



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ ΩΣ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΟΔΥΣΣΕΑΣ ΖΩΡΑΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***ΚΥΚΛΙΝΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΙΝΟ-
ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ
ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ ΣΤΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ***

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: EELCO DE BREE

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΑΡΙΝΑ ΙΩΑΝΝΟΥ

ΑΜ 1140001

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2021



UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF MEDICINE



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES
IN ONCOLOGY

DIRECTOR OF STUDIES
ODYSSEAS ZORAS
PROFESSOR OF SURGICAL ONCOLOGY



MASTER THESIS

***CYCLINS AND CYCLIN DEPENDENT KINASE
INHIBITORS AS BIOMARKERS OF PROGNOSIS
IN MELANOMA***

SUPERVISOR: EELCO DE BREE
PROFESSOR OF SURGICAL ONCOLOGY

MARINA IOANNOU
AM 1140001
HERAKLION 2021

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης που απονέμει το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Εγκρίθηκε από τη κάτωθι τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΒΑΘΜΙΔΑ

EELCO DE BREE

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΑΡΙΑ ΤΖΑΡΔΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΟΔΥΣΣΕΑΣ ΖΩΡΑΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract	7
1.Μελάνωμα.....	8
1.1 Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου	8
1.2 Διάγνωση.....	8
1.3 Ιστολογική εξέταση	9
1.4 Σταδιοποίηση	10
1.4.1 Πρωτοπαθής όγκος (T)	10
1.4.2 Λεμφαδενικές μεταστάσεις (N).....	11
1.4.3. Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M).....	12
1.4.4 Στάδια της νόσου.....	13
1.5 Θεραπεία	16
1.5.1 Θεραπεία του πρωτοπαθούς μελανώματος.....	16
1.5.2 Αντιμετώπιση των επιχώριων λεμφαδένων	17
1.5.2.1 Η βιοψία του λεμφαδένα φρουρού.....	17
1.5.2.2 Ο λεμφαδενικός καθαρισμός.....	19
1.5.3 Συστηματική θεραπεία.....	19
1.5.3.1 Ανοσοθεραπεία	20
1.5.3.2 Στοχευμένη θεραπεία	20
1.6 Πρόγνωση.....	21
2.Βιολογία μελανώματος	22
2.1 Κυτταρικός κύκλος	22
2.1.1 Γενικά στοιχεία.....	22
2.1.2 pRb και p53: Ρυθμιστικοί παράγοντες του κυτταρικού κύκλου	24
2.1.3 Κυκλίνες, κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs) και σημεία ελέγχου	26
2.1.4 Αναστολείς κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών	28
2.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια και συχνότητα μεταλλάξεων στο μελάνωμα.	30
2.3 Μελάνωμα: Συνέπεια ομοιοστατικής διαταραχής	35
2.3.1 Απορρύθμιση της έκφρασης των μελανοκυττάρων	36
2.3.2 Απορρύθμιση του πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των μελανοκυττάρων	37
2.3.3 Απορρύθμιση της επιβίωσης των μελανοκυττάρων.....	38
2.3.4 Απορρύθμιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ κυττάρων και της αλληλεπίδρασης κυττάρων με την εξωκυτταρική μήτρα	38

3. Κυκλίνες και αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών ως βιοδείκτες πρόγνωσης στο μελάνωμα	39
3.1 Βιοδείκτες: Γενικά στοιχεία	39
3.2 Βιοδείκτες στο μελάνωμα	40
3.3 Σκοπός της μελέτης	41
3.4 Μεθοδολογία	41
3.5 Αποτελέσματα	42
3.6 Κυκλίνες και πρόγνωση στο μελάνωμα	42
3.6.1 Κυκλίνη D	42
3.6.1.1 Κυκλίνη D1	42
3.6.1.2 Κυκλίνη D3	44
3.6.2 Κυκλίνη A	44
3.6.3 Κυκλίνη Β	45
3.6.4 Κυκλίνη Ε	46
3.7 Αναστολείς κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών και πρόγνωση στο μελάνωμα	47
3.7.1 p16 ^{INK4a}	47
3.7.2 p21 ^{WAF/CIP1}	48
3.7.3 p27 ^{Kip1}	49
3.7.4 p14 ^{ARF}	50
3.7.5 p15 ^{INK4b}	51
4. Συζήτηση και συμπεράσματα	52
5. Βιβλιογραφία	55

Περίληψη

Το μελάνωμα του δέρματος είναι ένας κακοήθης όγκος και αποτελεί την πιο επιθετική και θανατηφόρο μορφή κακοήθους νεοπλασματος του δέρματος. Τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του μελανώματος ποικίλουν ανάλογα με τη φυλή, τη γεωγραφική περιοχή, την ηλικία, τον ιστολογικό τύπο και την εντόπιση της νόσου. Η επιβίωση των ασθενών με μελάνωμα ποικίλει πάρα πολύ ακόμα στην ίδια κατηγορία της TNM σύστημα σταδιοποίησης της νόσου. Ακόμα και μετά από κατάλληλη χειρουργική εκτομή του πρωτοπαθούς μελανώματος, παρατηρείται μεταστατική νόσος σε ένα σημαντικό ποσοστό. Ως εκ τούτου, υπάρχει κατά την αρχική διάγνωση μεγάλη ανάγκη αναγνώρισης των ασθενών με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής ώστε να δοθεί σε αυτούς επικουρική θεραπεία. Για το λόγο αυτό παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον οι προγνωστικοί βιοδείκτες, οι οποίοι δύνανται να παρέχουν εκτίμηση της επιθετικότητας, της πιθανότητας μετάστασης και της συνολικής έκβασης της νόσου. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί πολύ σημαντικοί κλινικοπαθολογοανατομικοί προγνωστικοί παράγοντες όπως η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, το βάθος διήθησης κατά Breslow και την παρουσία εξέλκωσης. Επειδή όμως το μελάνωμα παρουσιάζει απρόβλεπτη βιολογική συμπεριφορά και οι καθιερωμένοι προγνωστικοί παράγοντες δεν εκφράζουν πλήρως τις παρατηρούμενες διαφορές στη σχετιζόμενη με τη νόσο επιβίωση, έχει εξέχουσα σημασία η συνεχής αναζήτηση νέων προγνωστικών βιοδεικτών που θα εκτιμούν με περισσότερη ακρίβεια την συνολική έκβαση της νόσου.

Γνωρίζουμε πως οι κυκλίνες και οι κυκλινο-εξαρτώμενοι αναστολείς των κινασών, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου των μελανοκυττάρων. Στην παρούσα εργασία, στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου διατριβής επιδιώκουμε να μελετήσουμε την προγνωστική αξία της σχέσης έκφρασης κυκλινών και κυκλινο-εξαρτώμενων αναστολών των κινασών και να ερευνήσουμε εάν οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να αποτελέσουν προγνωστικούς βιοδείκτες στο μελάνωμα του δέρματος. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας στη βάση δεδομένων PubMed.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι κυκλίνες D3 και A θα μπορούσαν να αποτελέσουν δείκτες πρόγνωσης για τη συνολική επιβίωση και την επιβίωση ελεύθερης νόσου στο επιφανειακά εξαπλούμενο μελάνωμα. Ο αναστολέας p16 έχει σημαντικό ρόλο ως προγνωστικός δείκτης στο μελάνωμα. Συσχετίζεται με συνολική επιβίωση και επιβίωση ελεύθερης νόσου ανεξάρτητα από τους γνωστούς προγνωστικούς δείκτες βάθος διήθησης κατά Breslow και εξέλκωση. Είναι εξίσου σημαντική η συσχέτιση του αναστολέα p16 με τις λεμφαδενικές μεταστάσεις και μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο προγνωστικό παράγοντα εκτίμησης της κατάστασης των λεμφαδένων στο μελάνωμα. Επίσης, φαίνεται ότι ο αναστολέας p27 συσχετίζεται με την επιβίωση στο μεταστατικό μελάνωμα και θα μπορούσε να αποτελεί έναν δυνητικά προγνωστικό παράγοντα με φτωχή πρόγνωση σε ασθενείς σταδίου III και IV. Τέλος, η έκφραση του αναστολέα p14 φαίνεται από την βιβλιογραφία ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μελάνωμα γιατί ενώ δεν συνδέεται με την επιβίωση και την υποτροπή, συσχετίζεται με λεμφαδενικές μεταστάσεις και με το βάθος διήθησης κατά Breslow.

Abstract

Melanoma of the skin is a malignant tumor and is the most aggressive and lethal form of malignant skin tumor. The epidemiological features of melanoma vary depending on the race, geographical area, age, histological type and location of the disease. The survival of patients with melanoma varies greatly within the same category of the TNM staging system. Even after appropriate surgical resection of the primary melanoma, metastatic disease is observed in a significant percentage. Therefore, there is a great need to identify patients at increased risk of recurrence at initial diagnosis, in order to provide adjuvant treatment to those patients. Of particular interest are prognostic biomarkers, which can provide an assessment of aggression, the likelihood of metastasis, and the overall outcome of the disease. To date, very important clinical and pathological prognostic factors have been found, such as presence of nodal metastases, Breslow infiltration depth and the presence of ulceration. Nevertheless, melanoma exhibits unpredictable biological behavior and established prognostic factors do not fully reflect the observed differences in disease-related survival. Therefore, it is important to constantly identify new prognostic biomarkers that will more accurately assess the overall outcome of the disease.

We know that cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors play an important role in regulating the cell cycle of melanocytes. In the present study, in the context of my master's thesis, we aim to study the prognostic value of the expression relationship between cyclin and cyclin-dependent inhibition of kinases and to investigate whether these proteins can be predictive biomarkers in skin melanoma. For this purpose, an extensive review of the literature in the PubMed database was performed.

According to the results, cyclin D3 and cyclin A could be prognostic markers for overall survival and disease-free survival in superficial growth melanoma. The p16 inhibitor plays an important role as a prognostic marker in melanoma. It is associated with overall survival and disease-free survival regardless of the known prognostic indicators of Breslow infiltration depth and ulceration. Equally important is the association of the p16 inhibitor with lymph node metastases and can be a useful prognostic factor in assessing the condition of lymph nodes in melanoma. The p27 inhibitor also appears to be associated with survival in metastatic melanoma and could be a potentially prognostic factor with a poor prognosis in stage III and IV patients. Finally, the expression of the p14 inhibitor appears in the literature to play an important role in melanoma because although it is not associated with survival and recurrence, it is associated with lymph node metastases and Breslow infiltration depth.

1.Μελάνωμα

Το μελάνωμα είναι ένας κακοήθης όγκος που προέρχεται από μελανοκύτταρα του χοριοεπιδερμικού ορίου. Εντοπίζεται κυρίως στο δέρμα, αλλά μπορεί να εμφανιστεί και στον οφθαλμό (στον επιπεφυκότα και στην ίριδα) και, σε βλεννογόνους. Συνήθως οι βλάβες του μελανώματος παρουσιάζουν έντονη μελάγχρωση, αλλά υπάρχουν και αμελανωτικοί όγκοι. Ακόμα και οι μικροί όγκοι έχουν την τάση να μεθίστανται με αποτέλεσμα να έχουν σχετικά κακή πρόγνωση. Το 90% των θανάτων από καρκίνο του δέρματος οφείλεται στο μελάνωμα (1,2).

1.1 Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου

Η συχνότητα εμφάνισης του μελανώματος, έχει αυξηθεί σταθερά τα τελευταία χρόνια στους λευκούς πληθυσμούς και κυρίως στις περιοχές όπου άτομα με ανοιχτόχρωμο δέρμα εκτίθενται παρατεταμένα στην ηλιακή ακτινοβολία (3). Η Αυστραλία παρουσιάζει την υψηλότερη επίπτωση με 50-60 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους ετησίως. Στην Ευρώπη, η νόσος είναι συχνότερη στις σκανδιναβικές χώρες και την Ελβετία, ενώ στην Ελλάδα, όπως και στις υπόλοιπες μεσογειακές χώρες τα ποσοστά είναι μικρότερα σε σχέση με άλλα ευρωπαϊκά κράτη, της τάξης των 4-5 νέων περιπτώσεων ανά 100.000 κατοίκους. Το μελάνωμα προσβάλλει κυρίως τη λευκή φυλή και είναι σπάνιο στη μαύρη και την κίτρινη. Η μέση ηλικία διάγνωσης υπολογίζεται στα 55 έτη, ενώ τα δύο φύλα προσβάλλονται εξίσου. Στους άνδρες ο όγκος εντοπίζεται συχνότερα στη ράχη, ενώ στις γυναίκες στα κάτω άκρα.

Είναι γνωστοί οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση του μελανώματος όπως η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία σε συνδυασμό με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως φωτότυποι κατά Fitzpatrick I και II (ανοικτό χρώμα δέρματος, μπλε ή πράσινα μάτια και ξανθά ή κόκκινα μαλλιά), ηλιακά εγκαύματα σε παιδική ηλικία, μεγάλος αριθμός μελανοκυτταρικών σπίλων, ύπαρξη δυσπλαστικών σπίλων και μεγάλοι σε μέγεθος συγγενείς σπίλοι. Σημαντικό ρόλο έχει το ιστορικό μελανώματος καθώς και το τεκμηριωμένο οικογενειακό ιστορικό μελανώματος, η ύπαρξη κληρονομικής μετάλλαξης στα γονίδια CDK4 και CDKN2A όπως και η ύπαρξη μίας σπάνιας, αυτοσωμικής υπολειπόμενης εκφυλιστικής νόσου χαρακτηριζόμενη από σοβαρή φωτοευαισθησία η οποία αναπτύσσεται κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής, το Xeroderma pigmentosum (4).

1.2 Διάγνωση

Οι περισσότεροι άνθρωποι έχουν κάποιες σκούρες κηλίδες πάνω στο δέρμα τους (ελιές, σπίλους, σημάδια εκ γενετής). Οι περισσότερες μελαγχρωματικές βλάβες είναι καλοήθειες και ακίνδυνες, αλλά μερικές μπορεί να είναι τελικά μελάνωμα. Το μελάνωμα αναπτύσσεται ως ένα μελανό σκούρο ή καφέ, επίπεδο ή οζώδες ογκίδιο εκ νέου ή σε μια προϋπάρχουσα μελαγχρωματική βλάβη. Ακόμη, μπορεί να εμφανίζεται ως ογκίδιο με το ίδιο ή πιο ανοιχτό χρώμα του δέρματος (αμελανωτικό μελάνωμα). Πρέπει να προσέχουμε οποιαδήποτε αλλαγή μιας προϋπάρχουσας μελαγχρωματικής δερματικής βλάβης καθώς και κάθε νεοεμφανιζόμενη μελαγχρωματική βλάβη. Η κλινική διάγνωση του παραμένει πολύ δύσκολη και σαφώς κάθε αλλαγή στο χρώμα, μέγεθος ή σχήμα δεν είναι ενδεικτική για μελάνωμα. Υπάρχουν μερικά χαρακτηριστικά που κάνουν τη βλάβη ύποπτη για μελάνωμα. Εκτός από τη σημαντική παρατήρηση της αλλαγής της βλάβης πρέπει να προσέχουμε σε κάθε μελαγχρωματική βλάβη του δέρματος τα κλινικά ABCD(E) κριτήρια του μελανώματος. Το A αντιστοιχεί στην

ασυμμετρία (Asymmetry) που παρουσιάζουν τα περισσότερα μελανώματα, ενώ το B στα ανώμαλα όρια (Borders) που έχουν τα μελανώματα και το C στη δυσχρωμία (Colour). Το D αντιστοιχεί στη διάμετρο (Diameter), που ξεπερνά στο μελάνωμα συχνά τα 6 χιλ. Μερικοί προσθέτουν το γράμμα E, που αντιστοιχεί στην ανύψωση (Elevation) που υπάρχει σε μια υποομάδα μελανωμάτων ή στην αλλαγή (Evaluation) χαρακτηριστικών μιας μελαγχρωματικής βλάβης. Κνησμός, αιμορραγία και εξέλκωση με εφελκίδα της βλάβης αποτελούν άλλα πιθανά συμπτώματα.

Παρά τις βοηθητικές καθοδηγητικές οδηγίες που καθιστά μια μελαγχρωματική βλάβη ως ύποπτη, πρακτικά παραμένει αδύνατο να καθοριστεί τέτοια βλάβη με βεβαιότητα ως μελάνωμα από την κλινική εξέταση μόνο, ακόμη και από τον πιο έμπειρο ειδικό. Αρκετές ύποπτες μελαγχρωματικές βλάβες τελικά αποδεικνύονται καλοήθειες. Η διάγνωση τεκμηριώνεται μόνο με τη χειρουργική αφαίρεση και την ιστολογική εξέταση της βλάβης με ύποπτα κλινικά χαρακτηριστικά.

Δε συστήνεται ως έλεγχος ρουτίνας κατά τη διάγνωση του μελανώματος ο γενετικός έλεγχος των πρωτοπαθών μελανωμάτων, εκτός κλινικής δοκιμής, παρά το γεγονός ότι εμφανίζονται σταδιακά νέες προγνωστικές μοριακές τεχνικές που βασίζονται σε έκφραση γονιδίων που διαφοροποιούν τα μελανώματα σε χαμηλού ή υψηλού κινδύνου για μεταστάσεις. Συστήνεται, όμως, ο έλεγχος για BRAF μετάλλαξη έχει ένδειξη σε ασθενείς με λεμφαδενικές ή απομακρυσμένες μεταστάσεις για τον καθορισμό του είδους της συστηματικής θεραπείας.

1.3 Ιστολογική εξέταση

Η ιστολογική εξέταση δεν περιορίζεται μόνο στη διάγνωση του μελανώματος, αλλά περιλαμβάνει επιπλέον τουλάχιστον τον τύπο μελανώματος, το βάθος διήθησης κατά Breslow σε χιλιοστά (με πλέον μόνο δέκατα και όχι εκατοστά του χιλιοστού στη τελευταία AJCC σταδιοποίηση), το επίπεδο διήθησης κατά Clark, αριθμός μιτώσεων ανά mm², η παρουσία εξέλκωσης, μικροδορυφόρων εστιών, λεμφαγγειακής διήθησης, υποστροφής, και/ή λεμφοκυτταρική διήθηση (TILs, tumor infiltrating lymphocytes) και εάν τα χειρουργικά όρια είναι ελεύθερα διήθησης.

Τέσσερις κύριοι τύποι μελανώματος αναγνωρίζονται κλινικά και ιστολογικά:

Το επιφανειακώς επεκτεινόμενο μελάνωμα παρουσιάζει μία αρχική ενδοεπιδερμική, οριζόντια ή ακτινωτής ανάπτυξης, φάση. Κλινικά παρουσιάζεται ως κηλίδα, που εξελίσσεται αργά σε πλάκα, και είναι συνήθως πολυχρωματική με ωχρές περιοχές υποστροφής. Σε δεύτερο χρόνο μπορεί να αναπτυχθούν ογκίδια. Το χαρακτηριστικό ιστολογικό εύρημα είναι η παζετοειδής διασπορά κακοηθών μελανοκυττάρων σε όλη την επιδερμίδα. Το επιφανειακώς επεκτεινόμενο μελάνωμα, έχει τη μεγαλύτερη συχνότητα μετάλλαξης BRAF σε σύγκριση με άλλους υπότυπους (5).

Το οζώδες μελάνωμα, που σε αντίθεση από το προηγούμενο εμφανίζεται από την αρχή της ανάπτυξής του ως ένας οζώδης, εξωφυτικός, σκουρόχρωμος (από καφέ έως μαύρος), συχνά διαβρωμένος ή και αιμορραγών όγκος. Σε ιστολογικό επίπεδο παρουσιάζει μία σύντομη οριζόντια φάση ανάπτυξης και στη συνέχεια μία επιθετική κάθετη φάση. Συνεπώς, η πρόωμη ανίχνευση, όταν δηλαδή βρίσκεται σε ενδοεπιδερμική φάση ανάπτυξης, είναι πρακτικώς αδύνατη. Η μετάλλαξη NRAS υπάρχει συχνότερα στα οζώδες μελανώματα και η συχνότητα της μετάλλαξης BRAF είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με το επιφανειακώς επεκτεινόμενο μελάνωμα (5).

Το μελάνωμα τύπου κακοήθους φακής, εμφανίζεται συνήθως μετά την πάροδο πολλών ετών σε έδαφος κακοήθους φακής και εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στο πρόσωπο ηλικιωμένων ασθενών.

Το μελάνωμα των άκρων, είναι συνήθως παλαμοπελματιαίο ή υπο- ή περι- ονύχιο. Κατά την πρώιμη ενδοεπιδερμική φάση εμφανίζεται ως μία ακανόνιστη, ασαφώς αφοριζόμενη μελάγχρωση, ενώ αργότερα αναπτύσσονται οζίδια που σηματοδοτούν τη διηθητική φάση ανάπτυξης. Υπάρχει υψηλό ποσοστό μετάλλαξης του KIT στο μελάνωμα των άκρων, ενώ οι μεταλλάξεις BRAF ή NRAS σπάνια υπάρχουν (6).

Εκτός από τους κύριους τύπους μελανώματος υπάρχουν και κάποιες λιγότερο συχνές μορφές, όπως το μελάνωμα των βλεννογόνων, το δεσμοπλαστικό, το αμελανωτικό, και το πολυποειδές, που αποτελούν λιγότερο από το 5% των περιπτώσεων.

1.4 Σταδιοποίηση

Μετά τη ταυτοποίηση του μελανώματος ακολουθεί η σταδιοποίηση της νόσου για την εκτίμηση της έκτασης και συνεπώς της θεραπευτικής αντιμετώπισης και της πρόγνωσης της. Η τρέχουσα σταδιοποίηση TNM από την AJCC περιλαμβάνει τους σημαντικότερους προγνωστικούς δείκτες σχετικά με την πρωτοπαθή βλάβη, καθώς και τις περιοχικές και απομακρυσμένες μεταστάσεις (7). Η τελευταία ενημερωμένη 8^η έκδοση τέθηκε πρόσφατα σε εφαρμογή τον Ιανουάριο του 2018 και βασίζεται σε μια μεγάλη πλατφόρμα βάσης δεδομένων >50.000 ασθενών με μελάνωμα από διάφορα κέντρα παγκοσμίως (7). Το σύστημα σταδιοποίησης περιλαμβάνει αποτελέσματα από την ιστοπαθολογική εξέταση σχετικά με την τοπική νόσο (T, Tumor) κλινική και ιστολογική εκτίμηση των επιχώριων λεμφαδένων (N, Nodes) και την ύπαρξη η μη απομακρυσμένων μεταστάσεων (M, Metastases), αξιολογήσιμη με απεικονιστικές μεθόδους και τη βιοχημική μέτρηση γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH).

1.4.1 Πρωτοπαθής όγκος (T)

Η σταδιοποίηση περιλαμβάνει το βάθος διήθησης κατά Breslow και κατηγοριοποιείται σε τέσσερις ομάδες, το T1-T4, με ένα αυξανόμενο πάχος για κάθε υψηλότερο επίπεδο T (Πίνακας 1). Τα T1 μελανώματα θεωρούνται τα λεπτά μελανώματα, τα T2 και T3 τα διαμέσου πάχους και τα T4 τα παχιά μελανώματα.

Υπάρχει μια υποκατηγορία κάθε επιπέδου T, ανάλογα με την απουσία ή την παρουσία εξέλκωσης στην πρωτοπαθή βλάβη. Τα T1 μελανώματα έχουν γενικά μια ευνοϊκή πρόγνωση και θεωρούνται κακοήθειες χαμηλού κινδύνου. Ωστόσο, υπάρχει ένα όριο στο βάθος διήθησης κατά Breslow 0,8 mm, το οποίο διακρίνει τους ασθενείς σε ευνοϊκό επίπεδο T1, με εξαιρετικά καλή πρόγνωση με πάχος <0,8 mm και χωρίς παρουσία εξέλκωσης (T1a) από ασθενείς με βάθος διήθησης 0,8-1,0 ή <0,8 mm με παρουσία εξέλκωσης (T1b) (Πίνακας 1). Η παρουσία εξέλκωσης καθορίζει τις υποκατηγορίες του T2b, T3b και T4b.

Υπάρχει μια προφανής διαφορά στην πρόγνωση μεταξύ της εντοπισμένης νόσου T1aN0 και T4bN0 από 98% έως 75% στην 10-ετή επιβίωση (8). Η παρουσία εξέλκωσης στο πρωτοπαθές μελάνωμα είναι ένας ισχυρός ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας. Αν και σήμερα δεν υπάρχει τεκμηριωμένος ορισμός της εξέλκωσης, συχνά ορίζεται ως η απουσία ακέραιας επιδερμίδας πάνω από το κυριότερο τμήμα του πρωτοπαθούς μελανώματος στην ιστολογική εξέταση (μικροσκοπικά) και δε σχετίζεται υποχρεωτικά με παρουσία τυπικού κρατήρα έλκους. Μπορεί να υφίσταται τεχνητή ή πραγματική λύση της επιδερμίδας που επισημαίνεται. Η συχνότητα της εξέλκωσης αυξάνει όσο μεγαλύτερο είναι το πάχος του όγκου και σχετίζεται με αυξημένο μεταστατικό δυναμικό, καθώς και με διπλάσιο κίνδυνο

υποτροπής (9). Όχι μόνο η παρουσία αλλά και η έκταση του έλκους φαίνεται να έχουν σημασία, αν και αυτό δεν περιλαμβάνεται στην ταξινόμηση AJCC (10). Η επιβίωση ασθενών με εξελκωμένα μελανώματα είναι παραπλήσια με εκείνη ασθενών με όγκους μεγαλύτερης κατηγορίας T χωρίς εξέλκωση. Στα λεπτού πάχους μελανώματα (βάθος διήθησης κατά Breslow < 1mm) η εξέλκωση είναι πολύ σπάνια (10). Η εξέλκωση εμφανίζεται συχνότερα σε μελανώματα με μεγαλύτερο βάθος διήθησης κατά Breslow και σε οζώδες μελάνωμα (11). Το μοριακό υπόβαθρο της εξέλκωσης είναι ακόμα ασαφές. Πρόσφατες μελέτες γονιδιακής έκφρασης έχουν δείξει υπερέκφραση γονιδίων που σχετίζονται με φλεγμονή για παράδειγμα ιντερλευκίνη-6, και οδούς που σχετίζονται με επούλωση τραυμάτων, πολλαπλασιασμό και αγγειογένεση (12,13). Η φλεγμονή που σχετίζεται με τον όγκο και η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος υποστηρίζει τα κλινικά αποτελέσματα με όφελος από την επικουρική ανοσοθεραπεία με χρήση ιντερφερόνης-άλφα σε ασθενείς με εξελκωμένα μελανώματα (14). Ως εκ τούτου, η εξέλκωση μπορεί να είναι ένας προβλεπτικός παράγοντας για την ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία.

T κατηγορία	Βάθος διήθησης κατά Breslow	Εξέλκωση
Tx	Άγνωστο, γνωστή πρωτοπαθής βλάβη	
T0	Άγνωστο, άγνωστη πρωτοπαθής βλάβη	
Tis		
T1	≤ 1,0 mm	άγνωστο
T1a	< 0,8 mm	-
T1b	<0.8 mm 0,8-1,0 mm	+ + ή -
T2	>1,0-2,0 mm	άγνωστο
T2a	>1,0-2,0 mm	-
T2b	>1,0-2,0 mm	+
T3	>2,0-4,0 mm	άγνωστο
T3a	>2,0-4,0 mm	-
T3b	>2,0-4,0 mm	+
T4	>4,0 mm	άγνωστο
T4a	>4,0 mm	-
T4b	>4,0 mm	+

Πίνακας 1: Κατάταξη T με βάση το βάθος διήθησης της πρωτοπαθούς βλάβης και την παρουσία εξέλκωσης. Tis: μελάνωμα in situ ή ενδοδερμικό μελάνωμα.

1.4.2 Λεμφαδενικές μεταστάσεις (N)

Η κατηγορία N του μελανώματος αντιπροσωπεύει την περιοχική νόσο και περιλαμβάνει την παρουσία ή μη λεμφαδενικών, δορυφόρων και/ή καθ'οδόν (in-transit) μεταστάσεων. Δορυφόρες μεταστάσεις είναι μεταστάσεις στα κοντινά λεμφαγγεία σε απόσταση μέχρι 2 εκ. από την πρωτοπαθή βλάβη, ενώ καθ'οδόν μεταστάσεις είναι μεταστάσεις στα λεμφαγγεία μεταξύ πρωτοπαθούς βλάβης και επιχώριων λεμφαδένων, σε απόσταση περισσότερη από 2 εκ. από την πρωτοπαθή βλάβη. Η σταδιοποίηση των επιχώριων λεμφαδενικών μεταστάσεων γίνεται για κλινικά ύποπτους λεμφαδένες αρχικά συνήθως με παρακέντηση και κυτταρολογική εξέταση (FNA) κατά την ψηλάφηση τους ή με την καθοδήγηση του

υπερηχογραφήματος. Για κλινικά μη διηθημένους λεμφαδένες πραγματοποιείται συνήθως η βιοψία του λεμφαδένα φρουρού για την ανάδειξη τυχόν κρυφών μικροσκοπικών λεμφαδενικών μεταστάσεων. Ο λεμφαδένας φρουρός είναι ο πρώτος λεμφαδένας που δέχεται την λεμφική αποχέτευση από την περιοχική του πρωτοπαθούς μελανώματος και ως εκ τούτου είναι ο λεμφαδένας που θα παρουσιάζει πρώτος μεταστατικά κύτταρα στην περίπτωση διήθησης των επιχώριων λεμφαδένων. Επί κυτταρολογικής εξέτασης θετικής για λεμφαδενική διήθηση ή διήθηση του λεμφαδένα φρουρού και ταυτόχρονα απουσίας απομακρυσμένων μεταστάσεων, ακολουθεί συνήθως επιχώριος λεμφαδενικός καθαρισμός, ο οποίος προσφέρει περαιτέρω σταδιοποίηση των λεμφαδένων.

