–150.

Huebner K, ar-Rushdi A, Griffin CA, et al, (1986) Actively transcribed genes in the raf oncogene group, located on the X chromosome in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(11):3934–3938.

Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, et al, (1994) Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature genetics* 8(1):15-21.

Ikawa S, Fukui M, Ueyama Y, et al, (1988) B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Mol Cell Biol* ;8(6):2651–2654.

Ikenoue, T., Hikiba, Y., Kanai, F., Aragaki, J., Tanaka, Y., Imamura, J., et al, (2004) Different effects of point mutations within the B- Raf glycine-rich loop in colorectal tumors on mitogen- activated protein/ extracellular signal-regulated kinase kinase/ extracellular signal- regulated kinase and nuclear factor kappa B pathway and cellular transformation. *Cancer Res* 64: 3428– 3435.

Infante JR, Fecher LA, Falchook GS, et al, (2012) Safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy data for the oral MEK inhibitor trametinib: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* 13(8):773–781.

J. Goodall, S. Carreira, L. Denat, D. Kobi, I. Davidson, P. Nuciforo, R.A. Sturm, L. Larue, C.R. Goding, (2008) Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells, *Cancer Res* 68 7788–7794.

J. Tiffen, S.J. Gallagher, P. Hersey, (2015) EZH2: an emerging role in melanoma biology and strategies for targeted therapy, *Pigment Cell Melanoma Res* 28: 21–30.

Jacobs JJ, Scheijen B, Voncken JW, Kieboom K, Berns A, van Lohuizen M, (1999) Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev* 13(20):2678–90.

Jafari, M., Papp, T., Kirchner, S., Diener, U., Henschler, D., Burg, G., et al, (1995) Analysis of ras mutations in human melanocytic lesions: activation of the ras gene seems to be associated with the nodular type of human malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 121: 23–30.

Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS, et al, (2012) NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer* 118(16):4014–4023.

Jansen HW, Ruckert B, Lurz R, et al, (1983) Two unrelated cell-derived sequences in the genome of avian leukemia and carcinoma inducing retrovirus MH2. *EMBO J* 2(11):1969–1175.

Jason E. Hawkes, Amanda Truong and Laurence J. Meyer, (2016) Genetic Predisposition to Melanoma. *Seminars in Oncology* 43(5):591-597.

Jensen DE, Proctor M, Marquis ST, et al (1998) BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1- mediated cell growth suppression. *Oncogene* 16(9):1097–1112.

Jiang, B.H., and Liu, L.Z. (2008) PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim. Biophys Acta* 1784, 150–158.

Jin L, Hu WL, Jiang CC, Wang JX, Han CC, Chu P, et al, (2011) MicroRNA-149*, a p53-responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(38):15840–5.

Johannessen CM, Reczek EE, James MF, et al, (2005) The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(24):8573–8578.

Johnson, G.L., and Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911–1912

Jonathan J. Lee, B.A.1, George F. Murphy, M.D.1, and Christine G. Lian, (2014) *Melanoma Epigenetics: Novel Mechanisms, Markers, and Medicines* 94(8): 822–838. doi:10.1038

Joseph RW, Sullivan RJ, Harrell R, et al, (2012) Correlation of NRAS mutations with clinical response to high-dose IL-2 in patients with advanced melanoma. *J Immunother* 35(1):66–72.

Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, et al, (1994) Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 8(1):23–6.

Kanetsky PA, Panossian S, Elder DE, et al, (2010) Does MC1R genotype convey information about melanoma risk beyond risk phenotypes?. *Cancer* 116(10):2416-2428.

Karim RZ, Li W, Sanki A, et al, (2009) Reduced p16 and increased Cyclin D1 and pRb expression are correlated with progression in cutaneous melanocytic tumors. *Int J Surg Pathol* 17: 361–7.

Karram S, Novy M, Saroufim M, Loya A, Taraif S, Houreih MA, et al, (2013) Predictors of BRAF mutation in melanocytic nevi: analysis across regions with different UV radiation exposure. *The American Journal of dermatopathology* 35(4):412–8.

Kennedy C, ter Huurne J, Berkhout M, et al, (2001) Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *The Journal of investigative dermatology* 117(2):294-300.

Kerl K, Palmedo G, Wiesner T, et al, (2012) A proposal for improving multicolor FISH sensitivity in the diagnosis of malignant melanoma using new combined criteria. *Am J Dermatopathol* 34(6):580–585.

Khaitan D, Dinger ME, Mazar J, Crawford J, Smith MA, Mattick JS, Perera RJ, (2011) The melanoma-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion. *Cancer Res* 71:3852- 62.

Kim JK, Patel D, Choi BS, (1995) Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochem Photobiol* 62: 44–50.

Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G, Johnson G, Frank J, Burghardt R, Kim S, Safe S, (2013) HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. *Oncogene* 32:1616-25.

Kim KB, Kefford R, Pavlick AC, et al, (2013) Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. *J Clin Oncol* 31(4):482–489.

Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S. M., Latek, R.R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., et al, (2003) GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient- sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 11, 895–904.

Klaus G. Griewank, Richard A. Scolyer, John F. Thompson, Keith T. Flaherty, Dirk Schadendorf, Rajmohan Murali (2014) Genetic Alterations and Personalized Medicine in Melanoma: Progress and Future Prospects *JNCI J Natl Cancer Inst* 106(2): djt435.

Kleuss C, Raw AS, Lee E, et al, (1994) Mechanism of GTP hydrolysis by G-protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21):9828–9831.

Kluger HM, Dudek AZ, McCann C, et al, (2011) A phase 2 trial of dasatinib in advanced melanoma. *Cancer* 117(10):2202–2208.

Kodaki, T., Woscholski, R., Hallberg, B., Rodriguez-Viciano, P., Downward, J., and Parker, P.J. (1994) The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr Biol* 4: 798–806.

Koga Y, Pelizzola M, Cheng E, Krauthammer M, Sznol M, Ariyan S, Narayan D, Molinaro AM, Halaban R, Weissman SM, (2009) Genome-wide screen of promoter methylation identifies novel markers in melanoma. *Genome Res* 19:1462-70.

Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, et al, (1995) Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature* 375(6531):506–510.

Kollipara R, Cooley LD, Horii KA, et al, (2014) Spitzoid melanoma in a child with Li-Fraumeni syndrome. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 17(1):64-69.

Kong Y, Si L, Zhu Y, et al, (2011) Large-scale analysis of KIT aberrations in Chinese patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 17(7):1684–1691.

Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, Xiong Y, (2011) Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15INK4B tumor suppressor gene. *Oncogene* 30:1956-62.

- Kouzarides T, (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*. 128(4):693–705.
- Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD, Lambert WC, (1994) The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Archives of dermatology* 130(8):1018- 1021.
- Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, et al, (2012) Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 44(9):1006–1014.
- Ku GY, Yuan J, Page DB, et al, (2010) Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting: lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. *Cancer* 116(7):1767–1775.
- Kuang H, Tang Z, Zhang C, et al, (2017) Taxifolin activates the Nrf2 anti-oxidative stress pathway in mouse skin epidermal JB6 P+ cells through epigenetic modifications. *Int J Mol Sci* 18:1546.
- Kulis M, Esteller M, (2010) DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 70:27-56.
- Kumar, R., Angelini, S., Czene, K., Sauroja, I., Hahka-Kemppinen, M., Pyyhonen, S., et al, (2003) BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clin CancerRes* 9: 3362– 3368.
- Kusters-Vandeveld HV, Klaasen A, Kusters B, et al, (2010) Activating mutations of the GNAQ gene: a frequent event in primary melanocytic neoplasms of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 119(3):317–323.
- Kylee J. Veazey; Daria Muller; and Michael C. Golding (2014) Prenatal Alcohol Exposure and Cellular Differentiation: A Role for Polycomb and Trithorax Group Proteins in FAS Phenotypes?. *Alcohol Research*: 35: 1.
- Landi MT, Kanetsky PA, Tsang S, et al, (2005) MC1R, ASIP, and DNA repair in sporadic and familial melanoma in a Mediterranean population. *Journal of the National Cancer Institute* 97(13):998-1007.
- Lavker RM, Gerberick GF, Veres D, et al, (1995) Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. *J Am Acad Dermatol* 32: 53–62.
- Lawlor, M.A., and Alessi, D.R, (2001) PKB/ Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. CellSci* 114: 2903–2910.
- Lee JH, An HT, Chung JH, et al, (2002) Acute effects of UVB radiation on the proliferation and differentiation of keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 18: 253–261.
- Li R, Zhang L, Jia L, Duan Y, Li Y, Bao L, Sha N, (2014) Long non-coding RNA BANCR promotes proliferation in malignant melanoma by regulating MAPK pathway activation. *PLoS ONE* 9:e100893.

Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., et al, (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275: 1943–1947.

Li, L., and Ross, A.H, (2007) Why is PTEN an important tumor suppressor?. *J Cell Biochem* 102: 1368–1374.

Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, Xu W, Tan L, Hu Y, Zhan Q, et al, (2012) Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell* 150:1135-46.

Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., et al, (2002) PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 8: 1153–1160.

Liaw D, Marsh DJ, Li J, et al, (1997) Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nature genetics* 16(1):64-67.

Lin SW, Kaye V, Goldfarb N, Rawal A, Warshaw E (2012). "Melanoma tumor seeding after punch biopsy". *Dermatol Surg*. 38 (7 pt 1): 1083–85.

Lister R, Ecker JR, (2009) Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res* 19(6):959–66.

Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, et al, (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462:315-22.

Liu S, Tetzlaff MT, Cui R, Xu X, (2012) miR-200c inhibits melanoma progression and drug resistance through down-regulation of BMI-1. *Am J Pathol* 181(5):1823–35.

Long GV, Grob JJ, Nathan P, Ribas A, Robert C, Schadendorf D, Lane SR, et al, (2016) Factors predictive of response, disease progression, and overall survival after dabrafenib and trametinib combination treatment: a pooled analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet Oncol* 17:1743–54.

Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H et al, (2014) Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *New Engl J Med* 371: 1877–1888.

Lovly, C. M., Dahlman, K. B., Fohn, L. E., Su, Z., Dias-Santagata, D., Hicks, D. J., et al, (2012) Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PLoS ONE* 7:e35309.

Lowy, D.R., and Willumsen, B. M, (1993) Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 62: 851–891.

Lugade AA, Sorensen EW, Gerber SA, et al, (2008) Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity. *Immunol* 180: 3132–3139.

Luk PP, Vilain R, Crainic O, McCarthy SW, Thompson JF, Scolyer RA (2015) "Punch biopsy of melanoma causing tumour cell implantation: another peril of utilising partial biopsies for melanocytic tumours". *Australas J Dermatol* 56 (3): 227–31.

Lukas J, Parry D, Aagaard L, et al, (1995) Retinoblastoma-protein-independent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 375(6531):503–506.

Lutzky J, Bauer J, Bastian BC, (2008) Dose- dependent, complete response to imatinib of a metastatic mucosal melanoma with a K642E KIT mutation. *Pigment Cell Melanoma Res* 21(4):492–493.

Lynch HT, Frichot BCI, Lynch JF, (1978) Familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *J Med Genet* 15: 352–6.

M Brait, D Sidransky (2011) Cancer epigenetics: above and beyond, *Toxicol. Mech. Methods* 21 275–288.

M Rodríguez-Paredes, M Esteller (2011) Cancer epigenetics reaches mainstream oncology, *Nat Med* 17 330–339.

M Vizoso, HJ Ferreira, P Lopez-Serra, FJ Carmona, A Martínez-Cardús, MR Girotti, A Villanueva, S Guil, C Moutinho, J Liz A Portela, H Heyn, S Moran, A Vidal, M Martinez-Iniesta, JL Manzano, MT Fernandez-Figueras, E Elez, E Muñoz-Couselo, R Botella-Estrada, A Berrocal, F Pontén, J van den Oord, WM Gallagher, DT Frederick, KT Flaherty, U. McDermott, P Lorigan, R Marais, M Esteller (2015) Epigenetic activation of a cryptic TBC1D16 transcript enhances melanoma progression by targeting EGFR. *Nat Med* 21 741–750.

