



La tua
Campania
cresce in
Europa



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca
in **Biologia dei Sistemi**
Ciclo XIV — Anno di discussione 2016

Coordinatore: Chiar.mo Prof. *Antonietta Leone*

Studio del ruolo della proteina anti-apoptotica BAG3 nel melanoma umano

settore scientifico disciplinare di afferenza: **BIO/11**

Dottorando

Dott. *Luana Guerriero*

Tutore

Chiar.mo Prof. *Maria Caterina Turco*

Alla mia famiglia

Abstract

Abstract 1

Sommario

Sommario 2

Capitolo I. Il melanoma cutaneo

1.1 Eziologia e fattori di rischio 3

1.2 Epidemiologia 4

1.3 Varianti cliniche 4

1.4 Diagnosi 6

 1.4.1 Auto-esame della pelle 6

 1.4.2 Dermoscopia 6

 1.4.3 Immagini fotografiche *total body* 7

 1.4.4 Microscopia confocale riflessa (RCM) 7

 1.4.5 metodiche di stadiazione 8

 1.4.5.1 Spessore di Breslow 8

 1.4.5.2 Microstadiazione di Clark 9

 1.4.5.3 stadiazione TNM 9

 1.4.6 Diagnosi per immagini 10

1.5 Patogenesi 11

 1.5.1 Vie genetico- molecolari coinvolte nella patogenesi del melanoma 11

 1.5.1.1 CDKN2A 12

 1.5.1.2 NRAS- BRAF 12

 1.5.1.3 PI3K 14

 1.5.1.4 MITF 15

 1.5.1.5 c-KIT 16

 1.5.2 Altre vie di segnalazione intracellulare coinvolte nella biogenesi del melanoma 16

1.6 Trattamento del melanoma 19

 1.6.1 Trattamento chirurgico 19

 1.6.2 Terapie coadiuvanti 19

 1.6.3 Nuovi trattamenti farmacologici 19

 1.6.3.1 Razionale per l'inibizione di BRAF nel melanoma 20

 1.6.3.2 Inibitori di BRAF: *pathway* coinvolti nella resistenza ai farmaci 22

1.7.3 Direzioni future nella terapia molecolare mirata per il melanoma 23

Capitolo II. Analisi strutturale e funzionale della proteina BAG3

2.1 La proteina BAG3.....	25
2.2 Ruolo della proteina BAG3 nella regolazione dell' apoptosi	27
2.3 Ruolo della proteina BAG3 nell' adesione e migrazione cellulare	28
2.4 Ruolo della proteina BAG3 nell' autofagia	29
2.5 BAG3 e melanoma.....	30

Scopo della tesi

Scopo della tesi.....	31
-----------------------	----

Capitolo III. Ruolo della proteina BAG3 nel melanoma umano

3.1 Risultati e Discussione	32
3.1.1 BAG3 è over-espressa nelle metastasi di pazienti caratterizzati dalla mutazione BRAF ^{V600E}	32
3.1.2 L'espressione di BAG3 correla con la prognosi in pazienti con linfonodi metastatici.....	34
3.1.3 Il silenziamento di BAG3 sensibilizza cellule di melanoma al Vemurafenib attraverso la <i>down-modulazione</i> di pERK	36
3.1.4 La prolungata esposizione al Vemurafenib della linea A375 dà luogo allo sviluppo di resistenza	38
3.1.5 La <i>down-modulazione</i> di BAG3 sensibilizza le A375VR al Vemurafenib	40
3.1.6 Il <i>pathway</i> di EGFR e l' <i>over-espressione</i> di BRAF sostiene la resistenza in cellule di melanoma	40
3.1.7 La <i>down-modulazione</i> di BAG3 induce un diverso grado di sensibilizzazione al Vemurafenib in cloni di melanoma resistenti	41
3.1.8 Il silenziamento di BAG3 ripristina la sensibilità delle A375VR#6 al Vemurafenib attraverso la via di pERK	42

Conclusioni

Conclusioni.....	46
------------------	----

Capitolo IV. Materiali e Metodi

4.1 Colture cellulari	47
4.2 Lisi cellulare	47
4.3 Western blot	47
4.4 Apoptosi	47
4.5 Trasfezione	48
4.6 Co-immunoprecipitazione	48

4.7 Saggio di vitalità cellulare e analisi del ciclo cellulare.....	48
4.8 Anticorpi, altri reagenti e kit.....	49
4.9 Campioni biotici.....	49
4.10 Immunoistochimica	49
4.11 Immunofluorescenza indiretta.....	49
4.12 Analisi statistiche.....	50

<i>Bibliografia</i>

Bibliografia.....	I-X
-------------------	-----

Abstract

BAG3 protein, a member of BAG family of co-chaperones, has a pro-survival role in several tumor types. BAG3 anti-apoptotic properties rely on its characteristic to bind several intracellular partners, thereby modulating crucial events such as apoptosis, differentiation, cell motility and autophagy. In human melanomas, BAG3 positivity is correlated with the aggressiveness of the tumor cells and can sustain IKK- γ levels, allowing a sustained activation of NF- κ B. Furthermore, BAG3 is able to modulate BRAF^{V600E} levels and activity in thyroid carcinomas.