Ο λεμφαδένας φρουρός χρησιμοποιείται στη σταδιοποίηση για κλινικά εντοπισμένα μελανώματα (δηλαδή κλινικά και απεικονιστικά χωρίς λεμφαδενικές και συστηματικές μεταστάσεις) με βάθος διήθησης κατά Breslow >1,0 mm και λαμβάνεται επίσης υπόψη σε T1b μελανώματα. Τα αναφερόμενα ποσοστά διήθησης του λεμφαδένα φρουρού σε κλινικά εντοπισμένα T2, T3 και T4 μελανώματα είναι 12-20%, 28-33% και 28-44%, αντίστοιχα (15). Σε κλινικά εντοπισμένα μελάνωμα, η διήθηση ή μη του λεμφαδένα φρουρού αποτελεί τον πιο ισχυρό προγνωστικό δείκτη (16). Επιπλέον, η παρουσία καθ'οδόν (in-transit) ή δορυφόρων μεταστάσεων χωρίς ή σε συνδυασμό με λεμφαδενικές μεταστάσεις είναι προγνωστικά δυσμενής (N1c-3c).

N κατηγορία	Λεμφαδενικές μεταστάσεις	Καθ' οδόν και/ή (μικρο)δορυφόρες μεταστάσεις
Nx	Δεν εξετάστηκαν ιστολογικά οι περιοχικοί λεμφαδένες (Δεν χρειάζεται στο T1 μελάνωμα. Τότε κλινική αξιολόγηση,cN)	
N0	0	-
N1		
N1a	1 κλινικά κρυφή	-
N1b	1 κλινικά ανιχνεύσιμη	-
N1c	0	+
N2		
N2a	2-3 κλινικά κρυφές	-
N2b	2-3, τουλάχιστον 1 κλινικά ανιχνεύσιμη	-
N2c	1	+
N3		
N3a	≥4 κλινικά κρυφές	-
N3b	≥4, τουλάχιστον 1 κλινικά ανιχνεύσιμη	-
N3c	≥2	+

Πίνακας 2: Κατάταξη με βάση την περιοχική νόσο (8).

1.4.3. Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)

Η παρουσία απομακρυσμένης μεταστατικής νόσου (κατηγορία M) ταξινομείται σε τέσσερις υποκατηγορίες με βάση την ανατομική θέση και τη μέτρηση γαλακτικής αφυδρογόνωσης (LDH) στον ορό (Πίνακας 3). Οι απομακρυσμένες μεταστάσεις ανιχνεύονται συνήθως με απεικονιστικό έλεγχο, ο οποίος μπορεί να περιλαμβάνει ακτινογραφία θώρακος, υπερηχογράφημα κοιλίας, αξονικές τομογραφίες, μαγνητικές τομογραφίες και PET-scan,

ανάλογα με τον κλινικά αναμενόμενο κίνδυνο για μεταστατική νόσο. Μπορεί να χρειαστεί FNA ή βιοψία για τη τεκμηρίωση της απομακρυσμένης μετάστασης.

Οι μεταστάσεις στο δέρμα, στο υποδόριο και στους απομακρυσμένους λεμφαδένες σχετίζονται με καλύτερη επιβίωση από αυτές στον πνεύμονα και σε άλλα όργανα. Η αυξημένη LDH στον ορό είναι ένας σημαντικός παράγοντας που σχετίζεται με ανεπιθύμητη κλινική έκβαση και στην τρέχουσα 8^η έκδοση AJCC έχει αναθεωρηθεί ώστε να είναι μια επιπρόσθετη υποκατηγορία κάθε τεσσάρων επιπέδων M1 (Πίνακας 3) (8).

M κατηγορία	Εντόπιση απομακρυσμένης μετάστασης	Αυξημένη τιμή LDH
M0	Δεν υπάρχει	
M1	Ύπαρξη απομακρυσμένης μετάστασης	
M1a	Δέρμα, υποδόριο, μυς και/ή μη επιχώριοι λεμφαδένες	άγνωστη
M1a(0)		-
M1a(1)		+
M1b	Πνευμόνια	άγνωστη
M1b(0)		-
M1b(1)		+
M1c	Σπλαχνική εντόπιση (εκτός ΚΝΣ)	άγνωστη
M1c(0)		-
M1c(1)		+
M1d	Κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ)	άγνωστη
M1d(0)		-
M1d(1)		+

Πίνακας 3: Κατάταξη με βάση την εντόπιση των απομακρυσμένων μεταστάσεων και την τιμή της LDH (8).

1.4.4 Στάδια της νόσου

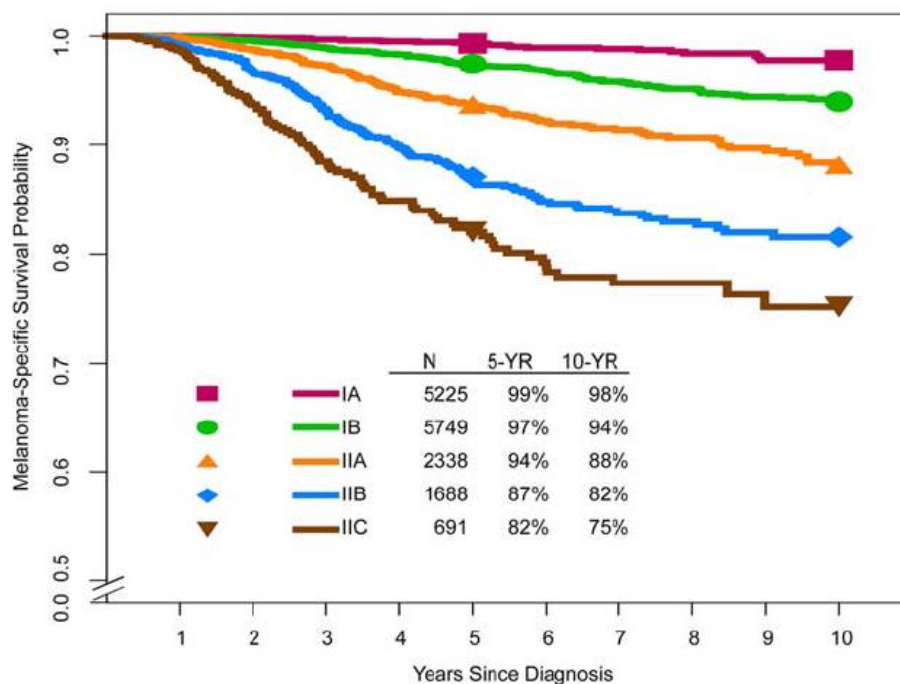
Η σταδιοποίηση του μελανώματος περιλαμβάνει τέσσερα στάδια (I-IV) και λαμβάνει υπόψη τις T, N και M κατηγοριοποιήσεις. Η παθολογοανατομική σταδιοποίηση περιλαμβάνει ιστολογικές εξετάσεις της διαγνωστικής βιοψίας και της συμπληρωματικής ευρύτερης εκτομής (T) και του λεμφαδένα φρουρού και/ή του λεμφαδενικού καθαρισμού (Πίνακας 4).

T	N	M	Στάδιο
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IA
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIIC
T0	N1b, N1c	M0	IIIB
T0	N2b, N2c, N3b ή N3c	M0	IIIC
T1a/b-T2a	N1a ή N2a	M0	IIIA
T1a/b-T2a	N1b/c ή N2b	M0	IIIB
T2b/T3a	N1a-N2b	M0	IIIB

T1a-T3a	N2c ή N3a/b/c	M0	IIIc
T3b/T4a	N≥1	M0	IIIc
T4b	N1a-N2c	M0	IIIc
T4b	N3a/b/c	M0	IIId
Κάθε T	Κάθε N	M1	IV

Πίνακας 4: Η παθολογοανατομική σταδιοποίηση του μελανώματος ανάλογα με τις T, N και M κατηγοριοποίηση.

Η πρόγνωση του σταδίου I είναι εξαιρετική με 92-98% 10-ετή επιβίωση, ενώ οι ασθενείς μελάνωμα σταδίου II έχουν μια προβλεπόμενη 10-ετής επιβίωση της τάξης 75-88% (Εικόνα 1) (8).



Εικόνα 1: Επιβίωση σε ασθενείς με εντοπισμένο μελάνωμα, δηλαδή χωρίς λεμφαδενικές (N0) και συστηματικές μεταστάσεις (M0)(8).

Στο στάδιο III περιλαμβάνονται τα μελάνωμα με λεμφαδενικές και/ή λεμφαγγειακές (καθ' οδόν και δορυφόρες) μεταστάσεις στην απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων. Στην πρόσφατη ενημερωμένη 8^η έκδοση AJCC, το στάδιο III, στο μελάνωμα επεκτάθηκε από τρεις σε τέσσερις υποομάδες, το στάδιο IIIA-D. Η υποκατηγοριοποίηση στο στάδιο III λαμβάνει υπόψη τις T και N κατηγορίες (Εικόνα 2).

Το πάχος του όγκου και η παρουσία εξέλκωσης του πρωτοπαθούς όγκου έχουν προγνωστική επίδραση στο στάδιο III του μελανώματος και στην τρέχουσα έκδοση του AJCC υπάρχει μια σημαντική αλλαγή στο στάδιο III με πρόσθετες πληροφορίες για το βάθος διήθησης του μελανώματος εκτός από την παρουσία εξέλκωσης, δηλαδή συνδυασμός κατηγορίας T και N (Εικόνα 2).

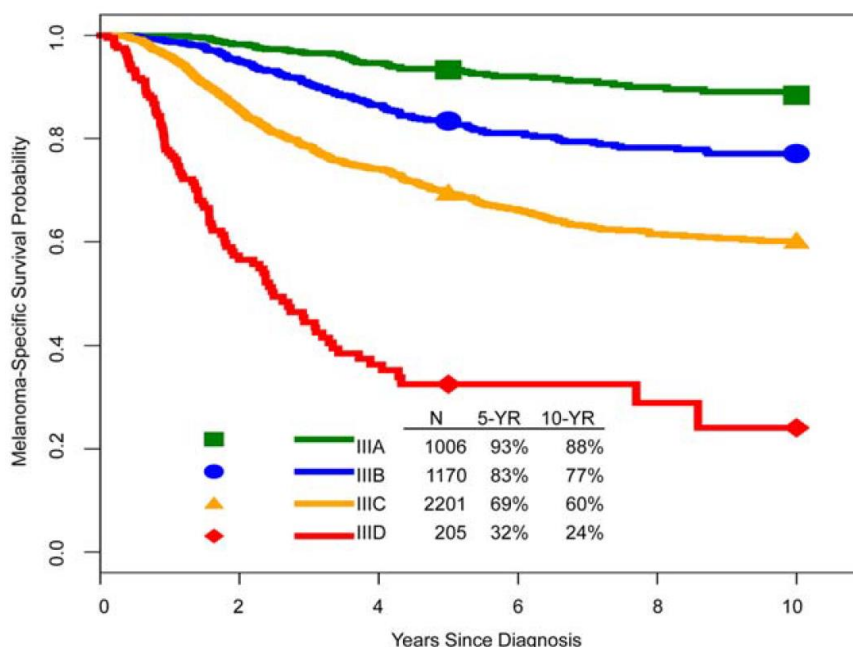
AJCC Eighth Edition Melanoma Stage III Subgroups									
N Category	T Category								
	T0	T1a	T1b	T2a	T2b	T3a	T3b	T4a	T4b
N1a	N/A	A	A	A	B	B	C	C	C
N1b	B	B	B	B	B	B	C	C	C
N1c	B	B	B	B	B	B	C	C	C
N2a	N/A	A	A	A	B	B	C	C	C
N2b	C	B	B	B	B	B	C	C	C
N2c	C	C	C	C	C	C	C	C	C
N3a	N/A	C	C	C	C	C	C	C	D
N3b	C	C	C	C	C	C	C	C	D
N3c	C	C	C	C	C	C	C	C	D

Instructions		Legend	
(1)	Select patient's N category at left of chart.	A	Stage IIIA
(2)	Select patient's T category at top of chart.	B	Stage IIIB
(3)	Note letter at the intersection of T&N on grid.	C	Stage IIIC
(4)	Determine patient's AJCC stage using legend.	D	Stage IIID

N/A=Not assigned, please see manual for details.⁴

Εικόνα 2: Συσχέτιση T και N σε ασθενείς σταδίου III (8).

Υπάρχει ένα σημαντικό μεταβλητό κλινικό αποτέλεσμα στο στάδιο III, από την αναφερόμενη 5-ετή επιβίωση 93% στο στάδιο IIIA έως 32% στο στάδιο IIID, όπως φαίνεται στην εικόνα 3 (8).



Εικόνα 3: Συσχέτιση των σταδίων IIIA-IIID με την 5-ετή επιβίωση σε ασθενείς με μελάνωμα (8).

Στο στάδιο IV υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις και η κλινική έκβαση είναι γενικά φτωχή με ποσοστό επιβίωσης στα 5 έτη περίπου 10-30% (17). Ωστόσο, σημειώθηκε

βελτίωση σε ένα συνεχώς αυξανόμενο σύνολο ασθενών με μακροχρόνια επιβίωση λόγω αποτελεσματικότερων θεραπειών που αναπτύχθηκαν τα τελευταία χρόνια.

Συμπερασματικά, μελανώματα που:

- περιορίζονται επιφανειακά στο δέρμα και δεν έχουν δώσει μεταστάσεις θεωρούνται σταδίου I.
- φτάνουν βαθύτερα στο δέρμα χωρίς μετάσταση σε λεμφαδένες ή απομακρυσμένη μετάσταση θεωρούνται σταδίου II.
- έχουν περιοχικές μεταστάσεις, δηλαδή έχουν στους λεμφαδένες και/ή στα λεμφαγγεία μεταξύ της πρωτοπαθούς εστίας τους και των επιχώριων λεμφαδένων (καθ'οδόν ή in transit μεταστάσεις) και/ή έχουν δορυφόρες μεταστάσεις, χωρίς όμως να υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις, θεωρούνται σταδίου III.
- έχουν δώσει μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα θεωρούνται σταδίου IV.

1.5 Θεραπεία

1.5.1 Θεραπεία του πρωτοπαθούς μελανώματος

Η χειρουργική εκτομή αποτελεί την θεραπεία εκλογής του πρωτοπαθούς μελανώματος και περιλαμβάνει την αφαίρεση του όγκου με τα κατάλληλα όρια περιβάλλοντος υγιούς μακροσκοπικά δέρματος και του υποκείμενου υποδόριου ιστού. Συνήθως έχει αφαιρεθεί ήδη η πρωτοπαθής εστία κατά τη διαγνωστική βιοψία εκτομής. Η ευρύτερη συμπληρωματική ενδείκνυται να μειωθεί ο κίνδυνος τοπικής υποτροπής, επειδή το μελάνωμα παρουσιάζει συχνά μικροσκοπικές δορυφόρες εστίες, που αντιπροσωπεύουν πιθανόν μεταστάσεις στα τοπικά λεμφαγγεία. Η απόσταση αυτών των εστιών από την πρωτοπαθή βλάβη σχετίζεται με το βάθος διήθησης κατά Breslow του μελανώματος. Στο παρελθόν οι αποστάσεις των χειρουργικών ορίων των συμπληρωματικών εκτομών ήταν μεγαλύτερες με αποτέλεσμα αυξημένη νοσηρότητα, χειρότερο αισθητικό αποτέλεσμα, αυξημένη ανάγκη πλαστικής αποκατάστασης, μεγαλύτερη διάρκεια νοσηλείας και αυξημένο κόστος. Σήμερα, μετά από τα αποτελέσματα έξι τυχαιοποιημένων και μερικών αναδρομικών μελετών τα προτεινόμενα χειρουργικά όρια είναι μικρότερα, χωρίς να υπάρχει αύξηση του ποσοστού της τοπικής υποτροπής ή μείωση της επιβίωσης (18,19). Έτσι, σήμερα με βάση τα κλινικά όρια του μελανώματος, όπως μετρώνται διεγχειρητικά και όχι μακροσκοπικά ή μικροσκοπικά από το παθολογοανατόμο, ορίζονται τα όρια της ευρείας εκτομής αναλόγως του βάθους διήθησης του μελανώματος όπως αναφέρονται στον Πίνακα 5.

Βάθος διήθησης (mm)	Κλινικά όρια εκτομής
In situ	0,5 – 1 cm
1 mm	1 cm
1,01 – 2 mm	1 – 2 cm
2,01 – 4 mm	2 cm
> 4 mm	2 cm

Πίνακας 5. Αρχές χειρουργικών ορίων για ευρεία εκτομή πρωτοπαθούς μελανώματος.

Τα όρια αυτά βέβαια μπορεί να χρειαστεί να τροποποιηθούν σε κάποιες ανατομικές περιοχές όπως π.χ. στο πρόσωπο για λόγους λειτουργικότητας και αισθητικής.

Στο *in situ* μελάνωμα και στην κακοήθη φακί, παρά που δεν υπάρχει διηθητική συμπεριφορά και πιθανότητα μικρο-δορυφόρων εστιών, μπορεί να χρειαστούν ευρύτερα όρια εκτομής (>0,5 cm) για να υπάρξουν ιστολογικά αρνητικά όρια επειδή παρατηρείται συνήθως υποκλινική επέκταση και αρκετά χιλιοστά πέραν των ορατών ορίων (20,21). Τα υπονόχια μελανώματα αντιμετωπίζονται με ακρωτηριασμό στη μεταταρσοφαλαγγική άρθρωση στα κάτω άκρα, ενώ στα άνω άκρα εγγύτερα της άπω μεσοφαλαγγικής άρθρωσης με στόχο μικρότερη λειτουργική αναπηρία.

Συμπληρωματική ακτινοθεραπεία χορηγείται μόνο σε επιλεγμένα περιστατικά με υψηλό κίνδυνο τοπικής υποτροπής. Δύναται να μειώσει την πιθανότητα τοπικής υποτροπής, χωρίς βελτίωση της συνολικής επιβίωσης και με τη σχετική τοξικότητα της.

1.5.2 Αντιμετώπιση των επιχώριων λεμφαδένων

1.5.2.1 Η βιοψία του λεμφαδένα φρουρού

Στην περίπτωση απουσίας κλινικά και απεικονιστικά διηθημένων επιχώριων λεμφαδένων και απομακρυσμένων μεταστάσεων, ενδείκνυται η βιοψία λεμφαδένα φρουρού, με την οποία μπορούμε να ανιχνεύουμε μικροσκοπικές λεμφαδενικές μεταστάσεις. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο αρχικός στόχος της είναι η λεπτομερής σταδιοποίηση των λεμφαδένων. Η βιοψία λεμφαδένα φρουρού είναι μια διαδικασία που στοχεύει επιπλέον στην επιλογή ασθενών υποψήφιων για πλήρη λεμφαδενικό καθαρισμό ή και επικουρική συστηματική θεραπεία λόγω υποκλινικής λεμφαδενικής νόσου και υψηλότερου κίνδυνου υποτροπής (22).

Όπως αναφέρθηκε επίσης προηγουμένως, ο λεμφαδένας φρουρός είναι ο πρώτος λεμφαδένας που δέχεται την λεμφική αποχέτευση της περιοχής του λεμφαδένα φρουρού. Ως εκ τούτου, εάν ο λεμφαδένας φρουρός δεν είναι διηθημένος, οι υπόλοιποι επιχώριοι λεμφαδένες είναι ελεύθεροι διήθησης. Ενώ όταν είναι διηθημένος υπάρχει περίπτωση διήθησης άλλων λεμφαδένων της επιχώριας ομάδας. Ο λεμφαδένας φρουρός ανιχνεύεται μετά από προεγχειρητικό σπινθηρογράφημα λεμφαγγείων, στο οποίο χορηγείται ειδικό ραδιοϊσότοπο ενδοδερμικά στη θέση του πρωτοπαθούς μελανώματος (συνήθως περί της ουλής της προηγηθείσας διαγνωστικής βιοψίας εκτομής) και απεικονίζεται η θέση του λεμφαδένα φρουρού. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται διεγχειρητικά ανιχνευτής γ-ακτινοβολίας για τον εντοπισμό και τη βιοψία του λεμφαδένα φρουρού. Εκτός από την ραδιοϊσοτοπική τεχνική, μπορεί να χορηγηθεί ειδική μπλε χρωστική ουσία ενδοδερμικά στη θέση του πρωτοπαθούς μελανώματος στην αρχή της επέμβασης και στη συνέχεια να ανιχνεύεται μπλε χρωματισμένος λεμφαδένας φρουρός στην επιχώρια λεμφαδενική ομάδα. Είναι προτιμότερο η ευρεία εκτομή, και ακόμα περισσότερη όταν γίνεται και πλαστική αποκατάσταση του δερματικού ελλείμματος με κρημνούς, να μην προηγείται την βιοψία του λεμφαδένα φρουρού, επειδή αυτές οι χειρουργικές επεμβάσεις μπορούν να διακόψουν την αρχική λεμφαγγειακή αποχέτευση. Ως εκ τούτου, η λεμφαγγειακή χαρτογράφηση με ραδιοϊσότοπο και/ή μπλε χρωστική ουσία να δείχνει λανθασμένο λεμφαδένα φρουρό. Όταν διενεργείται βιοψία λεμφαδένα φρουρού, πρέπει να εξετάζονται λεπτομερώς ιστολογικά όλοι οι λεμφαδένες φρουροί με χρώση αιματοξυλίνης - ηωσίνης και ανοσοϊστοχημεία. Με βάση την AJCC δεν υπάρχει κατώτατο φορτίο που να θεωρείται θετικό ως μικρομετάσταση, αλλά χρειάζεται προσοχή στην παρουσία μελανοκυττάρων στο λεμφαδένα με καλοήγη εμφάνιση, που να μπορεί να μιμούνται μεταστατική νόσο.

Η MSLT-I είναι μια πολυκεντρική μελέτη φάσης III, που διερευνούσε τη συμβολή της βιοψίας του λεμφαδένα φρουρού στη συνολική επιβίωση ασθενών στο κλινικά εντοπισμένο μελάνωμα. Δεν βρήκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην επιβίωση ελεύθερης νόσου συγκριτικά με την ευρεία εκτομή μόνο της πρωτοπαθούς βλάβης και στενή παρακολούθηση των λεμφαδένων με κλινική εξέταση και υπερηχογραφικό έλεγχο, αλλά επιβεβαίωσε τη σημασία της βιοψίας του λεμφαδένα φρουρού στη σταδιοποίηση του μελανώματος (23). Οι ασθενείς που υποβλήθηκαν επιπλέον στη βιοψία του λεμφαδένα φρουρού είχαν βελτιωμένη κατά 7-10% επιβίωση ελεύθερης νόσου, γεγονός που οφείλεται σε λιγότερες λεμφαδενικές υποτροπές στην ομάδα αυτή. Στην υποομάδα όμως ασθενών με ενδιάμεσου πάχους (1,2-3,5 mm) μελανώματος με θετικό λεμφαδένα φρουρό φάνηκε πλεονέκτημα στην 10-ετή συνολική επιβίωση σε σχέση με όσους με ενδιάμεσου πάχους μελάνωμα παρακολουθούνταν κλινικά και τελικά ανέπτυξαν λεμφαδενικές μεταστάσεις (62,1% έναντι 41,5%, $p=0,006$). Αυτό δε διαπιστώθηκε σε πάχος $>3,5$ mm, ενώ ασθενείς με λεπτού πάχους μελανώματα δεν ελέγχθηκαν χωριστά στη μελέτη αυτή.

Στους ασθενείς με λεπτά μελανώματα ο ρόλος της βιοψίας λεμφαδένα φρουρού είναι αμφιλεγόμενος επειδή η πιθανότητα διήθησης του είναι μικρή και η χειρουργική επέμβαση αυτή, όσο μικρή να είναι, σχετίζεται με κάποια νοσηρότητα και κόστος. Σε μια σχετική ανασκόπηση (21) αναφέρεται ότι σε ασθενείς με μελάνωμα βάθος διήθησης 0,75 mm, το ποσοστό εμφάνισης διήθησης του λεμφαδένα φρουρού είναι 2,7%, ενώ σε βάθος διήθησης 0,75-1 mm είναι 6.2%. Σε μία άλλη πολυκεντρική μελέτη το ποσοστό ήταν $<5\%$ όταν το βάθος διήθησης ήταν $<0,75$ mm, ανεξαρτήτως εξέλιξης και επιπέδου Clark (24). Όταν όμως στα λεπτά μελανώματα συνυπάρχει άλλος ένας παράγοντας κινδύνου, όπως εξέλιξη, επίπεδο διήθησης IV κατά Clark, υψηλός μιτωτικός δείκτης, υποστροφή ή ηλικία <40 ετών, το ποσοστό είναι υψηλότερο (18%). Τέλος, κάποιες μελέτες (25) βρίσκουν συσχέτιση της θετικότητας ή όχι του λεμφαδένα φρουρού με την επιβίωση ελεύθερης νόσου και την επιβίωση ειδική της νόσου στα λεπτά μελανώματα, ενώ άλλες μελέτες δε βρίσκουν (26,27).

Στα λεπτού πάχους μελανώματα ο μοναδικός σαφώς επαναλαμβανόμενος προβλεπτικός παράγοντας για θετικό φρουρό είναι το βάθος διήθησης κατά Breslow, ενώ και άλλοι αναφέρονται σε διάφορες μελέτες και περιλαμβάνουν το μιτωτικό δείκτη, την εξέλιξη, το επίπεδο διήθησης κατά Clark τη λεμφαγγειακή διήθηση, την κάθετη φάση ανάπτυξης και τη λεμφοκυτταρική διήθηση (24), όμως δεν αναπαράγονται σε όλους τους ασθενείς με λεπτού πάχους μελανώματα. Η σημασία της υποστροφής είναι αντιφατική, αλλά οι περισσότερες μελέτες δε δείχνουν συσχέτιση.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα η βιοψία λεμφαδένα φρουρού μπορεί να παραληφθεί σε μη διηθητικό (in situ) μελάνωμα και μελάνωμα πάχους $<0,8$ mm (T1a), με την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχουν άλλοι αρνητικοί παράγοντες κινδύνου. Στους ασθενείς με εντοπισμένο T1b έως T3 συνίσταται να γίνεται βιοψία του λεμφαδένα φρουρού. Επειδή τα εντοπισμένα παχιά (T4) μελανώματα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο συστηματικής νόσου, η σημασία της λεπτομερούς σταδιοποίησης της νόσου με τη βιοψία του λεμφαδένα φρουρού είναι μειωμένη. Ωστόσο, λόγω της περιορισμένης νοσηρότητας της επέμβασης και μη ανάπτυξη συστηματικών μεταστάσεων σε ένα μεγάλο ποσοστό αυτών των ασθενών, πολλοί θεωρούν χρήσιμη τη βιοψία του λεμφαδένα φρουρού ακόμα και σε αυτούς τους ασθενείς. Επίσης, σε σταδίου III ασθενείς με μονήρη καθ' οδόν (in transit) βλάβη ή μικροδορυφόρες εστίες, η βιοψία του λεμφαδένα φρουρού είναι σημαντική στη σταδιοποίηση, καθώς επί θετικότητας αυξάνεται το στάδιο σε IIIc (N3), ενώ θεραπευτικά έχει ασαφή σημασία.

Σε περίπτωση που υπάρχει ένδειξη για βιοψία του λεμφαδένα φρουρού, αλλά δεν μπορεί να γίνει για κάποιον λόγο ή ο λεμφαδένας δεν ανευρίσκεται διεγχειρητικά, δεν προτείνεται προφυλακτικός λεμφαδενικός καθαρισμός. Η υπερηχογραφική παρακολούθηση των λεμφαδένων είναι πολύ χρήσιμη σε αυτή την περίπτωση.

1.5.2.2 Ο λεμφαδενικός καθαρισμός

Ο ριζικός λεμφαδενικός καθαρισμός έχει ένδειξη σε ασθενείς με κλινικά ψηλαφητούς λεμφαδένες μετά από κυτταρολογική ή ιστολογική επιβεβαίωση της διήθησης τους και απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων. Ο λεμφαδενικός καθαρισμός είναι ανατομικός και εξαρτάται από την εντόπιση, ενώ η επάρκεια του εκτιμάται από τον αριθμό των εξαιρεθέντων λεμφαδένων.

Σε ασθενείς με διηθημένο λεμφαδένα φρουρό ο συμπληρωματικός λεμφαδενικός καθαρισμός έχει συχνά ένδειξη, αλλά όχι προφυλακτικά σε ασθενείς με λεμφαδένα φρουρό ελεύθερο διήθησης. Οι ασθενείς με διηθημένο λεμφαδένα φρουρό έχουν μέσο όρο 18% πιθανότητα για επιπλέον διηθημένους επιχώριους λεμφαδένες (28). Προβλεπτικοί παράγοντες για τη διήθηση μη φρουρών λεμφαδένων είναι, το φορτίο νόσου στον λεμφαδένα φρουρό, η κατανομή (υποκαψικά έναντι παρεγχυματική), ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων φρουρών, το βάθος διήθησης και η εξέλιξη του πρωτοπαθούς μελανώματος. Σύμφωνα με τη μελέτη MSLT-II, φαίνεται ότι η στενή παρακολούθηση με υπερηχογραφικό έλεγχο των περιοχικών λεμφαδένων θεωρείται ασφαλής σε ασθενείς με διηθημένο λεμφαδένα φρουρό. Ο συμπληρωματικός λεμφαδενικός καθαρισμός συμβάλλει στη περαιτέρω σταδιοποίηση και στον τοπικό περιοχικό έλεγχο της νόσου με ελάχιστο όφελος της επιβίωσης αλλά με αυξημένη νοσηρότητα (29,30).

Σε περιστατικά υψηλού κινδύνου για υποτροπή στη περιοχή του λεμφαδενικού καθαρισμού, δηλαδή σε αυτούς με μεγάλο αριθμό λεμφαδενικών μεταστάσεων και/ή εξωκαψική διήθηση, χορηγείται επιλεκτικά συμπληρωματική ακτινοθεραπεία. Δεν βελτιώνει τη συνολική επιβίωση, ενώ οι άμεσες και αψότερες παρενέργειες είναι συχνά μείζονες.

1.5.3 Συστηματική θεραπεία

Συστηματική θεραπεία χορηγείται γενικώς στην αντιμετώπιση απομακρυσμένων μεταστάσεων. Στην περίπτωση περιορισμένης απομακρυσμένης νόσου (‘ολιγομεταστατικής νόσου’), χειρουργική αφαίρεση της μεταστατικής νόσου, πάντα σε συνδυασμό με συστηματική θεραπεία, μπορεί να προσφέρει όφελος σε επιλεγμένους ασθενείς. Μαζί με τη συστηματική θεραπεία μπορεί να χρειαστεί παρηγορητική ακτινοθεραπεία για συμπτωματική μη χειρουργήσιμη μεταστατική νόσο, όπως π.χ. στην αντιμετώπιση εγκεφαλικών και οστικών μεταστάσεων.