Ma L, Chen, Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Pandolfi PP (2005) Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121:179–193.

Madhunapantula SV, Sharma A and Robertson GP (2007) PRAS40 deregulates apoptosis in malignant melanoma. *Cancer Res* 67, 3626– 3636.

Maertens O, Johnson B, Hollstein P, et al, (2013) Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov* 3(3):338–349.

Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, et al, (2003) Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Nat Cancer Inst* 95: 1878–1890.

Manning, BD and Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261– 1274.

Mao JH, To MD, Perez-Losada J, Wu D, DelRosario R and Balmain A (2004) Mutually exclusive mutations of the Pten and ras pathways in skin tumor progression. *GenesDev* 18:1800–1805.

Mar V, Roberts H, Wolfe R, English DR, Kelly JW (2012) Nodular melanoma: a distinct clinical entity and the largest contributor to melanoma deaths in Victoria, Australia. *J Am Acad Dermatol* 68: 568–75.

Marais R, Marshall CJ (1996) Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv* 27:101–125.

Marionnet C, Pierrard C, Golebiewski C, et al, (2014) Diversity of biological effects induced by longwave UVA rays (UVA1) in reconstructed skin. *PLoS One* 9: e105263.

Markert CL, Silvers WK (1956) "The effects of genotype and cell environment on melanoblast differentiation in the house mouse". *Genetics* 41(3):429–450.

Marks JL, Gong Y, Chitale D, Golas B, McLellan MD, Kasai Y, et al, (2008) Novel MEK1 mutation identified by mutation analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 68:5524– 5528.

Martin GA, Viskochil D, Bollag G, et al, (1990) The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 63(4):843–849.

Martin RC 2nd, Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, Noyes RD, Edwards MJ, McMasters KM (2005) "Is incisional biopsy of melanoma harmful?". *Am J Surg* 190 (6):913–17.

Martincorena I, Roshan A, Gerstung M, et al, (2015) Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* 348: 880–886.

Masaki T, Wang Y, DiGiovanna JJ, et al, (2014) High frequency of PTEN mutations in nevi and melanomas from xeroderma pigmentosum patients. *Pigment Cell Melanoma Res* 27:454–464.

Mascolo M, Vecchione M, Ilardi G, Scalvenzi M, Molea G, Di Benedetto M, Nugnes L, Siano M, De Rosa G, Staibano S (2010) Overexpression of chromatin assembly factor-1/p60 helps to predict the prognosis of melanoma patients. *BMC Cancer* 10:63.

Maverakis E, Cornelius LA, Bowen GM, Phan T, Patel FB, Fitzmaurice S, He Y, Burrall B, Duong C, Kloxin AM, Sultani H, Wilken R, Martinez SR, Patel F (2015) "Metastatic melanoma – a review of current and future treatment options". *Acta Derm Venereol.* 95 (5):516–524.

Mazar J, Zhao W, Khalil AM, Lee B, Shelley J, Govindarajan SS, Yamamoto F, Ratnam M, Aftab MN, Collins S, et al, (2014) The functional characterization of long noncoding RNA SPRY4-IT1 in human melanoma cells. *Oncotarget* 5:8959-69.

McNeal AS, Liu K, Nakhate V, et al, (2015) CDKN2B loss promotes progression from benign melanocytic nevus to melanoma. *Cancer Discov* 5:1072–85.

ME Fane Y, Chhabra DEJ Hollingsworth JL Simmons L, Spoerri TG, OhJ Chauhan, T Chin, L. Harris, T.J. Harvey, G.E.O. Muscat, C.R. Goding, R.A. Sturm, NK Haass, GM Boyle, M.

Piper, A.G. Smith (2017) NFIB mediates BRN2 driven melanoma cell migration and invasion through regulation of EZH2 and MITF, *EBioMedicine* 16 63–75.

Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al, (2005) BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436:720–4.

Michaloglou C, Vredeveld, LC, Soengas, M.S., Denoyelle, C, Kuilman, T, Van Der Horst, CM, et al, (2005) BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436:720–724.

Milagre C, Dhomen N, Geyer FC, Hayward R, Lambros M, Reis-Filho JS, et al, (2010) A mouse model of melanoma driven by oncogenic KRAS. *Cancer Res* 70:5549–5557.

Milagre C, Dhomen N, Geyer FC, Hayward R, Lambros M, Reis-Filho JS, et al, (2010) A mouse model of melanoma driven by oncogenic KRAS. *Cancer Res* 70:5549–5557.

Minor DR, Kashani-Sabet M, Garrido M, et al, (2012) Sunitinib therapy for melanoma patients with KIT mutations. *Clin Cancer Res* 18(5):1457–1463.

Mintz B (1971) "Clonal basis of mammalian differentiation". *Symposia of the Society for Experimental Biology* 25: 345–370.

Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, Hassan M, Tannapfel A, Ruzicka T, Hengge UR (2006) Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res* 66:6546-52.

Mirza AM, Kohn AD, Roth RA and McMahon M (2000) Oncogenic transformation of cells by a conditionally active for mofthe protein kinase Akt/PKB. *CellGrowth Differ* 11:279–292.

Mitra D, Luo X, Morgan A, et al, (2012) An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature* 491: 449–453.

Mizuno N, Itoh H (2009) Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *Neurosignals* 17(1):42–54.

Montgomery BD, Sadler GM (2009) "Punch biopsy of pigmented lesions is potentially hazardous". *Can Fam Physician* 55 (1):24. PMC 2628830.

Mukherjee B, Delancey JO, Raskin L, et al, (2012) Risk of non-melanoma cancers in first-degree relatives of CDKN2A mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute* 104(12):953-956.

Murugan AK, Dong J, Xie J and Xing M (2009) MEK1 mutations, but not ERK2 mutations, occur in melanomas and colon carcinomas, but none in thyroid carcinomas. *Cell Cycle* 8:2122–2124.