BRAF^{V600E} mutation is the most frequent detected in malignant melanomas and is targeted by Vemurafenib, a molecule used for the treatment of advanced melanoma. However a subset of patients resulted not sensitive or acquired resistance to this molecule.

Here we confirmed that BAG3 expression is significantly enhanced in metastasis in respect to primary tumors, than we demonstrated that BAG3 protein expression was significantly enhanced in metastasis of patients carrying BRAF^{V600E} mutation. Furthermore we found a significant correlation between BAG3 positivity and patients' overall survival (OS), disease-specific survival (DSS) and disease-free survival (DFS) from surgery in patients with melanoma metastatic lymph nodes.

Moreover here we show that BAG3 down-modulation interferes with BRAF levels in melanoma cells and sensitizes them to Vemurafenib treatment.

Furthermore, in an *in vitro* model of acquired resistance to Vemurafenib, we demonstrated that the down-modulation of BAG3 protein can resensitize this cells to BRAF^{V600E} specific inhibition interfering with BRAF pathway, causing reduction of ERK and its targets phosphorylation.

Further studies will be focused in demonstrating our hypothesis that the molecular interactions between BAG3 and mutated BRAF can represent a target for novel multi-drugs treatment design and that BAG3 expression could contribute to prognosis and patient stratification for specific therapeutic approaches.

Sommaro

La proteina BAG3 è un membro della famiglia di co-chaperone caratterizzati dalla presenza del BAG domain nei pressi della porzione carbossi-terminale.

Tale proteina sostiene la sopravvivenza cellulare in diversi tipi di tumore ed ha quindi una proprietà anti-apoptotica. La proprietà anti-apoptotica di BAG3 è dovuta alla sua caratteristica capacità di legare diversi partner intracellulari, modulando in tal modo eventi cruciali quali l'apoptosi, il differenziamento, la motilità cellulare e l'autofagia. Nel melanoma umano, la positività per BAG3 è correlata all'aggressività del tumore e può sostenere i livelli di IKK- γ , permettendo l'attivazione di NF- κ B. Inoltre, BAG3 è in grado di modulare i livelli e l'attività di BRAF^{V600E} nei carcinomi tiroidei. La mutazione BRAF^{V600E} è la più mutazione che si riscontra più frequentemente nei melanomi maligni ed è il bersaglio del Vemurafenib, una molecola utilizzata per il trattamento del melanoma allo stadio avanzato. Tuttavia un sottogruppo di pazienti dopo un'iniziale risposta al trattamento acquisisce resistenza all'inibitore di BRAF mutato.

In questo lavoro di tesi abbiamo confermato che l'espressione di BAG3 è significativamente aumentata nel melanoma metastatico rispetto ai tumori primari, abbiamo, poi, dimostrato che l'espressione della proteina BAG3 è significativamente aumentata nelle lesione metastatiche dei pazienti caratterizzati dalla presenza della mutazione BRAF^{V600E}.

Inoltre abbiamo trovato una correlazione significativa tra la positività per BAG3 e la sopravvivenza globale dei pazienti (OS), la sopravvivenza specifica per la malattia (DSS) e la sopravvivenza libera da malattia (DFS) dopo l'intervento chirurgico in pazienti affetti da melanoma con linfonodi metastatici.

Inoltre, in tale lavoro abbiamo dimostrato che la down-modulazione di BAG3 interferisce con i livelli di BRAF in cellule di melanoma e le sensibilizza al trattamento con Vemurafenib. Inoltre, in un modello *in vitro* di resistenza acquisita al Vemurafenib, abbiamo dimostrato che la *down-modulazione* della proteina BAG3 può risensibilizzare queste cellule alla specifica inibizione di BRAF^{V600E} interferendo con la via di segnalazione molecolare di BRAF, inducendo la riduzione della fosforilazione della chinasi ERK e dei suoi bersagli a valle.