Συστηματική θεραπεία χρησιμοποιείται και ως επικουρική, συμπληρωματική, θεραπεία με σκοπό τη μείωση πιθανότητας ανάπτυξης συστηματική υποτροπής σε ασθενείς υψηλού κινδύνου. Προκειμένου να εκτιμηθεί η ανάγκη για χορήγηση επικουρικής θεραπείας οι ασθενείς χωρίζονται από την AJCC σε ομάδες κινδύνου:

Χαμηλού κινδύνου: Στάδιο IA

Ενδιάμεσου κινδύνου: Στάδια IB, IIA

Υψηλού κινδύνου: Στάδια IIB, IIC, IIIA

Πολύ υψηλού κινδύνου: Στάδια IIIB, IIIC

Τα ποσοστά απομακρυσμένων υποτροπών και θανάτου εντός 10 ετών είναι αντίστοιχα 10%, 10–30%, 30–50% και >50%.

Οι συστηματικές θεραπείες χωρίζονται σε χημειοθεραπεία, ανοσοθεραπεία και στοχευμένη θεραπεία. Με την ανάπτυξη νέων φαρμάκων στη τελευταία δεκαετία, η συστηματική θεραπεία χρησιμοποιείται πλέον πολύ σπάνια.

1.5.3.1 Ανοσοθεραπεία

Η ανοσοθεραπεία με υψηλές δόσεις ιντερφερόνης ήταν για δεκαετίες η μοναδική επικουρική συστηματική θεραπεία. Ωστόσο από μετα-αναλύσεις φάνηκε ότι το όφελος είναι περιορισμένο, ενώ η τοξικότητα είναι υψηλή. Σήμερα, με τη διαθεσιμότητα νέων πιο αποτελεσματικών φαρμάκων με λιγότερη τοξικότητα, δεν χρησιμοποιείται πλέον.

Η βαθύτερη γνώση των μηχανισμών διαφυγής του όγκου από την ανοσοεπιτήρηση οδήγησε στην ανάπτυξη των αντι-CTLA-4 και αντι-PD-1 αντισωμάτων, τα οποία είναι δραστικά στο μελάνωμα ενώ δοκιμάζονται με ενθαρρυντικά αποτελέσματα και σε άλλα συμπαγή νεοπλασμάτα. Αυτή η πρόσφατη έκρηξη γνώσης μεταφράστηκε σε αύξηση της συνολικής επιβίωσης για πρώτη φορά, καθώς και σε βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα. Επιπλέον, τυχαιοποιημένες μελέτες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα αυτών των ανοσορρυθμιστών ως επικουρική θεραπεία στη μείωση της πιθανότητας συστηματικής υποτροπής σε ασθενείς με μελάνωμα υψηλού κινδύνου. Όμως, πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα, όπως η κατάλληλη αλληλουχία των θεραπευτικών χειρισμών και οι βέλτιστοι συνδυασμοί τους, αλλά και ποια θα είναι η θέση των νέων φαρμακευτικών προϊόντων, όπως οι αναστολείς του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR. Υπάρχουν επί του παρόντος πέντε εγκεκριμένες από την FDA (U.S. Food and Drug Administration) επιλογές ανοσοθεραπείας για μελάνωμα με απομακρυσμένες μεταστάσεις ή μελάνωμα υψηλού κινδύνου που χρησιμοποιούνται σήμερα.

Atezolizumab (Tecentriq®): ένας αναστολέας που στοχεύει το μονοπάτι PD-1/PD-L1, εγκεκριμένο σε συνδυασμό με το cobimetinib και το vemurafenib για ένα υποσύνολο ασθενών με προχωρημένο μελάνωμα.

Ipilimumab (Yervoy®): ένας αναστολέας που στοχεύει το μονοπάτι CTLA-4, εγκεκριμένο για υποσύνολα ασθενών με προχωρημένο μελάνωμα, συμπεριλαμβανομένης της θεραπείας πρώτης γραμμής και σε συνδυασμό με το nivolumab.

Nivolumab (Opdivo®): έναν αναστολέα που στοχεύει το μονοπάτι PD-1/PD-L1, εγκεκριμένο για υποσύνολα ασθενών με προχωρημένο μελάνωμα, συμπεριλαμβανομένου σε συνδυασμό με το ipilimumab.

Pembrolizumab (Keytruda®): ένας αναστολέας που στοχεύει το μονοπάτι PD-1/PD-L1, εγκεκριμένο για υποσύνολα ασθενών με προχωρημένο μελάνωμα, συμπεριλαμβανομένης της επικουρικής θεραπείας.

Ένα άλλο είδος ανοσοθεραπείας που πήρε πρόσφατα FDA έγκριση για τη χρήση σε μεταστατικό μελάνωμα είναι η ογκολυτική ανοσοθεραπεία με T-VEC (talimogene laherparepvec, Imlygic®). Ένας τροποποιημένος ιός απλού έρπητα (HSV) εγχέεται σε μεταστατική εστία, μολύνει τα καρκινικά κύτταρα και προάγει την καταστροφή τους. Τα καταστραμμένα κύτταρα προκαλούν ανοσολογική απάντηση, με αποτέλεσμα καταστροφή και άλλων μεταστατικών εστιών στις οποίες δεν έχει γίνει έγχυση του φαρμάκου.

1.5.3.2 Στοχευμένη θεραπεία

Η αποκρυπτογράφηση, τα τελευταία έτη, των μοριακών μηχανισμών που διέπουν το κακοήθες μελάνωμα οδήγησε στην ανάπτυξη και την επιτυχή εφαρμογή στην κλινική πράξη νέων παραγόντων, όπως οι αναστολείς BRAF και οι αναστολείς MEK. Οι παράγοντες αυτοί στοχεύουν την αναστολή των συγκεκριμένων σημείων στο ίδιο NRAS/BRAF/MEK/ERK μονοπάτι. Ο ρόλος του μονοπατιού αυτού στην ανάπτυξη μελανώματος θα συζητηθεί παρακάτω. Όμως, η χρήση τους έχει μόνο ένδειξη όταν υπάρχει BRAF^{V600} μετάλλαξη στα κακοήθη κύτταρα του μελανώματος.

Πρόσφατες τυχαιοποιημένες μελέτες έχουν δείξει το όφελος αυτών των φαρμάκων ως συστηματική θεραπεία για μελάνωμα με απομακρυσμένες μεταστάσεις καθώς και ως επικουρική θεραπεία σε ασθενείς με μελάνωμα υψηλού κινδύνου. Συχνά χρησιμοποιείται συνδυασμός των δυο ειδών στοχευμένης θεραπείας για καλύτερη αναστολή του NRAS/BRAF/MEK/ERK μονοπατιού. Οι BRAF αναστολείς που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι το Vemurafenib, το Dabrafenib και το Encorafenib, ενώ οι MEK αναστολείς περιλαμβάνουν το Trametinib, το Binimetinib και το Cobimetinib.

1.6 Πρόγνωση

Οι πιο σημαντικοί καθιερωμένοι προγνωστικοί δείκτες βασίζονται στη τρέχουσα ταξινόμηση TNM από την AJCC (8^η έκδοση, 2018), όπως συζητήθηκαν στον παράγραφο για τη σταδιοποίηση της νόσου. Η προβλεπόμενη με τη νόσο σχετιζόμενη επιβίωση αναφέρθηκε στον ίδιο παράγραφο στις εικόνες 1 και 3.

Άλλοι προγνωστικοί παράγοντες είναι το επίπεδο διήθησης κατά Clark, ο αριθμός μιτώσεων ανά mm², η παρουσία υποστροφής, νευροτροπισμός και η παρουσία TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes) (8).

Μοντέλα εκτίμησης κινδύνου βασισμένα στους παράγοντες αυτούς δεν εκφράζουν πλήρως τις παρατηρούμενες διαφορές στη σχετιζόμενη με τη νόσο επιβίωση. Η επιβίωση των ασθενών με μελάνωμα ποικίλει πάρα πολύ ακόμα στην ίδια TNM κατηγορία. Το μελάνωμα παραμένει σχετικά απρόβλεπτο όσον αφορά τη βιολογική του συμπεριφορά. Στους ασθενείς με μελάνωμα με ευνοϊκούς προγνωστικούς δείκτες σύμφωνα με τη ταξινόμηση AJCC, υπάρχει ένα υποσύνολο ασθενών που έχουν χειρότερη κλινική έκβαση. Επίσης, στο παρελθόν κατά την απουσία αποτελεσματικών επικουρικών συστηματικών θεραπειών, αρκετοί ασθενείς με αρνητικούς προγνωστικούς δείκτες παρουσίαζαν μακροχρόνια επιβίωση. Ως εκ τούτου, υπάρχει ετερογένεια της πρόγνωσης σχετικά με την υποτροπή και την επιβίωση που πιθανώς οφείλεται σε ακόμη άγνωστους προγνωστικούς παράγοντες (31). Αυτοί οι άγνωστοι προγνωστικοί παράγοντες πρέπει μάλλον να αναζητηθούν στην μοριακή βιολογία του μελανώματος. Όπως και σε άλλους συμπαγείς όγκους, νεοπλάσματα με τις ίδιες κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο προφίλ έκφρασης πρωτεϊνών και η ταξινόμηση υπο-ομάδων βασισμένη σε γονιδιακή έκφραση μπορεί να σχετίζεται ισχυρά με διαφορετική επιβίωση. Αναγνώριση αυτών των δεικτών θα μπορούσαν να μας βοηθήσουν στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας για τους ασθενείς χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις, χορηγώντας επικουρική θεραπεία στους ασθενείς υψηλού κινδύνου για υποτροπή και παραλείποντας σε αυτούς χαμηλού κινδύνου. Μέχρι σήμερα, κανένας βιοδείκτης δεν έχει ακόμα χρησιμοποιηθεί στην κλινική πρακτική. Λόγω της πρόσφατης προόδου στην αντιμετώπιση του μελανώματος, που περιλαμβάνει και στοχευμένες θεραπείες, η συνεχής έρευνα για προγνωστικούς βιοδείκτες είναι εξέχουσα σημασίας (5). Επίσης η γνώση της μοριακής βιολογίας του μελανώματος μπορεί να αναδείξει στόχους φαρμακευτικής θεραπείας.

2.Βιολογία μελανώματος

2.1 Κυτταρικός κύκλος

2.1.1 Γενικά στοιχεία

Η ικανότητα ενός κυττάρου να πολλαπλασιάζεται και να δημιουργεί ακριβή αντίγραφα του αποτελεί μία ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία η οποία απαιτεί υψηλή "πιστότητα" για κάθε οργανισμό. Ο μοριακός μηχανισμός ελέγχου που χρησιμοποιούν τα κύτταρα για αναδιπλασιασμό χαρακτηρίζεται από οργάνωση και σημαντικού βαθμού διατήρηση κατά τη διάρκεια της εξέλιξης.

Τα κύτταρα θηλαστικών όταν τοποθετούνται σε καλλιέργεια υπό συνθήκες που ενθαρρύνουν τον εκθετικό πολλαπλασιασμό, εμφανίζουν έναν πολύπλοκο κύκλο ανάπτυξης και διαίρεσης που αναφέρεται ως κυτταρικός κύκλος. Ένα κύτταρο που έχει πρόσφατα σχηματιστεί από τις διαδικασίες της κυτταρικής διαίρεσης - μίτωση και κυττοκίνηση - πρέπει να αποφασίσει αμέσως μετά εάν θα ξεκινήσει έναν νέο γύρο ενεργού ανάπτυξης και διαίρεσης ή θα υποχωρήσει στη μη ανάπτυξη η οποία ονομάζεται φάση G0. Αυτή η απόφαση επηρεάζεται έντονα από τους μιτογόνους αυξητικούς παράγοντες στο περιβάλλον του κυττάρου. Η παρουσία τους σε επαρκή συγκέντρωση θα ενθαρρύνει ένα κύτταρο που σχηματίστηκε πρόσφατα με μίτωση για να παραμείνει στον ενεργό κύκλο ανάπτυξης και διαίρεσης. Αντίθετα, η απουσία τους θα προκαλέσει το κύτταρο να οδηγηθεί από τη μίτωση στη φάση G0, δηλαδή σε κατάσταση ηρεμίας.

Η απόφαση ενός κυττάρου (που σχηματίστηκε πρόσφατα από την κυτταρική διαίρεση) να παραμείνει σε ενεργό κύκλο ανάπτυξης και διαίρεσης απαιτεί αυτό το κύτταρο να αρχίσει αμέσως να προετοιμάζεται για την επόμενη διαίρεση. Αυτό συνεπάγεται τον διπλασιασμό των μακρομοριακών συστατικών για να διασφαλιστεί ότι τα δύο θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν από τον επόμενο γύρο της κυτταρικής διαίρεσης θα λαμβάνει το καθένα το κατάλληλο απόθεμα.

Η περίοδος μεταξύ της γέννησης ενός θυγατρικού κυττάρου και της επακόλουθης έναρξης της σύνθεσης του DNA, ονομάζεται φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου τα κύτταρα λαμβάνουν κρίσιμες αποφάσεις σχετικά με την ανάπτυξη έναντι της ηρεμίας. Σε πολλούς τύπους θηλαστικών κυττάρων, η σύνθεση DNA που ακολουθεί η φάση G1 απαιτεί 6 έως 8 ώρες για να ολοκληρωθεί. Αυτή η περίοδος σύνθεσης DNA ονομάζεται S (συνθετική) φάση, και η χρονική διάρκειά της καθορίζεται εν μέρει από την τεράστια ποσότητα κυτταρικού DNA ($\sim 6,4 \times 10^9$ ζεύγη βάσεων ανά διπλοειδές γονιδίωμα) με το οποίο πρέπει να αναπαραχθεί με πιστότητα κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Το πραγματικό μήκος της φάσης S ποικίλλει πολύ μεταξύ διαφορετικών ειδών κυττάρων. Έχοντας περάσει από τη φάση S, ένα κύτταρο μπορεί να θεωρηθεί κατάλληλο να εισέλθει απευθείας σε μίτωση (φάση M). Ωστόσο, τα περισσότερα κύτταρα θηλαστικών περνούν 3 έως 5 ώρες σε μία φάση, ονομαζόμενη G2, προετοιμάζοντας τον εαυτό τους για την είσοδο στη φάση M και την κυτταρική διαίρεση. Η ίδια η φάση M συνήθως διαρκεί μία ώρα περίπου και περιλαμβάνει τέσσερις ξεχωριστές υποφάσεις: πρόφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση. Η φάση αυτή καταλήγει στην κυτοκίνηση, τη διαίρεση του κυτταροπλάσματος που επιτρέπει το σχηματισμό δύο νέων κυττάρων. Όπως συμβαίνει με τη φάση S, η φάση M πρέπει να προχωρήσει και να ολοκληρωθεί με μεγάλη ακρίβεια.

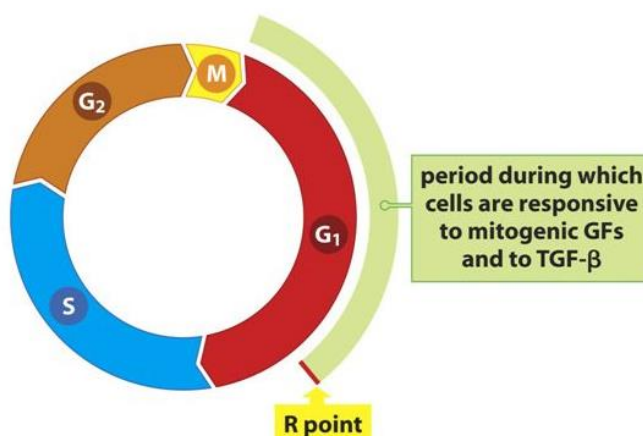
Οποιοδήποτε ελάττωμα στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο και τον οργανισμό, ένα από τα οποία είναι η ασθένεια του

καρκίνου. Για να διασφαλιστεί η ακεραιότητα του κυτταρικού κύκλου υπάρχουν πολλαπλά σημεία ελέγχου, που ονομάζονται “checkpoints” και τα οποία εξασφαλίζουν την ασφαλή μετάβαση από την μία φάση στην άλλη ή την αναστέλλουν. Στο σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου το κύτταρο δεν μπορεί να προχωρήσει στην επόμενη φάση σε περίπτωση βλάβης του γονιδιώματος. Υπάρχουν τέσσερα καθοριστικά σημεία ελέγχου στον κυτταρικό κύκλο:

1. Σημείο ελέγχου μεταξύ φάσης G1/S
2. Σημείο ελέγχου στη φάση S
3. Σημείο ελέγχου μεταξύ φάσης G2/M
4. Σημείο ελέγχου στη φάση M

Κατά την διάρκεια της μετάβασης από τη φάση G1 στην S το σημείο ελέγχου λειτουργεί ως φραγμός σε περίπτωση βλάβης του γονιδιώματος. Το επόμενο σημείο ελέγχου είναι στη φάση S όπου το κύτταρο θα σταματήσει τον διπλασιασμό του DNA εάν υπάρχει βλάβη. Το τρίτο σημείο ελέγχου δεν θα επιτρέψει στο κύτταρο να περάσει από την φάση G2 στην M έως ότου ολοκληρωθεί ο διπλασιασμός του DNA στην φάση S. Κατά την διάρκεια της φάσης M, υπάρχει ένα πολύ σημαντικό σημείο ελέγχου το οποίο σταματά το κύτταρο στην ανάφαση εάν δεν έχουν προσκολληθεί σωστά όλα τα χρωμοσώματα στον μιτωτικό άξονα.

Τα κύτταρα δέχονται σήματα ρύθμισης της ανάπτυξης κατά τη διάρκεια ενός διακριτού χρονικού παραθύρου του κυτταρικού κύκλου που διαρκεί από την έναρξη της φάσης G1 έως και μία ή δύο ώρες πριν από τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S. Ακριβώς σε αυτό το σημείο το κύτταρο πρέπει να αποφασίσει εάν θα παραμείνει στη G1, εάν θα υποχωρήσει από τον ενεργό κύκλο στη G0 ή θα προχωρήσει στη φάση late G1 και στη συνέχεια στις υπόλοιπες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Το σημείο αυτό ονομάζεται σημείο περιορισμού ή σημείο R (Εικόνα 4). Στα περισσότερα κύτταρα θηλαστικών που μελετήθηκαν μέχρι σήμερα, το σημείο R εμφανίζεται αρκετές ώρες πριν τη μετάβαση φάσης G1/S. Μετά την δίοδο από το σημείο R το κύτταρο δεν υπακούει πλέον στους εξωγενείς παράγοντες και η πορεία του κυτταρικού κύκλου μέχρι την ολοκλήρωση της μίτωσης είναι προδιαγεγραμμένη (32).



Εικόνα 4: Σημείο R του κυτταρικού κύκλου (32).

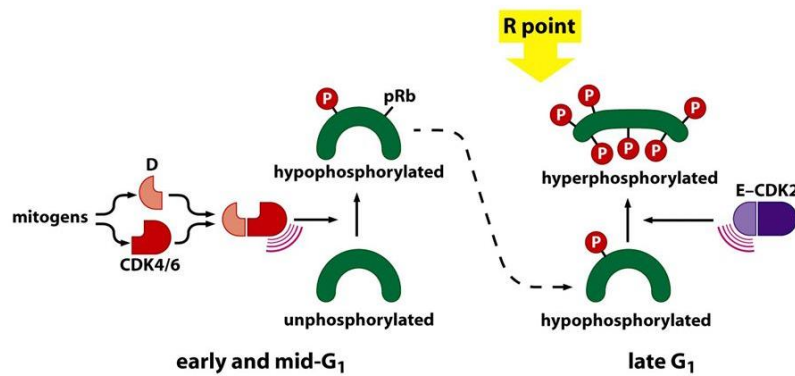
Η δέσμευση του κυττάρου να προχωρήσει μέσω του σημείου R και να συνεχίσει μέχρι τη φάση M δεν είναι απόλυτο. Μπορεί να παρέμβουν μεταβολικές, γενετικές ή φυσικές

καταστροφές κατά τη διάρκεια των φάσεων S, G2 ή M και να αναγκαστεί το κύτταρο να καλέσει μια διακοπή, συχνά προσωρινή, έως ότου αντιμετωπιστούν αυτές οι συνθήκες. Η απορρύθμιση του σημείου R και του μηχανισμού λήψης αποφάσεων συνοδεύει τον σχηματισμό των περισσότερων αν όχι όλων των τύπων καρκινικών κυττάρων.

2.1.2 pRb και p53: Ρυθμιστικοί παράγοντες του κυτταρικού κύκλου

Δυο ιδιαίτερα σημαντικοί ρυθμιστικοί παράγοντες του κυτταρικού κύκλου είναι η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb) και η p53. Κυρίαρχο ρόλο στην μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S, αναδιπλασιασμού του DNA, διαδραματίζει η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου pRb. Ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης στο κύτταρο παραμένουν σταθερά, η ενεργότητά της εξαρτάται από την κατάσταση φωσφορυλίωσής της. Πιο συγκεκριμένα, η pRb είναι μη φωσφορυλιωμένη όταν τα κύτταρα βρίσκονται στη φάση G0. Φωσφορυλιώνεται ασθενώς (υποφωσφορυλιωμένη) σε ένα μικρό αριθμό σερίνης και θρεονίνης μετά την είσοδο στη φάση G1 και γίνεται πολύ φωσφορυλιωμένη (υπερφωσφορυλιωμένη) σε συνδυασμό με την πρόοδο του κυττάρου μέσω του σημείου R. Όταν το κύτταρο περάσει μέσω του σημείου R, η pRb συνήθως παραμένει υπερφωσφορυλιωμένη σε όλο το υπόλοιπο του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 5). Μετά την έξοδο του κυττάρου από τη μίτωση, οι φωσφορικές ομάδες στο pRb απομακρύνονται από το ένζυμο που ονομάζεται πρωτεΐνη φωσφατάση τύπου 1 (PP1). Αυτή η απομάκρυνση των φωσφορικών ομάδων, θέτει το στάδιο για τον επόμενο κυτταρικό κύκλο και έτσι για έναν νέο κύκλο φωσφορυλίωσης της pRb. Το γεγονός ότι η υπερφωσφορυλίωση της pRb συμβαίνει σε συνδυασμό με τη διέλευση μέσω του σημείου ελέγχου R δηλώνει ότι αυτή η πρωτεΐνη είναι ο 'μοριακός κυβερνήτης' του σημείου R.

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος δρα, σχετίζεται άμεσα με την αλληλεπίδρασή της με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F, ο οποίος ρυθμίζει και ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση του DNA. Η υποφωσφορυλιωμένη μορφή της pRb δημιουργεί σύμπλοκα με τον E2F καταστέλλοντας την μεταγραφή των γονιδίων αυτών. Αντίθετα, η φωσφορυλίωση της pRb οδηγεί σε απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και συγκεκριμένα με την μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στην S, καθώς και τον αναδιπλασιασμό του DNA. Εάν το κύτταρο πρέπει να αντιμετωπίσει σοβαρές φυσιολογικές πιέσεις, για παράδειγμα, υποξία, βλάβη στο DNA ή διαταραχή του μιτωτικού άξονα ενώ βρίσκεται σε φάση S ή G2, η φωσφορυλίωση της pRb μπορεί να αντιστραφεί από κατάλληλες φωσφατάσες, επιστρέφοντας έτσι στην μη ενεργή μορφή της. Αυτή η κατάσταση είναι πιθανώς παροδική και αναστρέφεται μόλις οι φυσιολογικές πιέσεις ή η βλάβη αποκατασταθεί.



Εικόνα 5: Έλεγχος της μετάβασης του σημείου περιορισμού R μέσω φωσφορυλίωσης της pRb (32).

Η απορρύθμιση του μονοπατιού pRb μέσω μετάλλαξης του γονιδίου pRb, μεθυλίωσης του υποκινητή ή μέσω των ιικών ογκοπρωτεϊνών όπως την HPV E7, αποτελεί πολύ συχνό φαινόμενο στον καρκίνο με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη pRb να μην μπορεί πλέον να αποτελεί τον “πύλη του σημείου R”. Σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα η φωσφορυλίωση της pRb είναι απορρυθμισμένη, με αποτέλεσμα η pRb να είναι ακατάλληλα φωσφορυλιωμένη και κατά συνέπεια λειτουργικά ανενεργή. Σε ορισμένα άλλα καρκινικά κύτταρα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η αποφωσφορυλίωση της pRb, η οποία συνήθως συμβαίνει κατά τη μετάβαση M/G1 μέσω της δράσης της φωσφατάσης PP1, δεν συμβαίνει ποτέ, αφήνοντας την pRb σε υπερφωσφορυλιωμένη και απενεργοποιημένη κατάσταση σε ολόκληρο τον κύκλο ανάπτυξης και διαίρεσης αυτών των κυττάρων. Η απώλεια λειτουργίας του pRb με τους ανωτέρω τρόπους έχει ως συνέπεια τα κύτταρα να εισέρχονται μέσω της φάσης G1 στη φάση S χωρίς να υποβάλλονται στα σημεία ελέγχου που έχουν σχεδιαστεί για να διασφαλίζουν ότι το κύτταρο μπορεί να προχωρήσει μόνο όταν πληρούνται οι κατάλληλες προϋποθέσεις.

Ο έλεγχος της ακεραιότητας του γονιδιώματος αποτελεί μια πολύ ιδιαίτερα σημαντική διαδικασία η οποία πραγματοποιείται κυρίως από την πρωτεΐνη p53. Το γονίδιο p53 είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο και κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που παίζει κυρίαρχο ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA, στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση. Είναι γνωστό και ως «φύλακας του γονιδιώματος» ενώ βρίσκεται μεταλλαγμένο σε πάνω από τους μισούς τύπους καρκίνου. Όταν ένα φυσιολογικό κύτταρο υποστεί μια βλάβη στο DNA, η p53 διακόπτει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και προκαλεί την παραμονή του κυττάρου στη φάση G1 έως ότου ολοκληρωθεί η επιδιόρθωση της βλάβης του γενετικού υλικού. Η διαδικασία διακοπής του κυτταρικού κύκλου επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης του αναστολέα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης 1, της p21, η οποία οδηγεί σε αναστολή των συμπλόκων κυκλίνης με κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση. Σε περίπτωση που δεν επιτυγχάνεται η επιδιόρθωση του γενετικού υλικού και οπότε το κύτταρο δεν πρέπει να εισέλθει στη φάση αναδιπλασιασμού S, η p53 ενεργοποιεί τη διαδικασία κυτταρικού θανάτου μέσω αποπτωτικών μηχανισμών. Το μεγαλύτερο ποσοστό των νεοπλασμάτων παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο της p53 και αυτό έχει ως συνέπεια γενετική αστάθεια και διαταραχή του μηχανισμού της απόπτωσης. Η λειτουργία της p53 όμως εξαρτάται και από την παρουσία

μιας άλλης πρωτεΐνης, της Mdm2 (Mouse double minute 2 homolog). Η Mdm2 είναι ένας πολύ σημαντικός αρνητικός ρυθμιστής της p53. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Mdm2 λειτουργεί ως λιγάση ουβικιτίνης E3 που αναγνωρίζει τον N-τερματικό άκρο (TAD) του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, δεσμεύει τη p53 και αναστέλλει τη μεταγραφή της ενώ παράλληλα προωθεί την αποδόμησή της μέσω του συστήματος ουβικουιτίνης. Σε περίπτωση βλάβης γενετικού υλικού ενεργοποιείται η πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης ATM η οποία εμποδίζει τη δέσμευση της Mdm2 στη p53 μέσω φωσφορυλίωσης, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται το σημείο ελέγχου βλάβης του DNA που οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και επιδιόρθωση της βλάβης ή σε απόπτωση (32).

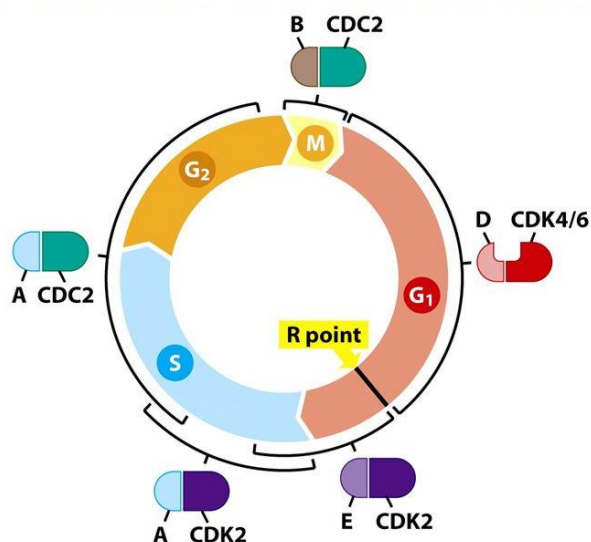
2.1.3 Κυκλίνες, κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs) και σημεία ελέγχου

Η λειτουργία του κυτταρικού κύκλου βασίζεται στη δράση πρωτεϊνικών συμπλόκων αποτελούμενων από κυκλίνες και κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (Cyclin-Dependent Kinases, CDKs). Ο αριθμός των CDKs και των κυκλινών έχει αυξηθεί σημαντικά κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Ωστόσο, μόνο ορισμένα σύμπλοκα CDK-κυκλίνης ελέγχουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

Οι CDKs είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης των οποίων η ενεργότητα εξαρτάται από την αλληλεπίδραση με το ρυθμιστικό υπόστρωμα των κυκλινών και έχουν σταθερή συγκέντρωση κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Οι CDKs παίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο αλλά και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες όπως η μεταγραφή (33).

Αντίθετα, οι κυκλίνες είναι πρωτεΐνες οι οποίες συντίθενται και αποδομούνται σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και σε αυτό το χαρακτηριστικό τους αποδίδεται και η ονομασία τους. Η μόνη εξαίρεση σε αυτές τις καλά προγραμματισμένες διακυμάνσεις στα επίπεδα των κυκλινών παρουσιάζεται από τις κυκλίνες τύπου D. Τα επίπεδα των υπολοίπων τριών, παρόμοια δομημένων κυκλινών δεν βρέθηκε να μεταβάλλονται δραματικά καθώς ένα κύτταρο προχωρά στις διάφορες φάσεις του κύκλου ανάπτυξης και διαίρεσης. Αντίθετα, τα επίπεδα κυκλινών τύπου D ελέγχονται σε μεγάλο βαθμό από εξωκυτταρικά σήματα, ειδικά αυτά που μεταφέρονται από μιτογόνους αυξητικούς παράγοντες. Οι κυκλίνες τύπου D χρησιμεύουν στη μεταφορά σημάτων από το εξωκυτταρικό περιβάλλον στον πυρήνα του κυττάρου και με αυτό τον τρόπο ενημερώνουν το κύτταρο για τις συνθήκες στο περιβάλλον γύρω από το κύτταρο.