Muthusamy V, Duraisamy S, Bradbury CM, Hobbs C, Curley DP, Nelson B, Bosenberg M (2006) Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. *Cancer Res* 66:11187-93.

Muthusamy V, Hobbs C, Nogueira C, et al, (2006) Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes Chromosomes Cancer*45: 447–454.

Nagore E, Heidenreich B, Requena C, et al, (2016) TERT promoter mutations associate with fast-growing melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*29:236–238.

Nakatani K, Sakaue H, Thompson DA, Weigel RJ, and Roth R A (1999) Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylationsite. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 257:906–910.

Namkoong J, Shin SS, Lee HJ, Marin YE, Wall BA, Goydos JS, et al, (2007) Metabotropic glutamate receptor 1 and glutamate signaling in human melanoma. *Cancer Res.* 67:2298–2305.

Narayanan DL, Saladi RN (2010) Fox JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol* 49:978–986.

Neil H Cox, John SC (2010) eds 'British Association of Dermatologists' management guidelines. Wiley-Blackwell . ISBN 978-1-4443-3552-1.

Newton Bishop JA, Gruis NA (2007) Genetics: what advice for patients who present with a family history of melanoma?. *Semin Oncol* 34(6):452–459.

Nichols SE, Reams WM (1969) "The occurrence and morphogenesis of melanocytes in the connective tissues of the PET/MCV mouse strain". *Journal of Embryology and Experimental Morphology*8:24–32.

Nogueira C, Kim KH, Sung H, Paraiso KH, Dannenberg JH, Bosenberg M, et al, (2010) Cooperative interactions of PTEN deficiency and RAS activation in melanoma metastasis. *Oncogene* 29:6222–6232.

Omholt K, Platz A, Kanter L, et al, (2003) NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* 9(17):6483–6488.

Padua RA, Barrass NC, Currie GA (1985) Activation of N-ras in a human melanoma cell line. *Mol Cell Biol* 5(3):582–585.

Palles C, Cazier JB, Howarth KM, et al, (2013) Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nature genetics* 45(2):136-144.

Palmer JS, Duffy DL, Box NF, et al, (2000) Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype?. *American journal of human genetics* 66(1):176-186.

Parmiter AH, and Nowell PC (1988) The cytogenetics of human malignant melanoma and premalignant lesions. *Cancer Treat Res* 43:47–61.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al, (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321(5897):1807–1812.

Pasmant E, Laurendeau I, Heron D, Vidaud M, Vidaud D, Bièche I (2007) Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer Res* 67:3963-9.

Pasmant E, Laurendeau I, Heron D, et al, (2007) Characterization of a germline deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanomaneural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer Res* 67(8):3963–3969.

Pasquali E, Garcia-Borrón JC, Fargnoli MC, et al, (2015) MC1R variants increased the risk of sporadic cutaneous melanoma in darker-pigmented Caucasians: a pooled-analysis from the M-SKIP project. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 136(3):618-631.

Paszowska-Szczur K, Scott RJ, Serrano-Fernandez P, et al, (2013) Xeroderma pigmentosum genes and melanoma risk. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 133(5):1094-1100.

Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani K, Amatruda JF, Murphey RD, et al, (2005) BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol* 15:249–254.

Pawson T (2004) Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116:191–203.

Pena-Llopis S, Vega-Rubin-de-Celis S, Liao A, et al, (2012) BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet* 44(7):751–759.

Pencheva N, Tran H, Buss C, Huh D, Drobnjak M, Busam K, et al, (2012) Convergent multi-miRNA targeting of ApoE drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis. *Cell* 151(5):1068–82.

Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A (2005) Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res* 571: 19–31.

Planta MB (2011) Sunscreen and melanoma: is our prevention message correct? *J Am Board Fam Med* 24:735–739.

Pollock P, Harper U, Hansen K, Yudt L, Stark M, Robbins C, et al, (2003) High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33:19–20.

Pollock PM, Cohen-Solal K, Sood R, Namkoong J, Martino J J, Koganti A, et al, (2003) Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia. *Nat Genet* 34:108–112.

Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al, (2003) High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33:19–20.

Pollock PM, Walker GJ, Glendening JM, QueNoy T, Bloch NC, Fountain JW, et al, (2002) PTEN inactivation is rare in melanoma tumours but occurs frequently in melanoma cell lines. *Melanoma Res* 12 565–575.

Potrony M, Puig-Butille JA, Aguilera P, et al, (2014) Increased prevalence of lung, breast and pancreatic cancers in addition to melanoma risk in families bearing the cyclin dependent kinase inhibitor 2A mutation: implications for genetic counseling. *Journal of the American Academy of Dermatology* 71(5):888-895.

Premi S, Wallisch S, Mano CM, et al, (2015) Photochemistry. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science* 347: 842–847.

Puntervoll HE, Yang XR, Vetti HH, et al, (2013) Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. *Journal of medical genetics* 50(4):264-270.

PWS Hill, R. Amouroux, P. Hajkova (2014) DNA demethylation, Tet proteins and 5-hydroxymethylcytosine in epigenetic reprogramming: an emerging complex story, *Genomics* 104 324–333.

Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, et al, (1995) Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83(6):993–1000.

R. Akbani, K.C. Akdemir, B.A. Aksoy, M. Albert, et al, (2015) Genomic classification of cutaneous melanoma, *Cell* 161 1681–1696.

Raimondi S, Sera F, Gandini S, et al, (2008) MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer* 122: 2753–2760.

Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, et al, (1983) Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(14):4218–4222.

Requena C, Rubio L, Traves V, et al, (2012) Fluorescence in situ hybridization for the differential diagnosis between Spitz naevus and spitzoid melanoma. *Histopathology* 61(5):899–909.

Rhodes AR, Harrist TJ, Day CL, Mihm Jr MC, Fitzpatrick TB, Sober AJ (1983) Dysplastic melanocytic nevi in histologic association with 234 primary cutaneous melanomas. *J Am Acad Dermatol* 9:563–74.