Ulteriori studi dovranno essere focalizzati a dimostrare la nostra ipotesi secondo cui l'interazione molecolare tra BAG3 e BRAF mutato può rappresentare un bersaglio per trattamenti combinati innovativi e secondo cui l'espressione di BAG3 potrebbe contribuire a determinare la prognosi e la stratificazione dei pazienti per specifici approcci terapeutici.

Il melanoma è un tumore cutaneo maligno che deriva dalla trasformazione neoplastica dei melanociti. Tali cellule, localizzate nell'epidermide, sono in grado di conferire la caratteristica pigmentazione cutanea grazie alla biosintesi della melanina. Quest'ultima una volta formata, e accumulata all'interno di specifici organelli di deposito detti melanosomi, viene trasferita ad altre cellule cutanee, gli adiacenti cheratinociti. La produzione di melanina aumenta in risposta alle radiazioni ultraviolette e i melanosomi si accumulano intorno al nucleo delle cellule cutanee, proteggendo il loro DNA dall'azione dannosa e mutagena dei raggi ultravioletti. Pertanto, la melanina, svolge fisiologicamente importanti funzioni protettive.

1.1 Eziologia e fattori di rischio

L'eziologia del melanoma è molteplice e, nella maggioranza dei casi, ancora sconosciuta. Il rischio di insorgenza del melanoma cutaneo è legato a fattori genetici, fenotipici, ambientali e alle combinazioni tra questi (Ferlay *et al.*, 2013). Tra i fattori genetici e fenotipici responsabili del 10-15% dei melanomi cutanei si annoverano il fototipo cutaneo chiaro, il numero totale di nevi ed in particolare di nevi displastici (Gudbjartsson *et al.*, 2008). Anche la familiarità è un fattore di rischio. La presenza all'interno del nucleo familiare di almeno un parente di primo grado affetto da melanoma aumenta il rischio di sviluppare questo tipo di tumore (Gandini *et al.*, 2005). Una predisposizione familiare può essere sospettabile nel caso in cui esistono più casi nella stessa famiglia; tali condizioni sono legate alla presenza di una suscettibilità su base genetica dell'individuo affetto. Nello specifico, una delle mutazioni più note nelle famiglie in cui si manifestano più casi di è quella a carico del gene CDKN2A (Udayakumar *et al.*, 2009, van der Rhee *et al.*, 2013). Il prodotto di questo gene sono due differenti proteine, la p16/Ink4 e la p14/Arf, che agiscono come potenti soppressori tumorali e che pertanto, se non funzionali, sono incapaci di regolare la proliferazione cellulare e portano alla crescita tumorale (Udayakumar *et al.*, 2009). Tra queste, la proteina p16/Ink4, se mutata, può portare anche allo sviluppo del carcinoma pancreatico (Udayakumar *et al.*, 2009). Altre mutazioni note riguardano il gene CDK4 (Udayakumar *et al.*, 2009) e la proteina *BRCA associated protein 1* (BAP1) (Njauw *et al.*, 2012; Aoude *et al.*, 2013). Quest'ultima in particolare sembra essere implicata nell'insorgenza del melanoma oculare e come recentemente dimostrato anche nell'associazione tra melanoma oculare e tumore dello stomaco e polmoni (Singh *et al.*, 2014). Gli studi più recenti di associazione *genome-wide* hanno identificato nuovi loci di suscettibilità cromosomica e nuovi polimorfismi di singoli nucleotidi del DNA associati al melanoma (Law *et al.*, 2015, Hill *et al.*, 2013). Anche gli stati di immunosoppressione costituiscono un fattore di rischio personale. Invece, il più importante fattore di rischio ambientale è stato identificato nell'esposizione ai raggi UV sia in rapporto alle dosi assorbite che al tipo di esposizione (intermittente piuttosto che cronica) ed anche all'età (a maggior rischio l'età infantile e adolescenziale). Il rischio di insorgenza della malattia risulta essere marcatamente maggiore nei casi di sussistenza e interazione di tutti questi fattori.

L'alimentazione potrebbe rivelarsi utile al fine della prevenzione del melanoma,

infatti, molti agenti anti-ossidanti in fase di sperimentazione per la prevenzione del melanoma sono derivati alimentari come ad esempio, i licopeni, che si trovano principalmente nei pomodori, i sulforafani, molecola isolata dai fiori di broccoli, e gli estratti del the verde (Curtin *et al.*, 2005; Lazovich *et al.*, 2010; El Ghissassi *et al.*, 2009; Cassidy *et al.*, 2013).