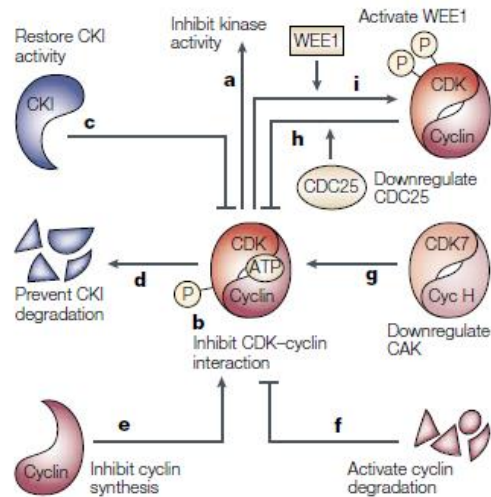
Κατά την διάρκεια της φάσης G1 στα θηλαστικά κύτταρα δύο CDKs με παρόμοια δράση, η CDK4 και η CDK6, δημιουργούν σύμπλοκο με τις κυκλίνες τύπου D (D1, D2 και D3). Μετά το σημείο R, στα τέλη της φάσης G1 οι κυκλίνες τύπου E (E1 και E2) συνδέονται με τη CDK2 ώστε να ενεργοποιήσουν τη φωσφορυλίωση των κατάλληλων υποστρωμάτων που απαιτούνται για την είσοδο στη φάση S (Εικόνα 6). Όταν το κύτταρο εισέρχεται στην φάση S οι κυκλίνες τύπου A (A1 και A2) συνδέονται με την CDK2 ενώ καθώς το κύτταρο οδεύει προς την ολοκλήρωση της φάσης S, η CDK2 αντικαθίσταται από μια πρωτεΐνη του κυτταρικού κύκλου (Cell Division Cycle, CDC), την CDC2 και δημιουργείται το σύμπλοκο A-CDC2. Όσο το κύτταρο προχωρά προς τη G2 φάση, η κυκλίνη B αντικαθιστά την κυκλίνη A και δημιουργείται το σύμπλοκο B-CDC2 το οποίο καθορίζει και τη φάση που ακολουθεί, δηλαδή τη φάση της μίτωσης (34).



Εικόνα 6: Συσχέτιση των συμπλόκων κυκλινών και κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών με τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (32).

Η δραστηριότητα των συμπλόκων ελέγχεται από τα ρυθμιζόμενα επίπεδα συγκέντρωσης των κυκλινών τα οποία διαφέρουν στις διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ένα επιπλέον επίπεδο ελέγχου των συμπλόκων κυκλίνης-CDK αποτελούν οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις των ίδιων των μορίων CDK. Συγκεκριμένα, οι CDKs πρέπει να φωσφορυλιωθούν στα αμινοξέα σερίνης/θρεονίνης για να είναι ενεργά και αυτό πραγματοποιείται από τις CAKs (CDK Activating Kinases). Ταυτόχρονα, πρέπει να απομακρυνθούν οι ανασταλτικές φωσφορυλιώσεις άλλων αμινοξέων από μια κατηγορία φωσφατασών, τις CDC25A, B, C. Τέλος, η δραστηριότητα των συμπλόκων ελέγχεται από μια πολύ σημαντική κατηγορία πρωτεϊνών, τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKIs, CDK Inhibitors).

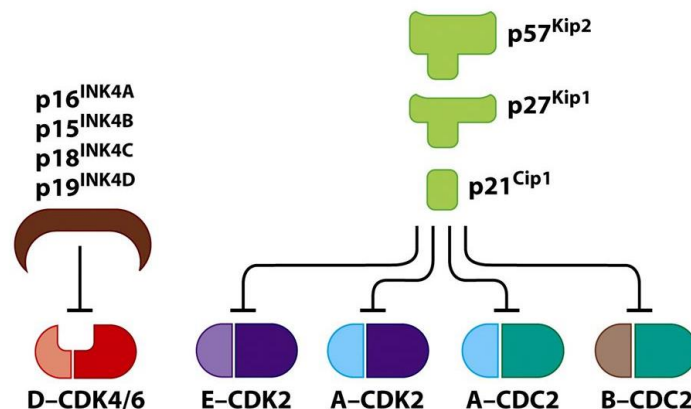
Όλα τα παραπάνω σημεία ελέγχου της ενεργότητας των συμπλόκων κυκλινών-CDKs αποτελούν δυνητικά θεραπευτικούς στόχους οι οποίοι περιλαμβάνουν: αναστολή της δραστηριότητας της CDK, αναστολή της αλληλεπίδρασης κυκλίνης-CDK, ενίσχυση της λειτουργίας των CDKIs με αύξηση των επιπέδων τους ή αναστολή της αποδόμησής τους, αναστολή της σύνθεσης κυκλινών ή επαγωγή της αποδόμησής τους, αναστολή των CAKs ή των CDC25 φωσφατασών και τέλος ενεργοποίηση των ανασταλτικών κινασών (35) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Ρύθμιση των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs) και δυνατότητες θεραπευτικής παρέμβασης (35).

2.1.4 Αναστολείς κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών

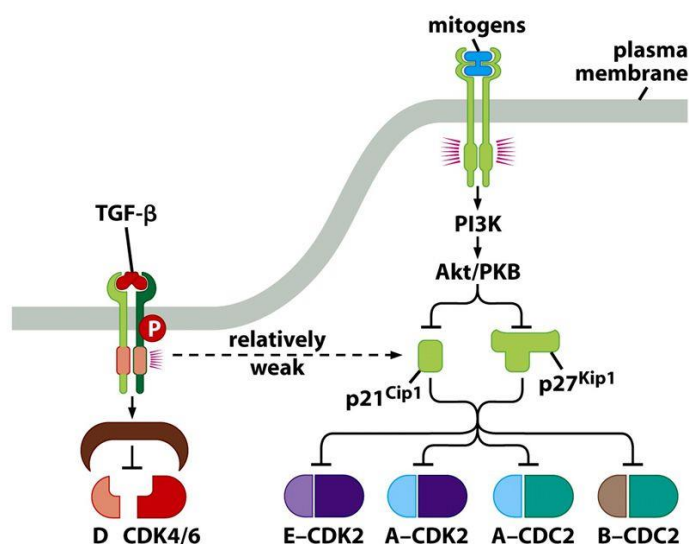
Οι CDKIs είναι πρωτεΐνες οι οποίες διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των συμπλόκων κυκλίνης-CDK. Υπάρχουν δυο ομάδες αναστολέων στον κυτταρικό κύκλο. Μία ομάδα τεσσάρων αναστολέων (INK4 αναστολείς) στην οποία ανήκουν συγκεκριμένα οι $p16^{INK4a}$ (CDKN2A), $p15^{INK4b}$ (CDKNb), $p18^{INK4c}$ (CDKN2c) και $p19^{INK4d}$ (CDKN2d) αναστολείς που στοχεύουν το σύμπλεγμα D-CDK4/6. Η δεύτερη ομάδα αναστολέων (Cip, Kip αναστολείς) περιλαμβάνει τους αναστολείς $p21^{Cip1}$ (CDKN1a), $p27^{Kip1}$ (CDKN1b) και $p57^{Kip2}$ (CDKN1c) οι οποίοι δρουν στα επόμενα στάδια του κυτταρικού κύκλου και αναστέλλουν τα σύμπλοκα E-CDK2, A-CDK2, A-CDC2 και B-CDC2 (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Δράσεις των αναστολέων κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών στα σύμπλοκα κυκλινών-CDKs (32).

Ένας παράγοντας όπως ο TGF-β (Transforming Growth Factor beta) μπορεί να προκαλέσει στα κύτταρα έναν αριθμό αποκρίσεων που ανταγωνίζονται τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Μεταξύ αυτών είναι σημαντικές αυξήσεις στα επίπεδα του αναστολέα p15, ο οποίος εμποδίζει τον σχηματισμό νέων συμπλόκων κυκλίνης D-CDK4/6 και αναστέλλει αυτά που έχουν ήδη σχηματιστεί. Χωρίς τα ενεργά σύμπλοκα κυκλίνης D-CDK4/6, το κύτταρο δεν μπορεί να εισέλθει και να προχωρήσει στις αρχές και τα μέσα του G1 και να φτάσει στο σημείο R. Μόλις ένα κύτταρο περάσει από το σημείο R, οι ενέργειες των συμπλόκων κυκλίνης D-CDK4/6 παύουν να είναι πλέον χρήσιμες και δεν υπάρχει ανάγκη για τον εκ νέου σχηματισμό τους. Ο TGF-β, αν και ασθενώς επάγει και τον αναστολέα p21. Τα επίπεδα του αναστολέα p21 μπορεί να αυξηθούν πολύ όταν το κύτταρο βρίσκεται σε στρες, όπως για παράδειγμα όταν υπάρχει βλάβη στο γονιδίωμα. Όσο η βλάβη δεν διορθώνεται, ο p21 θα αναστέλλει τη δραστηριότητα των ήδη σχηματισμένων συμπλόκων κυκλίνης-CDK, όπως τα E-CDK2, A-CDK2, A-CDC2 και B-CDC2. Μόλις επιδιορθωθεί η ζημιά, η αναστολή του p21 διακόπτεται. Αυτός ο μηχανισμός ελέγχου του κυτταρικού κύκλου έχει ιδιαίτερη σημασία στη φάση G1 γιατί διασφαλίζει ότι το κύτταρο δεν θα εισέλθει στην φάση S και δεν θα αντιγράψει αλληλουχίες DNA που έχουν υποστεί βλάβη έως ότου αυτή αποκατασταθεί.

Ενώ οι βλάβες του DNA και, σε πολύ μικρότερο βαθμό, ο παράγοντας TGF-β μπορεί να προκαλέσουν αυξήσεις στα επίπεδα του αναστολέα p21 (εμποδίζοντας έτσι την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου), τα μιτογόνα ενεργούν με αντίθετο τρόπο και ευνοούν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Στην περίπτωση των μιτογόνων, ο μηχανισμός λειτουργίας εξαρτάται από το μονοπάτι της κινάσης φωσφατιδυλινωσιτόλης 3-κινάσης (PI3K, Phosphatidylinositol-3 Kinase), η οποία ενεργοποιείται άμεσα ή έμμεσα από τα μιτογόνα που διεγείρουν πολλούς υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (Εικόνα 9). Συγκεκριμένα, η PI3K ενεργοποιεί την κινάση Akt/PKB (Protein Kinase B), η οποία στην συνέχεια φωσφορυλιώνει μόρια του αναστολέα p21^{Cip1} που βρίσκονται στον πυρήνα, προκαλώντας έτσι την εξαγωγή τους στο κυτταρόπλασμα, όπου δεν μπορούν πλέον να αναστείλουν τα σύμπλοκα κυκλίνης-CDK. Ομοίως, η Akt/PKB φωσφορυλιώνει τον αναστολέα p27^{Kip1} (που λειτουργεί σαν τον p21^{Cip1}) και εμποδίζει την εξαγωγή του από την κυτταροπλασματική θέση σύνθεσης στον πυρήνα. Αυτές οι επιδράσεις στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό μπορεί να έχουν κλινικές συνέπειες.

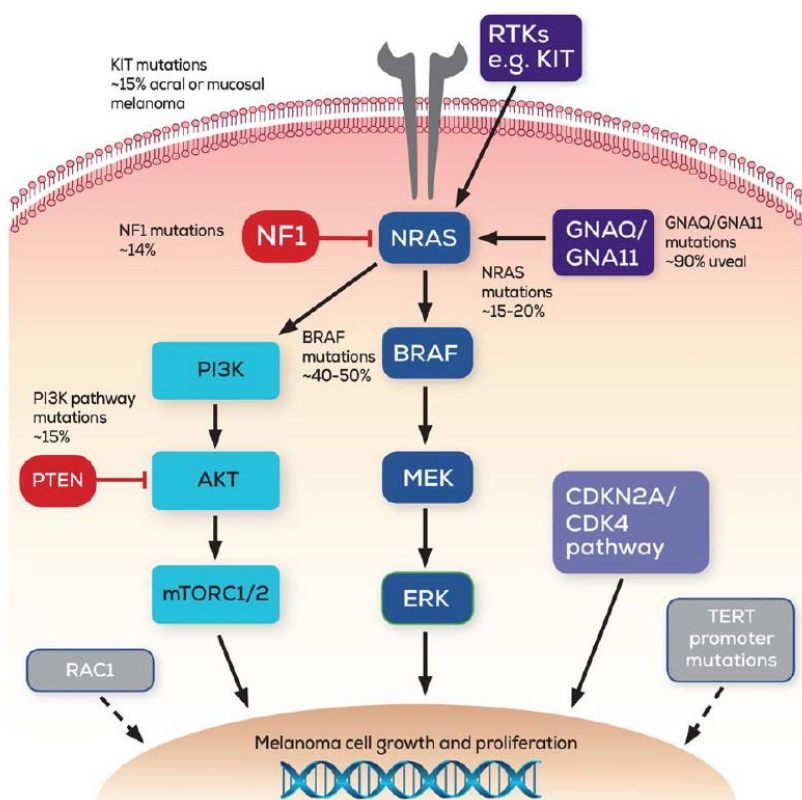


Εικόνα 9: Έλεγχος κυτταρικού κύκλου κατά την επίδραση εξωκυτταρικών παραγόντων.

2.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια και συχνότητα μεταλλάξεων στο μελάνωμα.

Στο μελάνωμα, η συχνότητα των σωματικών μεταλλάξεων κυμαίνεται από 0,1-100/Mb, αλλά συνολικά έχει την υψηλότερη συχνότητα μετάλλαξης συγκριτικά με όλους τους τύπους καρκίνων που αναλύθηκαν στη μελέτη των Alexandron et al. (36). Η μεταβλητότητα στη συχνότητα μετάλλαξης στο μελάνωμα μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία ή απουσία ενός καρκινογόνου παράγοντα, όπως η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Με βάση την εκτεταμένη έρευνα που αρχικά εστιάστηκε σε κυτταρογενετική ανάλυση πολλών μελανοκυτταρικών βλαβών που, αργότερα επιβεβαιώθηκε από την γενομική ανάλυση υψηλής ακρίβειας (CGH), διαπιστώθηκε ότι ο βαθμός ανιχνεύσιμων γενετικών αλλοιώσεων αυξάνεται δραματικά κατά τη διάρκεια της εξέλιξης από σπίλο σε πρωτογενές μελάνωμα και σε μεταστατικό μελάνωμα. Μετά από χρόνια τέτοιων αναλύσεων έχει εντοπιστεί σημαντικός αριθμός γονιδίων και μονοπατιών που έχουν αποδειχθεί κρίσιμα για την ανάπτυξη μελανώματος (Εικόνα 10). Ακολουθεί η αναφορά των πιο σημαντικών γονιδίων και μονοπατιών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του μελανώματος.



Εικόνα 10: Σηματοδοτικά μονοπάτια και συχνότητα μεταλλάξεων στο μελάνωμα (37).

Αναστολέας κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης 2A-(CDKN2A)

Γενετικές αναλύσεις σε οικογένειες που εμφάνιζαν γενετική προδιάθεση για την ανάπτυξη μελανώματος οδήγησε στην ανίχνευση του γονιδιακού τόπου (locus) CDKN2A στη χρωμοσωμική θέση 9p21. Ο γονιδιακός τόπος CDKN2A παρουσιάζει απώλεια ετεροζυγωτίας (Loss of Heterozygosity, LOH) και μεταλλάξεις με απώλεια λειτουργικότητας στο 25-40% των οικογενών μελανωμάτων ενώ η συχνότητα είναι μικρότερη στο σποραδικό μελάνωμα. Ο γονιδιακός τόπος CDKN2A κωδικοποιεί δυο πρωτεΐνες εντός δυο αλληλοεπικαλυπτόμενων DNA αλληλουχιών: των p16^{INK4a} και p14^{ARF}. Παρόλο που οι γενετικές ελλείψεις σε αυτή τη περιοχή απενεργοποιούν και τις δυο πρωτεΐνες στο μελάνωμα, υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις όπου επηρεάζεται η έκφραση της μόνο μιας από τις δυο πρωτεΐνες, υποδεικνύοντας ότι η κάθε μια έχει ξεχωριστό και διακριτό ρόλο στη μελανογένεση (38).

Τα p16^{INK4a} και p14^{ARF} λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια. Συγκεκριμένα, το p16^{INK4a} λειτουργεί ως αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. Δεσμεύεται στην κινάση CDK4 και CDK6, αποτρέποντας τη σύνδεσή του με τη κυκλίνη τύπου D και αναστέλλοντας την ικανότητά του να φωσφορυλιώσει και να απενεργοποιήσει την πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος pRB η οποία με τη σειρά της ρυθμίζει την έναρξη της φάσης S του κυτταρικού κύκλου. Αυτό είναι ένα κρίσιμο μονοπάτι στην μελανογένεση καθώς έχει παρατηρηθεί καταστολή έκφρασης της πρωτεΐνης p16^{INK4a} μέσω μεθυλίωσης, μεταλλάξης και/ή πολυμορφικών μεταβολών στις 5' και 3' UTR περιοχές (38). Επιπλέον έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στην κινάση CDK4 σε ασθενείς με μελάνωμα που αποτρέπουν την δέσμευση της p16^{INK4a} στη κινάση CDK4, ενίσχυση της έκφρασης (amplification) στο γονίδιο CCND1 που κωδικοποιεί την κυκλίνη D1 και μεταλλάξεις στο γονίδιο RB1 (RetinoBlastoma 1) (39).

Το p14^{ARF} λειτουργεί ως θετικός ρυθμιστής της p53. Στοχεύει την αποδόμηση της HDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog) η οποία αποσταθεροποιεί την p53. Η p53 είναι μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο λόγω βλάβης του DNA ή άλλου τύπου στρες ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου (40) και τις περιστάσεις. Το p53 είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στον καρκίνο, αλλά στο μελάνωμα είναι ένας σπάνιος στόχος όπου εκτιμάται ότι λιγότερο από το 10% των μελανωμάτων έχει μεταλλαγή στο p53 (41,42).

Κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση 4 (CDK4)

Οι γενετικές μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα 12q14 στον γονιδιακό τόπο CDK4 είναι ογκογονικές λόγω των επιδράσεών τους στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου μέσω του ίδιου μονοπατιού με το p16^{INK4a}. Δύο μεταλλάξεις έχουν αναγνωριστεί στο κωδικόνιο 24 του εξονίου 2 (R24C και R24H) στον τόπο CDK4, και οι δύο έχουν ως αποτέλεσμα η πρωτεΐνη CDK4 να δρα ως κυρίαρχη ογκοπρωτεΐνη λόγω της απώλειας σύνδεσης στο p16^{INK4a}, που είναι ο αρνητικός ρυθμιστής της. Ο CDK4 μεταλλάσσεται ή ενισχύεται σε μόνο 5% των μελανωμάτων. Υψηλότερης συχνότητας μεταλλάξεις παρατηρούνται σε ασθενείς με όγκους BRAF, NRAS και NF1 τριπλού άγριου τύπου (43).

BAP1 (BRCA1-Associated Protein 1)

Το BAP1 είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3p21. Γενετικές μεταλλάξεις απενεργοποίησης σε αυτόν τον γονιδιακό τόπο εντοπίστηκαν αρχικά σε δύο διαφορετικά σύνδρομα. Το ένα σύνδρομο χαρακτηρίζεται από οικογενές μεσοθηλίωμα και

οφθαλμικό μελάνωμα (44) και το άλλο από δερματικό και οφθαλμικό μελάνωμα (45). Περίπου 5% των σποραδικών δερματικών μελανωμάτων έχουν απενεργοποιημένο το BAP1.

Σηματοδοτικό μονοπάτι PTEN-AKT

Το PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10, μια περιοχή που σχετίζεται με ελλείψεις και απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) στο μελάνωμα, και φυσιολογικά δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Το PTEN είναι μια διπλή φωσφατάση, που διαθέτει δραστηριότητα λιπιδικής φωσφατάσης και πρωτεϊνικής φωσφατάσης (46). Τα εξοκυτταρικά σήματα ανάπτυξης συχνά διαμεσολαβούνται μέσω του ενδοκυτταρικού λιπιδίου PIP3, τα επίπεδα του οποίου αυξάνονται κατά τη σηματοδότηση μέσω του RBK, με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του AKT. Η λιπιδική φωσφατάση PTEN ανταγωνίζεται την PI3K αποφωσφορυλιώνοντας το PIP3 και επομένως ρυθμίζει αρνητικά τη δραστηριότητα της AKT, βοηθώντας στον έλεγχο τόσο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όσο και της επιβίωσης. Μεταλλάξεις ή ελλείψεις του PTEN μπορούν να βρεθούν σε περίπου 28% των κυτταρικών σειρών μελανώματος, 7% των πρωτοπαθών μελανωμάτων και 15% του μεταστατικού μελανώματος (47) προκαλώντας παρατεταμένη φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση του AKT. Επιπλέον, η υπερέκφραση της AKT3 συσχετίζεται με αυξημένο αριθμό αντιγράφων του DNA σε κάποια μελανώματα (48).

Σηματοδοτικό μονοπάτι WNT/β-κατενίνης

Η β-κατενίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο CTNNB1 και είναι βασικός ρυθμιστής του σηματοδοτικού μονοπατιού WNT. Είναι τεκμηριωμένη η συμμετοχή της στην εξέλιξη πολλών τύπων καρκίνου (49,50) καθώς επίσης και στη φυσιολογική διαφοροποίηση των μελανοκυττάρων από νευρικά προγονικά κύτταρα. Σε περίπτωση απουσίας της σηματοδότησης WNT, η β-κατενίνη οδηγείται σε αποδόμηση σε συνδυασμό με ένα σύμπλεγμα που περιλαμβάνει την APC (Adenomatous Polyposis Coli) και την GSK3β (Glycogen Synthase Kinase 3β). Κατά τη σηματοδότηση WNT, η β-κατενίνη σταθεροποιείται, συσσωρεύεται και μεταφέρεται στον πυρήνα όπου συνδέεται με την LEF1 (Lymphoid Enhancer binding Factor 1) και δρα ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής των γονιδίων στόχων της LEF1. Στα γονίδια-στόχους συμπεριλαμβάνονται το πρωτοογκογονίδιο MYC, το CCND1 και το γονίδιο που κωδικοποιεί το MITF (Melanocyte Inducing Transcription Factor) (50). Μεταλλάξεις έχουν ανιχνευθεί στο CTNNB1 που προσδίδουν αντίσταση στην αποδόμηση της β-κατενίνης σε 2-23% των ιστών με μελάνωμα και των κυτταρικών σειρών σε *in vitro* πειράματα (51,52). Η β-κατενίνη έχει επίσης αποδειχθεί ότι καταστέλλει τη μεταγραφή του p16^{INK4a} (53).

BRAF

Σύμφωνα με δημοσίευση των Davies και συν. (54), το 66% των μελανωμάτων έχουν μεταλλαγμένο το BRAF. Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώθηκαν και σε μελανοκυτταρικούς σπύλους όπου περίπου το 80% είχε μεταλλάξεις στο BRAF, συμπεριλαμβανομένων των καλοήθων σπύλων (55). Η πιο συχνή μετάλλαξη του BRAF είναι η V600E και παρατηρείται σε περισσότερο από το 90% των μεταλλάξεων στα μελανώματα. Η μετάλλαξη V600E εισάγει μια διαμορφωτική αλλοίωση στον τομέα ενεργοποίησης (activation domain) του BRAF, προκαλώντας συνεχή ενεργοποίηση της κινάσης (56). Οι λιγότερο συχνές μεταλλάξεις στο BRAF περιλαμβάνουν τις V600K, V600R και V600M, που αποτελούν το 11-20%, 2-5% και 1-4% των μεταλλάξεων BRAF αντίστοιχα. Άλλες, μη-V600 αλλοιώσεις στο BRAF εμφανίζονται στο περίπου 5% όλων των μελανωμάτων, συνήθως στα κωδικόνια 466, 469,

597 και 601, και στις συντήξεις του BRAF. Η BRAF είναι μέλος της οικογένειας των RAF γονιδίων (ARAF, BRAF, CRAF) και είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που ενεργοποιεί διαδοχικά την MEK1/2 και στη συνέχεια την ERK1/2 η οποία επάγει την κυτταρική ανάπτυξη και αναστέλλει την απόπτωση (57). Τα μελανώματα που εμφανίζονται στο δέρμα με διαλείπουσα έκθεση στον ήλιο είναι πιο πιθανό να έχουν μετάλλαξη BRAF σε σχέση με τα μελανώματα σε χρόνια έκθεση στον ήλιο, μη εκτεθειμένο στον ήλιο δέρμα ή μελανώματα του βλεννογόνου (58). Άλλα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά που έχουν συσχετιστεί με μεταλλαγμένο μελάνωμα BRAF περιλαμβάνουν νεότερη ηλικία, επιφανειακή εξάπλωση ή οζώδες μελάνωμα και παρουσία μιτώσεων.

Η σχέση μεταξύ των μελανοκυτταρικών σπύλων και της ανάπτυξης του μελανώματος δεν είναι πλήρως κατανοητή. Οι μεταλλάξεις BRAF βρέθηκαν στο 70-80% των σπύλων και τείνουν να εμφανίζονται συχνότερα σε μελανώματα που προκύπτουν από προϋπάρχοντες σπύλους. Ωστόσο, η πλειονότητα των σπύλων δεν θα προχωρήσει σε μελάνωμα. Οι μεταλλάξεις BRAF είναι συχνές σε μελανοκυτταρικούς σπύλους και μελανώματα κάθετης ανάπτυξης, αλλά σπάνια σε μελανώματα ακτινικής ανάπτυξης και σε *in situ* (55). Έτσι, ενώ οι μεταλλάξεις BRAF οδηγούν σαφώς στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του μελανώματος, δεν επαρκούν από μόνες τους για να προκαλέσουν μελανώματα. Η μελανογένεση απαιτεί συνεργασία μεταξύ μεταλλαγμένου BRAF και άλλων οδών.

NRAS

Η οικογένεια RAS περιλαμβάνει τρία πρωτογενή πρωτο-ογκογόνα: NRAS, KRAS και HRAS, που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την απόπτωση. Οι μεταλλάξεις NRAS ενεργοποιούν συστατικά τις οδούς σηματοδότησης MAPK, PI3K και άλλων κυτταρικών τύπων που προκαλούν ανάπτυξη κυττάρων, πολλαπλασιασμό και δυσλειτουργία του κυτταρικού κύκλου. Οι μεταλλάξεις NRAS εμφανίζονται σε >20% των ασθενών με δερματικό μελάνωμα, συνηθέστερα στο κωδικόνιο 61 και λιγότερο συχνά στα κωδικόνια 12 και 13 (43). Τα μελανώματα με μεταλλάξεις NRAS σχετίζονται με επιθετική κλινική πορεία και κακή πρόγνωση. Εμφανίζονται πιο συχνά σε δέρμα που δεν εκτίθεται στον ήλιο. Η RAF αποτελεί μεταγενέστερο στόχο της οικογένειας των RAS (NRAS, HRAS, KRAS) και μελανώματα που φέρουν μετάλλαξη στο BRAF γονίδιο, σπάνια έχουν και το RAS γονίδιο μεταλλαγμένο (54).

RTKs (Receptor Tyrosine Kinases)

Οι υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (RTKs) παίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση σχεδόν όλων των βασικών κυτταρικών διεργασιών υπό φυσιολογικές συνθήκες και έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη των περισσότερων καρκίνων. Στο μελάνωμα έχουν παρατηρηθεί αρκετές σημειακές μεταλλαγές και αυξημένος αριθμός DNA αντιγράφων (DNA copy number gains) που σχετίζονται με RTKs. Στη περίπτωση των μελανωμάτων προχωρημένου σταδίου παρατηρούνται αυξημένα αντίγραφα περιοχών του χρωμοσώματος 7, τα οποία κωδικοποιούν τον υποδοχέα του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGFR) στη χρωμοσωμική περιοχή 7p12 σε συνδυασμό με ενισχυμένη έκφραση του EGFR (38). Μια άλλη περιοχή του χρωμοσώματος 7 που εμφανίζει αυξημένο αριθμό αντιγράφων σε μελάνωμα προχωρημένου σταδίου σχετίζεται με το γονίδιο MET. Το γονίδιο MET κωδικοποιεί τον RTK HGF (Hepatocyte Growth Factor) του οποίου η έκφραση είναι αυξημένη στο μεταστατικό μελάνωμα (59).

Σημειακές μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τον υποδοχέα EGFR ή τον MET δεν έχουν βρεθεί στο μελάνωμα ακόμα. Έχει αναφερθεί όμως μια επαναλαμβανόμενη μετάλλαξη στο KIT, η L576P στο εξόνιο 11, για μικρό αριθμό μελανωμάτων της τάξης του 1-3%, που οδηγεί σε ενίσχυση και/ή επιλεκτική απώλεια του φυσιολογικού αλληλίου (6). Το KIT είναι ένας RTK που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτό ενεργοποιεί την πρωτεΐνη KIT με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πολλαπλών οδών σηματοδότησης που επηρεάζουν την ανάπτυξη των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη μετανάστευση. Μεταλλάξεις στο KIT συμβαίνουν συχνότερα σε μελανώματα των άκρων ή του βλεννογόνου και σε περιοχές χρόνιας βλάβης από τον ήλιο. Αποτελεί ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα μελανώματα που έχουν μετάλλαξη στο KIT δεν φέρνουν BRAF μεταλλάξεις.