Rhodes LE, Gledhill K, Masoodi M, et al, (2009) The sunburn response in human skin is characterized by sequential eicosanoid profiles that may mediate its early and late phases. *FASEB J* 23: 3947–3956.

Riaz N, Havel JJ, Makarov V, et al, (2017) Tumor and microenvironment evolution during immunotherapy with nivolumab. *Cell* 171: 934–949.e15.

Riggs AD (1975) X inactivation, differentiation and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14(1):9–25.

Ringrose L, Paro R (2004) Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet* 38:413–43.

Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, et al, (2007) Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 129:1311–23.

Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A, Barrett JC (1997) PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer research* 57(21):4736–4738.

Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al, (2011) Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 364(26):2517–2526.

Robles-Espinoza CD, Harland M, Ramsay AJ, et al, (2014) POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. *Nature genetics* 46(5):478–481.

Rochette PJ, Therrien JP, Drouin R, et al. (2003) UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic Acids Res* 31:2786–2794.

Rodriguez-Paredes M, Esteller M (2011) Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 330–9.

Rodriguez-Paredes M, Martinez de Paz A, Simo-Riudalbas L, Sayols S, Moutinho C, Moran S, et al, (2013) Gene amplification of the histone methyltransferase SETDB1 contributes to human lung tumorigenesis. *Oncogene* 33(21):2807–13.

Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, et al, (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370:527–532.

Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, et al, (2010) A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* 141(4):583–594.

Roskoski Rjr (2012) MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 417:5–10.

Ross MI, Gershenwald JE (2013) "Sentinel lymph node biopsy for melanoma: a critical update for dermatologists after two decades of experience". *Clinics in dermatology* 31 (3): 298–310.

Rous P, Beard JW (1935) The progression to carcinoma of virus-induced papillomas (Shope). *J Exp Med* 62:523–48e.

Rubinstein JC, Tran N, Ma S, et al, (2010) Genome-wide methylation and expression profiling identifies promoter characteristics affecting demethylation-induced gene up-regulation in melanoma. *BMC Med Genomics* 3:4.

Saladi SV, Wong PG, Trivedi AR, Marathe HG, Keenen B, Aras S, Liew Z-Q, Setaluri V, de la Serna IL (2013) BRG1 promotes survival of UV-irradiated melanoma cells by cooperating with MITF to activate the melanoma inhibitor of apoptosis gene. *Pigment Cell Melanoma Res* 26:377-91.

Salmena L, Carracedo A and Pandolfi PP (2008) Tenetsof PTEN tumorsuppression. *Cell* 133:403–414.

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Sil- liman N, Ptak J, Szabo S, et al, (2004) High frequency of mutations of the PIK3 CA gene in human cancers. *Science* 304:554.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM and Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/ PKB by therictor –mTOR complex. *Science* 307:1098–1101.

Sasaki H, Hikosaka Y, Kawano O, Moriyama S, Yano M and Fujii Y (2010) MEK1 and AKT2 mutations in Japanese lung cancer. *J Thorac Oncol* 5:597–600.

Sato K, Nakagawa H, Tajima A, Yoshida K, Inoue I (2010) ANRIL is implicated in the regulation of nucleus and potential transcriptional target of E2F1. *Oncol Rep* 24:701-7.

Satzger I, Mattern A, Kuettler U, Weinspach D, Niebuhr M, Kapp A, et al, (2012) microRNA-21 is upregulated in malignant melanoma and influences apoptosis of melanocytic cells. *Exp Dermatol* 21(7):509–14.

Scheffzek K, Ahmadian M R, Kab- sch W, Wiesmuller L, Lautwein A, Schmitz F, et al, (1997) The Ras– RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenicRasmutants. *Science* 277:333–338.

Scheuermann JC, de Ayala Alonso AG, Oktaba K, et al, (2010) Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* 465(7295):243–247.

Shain AH, Bastian BC (2016) From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*16: 345–358.

Shain AH, Bastian BC (2016) The Genetic Evolution of Melanoma. *New Engl J Maed*374: 995–996.

Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, et al, (2015) The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. *N Engl J Med* 373: 1926–36.

Shao, Y and Aplin AE (2010) Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells. *Cancer Res* 70:6670–6681.

Shi J, Yang XR, Ballew B, et al, (2014) Rare missense variants in POT1 predispose to familial cutaneous malignant melanoma. *Nature genetics* 46(5):482-486.

Shimizu K, Goldfarb M, Perucho M, et al, (1983) Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(2):383–387.

Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, et al, (2002) PKB/ Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27 (Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 8:1145–1152.

Shin SS, Wall B A, Goydos JS and Chen S (2010) AKT2 is a downstream target of metabotropic glutamate receptor 1 (Grm1). *Pigment Cell Melanoma Res* 23:103–111.

Shukla S, Meeran SM, Katiyar SK (2014) Epigenetic regulation by selected dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Cancer Lett* 355:9-17.

Shukla VK, Hughes DC, Hughes LE, McCormick F and Padua R A (1989) Ras mutations in human melanotic lesions: K-ras activation is a frequent and early event in melanoma development. *Oncogene Res* 5:121–127.

Si L, Xu X, Kong Y, et al, (2012) Major response to everolimus in melanoma with acquired imatinib resistance. *J Clin Oncol* 30(4):e37–e40.

Sigalotti L, Covre A, Fratta E, Parisi G, Colizzi F, Rizzo A, Danielli R, Nicolay H, Coral S, Maio M (2010) Epigenetics of human cutaneous melanoma: setting the stage for new therapeutic strategies. *J Transl Med* 8:56.

Skin Cancer Foundation (2015) *Skin Cancer Facts & Statistics*.

Smolle J, Smolle-Juettner FM, Stettner H, Kerl H (1992) Relationship of tumor cell motility and morphologic patterns. Part 1. Melanocytic skin tumors. *Am J Dermatopathol* 14: 231–7.

Snyder A, Makarov V, Merghoub T, et al, (2014) Genetic basis for clinical response to CTLA- 4 blockade in melanoma. *New Engl J Med* 371: 2189–2199.

Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, et al, (2012) Survival in BRAF V600- mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* 366(8):707–714.

Sparmann A, van Lohuizen M (2006) Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 6:846-56.

Staal S.P (1987) Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5034– 5037.

Stahl JM, Sharma A, Che- ung M, Zimmerman, Cheng JQ, Bosenberg MW, et al, (2004) Deregulated Akt 3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* 64:7002– 7010.

Stambolic V, Suzuki A, DeLaPompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, et al, (1998) Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95:29–39.

Stark MS, Woods SL, Gartside MG, et al, (2012) Frequent somatic mutations in MAP3K5 and MAP3K9 in metastatic melanoma identified by exome sequencing. *Nat Genet* 44(2):165–169.

Stewart AL, Mhashilkar AM, Yang, X H, Ekmekcioglu S, Saito Y, Sieger K, et al, (2002) PI3 kinase blockade by Ad-PTEN inhibits invasion and induces apoptosis in RGP and metastatic melanoma cells. *Mol Med* 8:451–461.

Stott FJ, Bates S, James MC, et al, (1998) The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 17: 5001–5014.

Straume O, Smeds J, Kumar R, Hemminki K, Akslen LA (2002) Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *Am J Pathol* 161:229-37.

Streicher KL, Zhu W, Lehmann KP, Georgantas RW, Morehouse CA, Brohawn P, et al, (2012) A novel oncogenic role for the miRNA-506–514 cluster in initiating melanocyte transformation and promoting melanoma growth. *Oncogene* 31(12):1558–70.

Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, et al, (1997) The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *The New England journal of medicine* 336(20):1401-1408.

Su Yin Lim, Jenny H Lee, Russell J Diefenbach, Richard F. Kefford and Helen Rizos (2018) Liquid biomarkers in melanoma: detection and discovery. *Molecular Cancer* 17:8.

Sun M, Liu XH, Lu KH, Nie FQ, Xia R, Kong R, Yang JS, Xu TP, Liu YW, Zou YF, et al, (2014) EZH2-mediated epigenetic suppression of long noncoding RNA SPRY4-IT1 promotes NSCLC cell proliferation and metastasis by affecting the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Death Dis* 5:e1298.

Suzuki A, DeLaPompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, Del BarcoBarrantes I, et al, (1998) High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol* 8:1169–1178.

Syn, Nicholas L Teng, Michele W L Mok, Tony S K Soo, Ross A (2017) "De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting". *The Lancet Oncology* 18 (12): e731–41.

T. De Raedt, E. Beert, E. Pasmant, A. Luscan, H. Brems, N. Ortonne, K. Helin, J.L. Hornick, V. Mautner, H. Kehrer-Sawatzki, W. Clapp, J. Bradner, M. Vidaud, M. Upadhyaya, E. Legius, K. Cichowski (2014) PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies, *Nature* 514 247–251.

Takai D, Jones PA (2003) The CpG island searcher: a new WWW resource. *In Silico Biol* 3:235-240.

Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, et al, (2011) Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146(6):1016–28.

Tanemura A, Terando AM, Sim M-S, van Hoesel AQ, de Maat MFG, Morton DL, Hoon DSB (2009) CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 15:1801-7.

Tang L, Zhang W, Su B, Yu B (2013) Long noncoding RNA HOTAIR is associated with motility, invasion, and metastatic potential of metastatic melanoma. *Biomed Res Int* 2013:7.

Tao ZH, Wan JL, Zeng LY, Xie L, Sun HC, Qin LX, et al, (2013) miR-612 suppresses the invasive-metastatic cascade in hepatocellular carcinoma. *The Journal of experimental medicine* 210(4):789–803.

Tapper W, Jones AV, Kralovics R, et al, (2015) Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. *Nature communications* 6:6691.

The American Cancer Society (2016). *Cancer Facts and Figures*

Theriault LL, Hurley LS (1970) "Ultrastructure of developing melanosomes in C57 black and pallid mice". *Developmental Biology* 23(2):261–275.

Tian Y, Zhang X, Hao Y, Fang Z, He Y (2014) Potential roles of abnormally expressed long noncoding RNA UCA1 and malat-1 in metastasis of melanoma. *Melanoma Res* 24:335-41.

Toker A and Newton AC (2000) Akt/ protein kinase B is regulated by auto phosphorylation at the hypothetical PDK-2site. *J Biol Chem* 275:8271–8274.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al, (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366(26):2443–2454.

Trahey M and McCormick F (1987) A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238:542–545.

Trahey M, Milley RJ, Cole GE, Innis M, Paterson H, Marshall C J, et al, (1987) Biochemical and biological properties of the human N-rasp 21 protein. *Mol Cell Biol* 7:541–544.

Tran MA, Gowda R, Sharma A, Park EJ, Adair J, ester M, et al, (2008) Targeting V600EBRaf and Akt3 using nanoliposomal- small interfering RNA inhibits cutaneous melanocytic lesion development. *Cancer Res* 68:7638–7649.

Tran S, Rizos H (2013) Human nevi lack distinguishing senescence traits. *Aging (Albany NY)* 5:98–9.

Tsao H, Chin L, Garraway LA et al, (2012) Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev* 26: 1131–1155.

Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, and Haluska FG (2004) Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 122:337–341.

Tsao H, Zhang X, Fowlkes K, and Haluska FG (2000) Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma celllines. *Cancer Res* 60:1800–1804.

Tucker MA, Fraser MC, Goldstein AM, Elder DE, Guerry D, Organic SM (1993) Risk of melanoma and other cancers in melanoma-prone families. *J Invest Dermatol* 100:350S–5S.

Tucker MA, Halpern A, Holly EA, et al, (1997) Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA* 277:1439–44.

Tüting T, de Visser KE (2016) CANCER. How neutrophils promote metastasis. *Science* 352: 145–146.

Ugurel S, Hildenbrand R, Zimpfer A, et al, (2005) Lack of clinical efficacy of imatinib in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 92(8):1398–1405.