1.2 Epidemiologia

Circa un uomo su 69 e una donna su 86 sono destinati a sviluppare un melanoma cutaneo nel corso della vita, ed erano quasi 11.000 i nuovi casi attesi in Italia nel 2014 (con una lieve preponderanza nei maschi). L'incidenza del melanoma maligno è da anni in costante ascesa sia negli uomini (+3,6%/anno), che nelle donne (+3,7%/anno). Gran parte di questo fenomeno (comune a tutti i Paesi sviluppati) è attribuibile alla sempre maggiore diffusione e potenza degli strumenti diagnostici, con diagnosi in stadio tendenzialmente più precoce, e all'effettivo aumento del ruolo eziopatogenetico da parte delle radiazioni UV, mentre la percentuale di malattia attribuibile a fattori genetici sembra stabile nel tempo. I più recenti dati ISTAT (2011) indicano che sono 1807 i decessi per melanoma maligno nel nostro Paese (1054 fra gli uomini e 753 fra le donne). Molto netto appare il gradiente geografico dell'incidenza, più alta al Nord, con un 18% nei maschi e 12% nelle donne del Centro Italia e 48% e 51% rispettivamente al Sud.

Negli ultimi decenni il trend di mortalità è risultato sostanzialmente stabile in entrambi i sessi. Il melanoma maligno rappresenta una neoplasia a buona prognosi: la sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi è aumentata nel corso degli ultimi due decenni di circa 14 punti percentuali nei maschi (dal 70% dei casi insorti nel 1990-92 all'84% nel 2005-2007) e di 6 punti nelle femmine (dall'83% all'89% nello stesso periodo AIRTUM 2012).

1.3 Varianti cliniche

Si distinguono 4 tipi principali di melanomi:

- **Lentigo maligna** (Fig. 1) - La lesione ha una fase di crescita radiale; è la variante a più lenta evoluzione; insorge su cute sana, solitamente al volto, più spesso negli individui anziani;



Figura 1. Melanoma lentigo maligna

• **A diffusione superficiale** (Fig. 2) - È la varietà più frequente; insorge su un nevo preesistente, prediligendo le zone coperte; la lesione ha una fase di crescita radiale. Consiste in una lesione piatta a contorno irregolare, di colore variabile, disomogeneo, di dimensioni da uno a più centimetri;

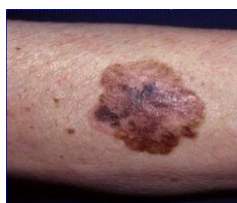


Figura 2. Melanoma a diffusione superficiale.

• **Acrale lentiginoso** – È una macchia pigmentata in maniera non omogenea, bruno-nera, a margini irregolari, insorge su cute sana o su nevo, tipicamente in sede palmo-plantare (Fig. 3a), sottoungueale (Fig. 3b) o mucosa;

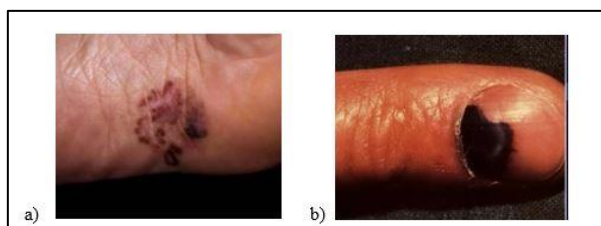


Figura 3. Melanoma acrale lentiginoso in sede palmare (a) e regione ungueale. (b)

• **Nodulare**: (Fig. 4) – È la varietà più aggressiva, insorge su cute sana o su nevo, in qualunque regione del corpo; di solito si presenta come una lesione molto invasiva, con alta probabilità di metastasi precoci. È un nodulo, talora polipoide e/o ulcerato, di colore nero, bluastro o roseo, la cute adiacente non è pigmentata. È una delle forme più aggressive di neoplasie maligne e la sua incidenza è in continuo aumento nella popolazione caucasica (Le Boit *et al.*, 2006).



Figura 4. Melanoma nodulare.

1.4 Diagnosi

I metodi diagnostici sono molteplici, basati più che altro sull'osservazione della pelle, sia ad occhio nudo, sia assistita da strumentazioni e pratiche idonee, ma per avere la certezza della diagnosi sono opportuni anche indagini istologiche e bioetiche.