NF1 (Neurofibromatosis type I)

Το γονίδιο της νευροϊνωμάτωσης τύπου 1, NF1, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ενεργοποίησης GTPase που μειώνει τη σηματοδότηση MAPK με μείωση της δραστηριότητας RAS ενώ μεταλλάξεις και/ή απώλεια του NF1 οδηγεί σε ενεργοποίηση του MAPK. Οι μεταλλάξεις NF1 αποτελούν το τρίτο πιο συχνό υπότυπο μελανώματος και εμφανίζονται στο 14% των δειγμάτων μελανώματος TCGA, συμπεριλαμβανομένων έως και 70% των δειγμάτων άγριου τύπου (wild type) BRAF/NRAS. Οι περισσότερες μεταλλάξεις NF1 οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας αυτού του ογκοκατασταλτικού γονιδίου και περίπου το 80% των ασθενών παρουσιάζουν σιωπηλές μεταλλάξεις, ένθεση ή έλλειψη που οδηγεί σε περικομμένη πρωτεΐνη (37).

TERT (Telomerase Reverse Transcriptase)

Η αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης (TERT ή hTERT σε ανθρώπους) είναι μια καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου τελομεράση, η οποία, μαζί με το συστατικό τελομεράσης RNA (Telomerase RNA Component, TERC), αποτελεί την πιο σημαντική μονάδα του συμπλέγματος τελομεράσης.

Οι μεταλλάξεις στο TERT είναι μοναδικές καθότι συνήθως εμφανίζονται στον υποκινητή, παρά στην κωδική περιοχή, οδηγώντας σε αυξημένη γονιδιακή έκφραση. Αυτές οι μεταλλάξεις εμφανίζονται στα περισσότερα μελανώματα, συμπεριλαμβανομένου του 69% όλων των μελανωμάτων και 86% των δερματικών μελανωμάτων (60). Οι TERT μεταλλάξεις (C>T ή CC>TT) έχουν συσχετιστεί με το υπεριώδες φως, και σε πρόσφατη μελέτη προσδίδουν κακή πρόγνωση (διάμεση συνολική επιβίωση 80 έναντι 291 μήνες), αν και δεν συσχετίστηκαν με το μήκος των τελομερών (61).

GNAQ/GNA11 (Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha/Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11)

Μεταλλάξεις στις GNAQ/GNA11 πρωτεΐνες εμφανίζονται σχεδόν στο 90% των οφθαλμικών μελανωμάτων και περιστασιακά σε άλλα μελανώματα (62,63). Αυτές οι μεταλλάξεις ενεργοποιούν τη σηματοδότηση MAPK και PI3K/AKT, πιθανότατα μέσω RasGRP3 και πρωτεϊνικής κινάσης C (64).

Μεταγραφικοί Παράγοντες

Το 10% των πρωτοπαθών μελανωμάτων και το 20% των μεταστατικών παρουσιάζουν ενίσχυση του μεταγραφικού παράγοντα MITF (65). Ο MITF είναι ένας παράγοντας που απαιτείται για τη μετατροπή των “ανώριμων κυττάρων” σε μελανοκύτταρα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και εμπλέκεται στην επιβίωση, την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των μελανοκυττάρων (66).

Τα μελανώματα που δείχνουν αντίσταση στους αναστολείς της BRAF έχει αποδειχθεί ότι υπερεκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα MITF, ενώ περαιτέρω πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η μείωση της έκφρασης του MITF ανέστρεψε αυτήν την αντίσταση (67). Ο μεταγραφικός παράγοντας TBX2 (T-Box transcription factor 2), ο οποίος αναστέλλει την έκφραση του p14^{ARF} και του p21^{Cip1} εμφανίζει αυξημένο αριθμό γονιδιακών αντιγράφων και υπερέκφραση στο μελάνωμα (68,69). Επίσης στα μελανώματα αναφέρεται αύξηση κατά 40% στον αριθμό γονιδιακών αντιγράφων του μεταγραφικού παράγοντα MYC (41). Μία πρόσφατη πειραματική μελέτη έδειξε ότι η υπερέκφραση του MYC στα μελανώματα συσχετίζεται με αυξημένο ρυθμό μετάστασης του όγκου (70).

RAC 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)

Η RAC1 είναι μια μικρή (~21 kDa) πρωτεΐνη και πιο συγκεκριμένα έχει δραστηριότητα GTPάσης και είναι μέλος της οικογένειας των Rho GTPases. Μαζί με άλλες υποοικογένειες πρωτεϊνών Rac και Rho, ασκούν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο ειδικά στην κινητικότητα των κυττάρων αλλά και στην ανάπτυξη των κυττάρων. Οι μεταλλάξεις στο RAC1 εμφανίζονται στο 10% περίπου των μελανωμάτων που εκτίθενται στον ήλιο και τείνουν να συνυπάρχουν με μεταλλάξεις BRAF ή NRAS. In vitro μελέτες υποδηλώνουν ότι η κύρια μετάλλαξη, RAC1 P29S, ενεργοποιεί τις μεταγενέστερες οδούς σηματοδότησης, προωθώντας έτσι τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση (migration) (71). Μεταγενέστερες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η μετάλλαξη μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση του PD-L1 και να προκαλέσει αντίσταση στους αναστολείς BRAF και MEK (72,73).

Γονίδιο προ-μετάστασης NEDD9

Γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικού ανθρώπινου μελανώματος χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί η λειτουργία του γονιδίου NEDD9 (Neural precursor cell expressed Developmentally Down-regulated protein 9). Διαπιστώθηκε ότι το NEDD9 παρέχει ενισχυμένη διεισδυτικότητα και μεταστατικό δυναμικό σε μελανοκύτταρα. Επιπλέον βρέθηκε ότι το NEDD9 διευκολύνει τη μετάσταση μέσω της αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη FAK (74).

2.3 Μελάνωμα: Συνέπεια ομοιοστατικής διαταραχής

Τα μελανοκύτταρα ζουν σε δυναμική και αρμονική ισορροπία με το περιβάλλον τους, το οποίο περιλαμβάνει κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά και κύτταρα του ανοσοποιητικού, καθώς και συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας. Συγκεκριμένα,

μελανοκύτταρα και κερατινοκύτταρα συνδέονται μεταξύ τους στη βασική στοιβάδα της επιδερμίδας. Κάθε μελανοκύτταρο έρχεται σε επαφή και στέλνει μελανοσώματα που περιέχουν χρωστική σε δεκάδες κερατινοκύτταρα, μια διαδικασία που μπορεί να αλλάξει δραματικά με την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τα κερατινοκύτταρα ρυθμίζουν την ανάπτυξη και τη συμπεριφορά των μελανοκυττάρων μέσω της δραστηριότητας των μορίων προσκόλλησης των κυττάρων και αυξητικών παραγόντων (75). Η έναρξη και η εξέλιξη του μελάνωματος σηματοδοτεί μια σημαντική διαταραχή σε αυτήν την ήρεμη ομοιόσταση, που περιλαμβάνει βασικές αλλαγές στο γονιδίωμα των μελανοκυττάρων και στον τρόπο με τον οποίο αυτά τα μελανοκύτταρα αναπτύσσονται, επιβιώνουν και αλληλεπιδρούν με το μικροπεριβάλλον τους.

2.3.1 Απορρύθμιση της έκφρασης των μελανοκυττάρων

Αρκετές μελέτες ανίχνευσαν πολλαπλές αλλαγές σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης καθώς τα μελανοκύτταρα μετατρέπονται σε κύτταρα μελάνωματος και περαιτέρω σε μεταστατικό μελάνωμα (76,77). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) προκαλεί σημαντικές αλλαγές στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης των μελανοκυττάρων (78). Στο μελάνωμα οι αλλαγές στην έκφραση παρατηρούνται σε διάφορα επίπεδα. Πρώτον, η έκφραση πολλών σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να μεταβληθεί στο μελάνωμα συμπεριλαμβανομένων των MITF, LEF1/β-κατενίνη, TBX2, MYC, PAX3 (Paired Box 3), SOX10 (SRY-related HMG-box 10) και SLUG. Αυτοί οι παράγοντες μεταγραφής όχι μόνο συμβάλλουν στη ρύθμιση της έκφρασης μιας πληθώρας μεταγενέστερων στόχων, αλλά μπορεί να επηρεάσουν ο ένας την έκφραση του άλλου, αποδεικνύοντας έτσι την πολυπλοκότητα αυτού του ρυθμιστικού δικτύου. Η τροποποίηση της χρωματίνης είναι ένα άλλο επίπεδο γονιδιακής ρύθμισης που παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη όγκων, συμπεριλαμβανομένου του μελάνωματος (79). Οι κυριότερες επιγενετικές αλλαγές που παρατηρούνται είναι η μεθυλίωση του DNA και οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις των ιστονών όπως η μεθυλίωση, φωσφορυλίωση και ουβικουιτίνωση. Μια πολύ σημαντική κατηγορία γονιδιακής ρύθμισης είναι και τα microRNAs, μικρά μόρια RNA περίπου 22 νουκλεοτιδίων, τα οποία ρυθμίζουν τα αγγελιαφόρα RNA μέσω αποσιώπησης ή αποδόμησης. Συνεπώς τα microRNAs μπορεί να έχουν ογκογόνα ή ογκοκατασταλτική δράση ανάλογα με το γονίδιο στόχο που ρυθμίζουν. Στο μελάνωμα έχει εντοπιστεί αρκετά μεγάλος αριθμός microRNAs όπου η δυσλειτουργία τους έχει επίπτωση στη γονιδιακή έκφραση και με αυτό τον τρόπο επηρεάζονται σημαντικά μονοπάτια (80). Μια άλλη κατηγορία ρυθμιστικών RNA αποτελούν τα lncRNAs, με μήκος περίπου 200 νουκλεοτιδίων, τα οποία διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο πολλαπλασιασμό, επιβίωση, μετανάστευση και στη σταθερότητα του γονιδιώματος. Οποιαδήποτε δυσλειτουργία στην έκφραση των lncRNAs συνδέεται με πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του μελάνωματος (81). Συμπερασματικά, οι γενετικές και επιγενετικές αλλαγές συμβάλλουν στη διαταραχή της φυσιολογικής ομοιόστασης των μελανοκυττάρων καθώς κινούνται προς την κακοήθεια.

2.3.2 Απορρύθμιση του πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των μελανοκυττάρων

Βασικός ρυθμιστής της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού των μελανοκυττάρων αποτελεί ο μεταγραφικός παράγοντας MITF. Ο παράγοντας MITF ρυθμίζει όλα τα γνωστά γονίδια που εμπλέκονται στο μελάνωμα όπως το TYR (Tyrosinase), DCT (Dopachrome Tautomerase) και TYRP1 (Tyrosinase Related Protein 1). Ρυθμίζει επίσης την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την επιβίωση των μελανοκυττάρων όπως τη BCL2 (B-cell lymphoma-2) και είναι απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό των μελανοκυττάρων. Μπορεί είτε να ενισχύσει είτε να εμποδίσει τον πολλαπλασιασμό των μελανοκυττάρων ανάλογα με το επίπεδο έκφρασής του ή τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που έχει υποστεί (66). Στο μελάνωμα έχουν ανιχνευτεί γονδιακές ενισχύσεις ή μεταλλάξεις του παράγοντα MITF που επηρεάζουν σημαντικά τη λειτουργία του (82).

Ο έλεγχος του πολλαπλασιασμού των μελανοκυττάρων, όπως και όλων των τύπων κυττάρων, γίνεται μέσω ρύθμισης της διέλευσης μέσω του κυτταρικού κύκλου. Η είσοδος των μελανοκυττάρων στο κυτταρικό κύκλο προωθείται από αυξητικούς παράγοντες όπως FGF2 (Fibroblast Growth Factor-2), HGF, KITLG (KIT Ligand), EDN3 (Endothelin 3), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) και WNT. Στη συνέχεια ενεργοποιούνται διαδοχικά μονοπάτια σηματοδότησης που βοηθούν το κύτταρο να εισέλθει από το σημείο ελέγχου G1/S του κυτταρικού κύκλου. Η απορρύθμιση αυτών των πολύ σημαντικών μονοπατιών συμβάλλουν στη εξέλιξη του μελανώματος. Επιπλέον, τα κύτταρα μελανώματος συχνά ξεκινούν αυτά τα σημαντικά μονοπάτια που οδηγούν στο πολλαπλασιασμό του κυττάρου ανεξάρτητα από τον αυξητικό παράγοντα, με διάφορους τρόπους όπως για παράδειγμα ενεργοποιώντας μεταλλάξεις σε RTKs όπως το KIT.

Επιπλέον, ένα κρίσιμο μονοπάτι που διαταράσσεται στο μελάνωμα είναι αυτό του MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Έχει αποδειχθεί ότι στο μελάνωμα παρατηρούνται περισσότερο NRAS μεταλλάξεις οι οποίες επηρεάζουν τη GTPase δραστηριότητα του RAS που οδηγεί σε μια σταθερά ενεργοποιημένη G-πρωτεΐνη και έναν απορρυθμισμένο έλεγχο ανάπτυξης. Ομοίως, η πιο κοινή μετάλλαξη του BRAF στα μελανώματα, η V600E, οδηγεί επίσης σε κατάσταση διαρκούς ενεργοποίησης του μονοπατιού. Οι μεταλλάξεις των NRAS και BRAF είναι οι πιο συχνές στο μελάνωμα και κυμαίνονται από 80-90%. Επειδή το BRAF και το NRAS μπορεί να ανιχνευθεί σε σπίλους θεωρείται ότι αυτές οι μεταλλάξεις είναι πρώιμα συμβάντα στη μελανογένεση (83).

Μερικές φορές τα κύτταρα εισέρχονται σε μια μη αναστρέψιμη κατάσταση διακοπής της ανάπτυξης που ονομάζεται γήρανση (senescence). Η κυτταρική γήρανση μπορεί να επαχθεί μέσω δυο μηχανισμών, αυτό της πολλαπλασιαστικής γήρανσης ή αναπλαστική γήρανση (replicative senescence) όπου εμφανίζεται μετά από εκτεταμένο πολλαπλασιασμό και σχετίζεται με την μείωση των τελομερών και εκείνο που επάγεται μέσω της ενεργοποίησης ογκογονιδίων. Τα καρκινικά κύτταρα όμως έχουν την ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται διαρκώς και επομένως πρέπει να χρησιμοποιήσουν έναν μηχανισμό για να ξεπεράσουν τη μείωση του τελομερούς και τη γήρανση. Ένας μηχανισμός που συχνά αξιοποιείται από τα καρκινικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων μελανώματος είναι η επανενεργοποίηση της έκφρασης της τελομεράσης. Όσον αφορά τον μηχανισμό αντιμετώπισης της πρώιμης γήρανσης που προκαλείται από ογκογόνα, έχουν εμπλακεί ένας αριθμός παραγόντων, ιδίως των p16^{INK4a}-CDK4/6 και ARF-HDM2-p53 και ειδικότερα του γονδιακού τύπου CDKN2A. Το p16^{INK4a} θεωρείται ένα βασικό γονίδιο γήρανσης των

μελανοκυττάρων. Η BRAF^{V600E} επάγει την έκφραση του p16^{INK4a} και έχει βρεθεί ότι σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια η έλλειψη του p16^{INK4a} οδηγεί σε μελανογένεση (84,85). Το p19^{ARF} είναι εξίσου σημαντικό για τη γήρανση των μελανοκυττάρων επισημαίνοντας τη σημασία της ταυτόχρονης απώλειας της λειτουργικότητας των p16^{INK4a} και p19^{ARF} όταν το CDK2A φέρει μεταλλάξεις. Επιπλέον, το p19^{ARF} επάγει γήρανση στα μελανοκύτταρα ανεξάρτητα από το p53 (86).

2.3.3 Απορρύθμιση της επιβίωσης των μελανοκυττάρων

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να ξεπεράσουν τον προγραμματισμό που οδηγεί το κύτταρο σε θάνατο (απόπτωση) σε περίπτωση βλάβης του DNA. Η απόπτωση ενεργοποιείται όταν ένας «αισθητήρας», όπως η p53, BAX, BAD, TNF (Tumor Necrosis Factor), TRAIL/TNFSF10 (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/TNF Superfamily Member 10) και FASLG (FAS Ligand), ανιχνεύει ένα σήμα που επάγει θάνατο, με αποτέλεσμα να επάγεται η απελευθέρωση του κυτοχρώματος C το οποίο σε συνδυασμό με την APAF1 (Apoptotic Protease-Activating Factor 1) ενεργοποιεί την κασπάση 9 και τον υπόλοιπο καταρράκτη κασπασών (87). Για να επιτευχθεί ισορροπία, αυτά τα μονοπάτια αντισταθμίζονται από παράγοντες επιβίωσης όπως BCL2, NFKB (Nuclear Factor-Kappa B), survivin (BIRC5, Baculoviral IAP Repeat Containing 5) και livin (BIRC7, Baculoviral IAP Repeat Containing 7) (88).

Στο μελάνωμα τα κύτταρα παράγουν αυξημένα επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL2, μειώνοντας την ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Η δραστηριότητα της κασπάσης-9 αναστέλλεται επίσης μέσω της επίδρασης του AKT κινάσης, η οποία είναι συνήθως πολύ ενεργή στα μελανώματα. Στα προχωρημένα μελανώματα έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται η survivin, η οποία δεσμεύεται και αναστέλλει την κασπάση-3 και την κασπάση-7 που δρουν μεταγενέστερα της κασπάσης-9. Ομοίως, η πρωτεΐνη livin υπερεκφράζεται στα μελανώματα και απενεργοποιεί την κασπάση-3, την κασπάση-7 και την κασπάση-9 (89). Οι κασπάσες ενεργοποιούνται επίσης από την ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου, μέσω δέσμευσης του TNF, FASLG και TRAIL (90). Αυτά τα μονοπάτια επιβίωσης είναι πολύπλοκα. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου προκαλεί επίσης την ενεργοποίηση του NFKB, το οποίο συχνά υπερεκφράζεται στο μελάνωμα και είναι ένας ουσιαστικός παράγοντας που προάγει την επιβίωση των κυττάρων του μελανώματος.

2.3.4 Απορρύθμιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ κυττάρων και της αλληλεπίδρασης κυττάρων με την εξωκυτταρική μήτρα

Τα μελανοκύτταρα, ιδιαίτερα οι μελανοβλάστες, μεταναστεύουν από τη φύση τους. Πιστεύεται επομένως ότι τα κύτταρα μελανώματος γίνονται μεταστατικά με τη συνεργασία και την ενίσχυση αυτής της έμφυτης μεταναστευτικής τάσης (91). Στην αρχική φάση αυτής της διαδικασίας, τα μελανοκύτταρα πρέπει πρώτα να διακόψουν τους μοριακούς δεσμούς τους με τα κερατινοκύτταρα, δεσμούς που αποτελούνται από μόρια κυτταρικής επιφάνειας που προάγουν αλληλεπιδράσεις με τα κερατινοκύτταρα. Αλλοιώσεις στην έκφραση μορίων προσκόλλησης κυττάρων όπως καντερίνες, ιντεγκρίνες και μέλη της υπερικογένειας των

ανοσοσφαιρινών μπορούν να διαταράξουν σημαντικά την ομοιοστατική ισορροπία μεταξύ μελανοκυττάρων και κερατινοκυττάρων, διευκολύνοντας την εξέλιξη του μελανώματος.

Οι καντερίνες είναι μια οικογένεια μορίων προσκόλλησης που ενεργούν τόσο ως υποδοχέας όσο και ως προσδέτης για τη διατήρηση κατάλληλων επαφών μεταξύ κυττάρων. Η N-καντερίνη ενισχύει την επιβίωση του μελανώματος διεγείροντας τη σηματοδότηση της β-κατενίνης, τη δραστηριότητα LEF1 και την επακόλουθη ενεργοποίηση των MITF και CCND1 (cyclin D1). Η E-καντερίνη ρυθμίζεται εν μέρει από τον παράγοντα μεταγραφής SNAI1, ενώ η έκφραση της N-καντερίνης ρυθμίζεται από το μονοπάτι σηματοδότησης Notch, που εμπλέκεται στη μελανογένεση (92).

Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που διευκολύνουν την προσκόλληση κυττάρων με την εξωκυτταρική μήτρα (ECM). Η προσκόλληση των μελανοκυττάρων στο δερμα-επιδερμική βασική μεμβράνη μπορεί να αποδυναμωθεί μέσω αλλαγών στις ιντεγκρίνες. Τα μελανώματα εκφράζουν συγκεκριμένες ιντεγκρίνες (π.χ ανβ3 και α4β1) που έχουν εμπλακεί στην προσκόλληση με το ECM, προάγοντας την κινητικότητα, την διήθηση και τη μετάσταση, η οποία συσχετίζεται με κακή κλινική έκβαση σε ασθενείς με μελάνωμα (93).

Τα μελανώματα υπερεκφράζουν επίσης τα μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών, συμπεριλαμβανομένου του MCAM (Melanoma Cell Adhesion Molecule MUC-18/CD146), ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1, CD54) και ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule CD166, Transmembrane glycoprotein). Το MCAM υπερεκφράζεται σε περισσότερο από το 80% των μελανωμάτων και προκαλεί αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων μελανώματος και εξωκυτταρικής μήτρας αλλά και μεταξύ άλλων τύπων κυττάρων όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Η διήθηση των κυττάρων μελανώματος μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από την ικανότητά τους να προκαλούν διάσπαση της βασικής μεμβράνης και άλλες μορφές αναδιαμόρφωσης μέσω έκκρισης πρωτεολυτικών ενζύμων όπως υαλουρονιδάση, ηπαράναση και MMPs (Matrix Metalloproteinases). Τα κύτταρα μελανώματος μπορούν επίσης να στρατολογήσουν τους ινοβλάστες που βρίσκονται γύρω τους για να βοηθήσουν στη διαδικασία της διήθησης ενθαρρύνοντας την έκκριση των πρωτεολυτικών ενζύμων τους. Η αποδομημένη ECM με τη σειρά της απελευθερώνει επιπλέον παράγοντες που μπορούν να επάγουν την ανάπτυξη των κυττάρων μελανώματος και των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενισχύοντας την αγγειογένεση. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η αυξημένη έκφραση κάποιων μεταλλοπρωτεϊνών όπως για παράδειγμα οι MMP-1, MMP-2 και MMP9 συσχετίζεται με διηθητικό μελάνωμα (94).

3. Κυκλίνες και αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών ως βιοδείκτες πρόγνωσης στο μελάνωμα

3.1 Βιοδείκτες: Γενικά στοιχεία

Οι βιοδείκτες ορίζονται ως βιολογικά μόρια, που παράγονται είτε από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα ή από φυσιολογικούς ιστούς σε απόκριση στον καρκίνο και εντοπίζονται σε βιολογικά υγρά (αίμα, ούρα, πτύελα) και/ή σε ιστούς. Είναι αντικειμενικά μετρήσιμες ουσίες και αξιολογούνται ως δείκτες των καρκινικών διεργασιών μέσα στο σώμα (95). Έτσι, ένας καρκινικός βιοδείκτης μπορεί να οριστεί ως «μόριο που υποδηλώνει την παρουσία καρκίνου

ή παρέχει πληροφορίες σχετικά με την πιθανή μελλοντική συμπεριφορά του καρκίνου, δηλαδή την πιθανότητα εξέλιξης ή απόκρισης στη θεραπεία » (96).

Στην ιδανική περίπτωση, ένας καρκινικός βιοδείκτης πρέπει να πληροί συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Πρέπει να παράγεται μόνο από τα καρκινικά κύτταρα, να συσχετίζεται με το φορτίο του όγκου, να υπάρχει σε υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα (ή σε άλλο ανθρώπινο βιολογικό υγρό) των ασθενών που πάσχουν από καρκίνο που το καθιστούν ανιχνεύσιμο και μετρήσιμο σε πρώιμο στάδιο, να είναι μη ανιχνεύσιμο (ή να υπάρχει σε πολύ χαμηλά επίπεδα) στο αίμα ή σε άλλα βιολογικά υγρά υγιών ατόμων και να είναι εύκολο να μετρηθεί ακόμη και σε μικρές ποσότητες με λίγη προετοιμασία, με χαμηλό κόστος και με υψηλή αξιοπιστία και ευαισθησία (97,98).

Υπάρχουν πέντε κατηγορίες βιοδεικτών: πρώιμης ανίχνευσης, διαγνωστικοί, προβλεπτικοί, προγνωστικοί και παρακολούθησης ασθενούς (97). Η πρόγνωση και πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία είναι οι πιο σημαντικές λειτουργίες. Οι προγνωστικοί βιοδείκτες είναι παράγοντες που προβλέπουν τη φυσική έκβαση της ασθένειας απουσία συστηματικής θεραπείας. Ως εκ τούτου, οι προγνωστικοί βιοδείκτες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον τη στιγμή της αρχικής διάγνωσης του καρκίνου, παρέχοντας εκτίμηση της επιθετικότητας, της πιθανότητας μετάστασης και της συνολικής έκβασης της νόσου. Αντίθετα, οι προβλεπτικοί βιοδείκτες είναι μόρια που παρέχουν πληροφορίες ως προς το αν ο ασθενής είναι πιθανό να επωφεληθεί από μια συγκεκριμένη θεραπεία πριν ξεκινήσει η θεραπεία (98). Γι' αυτό το λόγο οι προβλεπτικοί βιοδείκτες συμβάλλουν στην κατηγοριοποίηση των ασθενών ως πιθανοί ανταποκριτές ή μη ανταποκριτές της θεραπείας πριν την έναρξή της. Η κατηγοριοποίηση αυτή επιτρέπει ιδανικά την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας για κάθε μεμονωμένο ασθενή με αποτέλεσμα να απαλλάσσεται ο ασθενής από θεραπείες με χαμηλή πιθανότητα απόκρισης αλλά κυρίως από δυνητικά επιβλαβείς παρενέργειες.

3.2 Βιοδείκτες στο μελάνωμα

Στο μελάνωμα, μπορεί να χρησιμοποιηθούν βιοδείκτες για τη διάγνωση, πρόγνωση, καθώς και την πρόβλεψη της κλινικής έκβασης και/ή ανταπόκρισης στη θεραπεία. Αυτοί οι βιοδείκτες μπορεί να είναι είτε κλινικά χαρακτηριστικά είτε μοριακά προφίλ που προέρχονται κυρίως από τον ιστό του όγκου ή από το περιφερικό αίμα. Λόγω του δυναμικού των βιοδεικτών για τη βελτίωση της πρόγνωσης και με το παρόν αποτέλεσμα των ασθενών με μελάνωμα, η έρευνα εστιάζεται στον εντοπισμό και την επικύρωση βιοδεικτών μελανώματος από πολλές πηγές, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων, των περιφερικών λεμφαδένων, του ορού/πλάσματος, το μικροπεριβάλλον του όγκου και των κυτταρικών συστατικών του περιφερικού αίματος (99).

Τα τελευταία χρόνια, σημειώθηκε σημαντική πρόοδος στη μοριακή ταξινόμηση του μελανώματος σε υπότυπους με βάση κυρίως την αναγνώριση συγκεκριμένων γενετικών αλλοιώσεων. Σύμφωνα με το Cancer Genome Atlas (TCGA), το μελάνωμα διακρίνεται σε τέσσερις γενετικούς υπότυπους με βάση την μεταλλαγή-οδηγό (driver mutation) που χαρακτηρίζει τον κάθε υπότυπο. Συγκεκριμένα, οι τέσσερις υπότυποι του μελανώματος είναι οι εξής: BRAF, N,K,H-Ras, NF-1 και τριπλά αγρίου τύπου (triple wild type) οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το 50%, 25%, 15% και 10% των μελανωμάτων αντίστοιχα (43). Αυτή η μοριακή ταξινόμηση του μελανώματος έχει σημαντικό αντίκτυπο στην πρόγνωση του ασθενούς δεδομένου ότι ορισμένες από αυτές τις γονιδιακές μεταλλάξεις αποτελούν στόχο από ορισμένους εκλεκτικούς αναστολείς των κινασών.

Προβλέποντας τη πρόγνωση του μελανώματος είναι σημαντικό για τον προσδιορισμό της ανάγκης για περαιτέρω έρευνα, συμβουλευτική των ασθενών, για την κατάλληλη διαχείριση (ιδιαίτερα την ανάγκη για μετεγχειρητική συμπληρωματική θεραπεία) και για την συμμετοχή ανάλογα με την κατάσταση κινδύνου των ασθενών σε κλινικές δοκιμές. Τα περισσότερα δεδομένα σχετικά με τους προγνωστικούς βιοδείκτες στο μελάνωμα έχουν αξιολογηθεί σε δείγματα καρκινικού ιστού με βάση τη συμβατική μορφολογία και την ανοσοϊστοχημεία (IHC) καθώς και αναλύσεις DNA και RNA. Συμβατικοί προγνωστικοί βιοδείκτες όπως το βάθος διήθησης κατά Breslow, το επίπεδο διήθησης κατά Clark, η εξέλιξη, ο μιτωτικός ρυθμός και οι διηθημένοι λεμφαδένες, παραμένουν οι βασικοί προγνωστικοί δείκτες στο μελάνωμα (100) και χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του κινδύνου υποτροπής και θανάτου από τη νόσο. Όμως μοντέλα εκτίμησης κινδύνου βασιζόμενα στους παράγοντες αυτούς δεν εκφράζουν πλήρως τις παρατηρούμενες διαφορές στη σχετιζόμενη με τη νόσο επιβίωση. Το μελάνωμα παραμένει σχετικά απρόβλεπτο όσον αφορά τη βιολογική του συμπεριφορά. Μέχρι σήμερα, κανένας βιοδείκτης δεν έχει ακόμα χρησιμοποιηθεί στην κλινική πρακτική. Λόγω της πρόσφατης προόδου στην αντιμετώπιση του μελανώματος, που περιλαμβάνει και στοχευμένες θεραπείες, η συνεχής έρευνα για προγνωστικούς βιοδείκτες είναι εξέχουσας σημασίας (101). Φαίνεται πως οι κυκλίνες και οι κυκλινο-εξαρτώμενοι αναστολείς των κινασών, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου των μελανοκυττάρων.

3.3 Σκοπός της μελέτης

Στην παρούσα μελέτη, στο πλαίσιο της μεταπτυχιακής διατριβής επιδιώκουμε να διερευνήσουμε την προγνωστική αξία της σχέσης έκφρασης κυκλινών και των κυκλινο-εξαρτώμενων αναστολών των κινασών και να αξιολογήσουμε εάν θα μπορούσαν οι πρωτεΐνες αυτές να αποτελέσουν προγνωστικούς βιοδείκτες σε ασθενείς με μελάνωμα του δέρματος.