Ulloa-Montoya F, Louahed J, Dizier B, et al, (2013) Predictive gene signature in MAGE-A3 antigen-specific cancer immunotherapy. *J Clin Oncol* 31(19):2388–2395.

Urso C, Giannotti V, Reali UM, Giannotti B, Bondi R (1991) Spatial association of melanocytic naevus and melanoma. *Melanoma Res* 1: 245–9.

Vachtenheim J, Ondrusova L, Borovansky J (2010) SWI/SNF chromatin remodeling complex is critical for the expression of microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 392(3):454–459.

Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ (1995) Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature genetics* 11(3):328-330.

Van Belle PA, Elenitsas R, Satyamoorthy K, et al, (1999) Progression-related expression of beta3 integrin in melanomas and nevi. *Hum Pathol* 30: 562–7.

Van den Hurk K, Niessen HE, Veeck J, et al, (2012) Genetics and epigenetics of cutaneous malignant melanoma: a concert out of tune. *Biochim Biophys Acta* 1826(1):89–102.

Van den Hurk K, Niessen HEC, Veeck J, van den Oord JJ, van Steensel MAM, zur Hausen A, van Engeland M, Winnepenninckx VJL (2012) Genetics and epigenetics of cutaneous malignant melanoma: a concert out of tune. *Biochim Biophys Acta* 1826:89- 102.

Van der Velden PA, Metzelaar-Blok JAW, Bergman W, Monique H, Hurks H, Frants RR, Gruis NA, Jager MJ (2001) Promoter hypermethylation: a common cause of reduced p16INK4a expression in uveal melanoma. *Cancer Res* 61:5303-6.

- Van Elsas A, Zerp SF, VanDer Flier, S, Kruse KM, Aarnoudse C, Hayward NK, et al, (1996) Relevance of ultraviolet- induced N-ras oncogene point mutations in development of primary human cutaneous melanoma. *Am J Pathol* 149:883–893.
- Van Heesch S, van Iterson M, Jacobi J, Boymans S, Essers P, de Bruijn E, Hao W, MacInnes A, Cuppen E, Simonis M (2014) Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono- and polyribosomal complexes. *Genome Biol* 15:R6.
- Van Kempen LC, van den Hurk K, Lazar V, Michiels S, Winnepenninckx V, Stas M, et al, (2012) Loss of microRNA-200a and c, and microRNA-203 expression at the invasive front of primary cutaneous melanoma is associated with increased thickness and disease progression. *Virchows Arch* 461(4):441–8.
- Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, et al, (2009) Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* 457(7229):599–602.
- Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, et al, (2010) Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med* 363(23):2191–2199.
- Van Veer LJ, Burgering BM, Versteeg R, et al, (1989) N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *Mol Cell Biol* 9(7):3114–3116.
- Ventii KH, Devi NS, Friedrich KL, et al, (2008) BRCA1-associated protein-1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization. *Cancer Res* 68(17):6953–6962.
- Vereecken P, Cornelis F, Van Baren N, Vandersleyen V, Baurain JFA (2012) Synopsis of serum biomarkers in cutaneous melanoma patients. *Dermatol Res Pract* 2012:260643.
- Vergier B, Prochazkova-Carlotti M, de la Fouchardiere A, et al, (2011) Fluorescence in situ hybridization, a diagnostic aid in ambiguous melanocytic tumors: European study of 113 cases. *Mod Pathol* 24(5):613–623.
- Vinagre J, Almeida A, Populo H, et al, (2013) Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nature communications* 4:2185.
- Vinod Saladi S, Marathe H, de la Serna IL (2010) SWItching on the transcriptional circuitry in melanoma. *Epigenetics* 5:469-75.
- Virós A, Fridlyand J, Bauer J, et al, (2008) Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med* 5: e120.
- Virós A, Sanchez-Laorden B, Pedersen M et al, (2014) Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature* 511: 478–482.
- Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, et al, (1990) Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 62(1):187–192.
- Vizoso M, Esteller M (2015) Targeting melanoma: unusual epigenetics reveals the dynamic rewiring of metastatic cells. *Epigenomics* 7:1079-1081.

Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, et al, (1990) Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 249(4965):181–186.

Wan G, Mathur R, Hu X, Liu Y, Zhang X, Peng G, Lu X (2013) Long non-coding RNA ANRIL (CDKN2BAS) is induced by the ATM-E2F1 signaling pathway. *Cell Signal* 25:1086-95.

Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al, (2004) Mechanism of activation of the RAF–ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116:855–867.

Wang GG, Allis CD, Chi P (2007) Chromatin remodeling and cancer, part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends Mol Med* 13:373-80.

Wangari-Talbot J, Wall BA, Goydos JS and Chen S (2012) Functional effects of GRM1 suppression in human melanoma cells. *Mol Cancer Res* 10:1440–1450.

Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81(3):323–330.

Wellbrock C, Karasarides M, Marais R (2004) The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(11):875–885.

Wellbrock, C, Karasarides, M and Marais R (2004) The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:875–885.

Wellbrock, C., Ogilvie, L., Hedley, D., Karasarides, M., Martin, J., Niculescu-Duvaz, D. et al, (2004) V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res* 64, 2338–2342.

Wheatley K, Ives N, Eggermont A, et al, (2007) "Interferon- α as an adjuvant therapy for melanoma: an individual patient meta-analysis of randomised trials". *J Clin Oncol* 25 (18 suppl): 8526.

Whimster IW. (1965) Recurrent pigment cell naevi and their significance in the problem of endogenous carcinogenesis. *Ann Ital Dermatol Clin Sper* 19: 168–91.

Whiteman D, Green A. (1999) The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *New Engl J Med* 341: 766–767.

Whiteman DC, Parsons PG, Green AC (1998) p53 expression and risk factors for cutaneous melanoma: a case-control study. *Int J Cancer* 77: 843–848.

Whiteman DC, Stickley M, Watt P, et al, (2006) Anatomic site, sun exposure, and risk of cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 24: 3172–3177.

Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, et al, (2003) Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Nat Cancer Inst* 95: 806–812.

Whittaker SR, Theurillat JP, Van Allen E, et al, (2013) A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov* 3(3):350–362.