3.4 Μεθοδολογία

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας στη βάση δεδομένων PubMed από τη δημιουργία της ως και 30/09/2020. Η αναζήτηση έγινε με τους εξής όρους αναζήτησης:

1. cyclin AND melanoma AND (prognosis OR progno OR prognostic OR progn) AND ENGLISH [Language]
2. (cyclin kinase Inhibitor OR CDKi OR CDK inhibitor OR cyclin inhibitor) AND melanoma AND (prognosis OR progno OR prognostic OR progn) AND ENGLISH [Language].

Οι μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στην ανασκόπηση έπρεπε να πληρούν τα παρακάτω κριτήρια: 1) να αναφέρονται στο μελάνωμα, 2) να είναι στην αγγλική γλώσσα, 3) να περιλαμβάνουν τις κυκλίνες και/ή τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, 4) να υπάρχει σύνδεση των κυκλινών και/ή των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών με την πρόγνωση στο μελάνωμα. Η αναζήτηση στη PubMed βρήκε συνολικά 433 μελέτες. Από το σύνολο των μελετών απορρίφθηκαν αυτές που δεν πληρούσαν τα προαναφερόμενα κριτήρια και τελικά

έμειναν 32 μελέτες. Τα αποτελέσματα της αναζήτησης αναφέρονται αναλυτικά στην παρακάτω ενότητα.

3.5 Αποτελέσματα

3.6 Κυκλίνες και πρόγνωση στο μελάνωμα

3.6.1 Κυκλίνη D

Η κυκλίνη D είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών κυκλίνης που εμπλέκεται στη ρύθμιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Η σύνθεση της κυκλίνης D ξεκινά κατά τη διάρκεια της φάσης G1 και οδηγεί τη μετάβαση φάσης G1/S. Η κυκλίνη D είναι μία από τις σημαντικότερες κυκλίνες που παράγονται από άποψη λειτουργικής σημασίας. Σε πολλαπλασιαστικά κύτταρα, η συσσώρευση συμπλόκου κυκλίνης D-CDK4/6 έχει μεγάλη σημασία για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο κυκλίνης D-CDK4/6 φωσφορυλιώνει μερικώς την πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος (Rb), της οποίας η αναστολή μπορεί να προκαλέσει έκφραση ορισμένων γονιδίων, (π.χ κυκλίνη E), σημαντική για την πρόοδο της φάσης S. Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις ομόλογες πρωτεΐνες τύπου D, η κυκλίνη D1, κυκλίνη D2 και κυκλίνη D3 οι οποίες εκφράζονται σε διαφορετικές ποσότητες ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (102).

3.6.1.1 Κυκλίνη D1

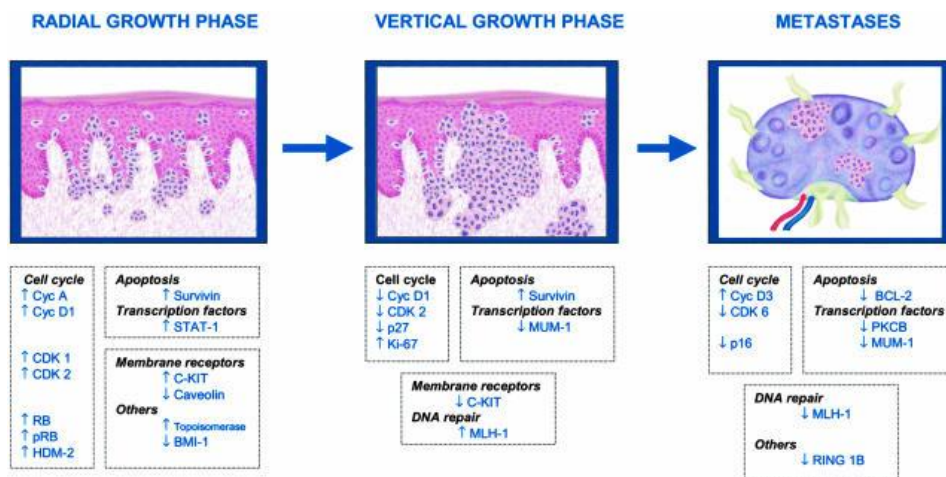
Υπερέκφραση της κυκλίνης D1 με ή χωρίς γονιδιακή ενίσχυση αναφέρεται σε πολλές κακοήθειες όπως στον καρκίνο μαστού, πνεύμονα και κεφαλής/τραχήλου καθώς και στα λεμφώματα. Ο ρόλος της κυκλίνης D1 στην ανάπτυξη, εξέλιξη και πρόγνωση των μελανωμάτων είναι αμφιλεγόμενη. Αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D1 παρατηρείται στο 62% των πρωτοπαθών μελανωμάτων και στο 29% των μεταστατικών βλαβών ενώ η έκφρασή της παραμένει χαμηλή στους μελανοκυτταρικούς σπίλους (103). Η υψηλότερη συχνότητα έκφρασης κυκλίνης D1 στα πρωτοπαθή σε σύγκριση με τα μεταστατικά μελανώματα εξηγείται από το γεγονός ότι η κυκλίνη D1 φαίνεται να ανταποκρίνεται σε εξωτερικά ερεθίσματα, και μπορεί να θεωρηθεί, ως εκ τούτου, ότι η υψηλή έκφρασή της μπορεί να προκύψει από την αλληλεπίδραση με συγκεκριμένους αυξητικούς παράγοντες που υπάρχουν στο μικροπεριβάλλον. Φαίνεται ότι η κυκλίνη D1 εμπλέκεται στα αρχικά στάδια του μελανώματος και είναι πιθανό στα μεταστατικά μελανώματα τα κύτταρα να συσσωρεύουν άλλες γενετικές ανωμαλίες που δεν απαιτούν την κυκλίνη D για τον πολλαπλασιασμό τους (104). Η μελέτη των Alonso et al. (105) επιβεβαιώνει ότι η κυκλίνη D1 αυξάνεται στο μελάνωμα και επίσης υποδεικνύει ότι το ακριβές στάδιο αύξησης της κυκλίνης D1 στο μελάνωμα είναι η ακτινική φάση ανάπτυξης (Εικόνα 11).

Επιπλέον, φαίνεται να μην υπάρχει καμία συσχέτιση της έκφρασης της κυκλίνης D1 με το πάχος του μελανώματος. Καμία συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της κυκλίνης D1 και της κλινικής έκβασης δεν παρατηρήθηκε σε επιφανειακά εξαπλούμενο μελάνωμα αλλά και στο οζώδες μελάνωμα. Δεν έχει καμία επίδραση σχετικά με την ελεύθερη νόσου επιβίωση και τη συνολική επιβίωση για κανένα από τους δυο υποτύπους (103). Στην μελέτη των Ramirez et al. (106) φαίνεται πως συγκεκριμένο επίπεδο έκφρασης κυκλίνης D1 παρατηρήθηκε στο 46%

των σπύλων που μελέτησαν και επιπλέον ότι τα πρωτοπαθή in situ μελανώματα έχουν μεγαλύτερη αύξηση κυκλίνης D1 σε σχέση με τα διηθητικά. Αυτά τα ευρήματα έρχονται σε αντίθεση με αυτά που ανέφεραν οι Florenes et al. (103) όπου δεν παρατήρησαν καμία έκφραση της κυκλίνης D1 στους σπύλους.

Σε μια μελέτη με 112 δείγματα μελανώματος αξιολογήθηκε ο προγνωστικός ρόλος της κυκλίνης D1 στα μελανώματα βάθους διήθησης κατά Breslow <1mm (107). Βρέθηκε ότι η έκφραση της κυκλίνης D1 είναι αυξημένη στα διηθητικά λεπτά μελανώματα σε σύγκριση με τα in situ μελανώματα το οποίο υποστηρίζει έναν πιθανό ρόλο της κυκλίνης D1 στα πρώιμα στάδια της διήθησης του μελανώματος. Αν και τα ευρήματά της μελέτης δείχνουν ένα πιθανό ρόλο της κυκλίνης D1 κατά τα αρχικά στάδια διήθησης των κυττάρων μελανώματος, η έκφραση αυτής της πρωτεΐνης από μόνη της δεν φαίνεται να έχει προγνωστική σημασία.

Μελετήθηκε επιπλέον ο προγνωστικός ρόλος της κυκλίνης D1 στο οζώδες μελάνωμα. Ένα σημαντικό υψηλό ποσοστό δειγμάτων οζώδους μελανώματος έδειξε μέτρια ή ισχυρή έκφραση κυκλίνης D1 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αυτό υποδηλώνει ότι η κυκλίνη D1 παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του οζώδους μελανώματος. Ωστόσο, η κυκλίνη D1 δεν είναι πιθανός υποψήφιος ως διαγνωστικός βιοδείκτης για το οζώδες μελάνωμα λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι ένα ποσοστό της ομάδας ελέγχου (21%) εκφράζει επίσης μέτρια ή ισχυρή κυκλίνη D1 (108).



Εικόνα 11: Αντιπροσωπευτικές πρωτεΐνες με διαφορετικό προφίλ έκφρασης στο δερματικό κακόηθες μελάνωμα (109).

Στο οφθαλμικό μελάνωμα η έκφραση της κυκλίνης D1 συσχετίστηκε με μια επιθετική πορεία και δυσμενή κλινική έκβαση. Οι αναλύσεις έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D1 είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας μετά τον έλεγχο για άλλους προγνωστικούς δείκτες και αυτό θα μπορούσε να χρησιμεύσει στη πρόγνωση του οφθαλμικού μελανώματος (110).

Συμπερασματικά, ο βιολογικός ρόλος της κυκλίνης D1 στην ανάπτυξη των μελανοκυτταρικών βλαβών του δέρματος είναι ασαφής επειδή η έκφραση της κυκλίνης D1 φαίνεται να αυξάνεται σε πρωτοπαθή μελανώματα σε σύγκριση με καλοήθη σπύλους αλλά φαίνεται να έχει μικρό ρόλο στην ανάπτυξη του μεταστατικού φαινοτύπου. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να εξακριβωθεί ο βιολογικός ρόλος της κυκλίνης D1 στην εξέλιξη των μελανοκυτταρικών βλαβών.

3.6.1.2 Κυκλίνη D3

Η κυκλίνη D3 είναι η πιο ευρέως εκφρασμένη κυκλίνη τύπου D στα μελανώματα. Σε μια αναφορά (103) που μελέτησε σημαντικό αριθμό δειγμάτων, η κυκλίνη D3 εκφράστηκε κατά 96% στα πρωτοπαθή και κατά 97% στα μεταστατικά μελανώματα. Στην ίδια αναφορά παρουσιάζεται επίσης μια σχέση μεταξύ της κυκλίνης D3 και της κλινικής έκβασης σε ασθενείς με μελάνωμα. Πιο συγκεκριμένα, επισημάνθηκε μια στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ αυξημένης έκφρασης της κυκλίνης D3 και της επιβίωσης χωρίς υποτροπές καθώς και της συνολικής επιβίωσης (relapse-free and overall survival) για ασθενείς με επιφανειακά εξαπλούμενο μελάνωμα, κάτι που υποδηλώνει ότι η απορρύθμιση της κυκλίνης D3 παρέχει μια επιλεκτική ανάπτυξη που σχετίζεται με την εξέλιξη αυτού του τύπου καρκίνου. Αντίθετα, η υπερέκφραση της κυκλίνης D3 δεν σχετίζεται με πρόβλεψη πρόωρης υποτροπής για ασθενείς με οζώδη μελανώματα (103,111). Τα υψηλά επίπεδα κυκλίνης D3 είναι ένας δείκτης πρόωρης υποτροπής και μειωμένης συνολικής επιβίωσης για ασθενείς με επιφανειακά εξαπλούμενο μελάνωμα αλλά όχι για ασθενείς με οζώδες μελάνωμα. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η απορρύθμιση της έκφρασης της κυκλίνης D3 που οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό μπορεί να είναι προγνωστικός παράγοντας μόνο για το επιφανειακά εξαπλούμενο μελάνωμα.

Σε μια άλλη μελέτη (105), χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες ιστών (TMA), αναλύθηκαν 165 δείγματα μελανωμάτων που αντιστοιχούν σε διακριτά ιστολογικά στάδια ανάπτυξης (ακτινική φάση ανάπτυξης, κάθετη φάση ανάπτυξης, μεταστατικά μελανώματα) και παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D3 μόνο στο μεταστατικό στάδιο του μελανώματος (Εικόνα 11). Παρατηρήθηκε επίσης ότι η έκφραση της κυκλίνης D3 είναι υψηλότερη στα μελανώματα σε σύγκριση με τους δυσπλαστικούς σπίλους το οποίο ενισχύει την άποψη ότι οι κυκλίνες ενεργοποιούνται κατά τη μετάβαση από καλοήγη σε κακοήγη φαινότυπο μελανοκυτταρικών βλαβών του δέρματος και ότι οι δυσπλαστικοί σπίλοι αντιπροσωπεύουν ένα ενδιάμεσο στάδιο αυτής της διαδικασίας (112). Με βάση τα παραπάνω, ενισχύεται η άποψη ότι έκφραση της κυκλίνης D3 θα μπορούσε να είναι ένας διαγνωστικός δείκτης για δυσπλαστικές μελανοκυτταρικές βλάβες. Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση (111) έδειξε ότι η υπερέκφραση της κυκλίνης D3 μπορεί να αποτελέσει ένα προγνωστικό βιοδείκτη για δυσμενή πρόγνωση σε διάφορους ασθενείς με κακοήθεια, το οποίο μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην κλινική διάγνωση και θεραπεία. Επιπλέον η υπερέκφραση της κυκλίνης D3 καθορίζει την έναρξη του όγκου αλλά ταυτόχρονα η παρουσία της αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη διατήρηση του όγκου (113). Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται ώστε να προσδιορίσουν τον προγνωστικό ρόλο της κυκλίνης D3 στο μελάνωμα.

3.6.2 Κυκλίνη A

Η κυκλίνη A, μαζί με τα άλλα μέλη της οικογένειας των κυκλινών, ρυθμίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω της φυσικής αλληλεπίδρασης με εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες (CDK), με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί έτσι την ενζυματική δραστηριότητα της κινάσης CDK. Η κυκλίνη A είναι η μόνη κυκλίνη που ρυθμίζει πολλαπλά στάδια του κυτταρικού κύκλου επειδή συνδέεται (και συνεπώς ενεργοποιεί) με δύο ξεχωριστές κινάσες CDK, τις CDK2 και CDK1. Ανάλογα με την κινάση CDK που συνδέεται, το κύτταρο θα συνεχίσει μέσω της φάσης S ή θα μεταβεί από τη φάση G2 στη φάση M. Για τη μετάβαση του κυττάρου στη φάση S, απαιτείται σύνδεση της κυκλίνης A με την κινάση CDK2 ενώ για την είσοδο στη φάση M απαιτείται σύνδεση με την κινάση CDK1.

Μια περιορισμένη μελέτη, των Tran et. al. (114) ανέφερε σημαντικά υψηλότερη έκφραση της κυκλίνης A σε πρωτοπαθή μελανώματα σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης σε καλοήγη σπύλους. Μια άλλη μελέτη με αρκετά μεγάλο αριθμό δειγμάτων επιβεβαίωσε και επέκτεινε αυτά τα ευρήματα ερευνώντας μελανώματα διαφορετικών υποτύπων, καθώς και μεταστατικά δείγματα για την πρωτεϊνική έκφραση της κυκλίνης A. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα πυρηνικής κυκλίνης A στο 99% των πρωτοπαθών μελανωμάτων και στα μεταστατικά μελανώματα ενώ σπάνια εντοπίστηκαν θετικά κύτταρα σε καλοήγη σπύλους (115). Σημαντικά λιγότερη κυκλίνη A ανιχνεύθηκε σε λεπτά επιφανειακά εξαπλούμενα μελανώματα, υποδεικνύοντας ότι σε αυτό το τύπο μελανώματος η κυκλίνη A σχετίζεται με το πάχος του όγκου και αυτό το εύρημα είναι σύμφωνο με την παρατήρηση ότι τα επιφανειακά εξαπλούμενα μελανώματα χαρακτηρίζονται αρχικά από αργή ακτινική φάση ανάπτυξης πριν προχωρήσει σε κάθετη φάση ανάπτυξης με ικανότητα διήθησης και μετάστασης. Επιπλέον, βρέθηκε ότι όσοι ασθενείς με επιφανειακά εξαπλούμενα μελανώματα οι οποίοι είχαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης κυκλίνης A, είχαν σημαντικά αυξημένη επιβίωση ελεύθερης νόσου καθώς και συνολική επιβίωση σε σύγκριση με ασθενείς που είχαν υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής. Πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η επίδραση της κυκλίνης A στην επιβίωση ελεύθερης νόσου βρέθηκε να είναι ανεξάρτητη του κατακόρυφου πάχους του πρωτογενούς όγκου (βάθος διήθησης κατά Breslow), το οποίο αποτελεί τον πιο αξιόπιστο προγνωστικό δείκτη μέχρι σήμερα, υποδηλώνοντας ότι το επίπεδο της έκφρασης κυκλίνης A μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης πρόωρης υποτροπής σε ασθενείς με επιφανειακά εξαπλούμενα μελανώματα. Αντίθετα, σε οζώδη μελανώματα, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ επιπέδου έκφρασης κυκλίνης A, πάχους όγκου, και κλινικής έκβασης.

Μια άλλη αναφορά που μελετά την ανάπτυξη του κακοήθους μελανώματος επιβεβαιώνει επίσης ότι ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης A στα κακοήγη μελανώματα σε σύγκριση με τους σπύλους. Ειδικότερα, η αύξηση της κυκλίνης A εντοπίζεται στην ακτινική φάση ανάπτυξης του μελανώματος (109). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η κυκλίνη A αποτελεί ένα ισχυρό προγνωστικό δείκτη στα επιφανειακά εξαπλούμενα μελανώματα.

3.6.3 Κυκλίνη B

Η κυκλίνη B είναι μέλος της οικογένειας των κυκλινών. Το σύμπλεγμα της κυκλίνης B, που περιλαμβάνει την κυκλίνη B1 και την κυκλίνη B2 στον άνθρωπο, είναι υπομονάδα του CDC2 και διέπει την είσοδο στην μίτωση. Η κυκλίνη B συντίθεται στην όψιμη φάση S και στη G2. Στο τέλος της φάσης S η φωσφατάση CDC25C αποφωσφορυλιώνει τα κατάλοιπα τυροσίνης και θρεονίνης που βρίσκονται κοντά στη θέση σύνδεσης του ATP του CDC2 αναστέλλοντας την δραστηριότητα της κινάσης, και αυτό ενεργοποιεί το σύμπλοκο κυκλίνης B-CDC2. Κατά την ενεργοποίηση, το σύμπλεγμα εισέρχεται στον πυρήνα ώστε να προκαλέσει την είσοδο σε μίτωση. Ωστόσο, εάν ανιχνευθεί βλάβη στο DNA, ενεργοποιούνται εναλλακτικές πρωτεΐνες που έχουν ως αποτέλεσμα την ανασταλτική φωσφορύλιωση του CDC25C και συνεπώς η κυκλίνη B-CDC2 δεν ενεργοποιείται. Για να προχωρήσει το κύτταρο από τη μίτωση, είναι απαραίτητη η αποδόμηση της κυκλίνης B (116,117).

Η κυκλίνη B παίζει καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκινικού κυτταρικού κύκλου και υπερεκφράζεται σε πολλούς καρκίνους στον άνθρωπο. Η γνώση όσον αφορά την προγνωστική αξία της κυκλίνης B στο μελάνωμα είναι πολύ περιορισμένη. Μια μελέτη, αξιολόγησε με ανοσοϊστοχημεία την έκφραση της κυκλίνης B σε ένα ευρύ φάσμα

μελανοκυτταρικών βλαβών. Η μελέτη έδειξε υπερέκφραση της κυκλίνης B σε πρωτοπαθή κακοήγη μελανώματα σε σύγκριση με τους καλοήγη σπίλους (114,118). Σε αντίθεση με τις περισσότερες κυκλίνες και κινάσες που ανιχνεύονται μόνο στον πυρήνα, η κυκλίνη B μπορεί να ανιχνευτεί τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Ωστόσο, η υπερέκφραση της κυκλίνης B δεν συσχετίζεται με την κλινική έκβαση του μελανώματος.

Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση (119) μελέτησε τον προγνωστικό ρόλο της κυκλίνης B σε συμπαγείς όγκους και έδειξε ότι η υπερέκφραση της κυκλίνης B συσχετίζεται με κακή επιβίωση στους περισσότερους συμπαγείς όγκους. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι το επίπεδο έκφρασης της κυκλίνης B μπορεί να αποτελέσει σημαντικό προγνωστικό παράγοντα στους συμπαγείς όγκους. Οι μελέτες που αφορούν το μελάνωμα συγκεκριμένα είναι ελάχιστες. Συνεπώς, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες ώστε να διευκρινιστεί ο προγνωστικός ρόλος της κυκλίνης B στην παθογένεση του μελανώματος.

3.6.4 Κυκλίνη E

Η κυκλίνη E είναι μια πρωτεΐνη που συνδέεται με τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Δημιουργεί σύμπλοκο με τη κινάση CDK2, το οποίο απαιτείται για τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο κυκλίνη E-CDK2 φωσφορυλιώνει τον αναστολέα p27^{Kip1} (αναστολέας της κυκλίνης D), οδηγώντας το για αποικοδόμηση, προωθώντας έτσι την έκφραση της κυκλίνης A και την είσοδο στη φάση S (120). Η υπερέκφραση της κυκλίνης E συσχετίζεται με την ογκογένεση. Αρκετοί μηχανισμοί οδηγούν στην απορρυθμισμένη έκφραση της κυκλίνης E. Οι μελέτες δείχνουν ότι η κυκλίνη E εμπλέκεται σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου, της ουροδόχου κύστης, του δέρματος και του πνεύμονα. Όσον αφορά το μελάνωμα όμως, οι αναφορές που υπάρχουν σχετικά με την προγνωστική αξία της κυκλίνης E είναι αρκετά περιορισμένες.

Μια μελέτη (121,122) που ανέλυσε έναν επαρκή αριθμό δειγμάτων μελανώματος έδειξε ότι η κυκλίνη E έχει την υψηλότερη έκφραση στις μεταστάσεις σε σύγκριση με τους σπίλους και τα πρωτοπαθή μελανώματα διαφορετικού πάχους. Επιπλέον, δείχθηκε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ διαφορετικών υποτύπων και έκφρασης της κυκλίνης E. Συγκεκριμένα, τα διηθητικά οζώδη μελανώματα παρουσιάζουν υψηλότερη έκφραση κυκλίνης E σε σχέση με τα επιφανειακά εξαπλούμενα μελανώματα και τα μελανώματα τύπου κακοήθους φακής (122). Σε μια άλλη μελέτη (105), η αύξηση της έκφρασης της κυκλίνης E συσχετίστηκε με μείωση της συνολικής επιβίωσης.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η κυκλίνη E υπερεκφράζεται σε όγκους μελανώματος δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτη των Bales et. al. 2005 (121), η κυκλίνη E δρα ως πιθανός ρυθμιστής διήθησης και μετάστασης στο μελάνωμα. Για να εξεταστεί η πιθανή χρήση της κυκλίνης E ως προγνωστικός δείκτης, απαιτούνται μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και δειγμάτων μελανώματος.

3.7 Αναστολείς κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών και πρόγνωση στο μελάνωμα

3.7.1 p16^{INK4a}

Το p16 (p16^{INK4a} ή CDKN2A), είναι μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο CDKN2A το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 και ενεργεί μπλοκάροντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από την ανασταλτική της επίδραση στο μονοπάτι κυκλίνης D-CDK4-pRb. Τροποποιήσεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου CDKN2A φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορους τύπους όγκων. Το γονίδιο p16 μπορεί να απενεργοποιηθεί από ομόζυγες ελλείψεις, σημειακές μεταλλάξεις ή μεθυλίωσεις στην περιοχή του υποκινητή. Το γονίδιο p16 είναι συχνά απενεργοποιημένο από μεταλλάξεις της γαμετικής σειράς σε οικογενή μελανώματα (123). Παρόλο που οι μεταλλάξεις του p16 της γαμετικής σειράς συσχετίστηκαν έντονα με το οικογενές μελάνωμα, δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εκδήλωση μελανώματος καθότι υπάρχουν περιπτώσεις μελανωμάτων που δεν παρουσιάζουν μετάλλαξη στο p16. Σχετικά πρόσφατες μελέτες ανέφεραν μεταλλάξεις του γονιδίου p16 και σε σποραδικά πρωτοπαθή μελανώματα (124).

Απώλεια έκφρασης της πρωτεΐνης p16 έχει συσχετιστεί με προχωρημένα στάδια εξέλιξης του μελανώματος σε αντίθεση με καλοήγη σπίλους όπου η έκφρασή της είναι αυξημένη. Συγκεκριμένα, το ποσοστό θετικής χρώσης του p16 με IHC στους καλοήγη σπίλους κυμαίνεται από 61%-100%, στα πρωτοπαθή μελανώματα από 12%-93% και στα μεταστατικά μελανώματα από 0%-70%. Εκτός όμως από τη χρήση του αναστολέα p16 ως διαγνωστικό βιοδείκτη στο μελάνωμα, έχει διερευνηθεί η χρήση του αναστολέα ως προγνωστικός δείκτης. Μια μετα-ανάλυση του 2018 (125) έδειξε ότι οι μελέτες σχετικά με τον προγνωστικό ρόλο της p16 παρουσιάζουν αμφίβολα αποτελέσματα. Μια από τις κύριες διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των μελετών είναι εάν η θετική χρώση για το p16 είναι πυρηνική και/ή κυτταροπλασματική. Σύμφωνα με τις αναλύσεις, όταν μόνο η πυρηνική χρώση της p16 θεωρείται θετική, τότε η ανίχνευση των μελανολυτταρικών βλαβών είναι πιο αξιόπιστη. Ωστόσο δεν είναι ακόμα σαφές εάν πρέπει να συμπεριλαμβάνεται και η κυτταροπλασματική χρώση. Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι η απουσία του p16 συσχετίζεται με υποτροπιάζουσα νόσο (126), μειωμένη επιβίωση (109,127) και ως δείκτης λεμφαδενικών μεταστάσεων (128). Σε μια άλλη μελέτη (129) βρέθηκε ότι η απώλεια έκφρασης είναι προγνωστικός δείκτης του μελανώματος και συνδέεται με μειωμένη επιβίωση. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε επίσης μια ισχυρή συσχέτιση της απώλειας του p16 με τους κλασικούς βιοδείκτες του μελανώματος όπως το βάθος διήθησης κατά Breslow, η εξέλκωση και το στάδιο νόσου. Επιπλέον, η απουσία έκφρασης του p16 προβλέπει φτωχή συνολική επιβίωση και επιβίωση ελεύθερης νόσου από απομακρυσμένες μεταστάσεις ανεξάρτητα από το βάθος διήθησης κατά Breslow, την εξέλκωση και το στάδιο νόσου. Μειωμένη έκφραση του p16 συσχετίζεται με υποτροπή σε πολύ λεπτά μελανώματα (130). Η μελέτη των Sanki et. al.(131) σε αντίθεση, προτείνουν ότι η έκφραση του p16 σε χρώση ανοσοϊστοχημείας δεν προβλέπει αξιόπιστα την υποτροπή ή την επιβίωση.

Επιπρόσθετα, για τα ρινοκολπικά βλεννογονικά μελανώματα (sinonasal melanomas), η απώλεια του p16 δεν συσχετίζεται με την πρόγνωση (132). Βρέθηκε επίσης ότι και στα άλλα βλεννογονικά μελανώματα του κεφαλής και τραχήλου η μείωση της έκφρασης του p16 συσχετίζεται με μειωμένη συνολική επιβίωση (133). Σε μια άλλη μελέτη φαίνεται ότι γενικώς η υπερέκφραση του p16 σχετίζεται με μειωμένη ολική επιβίωση στο βλεννογονικό

μελάνωμα το οποίο υποδεικνύει ότι ο αναστολέας p16 αποτελεί δυνητικό προγνωστικό δείκτη στο βλεννογονικό μελάνωμα(134).

Μια μετα-ανάλυση που μελέτησε τη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου p16 στο μελάνωμα, αποκάλυψε ότι η υπερμεθυλίωση του p16 η οποία έχει ως συνέπεια τη μείωση έκφρασης του p16 συμβάλλει στην παθογένεση και την εξέλιξη του μελανώματος και μπορεί να είναι πιθανός βιοδείκτης. Η υπερμεθυλίωση παρατηρείται στο πρωτοπαθή αλλά και στο μεταστατικό μελάνωμα (135).

3.7.2 p21^{WAF/CIP1}

Η p21^{WAF1/CIP1}, γνωστή και ως cyclin-dependent kinase inhibitor 1 ή CDK-interacting protein 1 (CIP1) ή wild-type p53 activated-factor 1 (WAF1), κωδικοποιείται από το γονίδιο CDKN1A που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 (6p21.2) στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Η p21 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των κυττάρων αλλά μόνο η πυρηνική μορφή έχει την ιδιότητα του αναστολέα. Οι αναστολείς CDK είναι αρνητικοί ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και συχνά απορρυθμίζονται στον καρκίνο. Η πρωτεΐνη p21 φυσιολογικά δεσμεύει και αναστέλλει τη δραστηριότητα των συμπλόκων κυκλίνης-CDK4/6, CDK2 και CDK1, και έτσι λειτουργεί ως ρυθμιστής της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και S. Σε φυσιολογικά κύτταρα, η επαγωγή βλάβης του DNA ή άλλων σημάτων στρες ενεργοποιεί το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, οδηγώντας σε παροδική έκφραση του αναστολέα p21. Υπό αυτές τις συνθήκες, το p21 προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου και της ανάπτυξης και σε ορισμένες περιπτώσεις οδηγεί σε κυτταρική γήρανση όταν η βλάβη είναι ανεπανόρθωτη. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι το p21 μπορεί να αποκτήσει είτε ογκοκατασταλτικές είτε ογκογονικές ιδιότητες ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων, την κατάσταση του p53 και τον τύπο και το επίπεδο του στρες. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση που η p53 είναι φυσιολογική τότε η p21 μαζί με την p53 δρουν μαζί με σκοπό τη διόρθωση της βλάβης του DNA και εξασφαλίζουν την σταθερότητα του γονιδιώματος, ενεργώντας ως « φύλακες του γονιδιώματος». Όταν η p53 παρουσιάζει κάποια μετάλλαξη, η p21 μπορεί να υιοθετήσει μια διαφορετική λειτουργία, προωθώντας τη διαφυγή από τη γήρανση και τη δημιουργία κυττάρων με γονιδιωματική αστάθεια, η οποία μπορεί να δράσει ως πρόδρομος του καρκίνου (136,137).