Whitwam, T., Vanbrocklin, M.W., Russo, M.E., Haak, P.T., Bilgili, D., Resau, J.H., et al, (2007) Differential oncogenic potential of activated RAS isoforms in melanocytes. *Oncogene* 26:4563–4570.

Widschwendter M, Jones PA (2002) DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene* 21:5462-5482.

Wiesner T, Murali R, Fried I, et al, (2012) A distinct subset of atypical Spitz tumors is characterized by BRAF mutation and loss of BAP1 expression. *Am J Surg Pathol* 36(6):818–830.

Wiesner T, Murali R, Fried I, et al, (2012) A distinct subset of atypical Spitz tumors is characterized by BRAF mutation and loss of BAP1 expression. *Am J Surg Pathol* 36(6):818–830.

Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, et al, (2013) Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 369(2):122–133.

Wood LD, Parsons DW, Jones S, et al, (2007) The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318(5853):1108–1113.

Woodman SE, Trent JC, Stemke-Hale K, et al, (2009) Activity of dasatinib against L576P KIT mutant melanoma: molecular, cellular, and clinical correlates. *Mol Cancer Ther* 8(8):2079–2085.

Wouters J, Vizoso M, Martinez-Cardus A, et al, (2017) Comprehensive DNA methylation study identifies novel progression-related and prognostic markers for cutaneous melanoma. *BMC Med* 15:101.

Wu C-F, Tan G-H, Ma C-C, Li L (2013) The non-coding RNA L1me23 drives the malignant property of human melanoma cells. *J Genet Genomics* 40:179-88.

Wu H., Goel, V., and Haluska F.G. (2003) PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 22,3113–3122.

Wu ZL, Zheng SS, Li ZM, Qiao YY, Aau MY, Yu Q (2010) Polycomb protein EZH2 regulates E2F1-dependent apoptosis through epigenetically modulating Bim expression. *Cell Death Differ* 17:801-10.

Wurm EM, Soyer HP (2010) "Scanning for melanoma". *Australian Prescriber* (33):150–55. Archived from the original on 2010-10-19.

Wyman K, Atkins MB, Prieto V, et al, (2006) Multicenter phase II trial of highdose imatinib mesylate in metastatic melanoma: significant toxicity with no clinical efficacy. *Cancer* 106(9):2005–2011.

Xiang F, Lucas R, Hales S, et al, (2014) Incidence of nonmelanoma skin cancer in relation to ambient UV radiation in white populations, 1978-2012: empirical relationships. *JAMA Dermatol* 150:1063–1071.

Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, et al, (2011) Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 19(1):17–30. Epub 2011/01/22. [PubMed: 21251613].

Xu X-C. (2007) Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor-b in cancer. *Cancer Lett* 253:14-24.

Xu Y, Brenn T, Brown ER, et al, (2012) Differential expression of microRNAs during melanoma progression: miR-200c, miR-205 and miR-211 are downregulated in melanoma and act as tumour suppressors. *Br J Cancer* 106(3):553–561.

Yamashita Y, Hashimoto I, Abe Y, Seike T, Okawa K, Senzaki Y, Murao K, Kubo Y, Nakanishi H (2014) "Effect of biopsy technique on the survival rate of malignant melanoma patients". *Arch Plast Surg* 41 (2):122–25. doi:10.5999 /aps. 41 .2.122. PMC 3961608 [3](#).

Yang Z, Zhou L, Wu L-M, Lai M-C, Xie H-Y, Zhang F, Zheng S-S (2011) Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation. *Ann Surg Oncol* 1243-50.

Yap KL, Li S, Muñoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, Gil J, Walsh MJ, Zhou M-M. (2010) Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell* 38:662-74.

Yazdan P, Cooper C, Sholl LM, et al, (2014) Comparative analysis of atypical spitz tumors with heterozygous versus homozygous 9p21 deletions for clinical outcomes, histomorphology, BRAF mutation, and p16 expression. *Am J Surg Pathol* 38:638–45.

Yi M, Yang J, Chen X, Li J, Li X, Wang L, Tan Y, Xiong W, Zhou M, McCarthy JB, et al, (2011) RASSF1A suppresses melanoma development by modulating apoptosis and cell-cycle progression. *J Cell Physiol* 226:2360-9.

Yin Q-F, Yang L, Zhang Y, Xiang J-F, Wu Y-W, Carmichael Gordon G, Chen L-L (2012) Long oncoding RNAs with snoRNA ends. *Mol Cell* 2012 48:219-30.

Yin, Y. and Shen, W.H. (2008) PTEN: a new guardian of the genome. *Onco-gene* 27:5443–5453.

Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, et al, (2011) A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* 480(7375):99-103.

You YH, Lee DH, Yoon JH, et al, (2001) Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J Biol Chem* 276:44688–44694.

Yuan, T.L., and Cantley, L.C. (2008) PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27:5497–5510.

Zaidi MR, Davis S, Noonan FP, et al. (2011) Interferon-gamma links ultraviolet radiation to melanomagenesis in mice. *Nature* 469:548–553.

Zhang H, Cai K, Wang J, Wang X, Cheng K, Shi F, Jiang L, Zhang Y, Dou J. MiR-7 (2014) inhibited indirectly by lincRNA HOTAIR, directly inhibits SETDB1 and reverses the EMT of breast cancer stem cells by downregulating the STAT3 pathway. *STEM CELLS* 32:2858-68.

Zhao W, Soejima H, Higashimoto K, Nakagawachi T, Urano T, Kudo S, Matsukura S, Matsuo S, Joh K, Mukai T (2005) The essential role of histone H3 Lys9 di-methylation and MeCP2 binding in MGMT silencing with poor DNA methylation of the promoter CpG island. *J Biochem* 137:431-40.

Zinda, M.J., Johnson, M.A., Paul, J. D., Horn, C., Konicek, B.W., Lu, Z. H., et al, (2001) AKT-1,-2, and-3 are expressed in both normal and tumor tissues of the lung, breast, prostate, and colon. *Clin. CancerRes* 7, 2475–2479.