Κλινικές μελέτες που αφορούν την παρουσία ή την απουσία του αναστολέα p21 σε όγκους, απέδωσαν διφορούμενα αποτελέσματα σχετικά με τον ρόλο του στον καρκίνο. Σε ορισμένους τύπου καρκίνου (γλοιώματα, προστάτης, τραχήλου της μήτρας, ωοθηκών και οισοφάγος) ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα στην έκφραση του p21 που σχετίζονται με κακή επιβίωση ενώ αντίθετα σε άλλους τύπου καρκίνου (μαστού, γαστρικό και ωοθηκών) παρατηρείται απώλεια έκφρασης του p21, όπου σε συνδυασμό με αυξημένη ανίχνευση της p53, συσχετίστηκε με κακή πρόγνωση και μειωμένη συνολικά επιβίωση (138).

Όσον αφορά το μελάνωμα, το p21, ως αναστολέας κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, αναμένεται να έχει μειωμένη έκφραση για να επιτρέψει την αύξηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, μόνο ένας μικρός αριθμός μελετών επιβεβαίωσε ότι η μείωση της έκφρασης του p21 ενδέχεται να συμβάλλει στην αύξηση του ογκογόνου δυναμικού (oncogenic potential) (139–141). Οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν αύξηση της έκφρασης του p21 η οποία σχετίζεται με διαφοροποίηση μελανώματος, διακοπή ανάπτυξης και μεταστατική καταστολή (139,142). Τα επίπεδα έκφρασης του p21 βρίσκονται χαμηλά ή σε μη ανιχνεύσιμο επίπεδο στην πλειονότητα των σπίλων, με μεγαλύτερη έκφραση σε πρωτοπαθή και μεταστατικά μελανώματα (140–143). Η έκφραση του p21 είναι χαμηλότερη

στις μεταστάσεις σε σύγκριση με τις αντίστοιχες πρωτοπαθή βλάβες (140,144) στις περισσότερες μελέτες, προτείνοντας ότι η μείωση της έκφρασης του p21 σχετίζεται με την ανάπτυξη ενός μεταστατικού φαινοτύπου. Ο ακριβής μηχανισμός που προκαλεί την αυξημένη έκφραση του p21 στο μελάνωμα είναι ασαφής. Υπάρχουν διάφορες υποθέσεις που εξηγούν αυτή τη παρατήρηση, όπως πιθανές μεταλλάξεις του p21, σήματα από το μικροπεριβάλλον, τροποποιημένη ή παρεμποδισμένη δέσμευση του p21 σε σύμπλοκα κυκλίνης-CDK και μη φυσιολογική αποδόμηση της πρωτεΐνης (145).

Η προγνωστική αξία του p21 στο μελάνωμα είναι ασαφής. Μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ έκφρασης της πρωτεΐνης p21 και του πάχους του όγκου έχει αναφερθεί σε ορισμένες μελέτες (140,141) σύμφωνα με τις οποίες τα μελανώματα με μεγάλο πάχος εκφράζουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης p21. Αυτό υποστηρίζει την άποψη ότι η απώλεια λειτουργίας του p21 μπορεί να σχετίζεται με την εξέλιξη του μελανώματος και με μεταστατικό φαινότυπο (141). Αντίθετα, σε μια άλλη μελέτη (115), τα επίπεδα της πρωτεΐνης p21 αυξάνουν με το πάχος του μελανώματος. Μειωμένη έκφραση του p21 βρέθηκε να σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση χωρίς υποτροπή (141). Μια άλλη μελέτη (105) αναφέρει ότι η αυξημένη έκφραση του p21 συσχετίζεται με μειωμένη συνολικά επιβίωση. Ωστόσο, σε άλλες μελέτες (144,146) δεν αποδεικνύεται σημαντική σχέση μεταξύ έκφρασης του p21 και κλινικής έκβασης του μελανώματος.

Η παρουσία υψηλών επιπέδων του αναστολέα p21 στα διηθητικά πρωτοπαθή μελανώματα απαιτεί περαιτέρω μελέτες. Δεν γνωρίζουμε τι ακριβώς προκαλεί τη μετάβαση από χαμηλή ή αρνητική έκφραση του p21 που παρατηρείται σε καλοήθεις βλάβες, σε υψηλή έκφραση που παρατηρείται στα διηθητικά μελανώματα. Δεδομένης της διπλής δράσης του p21 σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες είναι προφανές ότι μπορεί να έχει διπλό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου, με βάση τον τύπο καρκίνου και την κατάσταση του p53. Μπορεί να χρησιμεύσει ως βιοδείκτης για πρόγνωση, εν μέρει ανάλογα με τον υποκυτταρικό εντοπισμό του (πυρήνα ή κυτταρόπλασμα).

3.7.3 p27^{Kip1}

Το p27, επίσης γνωστό ως p27^{Kip1}, είναι ένας αναστολέας που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο CDKN1B. Είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που ρυθμίζει τη μετάβαση από τη φάση G0 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου δεσμεύοντας και ρυθμίζοντας την λειτουργία των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs). Στη φάση G0 και στην αρχή της φάσης G1, το p27 δεσμεύει και αναστέλλει το σύμπλοκο κυκλίνης E-CDK2. Η προοδευτική μείωση των επιπέδων έκφρασης του p27 κατά τη διάρκεια της G1 επιτρέπει στα σύμπλοκα κυκλίνης E-CDK2 και κυκλίνης A-CDK2 την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη G1-S μετάβαση. Σπάνια παρατηρούνται μεταλλάξεις ή ελλείψεις του p27 στον καρκίνο. Είναι όμως συχνά απορρυθμισμένο και τα επίπεδα της πρωτεΐνης p27 μειώνονται ή η πρωτεΐνη έχει εσφαλμένη τοποθέτηση στους περισσότερους καρκίνους και αυτό σχετίζεται με κακή πρόγνωση (147).

Το p27 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα φυσιολογικά μελανοκύτταρα και τους καλοήθεις σπίλους, ενώ στο κακόηθες μελάνωμα παρατηρείται ετερογενή έκφραση. Στην περίπτωση του οζώδες μελανώματος, το επίπεδο έκφρασης του p27 βρέθηκε να συσχετίζεται με το βάθος διήθησης του όγκου κατά Breslow, όπου ο αναστολέας εκφράζεται λιγότερο στα μελανώματα με μεγαλύτερο πάχος. Επιπλέον, στο οζώδες μελάνωμα η μειωμένη έκφραση του p27 συνδέεται με υψηλότερο κίνδυνο πρόωρης υποτροπής της νόσου. Αντίθετα, στην περίπτωση του επιφανειακά εξαπλούμενου μελανώματος το επίπεδο έκφρασης του p27 δεν

συσχετίζεται με το βάθος διήθησης του όγκου κατά Breslow αλλά ούτε και με την επιβίωση ελεύθερης νόσου. Επίσης, το p27 δεν συσχετίζεται με ολική επιβίωση και στους δυο τύπους μελανώματος που προαναφέρθηκαν (144). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, η απώλεια έκφρασης του p27 δύναται να έχει πιθανή σημασία ως προγνωστικός δείκτης πρόωρης υποτροπής σε ασθενείς με οζώδες μελάνωμα.

Η μελέτη των Alonso et. al. (105), αναφέρει ότι στο κακόηθες μελάνωμα κάθετης φάσης ανάπτυξης παρατηρείται μείωση της έκφρασης του p27 σε σύγκριση με το μελάνωμα οριζόντιας φάσης ανάπτυξης ή τις καλοήθεις βλάβες. Ταυτόχρονα με την μείωση του p27, παρατηρείται προοδευτική αύξηση της έκφρασης της πυρηνικής πρωτεΐνης Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2) κατά την διάρκεια της εξέλιξης του μελανώματος από μελανοκυτταρικό σπίλο σε *in situ* μελάνωμα, σε πρωτοπαθές δερματικό μελάνωμα και στη συνέχεια σε μεταστατικό μελάνωμα (148). Η πυρηνική πρωτεΐνη Skp2 εμπλέκεται στην πρωτεόλυση του αναστολέα p27, αλλά δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση του μελανώματος.

Αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι σε πολλούς καρκίνους το p27 δεν βρίσκεται στον πυρήνα. Αυτή η εσφαλμένη εντόπιση σχετίζεται με κακή πρόγνωση (147,149). Μια μελέτη που ανέλυσε έναν μεγάλο αριθμό δειγμάτων μελανοκυτταρικών βλαβών, έδειξε ότι η έκφραση του πυρηνικού p27 μειώνεται σημαντικά στα πρωτοπαθή μελανώματα και υπάρχει περαιτέρω μείωση στα μεταστατικά μελανώματα σε σύγκριση με δυσπλαστικούς σπίλους. Αντίθετα, η κυτταροπλασματική έκφραση του p27 αυξάνεται από δυσπλαστικούς σπίλους σε πρωτοπαθή μελανώματα και ακόμα περισσότερο στα μεταστατικά. Η αύξηση του κυτταροπλασματικού p27 συσχετίστηκε με φτωχή 5-ετή επιβίωση σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα. Επίσης δείχθηκε ότι η κυτταροπλασματική έκφραση p27 είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την πρόβλεψη της έκβασης του μεταστατικού μελανώματος (150). Ο προγνωστικός ρόλος του p27 στο μεταστατικό μελάνωμα αναφέρθηκε και από μια άλλη μελέτη (151) η οποία έδειξε ότι όταν το p27 εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα είναι προγνωστικός παράγοντας για κακή πρόγνωση σε ασθενείς σταδίου III και IV. Συμπερασματικά, το κυτταροπλασματικό p27 μπορεί να χρησιμεύσει ως πολλά υποσχόμενος προγνωστικός δείκτης για μεταστατικό μελάνωμα.

3.7.4 p14^{ARF}

Το p14, γνωστό και ως ARF ή p14^{ARF}, είναι αναστολέας του κυτταρικού κύκλου που κωδικοποιείται από το γονίδιο CDKN2A. Το p14 λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο και καλείται «ενεργοποιητής της p53». Αναστέλλει την Mdm2, προωθώντας έτσι την p53 ώστε να προάγει την ενεργοποίηση του p21, το οποίο στη συνέχεια δεσμεύει και απενεργοποιεί ορισμένα σύμπλοκα κυκλίνης-CDK. Η απώλεια του p14 από μια ομόζυγη μετάλλαξη στο γονίδιο CDKN2A (INK4A) οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της Mdm2 και, συνεπώς, απώλεια της λειτουργίας της p53 και του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (152).

Το CDKN2A/p14 είναι ένα πολύ σημαντικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο του μονοπατιού Mdm2/p53. Έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου σε ένα υποσύνολο οικογενών μελανωμάτων που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p14 που έχει ως συνέπεια την αυξημένη αποδόμηση της p53 μέσω της Mdm2. Οι μεταλλάξεις αυτές προσδίδουν αυξημένη ευαισθησία σε δυσπλαστικούς σπίλους, μελάνωμα και άλλους τύπους κακοήθειας (153). Τα IHC πρότυπα έκφρασης για το p14 είναι αντιπροσωπευτικά των γενετικών αλλαγών στον γονιδιακό τόπο CDKN2A. Επιπλέον, οι γενετικές και επιγενετικές αναλύσεις του γονιδιακού τόπου 9p21 δείχνουν ότι οι τροποποιήσεις του p14 συμβαίνουν

ανεξάρτητα της απενεργοποίησης του p16 στο μελάνωμα και υποδηλώνουν ότι το p14 απενεργοποιείται συχνότερα σε σχέση με το p16 (154). Στη μελέτη των Venza et. al. (155) αναφέρεται ότι οι επιγενετικές αλλαγές και συγκεκριμένα η υποακετυλίωση των ιστονών, είναι πολύ συχνές στο δερματικό και οφθαλμικό μελάνωμα και ρυθμίζουν την έκφρασή του p14. Αυτή η μελέτη παρέχει έναν νέο μηχανισμό αποσιώπησης του γονιδίου σε αυτά τα είδη μελανώματος και υπογραμμίζει τη σημασία της μειωμένης έκφρασης του p14 στην ανάπτυξη του κακόηθους μελανώματος.

Πλήρης απώλεια έκφρασης του αναστολέα p14 παρατηρείται στα μεταστατικά μελανώματα σε σύγκριση με τους καλοήθεις σπίλους. Ο μηχανισμός που συνδέει την ανάπτυξη μεταστάσεων με την απώλεια έκφρασης του p14 βασίζεται στον αύξηση του μεταγραφικού παράγοντα BRN2 ο οποίος ρυθμίζεται άμεσα από τον E2F1 (156). Σε μια μελέτη (157) αναφέρεται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων όπου παρατηρείται απώλεια έκφρασης του p14 έχουν μεταστάσεις στους λεμφαδένες. Στα μελανώματα με απώλεια έκφρασης του p14 και μεταστάσεις στους λεμφαδένες, οι βλάβες είναι ενδιάμεσου πάχους (βάθος διήθησης κατά Breslow: 1,2-3 mm) και ο μιτωτικός ρυθμός κυμαίνεται από 1-5 μιτώσεις/mm². Είναι ενδιαφέρον ότι οι μεταβολές στην έκφραση του p14 δεν συσχετίζονται με αλλαγές στην έκφραση της p53, παρά τη λειτουργία του ως ρυθμιστή του μονοπατιού HDM2/p53. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο αναστολέας p14 μπορεί να ρυθμίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ανεξάρτητα από την p53 και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διερευνηθεί η επίδραση του p14 σε BRN2, Rb και άλλα μόρια που ρυθμίζουν την διαίρεση των μελανοκυττάρων (156).

Υπάρχει συσχέτιση της έκφρασης του p14 με το πάχος του μελανώματος. Παρατηρήθηκε δραστική μείωση της έκφρασης του p14 από μελανώματα με λεπτό πάχος σε εκείνα με ενδιάμεσο πάχος και ακόμα περισσότερη μείωση σε μελανώματα με μεγάλο πάχος. Αν και συσχετίστηκε η απώλεια έκφρασης του p14 με το βάθος διήθησης κατά Breslow και την διήθηση, δεν υπήρχε συσχέτιση με το ποσοστό υποτροπής ή την επιβίωση του ασθενούς. Η παρατήρηση ότι η έκφραση του p14 σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με το πάχος του μελανώματος, σύμφωνα με το βάθος διήθησης κατά Breslow, έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία, ιδίως για διαγνωστικούς και προγνωστικούς σκοπούς (155,158).

Με βάση τα στοιχεία των μελετών που αναφέρθηκαν παραπάνω, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η απώλεια του p14 θα μπορούσε να είναι ένας χρήσιμος διαγνωστικός και προγνωστικός βιοδείκτης στο μελάνωμα. Ωστόσο η γνώση μας για το p14 και κυρίως για τον προγνωστικό του ρόλο στο μελάνωμα είναι πολύ περιορισμένη και οι ερευνητικές μελέτες είναι ελάχιστες. Είναι απαραίτητο να μελετηθεί περαιτέρω για να επικυρωθεί ο ρόλος του ως διαγνωστικός και προγνωστικός βιοδείκτης στο μελάνωμα.

3.7.5 p15^{INK4b}

Το p15, γνωστό και ως p15^{INK4b}, Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B ή multiple tumor suppressor 2 (MTS-2), κωδικοποιείται από το γονίδιο CDKN2B. Αυτό το γονίδιο βρίσκεται δίπλα στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο CDKN2A σε μια περιοχή που συχνά μεταλλάσσεται και διαγράφεται σε πολλές κακοήθειες. Το γονίδιο CDKN2B κωδικοποιεί έναν κυκλινο-εξαρτώμενο αναστολέα, την πρωτεΐνη p15^{INK4b}, η οποία σχηματίζει σύμπλοκο με την κινάση CDK4 ή CDK6, και αποτρέπει την ενεργοποίηση των CDK κινάσεων από την κυκλίνη D, επομένως η πρωτεΐνη p15 λειτουργεί ως ρυθμιστής ανάπτυξης κυττάρων που αναστέλλει την εξέλιξη της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου. Η έκφραση αυτού του γονιδίου επάγεται από τον TGF-beta (159).

Ο αναστολέας p15 έχει μελετηθεί λιγότερο σε σύγκριση με τους άλλους αναστολείς που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του μελανώματος αλλά έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε μελανοκυτταρικούς σπίλους και η απώλεια του προωθεί την μελανογένεση (160). Ομόζυγες ελλείψεις και σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου p15 ανιχνεύθηκαν σε δείγματα ασθενών με πρωτοπαθή μελάνωμα. Μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν και σε μεταστατικές βλάβες, επισημαίνοντας τον σημαντικό ρόλο του p15 στη παθογένεση του κακώθους μελανώματος (161,162).

Η απώλεια έκφρασης του p15 προάγει την μετάβαση από καλοήγη σπίλο σε κακώθες μελάνωμα. Συγκεκριμένα, εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στους μελανοκυτταρικούς σπίλους, συμβάλλει στη διατήρηση των σπίλων σε μια κατάσταση που έχει ανασταλεί ο πολλαπλασιασμός και η ανάπτυξη και τέλος μειώνεται η έκφρασή του στο μελάνωμα (163). Τα επίπεδα έκφρασης του p15 μελετήθηκαν και σε μια άλλη ερευνητική μελέτη (164) όπου αναφέρονται τα ίδια αποτελέσματα και επιβεβαιώνουν τον καθοριστικό ρόλο του p15 στην ανάπτυξη του μελανώματος.

Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η έκφραση του p15 είναι ένας υποσχόμενος διαγνωστικός βιοδείκτης στη διάκριση καλόηθων μελανοκυτταρικών βλαβών από το μελάνωμα. Ωστόσο ο βαθμός στον οποίο συμβάλλει η απώλεια του p15 στην ογκογένεση είναι ασαφής. Επιπλέον, δεν υπάρχουν μελέτες που να υποδεικνύουν πιθανό προγνωστικό ρόλο του p15 στο μελάνωμα. Πρόσθετες μελέτες στο μέλλον θα είναι χρήσιμες για την περαιτέρω επιβεβαίωση της χρησιμότητας του p15 ως διαγνωστικού και ενδεχομένως προγνωστικού δείκτη για μελανοκυτταρικές βλάβες.

4. Συζήτηση και συμπεράσματα

Το μελάνωμα του δέρματος είναι ένας κακώθης όγκος και αποτελεί την πιο επιθετική και θανατηφόρο μορφή κακώθους νεοπλασματος του δέρματος. Τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του μελανώματος ποικίλουν ανάλογα με τη φυλή, τη γεωγραφική περιοχή, την ηλικία, τον ιστολογικό τύπο και την εντόπιση της νόσου. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνεται διαρκώς, κυρίως στην Ευρώπη, τη Βόρεια Αμερική και την Αυστραλία. Στην Ευρώπη η επίπτωση είναι πιο συχνή στο Βορρά σε σύγκριση με το Νότο και αυτό μπορεί να οφείλεται στα διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού στη Βόρεια Ευρώπη (ανοιχτό χρώμα δέρματος, ματιών και μαλλιών) και στην έντονη διαλείπουσα έκθεση στον ήλιο κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών διακοπών. Στην Ελλάδα τα ποσοστά είναι μικρότερα σε σχέση με άλλα ευρωπαϊκά κράτη, της τάξης των 4-5 περιπτώσεων ανά 100.000 κατοίκους ενώ στην Βόρεια Ευρώπη διαγιγνώσκονται περίπου 20 ανά 100.000 άνθρωποι κάθε χρόνο με μελάνωμα. Κύριοι παράγοντες κινδύνου του μελανώματος είναι η υπεριώδης ακτινοβολία (η φυσική ή η τεχνηκή της μορφή), τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του δέρματος και η ύπαρξη δυσπλαστικών σπίλων. Το οικογενειακό ιστορικό μελανώματος καθώς και η ύπαρξη κληρονομικών μεταλλάξεων σε σημαντικά γονίδια όπως το CDK4 και CDKN2A, έχουν εξέχουσα σημασία στην επίπτωση του μελανώματος.

Η επιβίωση των ασθενών με μελάνωμα ποικίλει πάρα πολύ. Στις περιπτώσεις λεμφαδενικών μεταστάσεων και απομακρυσμένων μεταστάσεων, η 5-ετής επιβίωση δύναται να μειωθεί έως και 39% και 10% αντιστοίχως, ενώ στην περίπτωση των εντοπισμένων μελανωμάτων η 5-ετής επιβίωση κυμαίνεται από 53% έως 97%. Ακόμα και μετά από κατάλληλη χειρουργική εκτομή του πρωτοπαθούς μελανώματος, παρατηρείται μεταστατική νόσος σε ένα σημαντικό

ποσοστό. Ως εκ τούτου, υπάρχει κατά την αρχική διάγνωση μεγάλη ανάγκη αναγνώρισης των ασθενών με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής. Για το λόγο αυτό παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον οι προγνωστικοί βιοδείκτες, οι οποίοι δύνανται να παρέχουν εκτίμηση της επιθετικότητας, της πιθανότητας μετάστασης και της συνολικής έκβασης της νόσου. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί πολύ σημαντικοί κλινικοπαθολογοανατομικοί προγνωστικοί παράγοντες οι οποίοι περιλαμβάνουν το βάθος διήθησης κατά Breslow, εξέλκωση, αριθμός μιτώσεων, επίπεδο διήθησης κατά Clark, διήθηση λεμφαδένων και απομακρυσμένες μεταστάσεις. Αυτοί οι προγνωστικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του κινδύνου υποτροπής και θανάτου από τη νόσο. Επειδή όμως το μελάνωμα παρουσιάζει απρόβλεπτη βιολογική συμπεριφορά και οι καθιερωμένοι προγνωστικοί παράγοντες δεν εκφράζουν πλήρως τις παρατηρούμενες διαφορές στη σχετιζόμενη με τη νόσο επιβίωση, έχει εξέχουσα σημασία η συνεχής αναζήτηση νέων προγνωστικών βιοδεικτών που θα εκτιμούν με περισσότερη ακρίβεια την συνολική έκβαση της νόσου.

Γνωρίζουμε πως οι κυκλίνες και οι κυκλινο-εξαρτώμενοι αναστολείς των κινασών, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου των μελανοκυττάρων. Στην παρούσα μελέτη, στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου διατριβής επιδιώκουμε να μελετήσουμε την προγνωστική αξία της σχέσης έκφρασης κυκλινών και κυκλινο-εξαρτώμενων αναστολών των κινασών και να ερευνήσουμε εάν οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να αποτελέσουν προγνωστικούς βιοδείκτες στο μελάνωμα του δέρματος. Σε μια συστηματική ανασκόπηση και μετά-ανάλυση δεκάδων υποψήφιων βιοδεικτών, φάνηκε πως οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με 'μη ευαισθησία σε σήματα κατά την ανάπτυξη' (insensitivity to antigrowth signals), με 'απεριόριστο δυναμικό αντιγραφής' (limitless replicative potential), με 'αυτάρκεια σε σήματα ανάπτυξης' (self-sufficiency in growth signals) και με 'διήθηση του ιστού και μετάσταση' (tissue invasion and metastasis), έχουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα να επηρεάσουν τη συνολική, τη σχετιζόμενη με το μελάνωμα, και την ελεύθερη νόσου επιβίωση και ως εκ τούτου να αποτελέσουν χρήσιμους βιοδείκτες (164). Οι κυκλίνες A, B, D1, D3, E καθώς και οι κυκλινο-εξαρτώμενοι αναστολείς των κινασών p16^{INK4a}, p21^{WAF1/CIP1} και p27^{Kip1} συμπεριλαμβάνονται στην προαναφερόμενη συστηματική ανασκόπηση όπου αναφέρονται οι πρωτεΐνες που έχουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα να αποτελέσουν χρήσιμους βιοδείκτες στο μελάνωμα.

Σύμφωνα με τη συστηματική βιβλιογραφική ανασκόπηση που πραγματοποιήθηκε, η κυκλίνη D1 δεν βρέθηκε να συσχετίζεται με την ελεύθερη νόσου επιβίωση και τη συνολική επιβίωση στο μελάνωμα επιφανειακής ανάπτυξης καθώς και στο οζώδες μελάνωμα (103). Σε μία αναφορά (110) που μελετά την έκφραση της κυκλίνης D1 στο οφθαλμικό μελάνωμα βρέθηκε ότι συσχετίζεται με επιθετική πορεία και κατ' επέκταση με δυσμενή έκβαση αυτού του τύπου του μελανώματος. Η έκφραση των κυκλινών D3 και A συσχετίστηκαν με συνολική επιβίωση και ελεύθερη νόσου επιβίωση στο επιφανειακά εξαπλούμενο μελάνωμα (103,165). Επιπρόσθετα, η μελέτη των Florenes et. al. (115) έδειξε ότι η επίδραση της κυκλίνης A στην επιβίωση ελεύθερης νόσου βρέθηκε να είναι ανεξάρτητη του κατακόρυφου πάχους, το οποίο αποτελεί τον πιο αξιόπιστο προγνωστικό δείκτη μέχρι σήμερα στο μελάνωμα. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι το επίπεδο έκφρασης της κυκλίνης A μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης πρόωρης υποτροπής σε ασθενείς με επιφανειακά εξαπλούμενο μελάνωμα. Οι μελέτες που αναφέρονται στην κυκλίνη B είναι περιορισμένες και δείχνουν ότι η κυκλίνη B δεν σχετίζεται με την κλινική έκβαση του μελανώματος (114,118). Αντίθετα, η έκφραση της κυκλίνης E, ως προγνωστικός παράγοντας για τη συνολική επιβίωση, μελετήθηκε από τους Alonso et. al. (105) και φάνηκε ότι η αύξηση της κυκλίνης E σχετίζεται με μείωση της συνολικής επιβίωσης. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, η κυκλίνη E μπορεί δυνητικά να αποτελέσει έναν βιοδείκτη για ασθενείς με μελάνωμα.

Το δεύτερο μέρος της βιβλιογραφικής έρευνας αφορά τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών και την πιθανή χρήση τους ως προγνωστικούς δείκτες στο δερματικό μελάνωμα. Ο προγνωστικός ρόλος του αναστολέα p16 στο μελάνωμα έχει μελετηθεί αρκετά. Η απώλεια έκφρασης του p16 συσχετίζεται με υποτροπιάζουσα νόσο (126), μειωμένη επιβίωση (109,127,133) και παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (128). Μια μελέτη (129) με μεγάλο αριθμό δειγμάτων έδειξε ότι η απουσία έκφρασης του p16 προβλέπει φτωχή συνολική επιβίωση και επιβίωση ελεύθερης νόσου από απομακρυσμένες μεταστάσεις, ανεξάρτητα από τους γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες όπως το βάθος διήθησης κατά Breslow, η εξέλιξη και το στάδιο της νόσου. Αντίθετα, η προγνωστική αξία του αναστολέα p21 στο μελάνωμα είναι ασαφής και οι μελέτες είναι αντιφατικές. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν μείωση της έκφρασης του p21 σε μελανώματα με μεγάλο βάθος διήθησης κατά Breslow (140,141) ενώ άλλες αναφέρουν αύξηση της έκφρασης του p21 σε μεγάλου πάχους μελανώματα (115). Οι Alonso et. al. (105) υποστηρίζουν ότι η αύξηση της έκφρασης του p21 συσχετίζεται με μειωμένη συνολικά επιβίωση, ενώ σε άλλες μελέτες (144,146) δεν αποδεικνύεται σημαντική σχέση του p21 και της κλινικής έκβασης του μελανώματος.

Το επίπεδο έκφρασης του αναστολέα p27 δεν συσχετίζεται με συνολική επιβίωση στο μελάνωμα ενώ συγκεκριμένα στο οζώδες μελάνωμα η μειωμένη έκφραση του p27 συνδέεται με υψηλότερο κίνδυνο πρόωρης υποτροπής. Επιπλέον, στην περίπτωση του οζώδες μελανώματος, ο αναστολέας p27 εκφράζεται σε μικρότερα επίπεδα σε μελανώματα με μεγαλύτερο βάθος διήθησης κατά Breslow, ενώ αυτή η συσχέτιση δεν παρατηρείται στο επιφανειακά εξαπλούμενο μελάνωμα (144). Η αύξηση του κυτταροπλασματικού p27 συσχετίζεται με φτωχή 5-ετή επιβίωση στο μεταστατικό μελάνωμα (150) και φαίνεται να αποτελεί έναν δυνητικά προγνωστικό παράγοντα για φτωχή πρόγνωση σε ασθενείς σταδίου III και IV (151).

Ο προγνωστικός ρόλος των αναστολέων p14 και p15 στο μελάνωμα δεν έχει μελετηθεί αρκετά. Ωστόσο υπάρχουν μελέτες που επισημαίνουν τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν στην παθογένεση του κακόηθους μελανώματος (153,155,161,162). Μια μελέτη (157) αναφέρει ότι η απώλεια του αναστολέα p14 συνδέεται με λεμφαδενικές μεταστάσεις και σε αυτή την περίπτωση οι βλάβες είναι ενδιάμεσου πάχους (1,2-3 mm) και ο μιτωτικός ρυθμός κυμαίνεται από 1-5 μιτώσεις/mm². Επιπλέον, υπάρχει συσχέτιση της απώλειας έκφρασης του p14 με το βάθος διήθησης κατά Breslow και αυτό έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία. Ωστόσο, δεν υπάρχει συσχέτιση με το ποσοστό υποτροπής ή την επιβίωση του ασθενούς (155,158).

Συμπερασματικά, από τη συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου διατριβής φαίνεται πως σημαντική αξία στην πρόγνωση του μελανώματος έχουν οι κυκλίνες D3, A και E. Πιο συγκεκριμένα, οι κυκλίνες D3 και A θα μπορούσαν να αποτελέσουν δείκτες πρόγνωσης για τη συνολική επιβίωση και την επιβίωση ελεύθερης νόσου στο επιφανειακά εξαπλούμενο μελάνωμα. Η κυκλίνη E, παρόλο που οι μελέτες είναι περιορισμένες, φάνηκε πως σχετίζεται με την συνολική επιβίωση και μπορεί δυνητικά να αποτελέσει έναν βιοδείκτη στο μελάνωμα. Σε ότι αφορά την προγνωστική αξία των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, βρέθηκε ότι ο αναστολέας p16 έχει σημαντικό ρόλο ως προγνωστικός δείκτης στο μελάνωμα. Συσχετίζεται με συνολική επιβίωση και επιβίωση ελεύθερης νόσου ανεξάρτητα από τους γνωστούς προγνωστικούς δείκτες βάθος διήθησης κατά Breslow, εξέλιξη και στάδιο νόσου. Είναι εξίσου σημαντική η συσχέτιση της απώλειας έκφρασης του p16 με τις λεμφαδενικές μεταστάσεις και μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο προγνωστικό παράγοντα της κατάστασης των λεμφαδένων στο κακόηθες μελάνωμα. Φαίνεται ότι και ο αναστολέας p27 έχει σημαντικό ρόλο στο μελάνωμα. Συσχετίζεται με την επιβίωση στο μεταστατικό μελάνωμα και φαίνεται να αποτελεί έναν δυνητικά προγνωστικό παράγοντα με φτωχή

πρόγνωση σε ασθενείς σταδίου III και IV. Επίσης, η έκφραση του p14 παρόλο που δεν έχει μελετηθεί αρκετά, φαίνεται από την βιβλιογραφία ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μελάνωμα γιατί ενώ δεν συνδέεται με την επιβίωση και την υποτροπή, συσχετίζεται με λεμφαδενικές μεταστάσεις και το βάθος διήθησης κατά Breslow. Σε ότι αφορά τον αναστολέα p21, οι μελέτες είναι διφορούμενες και δεν αποδεικνύεται ο προγνωστικός του ρόλος. Παρόλα αυτά, αναφέρεται σε μελέτες πως όταν ο προγνωστικός ρόλος του p21 μελετάται συνδυαστικά με του αναστολέα p27 ή με της κυκλίνης A, η προγνωστική αξία του είναι μεγαλύτερη.

5. Βιβλιογραφία

1. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2012. *Eur J Cancer* [Internet]. 2012;48(15):2375–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.06.013>
2. Marsden JR, Newton-Bishop JA, Burrows L, Cook M, Corrie PG, Cox NH, et al. Revised UK guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg* [Internet]. 2010;63(9):1401–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2010.07.006>
3. Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schüz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart EW, et al. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008-are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer*. 2013;132(2):385–400.
4. Lo J a, Fisher DE. The melanoma revolution: From UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science* (80-) [Internet]. 2014 Nov 21;346(6212):945–9. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1253735>
5. Edlundh-Rose E, Egyházi S, Omholt K, Månsson-Brahme E, Platz A, Hansson J, et al. NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: A study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res*. 2006;16(6):471–8.
6. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(26):4340–6.
7. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93–9.
8. Gershenwald JE, Scolyer RA. Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2018;25(8):2105–10. Available from: <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6513-7>
9. Spatz A, Cook MG, Elder DE, Piepkorn M, Ruitter DJ, Barnhill RL. Interobserver reproducibility of ulceration assessment in primary cutaneous melanomas. *Eur J Cancer*. 2003;39(13):1861–5.
10. In’T Hout FEM, Haydu LE, Murali R, Bonenkamp JJ, Thompson JF, Scolyer RA.

- Prognostic importance of the extent of ulceration in patients with clinically localized cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 2012;255(6):1165–70.
11. Warycha MA, Christos PJ, Mazumdar M, Darvishian F, Shapiro RL, Berman RS, et al. Changes in the presentation of nodular and superficial spreading melanomas over 35 years. *Cancer.* 2008;113(12):3341–8.
 12. Rakosy Z, Ecsedi S, Toth R, Vizkeleti L, Hernandez-Vargas H, Lazar V, et al. Integrative Genomics Identifies Gene Signature Associated with Melanoma Ulceration. *PLoS One.* 2013;8(1).
 13. Jewell R, Elliott F, Laye J, Nsengimana J, Davies J, Walker C, et al. Associated With Ulceration of Primary Melanoma. 2016;28(1):94–104.
 14. Eggermont AMM, Suci S, Testori A, Kruit WH, Marsden J, Punt CJ, et al. Ulceration and stage are predictive of interferon efficacy in melanoma: Results of the phase III adjuvant trials EORTC 18952 and EORTC 18991. *Eur J Cancer.* 2012;48(2):218–25.
 15. Wrightson WR, Wong SL, Edwards MJ, Chao C, Reintgen DS, Ross MI, et al. Complications associated with sentinel lymph node biopsy for melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2003;10(6):676–80.
 16. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF. Update on the melanoma staging system: The importance of sentinel node staging and primary tumor mitotic rate. *J Surg Oncol.* 2011;104(4):379–85.
 17. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009;27(36):6199–206.
 18. Michielin O, Akkooi ACJ Van, Ascierto PA, Dummer R, Keilholz U, Committee G. Cutaneous melanoma : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis , treatment and follow-up †. *Cancer-related Cogn Impair [Internet].* 2019;30(12):1884–901. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdz411>
 19. Joyce D, Skitzki JJ. Surgical Management of Primary Cutaneous Melanoma. *Surg Clin North Am [Internet].* 2020;100(1):61–70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.suc.2019.09.001>
 20. Hazan C, Dusza SW, Delgado R, Busam KJ, Halpern AC, Nehal KS. Staged excision for lentigo maligna and lentigo maligna melanoma: A retrospective analysis of 117 cases. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58(1):142–8.
 21. Kunishige JH, Brodland DG, Zitelli JA. Surgical margins for melanoma in situ. *J Am Acad Dermatol [Internet].* 2012;66(3):438–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2011.06.019>
 22. Johnson TM, Sondak VK, Bichakjian CK, Sabel MS. The role of sentinel lymph node biopsy for melanoma: Evidence assessment. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(1):19–27.
 23. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Nieweg OE, Roses DF, et al. Final Trial Report of Sentinel-Node Biopsy versus Nodal Observation in Melanoma. *N Engl J Med.* 2014;370(7):599–609.
 24. Han D, Zager JS, Shyr Y, Chen H, Berry LD, Iyengar S, et al. Clinicopathologic predictors of sentinel lymph node metastasis in thin melanoma. *J Clin Oncol.* 2013;31(35):4387–93.
 25. Mozzillo N, Pennacchioli E, Gandini S, Caracò C, Crispo A, Botti G, et al. Sentinel node biopsy in thin and thick melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(8):2780–6.

26. Wong SL, Brady MS, Busam KJ, Coit DG. Results of sentinel lymph node biopsy in patients with thin melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2006;13(3):302–9.
27. Murali R, Haydu LE, Quinn MJ, Saw RPM, Shannon K, Spillane AJ, et al. Sentinel lymph node biopsy in patients with thin primary cutaneous melanoma. *Ann Surg*. 2012;255(1):128–33.
28. Cascinelli N, Bombardieri E, Bufalino R, Camerini T, Carbone A, Clemente C, et al. Sentinel and nonsentinel node status in stage IB and II melanoma patients: two-step prognostic indicators of survival. *J Clin Oncol*. 2006;24(27):4464–71.
29. Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, Andtbacka RH, Mozzillo N, Zager JS, et al. Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Jun 8;376(23):2211–22. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1613210>
30. Bello DM, Faries MB. The Landmark Series: MSLT-1, MSLT-2 and DeCOG (Management of Lymph Nodes). *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2020;27(1):15–21. Available from: <https://doi.org/10.1245/s10434-019-07830-w>
31. Pilko G, Besic N, Zgajnar J, Hocevar M. Prognostic heterogeneity after the excision of lymph node metastases in patients with cutaneous melanoma. *Surg Oncol* [Internet]. 2011;20(1):26–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.suronc.2009.09.004>
32. Weinberg RA. *The biology of CANCER*. Second Edi. 2013.
33. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol* [Internet]. 2014;15(6):122. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb4184>
34. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(3):153–66.
35. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(3):222–31.
36. Alexandrov LB, Nik-zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR. Europe PMC Funders Group Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2014;500(7463):415–21.
37. Davis EJ, Johnson DB, Sosman JA, Chandra S. Melanoma: What do all the mutations mean? *Cancer* [Internet]. 2018 Sep 1;124(17):3490–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.31345>
38. Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: Genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev*. 2006;20(16):2149–82.
39. Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: From mutations to medicine. *Genes Dev*. 2012;26(11):1131–55.
40. Liebermann DA, Hoffman B, Vesely D. P53 Induced Growth Arrest Versus Apoptosis and Its Modulation By Survival Cytokines. *Cell Cycle*. 2007;6(2):166–70.
41. Bennett DC. How to make a melanoma: What do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008;21(1):27–38.
42. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian S V., Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* [Internet]. 2007 Jun;28(6):622–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.20495>
43. Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, Albert M, Ally A, Amin SB, et al. Genomic

- Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015;161(7):1681–96.
44. Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, Sementino E, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet* [Internet]. 2011 Oct 28;43(10):1022–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng.912>
 45. Wiesner T, Obenauf AC, Murali R, Fried I, Griewank KG, Ulz P, et al. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet*. 2011;43(10):1018–22.
 46. Lee YR, Chen M, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2018;19(9):547–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0015-0>
 47. Aguisa-Touré AH, Li G. Genetic alterations of PTEN in human melanoma. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(9):1475–91.
 48. Robertson GP. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2005;24(2):273–85.
 49. Kaur A, Webster MR, Weeraratna AT. In the Wnt-er of life: Wnt signalling in melanoma and ageing. *Br J Cancer*. 2016;115(11):1273–9.
 50. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. 2017;36(11):1461–73.
 51. Dahl C, Guldborg P. The genome and epigenome of malignant melanoma. *Apmis*. 2007;115(10):1161–76.
 52. Larue L, Delmas V. Developmental Genetics of Melanocytes, UMR 146 CNRS-Institut Curie, Bat. 110, 91405, Orsay Cedex, France. *Front Biosci*. 2006;11:733–42.
 53. Delmas V, Beermann S, Viros A, Demirkan N, Bastian BC, Goding CR, et al. β -Catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing. *Genes Dev*. 2007;29:23–35.
 54. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949–54.
 55. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*. 2003;33(1):19–20.
 56. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116(6):855–67.
 57. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. 2004;6(4):313–9.
 58. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(24):1878–80.
 59. Natali PG, Nicotra MR, Di Renzo MF, Prat M, Bigotti A, Cavaliere R, et al. Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: Demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression. *Br J Cancer*. 1993;68(4):746–50.
 60. Griewank KG, Murali R, Puig-Butille JA, Schilling B, Livingstone E, Potrony M, et al. TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous

- melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(9).
61. Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N, Johansson PA, Field MA, Nones K, et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature.* 2017;545(7653):175–80.
 62. Robertson AG, Shih J, Yau C, Gibb EA, Oba J, Mungall KL, et al. Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell.* 2018;33(1):151.
 63. Johnson DB, Roszik J, Shoushtari AN, Eroglu Z, Balko JM, Higham C, et al. Comparative analysis of the GNAQ , GNA11 , SF3B1 , and EIF1AX driver mutations in melanoma and across the cancer spectrum. *Pigment Cell Melanoma Res [Internet].* 2016 Jul;29(4):470–3. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/pcmr.12482>
 64. Chen X, Wu Q, Depeille P, Chen P, Thornton S, Kalirai H, et al. RasGRP3 Mediates MAPK Pathway Activation in GNAQ Mutant Uveal Melanoma. *Cancer Cell [Internet].* 2017 May;31(5):685–696.e6. Available from: <http://journals.lww.com/00000434-201811000-00002>
 65. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature.* 2005;436(7047):117–22.
 66. Kawakami A, Fisher DE. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Lab Investig [Internet].* 2017;97(6):649–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2017.9>
 67. Smith MP, Ferguson J, Arozarena I, Hayward R, Marais R, Chapman A, et al. Effect of SMURF2 targeting on susceptibility to MEK inhibitors in melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(1):33–46.
 68. Jacobs JLL, Keblusek P, Robanus-Maandag E, Kristel P, Lingbeek M, Nederlof PM, et al. Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat Genet.* 2000;26(3):291–9.
 69. Jönsson G, Dahl C, Staaf J, Sandberg T, Bendahl PO, Ringnér M, et al. Genomic profiling of malignant melanoma using tiling-resolution arrayCGH. *Oncogene.* 2007;26(32):4738–48.
 70. Lin X, Sun R, Zhao X, Zhu D, Zhao X, Gu Q, et al. C-myc overexpression drives melanoma metastasis by promoting vasculogenic mimicry via c-myc/snail/Bax signaling. *J Mol Med [Internet].* 2017;95(1):53–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-016-1452-x>
 71. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet [Internet].* 2012 Sep 29;44(9):1006–14. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng.2359>
 72. Watson IR, Li L, Cabeceiras PK, Mahdavi M, Gutschner T, Genovese G, et al. The RAC1 P29S Hotspot Mutation in Melanoma Confers Resistance to Pharmacological Inhibition of RAF. *Cancer Res [Internet].* 2014 Sep 1;74(17):4845–52. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-14-1232-T>
 73. Vu HL, Rosenbaum S, Purwin TJ, Davies MA, Aplin AE. RAC1 P29S regulates PD-L1 expression in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res [Internet].* 2015 Sep;28(5):590–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/pcmr.12392>

74. Kim M, Gans JD, Nogueira C, Wang A, Paik JH, Feng B, et al. Comparative Oncogenomics Identifies NEDD9 as a Melanoma Metastasis Gene. *Cell*. 2006;125(7):1269–81.
75. Haass NK, Herlyn M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Investig Dermatol Symp Proc [Internet]*. 2005;10(2):153–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1087-0024.2005.200407.x>
76. Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D, Crothers J, Khodabakhsh D, Pulliam BL, et al. The gene expression signatures of melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(17):6092–7.
77. Hoek KS. DNA microarray analyses of melanoma gene expression: A decade in the mines. *Pigment Cell Res*. 2007;20(6):466–84.
78. Zaidi MR, Davis S, Noonan FP, Graff-Cherry C, Hawley TS, Walker RL, et al. Interferon- γ links ultraviolet radiation to melanomagenesis in mice. *Nature [Internet]*. 2011 Jan 19;469(7331):548–53. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature09666>
79. Moran B, Silva R, Perry AS, Gallagher WM. Epigenetics of malignant melanoma. *Semin Cancer Biol [Internet]*. 2018;51:80–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.10.006>
80. Fattore L, Costantini S, Malpicci D, Ruggiero CF, Ascierto PA, Croce CM, et al. MicroRNAs in melanoma development and resistance to target therapy. *Oncotarget*. 2017;8(13):22262–78.
81. Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1253–61.
82. Garraway LA, Sellers WR. Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(8):593–602.
83. Damsky WE, Bosenberg M. Melanocytic nevi and melanoma: Unraveling a complex relationship. *Oncogene*. 2017;36(42):5771–92.
84. Liu W, Sharpless NE. Senescence-escape in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res [Internet]*. 2012 Jul;25(4):408–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22900268>
85. Pérez-Guijarro E, Day C-P, Merlino G, Zaidi MR. Genetically engineered mouse models of melanoma. *Cancer [Internet]*. 2017 Jun 1;123(S11):2089–103. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.30684>
86. Ha L, Lchikawa T, Anver M, Dickins R, Lowe S, Sharpless NE, et al. ARF functions as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-independent senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(26):10968–73.
87. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis [Internet]*. 2000 Mar;21(3):485–95. Available from: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/21.3.485>
88. Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. P53-Related Pathways and the Molecular Pathogenesis of Melanoma. *Eur J Cancer Prev*. 2003;12(2):93–100.
89. Kasof GM, Gomes BC. Livin, a Novel Inhibitor of Apoptosis Protein Family Member. *J Biol Chem*. 2001;276(5):3238–46.
90. Ivanov VN, Bhoumik A, Ronai Z. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene*. 2003;22(20):3152–61.

91. Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet J, Ramaswamy S, Kuo W, Gray JW, et al. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet* [Internet]. 2005 Oct 4;37(10):1047–54. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng1634>
92. Nickoloff BJ, Hendrix MJC, Pollock PM, Trent JM, Miele L, Qin JZ. Notch and NOXA-related pathways in melanoma cells. *J Investig Dermatol Symp Proc* [Internet]. 2005;10(2):95–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1087-0024.2005.200404.x>
93. Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2005;24(2):195–222.
94. Crowson AN, Magro C, Miller A, Mihm MC. The Molecular Basis of Melanomagenesis and the Metastatic Phenotype. *Semin Oncol*. 2007;34(6):476–90.
95. Füzéry AK, Levin J, Chan MM, Chan DW. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: Issues and challenges. *Clin Proteomics* [Internet]. 2013;10(1):1. Available from: *Clinical Proteomics*
96. Duffy MJ. Tumor markers in clinical practice: A review focusing on common solid cancers. *Med Princ Pract*. 2012;22(1):4–11.
97. Mordente A, Meucci E, Martorana GE, Silvestrini A. Cancer biomarkers discovery and validation: State of the art, problems and future perspectives. *Adv Exp Med Biol*. 2015;867:9–26.
98. Duffy MJ, O'Donovan N, Crown J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2011;37(2):151–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.07.004>
99. Eisenstein A, Gonzalez EC, Raghunathan R, Xu X, Wu M, McLean EO, et al. Emerging Biomarkers in Cutaneous Melanoma. *Mol Diagnosis Ther* [Internet]. 2018;22(2):203–18. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0318-z>
100. Mandalà M, Massi D. Tissue prognostic biomarkers in primary cutaneous melanoma. *Virchows Arch*. 2014;464(3):265–81.
101. Schramm S, Menzies AM, Mann GJ. Molecular biomarkers of prognosis in melanoma : how far are we from the clinic ? 2013;423–5.
102. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(8):558–72.
103. Flørenes VA, Faye RS, Mælandsmo GM, Nesland JM, Holm R. Levels of Cyclin D1 and D3 in Malignant Melanoma : Deregulated Cyclin D3 Expression Is Associated with Poor Clinical Outcome in Superficial Melanoma 1. 2000;6(3):3614–20.
104. Karim RZ, Li W, Sanki A, Colman MH, Yang YH, Thompson JF, et al. Reduced p16 and Increased Cyclin D1 and pRb Expression Are Correlated with Progression in Cutaneous Melanocytic Tumors. *Int J Surg Pathol*. 2009;17(5):361–7.
105. Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuña MJ, et al. Progression in Cutaneous Malignant Melanoma Is Associated with Distinct Expression Profiles. *Am J Pathol* [Internet]. 2004 Jan;164(1):193–203. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010631100>
106. Ramirez JA, Guitart J, Rao MS, Diaz LK. Cyclin D1 expression in melanocytic lesions of the skin. *Ann Diagn Pathol*. 2005;9(4):185–8.
107. Kaufmann C, Kempf W, Mangana J, Cheng P, Emberger M, Lang R, et al. The role of

- cyclin D1 and Ki-67 in the development and prognostication of thin melanoma. *Histopathology*. 2020;77(3):460–70.
108. Katunarić M, Jurišić D, Petković M, Grahovac M, Grahovac B, Zamolo G. EGFR and cyclin D1 in nodular melanoma: Correlation with pathohistological parameters and overall survival. *Melanoma Res*. 2014;24(6):584–91.
 109. Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuña MJ, et al. Progression in Cutaneous Malignant Melanoma Is Associated with Distinct Expression Profiles: A Tissue Microarray-Based Study. *Am J Pathol*. 2004;164(1):193–203.
 110. Coupland SE, Anastassiou G, Stang A, Schilling H, Anagnostopoulos I, Bornfeld N, et al. The prognostic value of cyclin D1, p53, and MDM2 protein expression in uveal melanoma. *J Pathol*. 2000;191(2):120–6.
 111. Wang B, Wang Z, Han L, Gong S, Wang Y, He Z, et al. Prognostic significance of cyclin D3 expression in malignancy patients: A meta-analysis. *Cancer Cell Int [Internet]*. 2019;19(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0865-3>
 112. Alekseenko A, Wojas-Pelc A, Lis GJ, Furgał-Borzych A, Surówka G, Litwin JA. Cyclin D1 and D3 expression in melanocytic skin lesions. *Arch Dermatol Res*. 2010;302(7):545–50.
 113. Choi YJ, Li X, Hydbring P, Sanda T, Stefano J, Christie AL, et al. The Requirement for Cyclin D Function in Tumor Maintenance. *Cancer Cell [Internet]*. 2012 Oct;22(4):438–51. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 114. Tran T, Ross JS, Carlson JA, Mihm MC. Mitotic cyclins and cyclin-dependent kinases in melanocytic lesions. *Hum Pathol [Internet]*. 1998 Oct;29(10):1085–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004681779890418X>
 115. Ann Flørenes V, Mari Mælandsmo G, Faye R, Nesland JM, Holm R. Cyclin A expression in superficial spreading malignant melanomas correlates with clinical outcome. *J Pathol*. 2001;195(5):530–6.
 116. Moore JD, Kirk JA, Hunt T. Unmasking the S-phase-promoting potential of cyclin B1. *Science (80-)*. 2003;300(5621):987–90.
 117. Hydbring P, Malumbres M, Sicinski P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]*. 2016 May 1;17(5):280–92. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrm.2016.27>
 118. Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol*. 2008;35(5):433–44.
 119. Ye C, Wang J, Wu P, Li X, Chai Y. Prognostic role of cyclin B1 in solid tumors: A meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(2):2224–32.
 120. Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*. 2004;432(7015):298–306.
 121. Bales E, Mills L, Milam N, McGahren-Murray M, Bandyopadhyay D, Chen D, et al. The low molecular weight cyclin E isoforms augment angiogenesis and metastasis of human melanoma cells in vivo. *Cancer Res*. 2005;65(3):692–7.
 122. Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol*. 2001;54(3):229–35.

123. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PAT, Ally DS, Sheahan MD, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet.* 1994;8(1):15–21.
124. Kumar R, Rozell BL, Louhelainen J, Hemminki K. Mutations in the CDKN2A (p16INK4a) gene in microdissected sporadic primary melanomas. *Int J Cancer* [Internet]. 1998 Jan 19;75(2):193–8. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980119\)75:2%3C193::AID-IJC5%3E3.0.CO;2-P](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0215(19980119)75:2%3C193::AID-IJC5%3E3.0.CO;2-P)
125. Koh SS, Cassarino DS. Immunohistochemical expression of p16 in melanocytic lesions: An updated review and meta-analysis. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(7):815–28.
126. Straume O, Akslen LA. Alterations and prognostic significance of p16 and p53 protein expression in subgroups of cutaneous melanoma. *Int J Cancer.* 1997;74(5):535–9.
127. Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res.* 2000;6(5):1845–53.
128. Mihic-Probst D, Mnich CD, Oberholzer PA, Seifert B, Sasse B, Moch H, et al. P16 Expression in Primary Malignant Melanoma Is Associated With Prognosis and Lymph Node Status. *Int J Cancer.* 2006;118(9):2262–8.
129. Lade-Keller J, Riber-Hansen R, Guldborg P, Schmidt H, Hamilton-Dutoit SJ, Steiniche T. Immunohistochemical analysis of molecular drivers in melanoma identifies p16 as an independent prognostic biomarker. *J Clin Pathol.* 2014;67(6):520–8.
130. Fearfield LA, Larkin JMG, Rowe A, A'Hern R, Fisher C, Francis N, et al. Expression of p16, CD95, CD95L and Helix pomatia agglutinin in relapsing and nonrelapsing very thin melanoma. *Br J Dermatol.* 2007;156(3):440–7.
131. Sanki A, Li W, Colman M, Karim RZ, Thompson JF, Scolyer RA. Reduced expression of p16 and p27 is correlated with tumour progression in cutaneous melanoma. *Pathology.* 2007;39(6):551–7.
132. Franchi A, Alos L, Gale N, Massi D, Paglierani M, Santucci M, et al. Expression of p16 in sinonasal malignant melanoma. *Virchows Arch.* 2006;449(6):667–72.
133. Prasad ML, Patel SG, Shah JP, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ. Prognostic Significance of Regulators of Cell Cycle and Apoptosis, p16 INK4a, p53, and bcl-2 in Primary Mucosal Melanomas of the Head and Neck. *Head Neck Pathol.* 2012;6(2):184–90.
134. Chen H, Li Y, Long Y, Tang E, Wang R, Huang K, et al. Increased p16 and p53 protein expression predicts poor prognosis in mucosal melanoma. *Oncotarget.* 2017;8(32):53226–33.
135. Guo Y, Long J, Lei S. Promoter methylation as biomarkers for diagnosis of melanoma: A systematic review and meta-analysis. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):7356–67.
136. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: A function for each cell compartment? *Trends Cell Biol.* 2003;13(2):65–70.
137. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* [Internet]. 2013 Aug 1;140(15):3079–93. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.091744>

138. Georgakilas AG, Martin OA, Bonner WM. p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol Med*. 2017;23(4):310–9.
139. Mouriaux F, Maurage CA, Labalette P, Sablonnière B, Malecaze F, Darbon JM. Cyclin-dependent kinase inhibitory protein expression in human choroidal melanoma tumors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2000 Sep;41(10):2837–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967035>
140. Maelandsmo GM, Holm R, Fodstad O, Kerbel RS, Flørenes VA. Cyclin kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in malignant melanoma: reduced expression in metastatic lesions. *Am J Pathol* [Internet]. 1996 Dec;149(6):1813–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005276069902355>
141. Karjalainen JM, Eskelinen MJ, Kellokoski JK, Reinikainen M, Alhava EM, Kosma VM. P21(WAF1/CIP1) expression in stage I cutaneous malignant melanoma: Its relationship with p53, cell proliferation and survival. *Br J Cancer*. 1999;79(5–6):895–902.
142. Trotter MJ, Tang L, Tron VA. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/GIP1 in human cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol* [Internet]. 1997 May;24(5):265–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0560.1997.tb00790.x>
143. Bales ES, Dietrich C, Bandyopadhyay D, Schwahn DJ, Xu W, Didenko V, et al. High levels of expression of p27(KIP1) and cyclin E in invasive primary malignant melanomas. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1999;113(6):1039–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00812.x>
144. Flørenes VA, Maelandsmo GM, Kerbel RS, Slingerland JM, Nesland JM, Holm R. Protein Expression of the Cell-Cycle Inhibitor p27Kip1 in Malignant Melanoma. *Am J Pathol* [Internet]. 1998 Jul;153(1):305–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010655721>
145. Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Lee CS, Zhuang L, et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology*. 2006;38(4):287–301.
146. Baldi A, Santini D, Battista T, Dragonetti E, Ferranti G, Petitti T, et al. Expression of AP-2 transcription factor and of its downstream target genes c-kit, E-cadherin and p21 in human cutaneous melanoma. *J Cell Biochem*. 2001;83(3):364–72.
147. Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: Prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(4):253–67.
148. Li Q, Murphy M, Ross J, Sheehan C, Carlson JA. Skp2 and p27kip1 expression in melanocytic nevi and melanoma: An inverse relationship. *J Cutan Pathol*. 2004;31(10):633–42.
149. Denicourt C, Saenz CC, Datnow B, Cui XS, Dowdy SF. Relocalized p27Kip1 tumor suppressor functions as a cytoplasmic metastatic oncogene in melanoma. *Cancer Res*. 2007;67(19):9238–43.
150. Chen G, Cheng Y, Zhang Z, Martinka M, Li G. Prognostic significance of cytoplasmic p27 expression in human melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(10):2212–21.
151. Cheng Y, Lu J, Chen G, Ardekani GS, Rotte A, Martinka M, et al. Stage-specific prognostic biomarkers in melanoma. *Oncotarget*. 2015;6(6):4180–9.

152. Weber HO, Samuel T, Rauch P, Funk JO. Human p14arf-mediated cell cycle arrest strictly depends on intact p53 signaling pathways. *Oncogene*. 2002;21(20):3207–12.
153. Sargen MR, Merrill SL, Chu EY, Nathanson KL. CDKN2A mutations with p14 loss predisposing to multiple nerve sheath tumours, melanoma, dysplastic naevi and internal malignancies: a case series and review of the literature. *Br J Dermatol*. 2016;175(4):785–9.
154. Freedberg DE, Rigas SH, Russak J, Gai W, Kaplow M, Osman I, et al. Frequent p16-independent inactivation of p14ARF in human melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(11):784–95.
155. Venza M, Visalli M, Biondo C, Lentini M, Catalano T, Teti D, et al. Epigenetic regulation of p14ARF and p16INK4A expression in cutaneous and uveal melanoma. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2015;1849(3):247–56.
156. Zeng H, Jorapur A, Shain AH, Lang UE, Zhang Y, Mcneal AS, et al. Bi-allelic loss of CDKN2A initiates melanoma invasion via BRN2 activation. *Cancer Cell*. 2019;34(1):56–68.
157. Sargen MR, Cloutier JM, Sarin KY, Rieger KE, Chu P, Swetter SM, et al. Biomarker discovery analysis: Alterations in p14, p16, p53, and BAP1 expression in nevi, cutaneous melanoma, and metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2019;32(3):474–8.
158. Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Altered expression of cell cycle regulators Cyclin D1, p14, p16, CDK4 and Rb in nodular melanomas. *Int J Oncol*. 2004;25(6):1559–65.
159. Reynisdóttir I, Massagué J. The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev*. 1997;11(4):492–503.
160. Jakkett LA, Scolyer RA. A review of key biological and molecular events underpinning transformation of melanocytes to primary and metastatic melanoma. *Cancers (Basel)*. 2019;11(12).
161. Matsumura Y, Nishigori C, Yagi T, Imamura S, Takebe H. Mutations of p16 and p15 tumor suppressor genes and replication errors contribute independently to the pathogenesis of sporadic malignant melanoma. *Arch Dermatol Res*. 1998;290(4):175–80.
162. Flores JF, Walker GJ, Glendening JM, Haluska FG, Castresana JS, Rubio MP, et al. Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma. *Cancer Res [Internet]*. 1996 Nov 1;56(21):5023–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895759>
163. McNeal AS, Liu K, Nakhate V, Natale CA, Duperrret EK, Capell BC, et al. CDKN2B loss promotes progression from benign melanocytic nevus to melanoma. *Cancer Discov*. 2015;5(10):1072–85.
164. Rothberg BEG, Bracken MB, Rimm DL. Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: A systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(7):452–74.
165. Ann Flørenes V, Mari Maelandsmo G, Faye R, Nesland JM, Holm R. Cyclin A expression in superficial spreading malignant melanomas correlates with clinical outcome. *J Pathol [Internet]*. 2001 Dec;195(5):530–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.1007>.