1.4.1 Auto- esame della pelle

L'auto-esame della pelle, semplice e comodo, risulta essere un metodo di *screening* ad alto potenziale sia per il melanoma cutaneo sia per le lesioni precancerose. Il bisogno di istruire i medici ed i pazienti riguardo ad una diagnosi precoce ha condotto allo sviluppo del sistema **ABCDE** (Fig. 5):

- **Asimmetria.** I melanomi sono di solito asimmetrici, con metà della macchia cutanea più grande dell'altra.
- **Bordi.** I bordi del melanoma sono irregolari, a carta geografica, al contrario di quelli dei nei.
- **Colore.** Spesso il melanoma è policromo ovvero presenta colori diversi come nero, bruno, rosso e rosa.
- **Dimensione.** Una lesione cutanea sospetta, di diametro superiore ai 6 millimetri deve essere verificata da uno specialista.
- **Evoluzione.** La lesione cutanea che tende a modificare la propria forma, colore e superficie è da ritenersi sospetta e da verificare (Rigel *et al.*, 2010).

Altri approcci clinici sono stati sviluppati per aumentare le diagnosi precoci, come la lista di controllo Glasgow (MacKie *et al.*, 1990).

1.4.2 Dermoscopia

La dermoscopia, o epiluminescenza, è una tecnica diagnostica non invasiva per l'osservazione in vivo della pelle. Per tale analisi viene utilizzato uno strumento ottico chiamato dermatoscopio che permette di osservare *patterns* sub-cutanei non visibili ad occhio nudo, favorendone il riconoscimento. Il dermatoscopio ottico è un piccolo strumento manuale basato su una lente, appositamente illuminata con luce incidente, in grado di fornire ingrandimenti prevalentemente compresi tra le 10 e le 20 volte. La tecnica è basata sull'interposizione tra lente e cute di alcune gocce di acqua, olio o gel ecografico; in questo modo la cute diventa traslucida, permettendo al dermatologo di osservare fino alla giunzione dermo-epidermica e poter scorgere quelle caratteristiche peculiari, come presenza di strutture vascolari, valutazione del colore, del grado di pigmentazione e della sua relativa distribuzione nell'ambito della lesione pigmentata, altresì non visibili ad occhio nudo, per la diagnosi precoce del melanoma (Rastrelli *et al.*, 2013) dimostrato che la dermoscopia incrementa la sensibilità diagnostica, rispetto alla semplice visione ad occhio nudo, del 20-30% permettendo diagnosi sempre più precoci. È una metodica da integrare all'esame









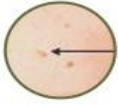
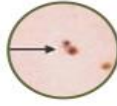
NORMAL		CANCEROUS
	<p>“A” is for Asymmetry</p> <ul style="list-style-type: none"> • If you draw a line through the middle of the mole, the halves of a melanoma won't match in size. 	
	<p>“B” is for Border</p> <ul style="list-style-type: none"> • The edges of an early melanoma tend to be uneven, crusty or notched. 	
	<p>“C” is for Color</p> <ul style="list-style-type: none"> • Healthy moles are uniform in color. A variety of colors, especially white and/or blue, is bad. 	
	<p>“D” is for Diameter</p> <ul style="list-style-type: none"> • Melanomas are usually larger in diameter than a pencil eraser, although they can be smaller. 	
	<p>“E” is for Evolving</p> <ul style="list-style-type: none"> • When a mole changes in size, shape or color, or begins to bleed or scab, this points to danger. 	

Figura 5. Sistema ABCDE

clinico ed anamnestico generale per evitare un potenziale falso negativo (Clark *et al.*, 1989; Breslow 1970; Stanganelli *et al.*, 2013).

1.4.3 Immagini fotografiche *total-body*

La fotografia *total body* (FTB) è utilizzata per eseguire una diagnosi precoce in pazienti ad elevato rischio di melanoma, soprattutto coloro che presentano un numero elevato di nevi melanocitici comuni o atipici. La FTB è necessaria, inoltre per il rinvenimento di lesioni pigmentate di nuova insorgenza o che mutano il proprio aspetto. Alcuni melanomi non possono essere diagnosticati né a occhio nudo e nemmeno tramite dermoscopia. E' quindi possibile e necessario creare delle immagini fotografiche che possano essere memorizzate, archiviate elettronicamente e poi confrontate per avere dei riscontri a breve termine (3-6 mesi) o a lungo termine (>6 mesi). In questo modo è possibile rilevare anche i più sottili cambiamenti durante le prime fasi di sviluppo del melanoma (Rastrelli *et al.*, 2013).

1.4.4 Microscopia confocale riflessa (RCM)

La RCM consente un esame non invasivo della pelle, in tempo reale e con una risoluzione quasi istologica, grazie all'emissione di un raggio laser, nel vicino infrarosso, che illumina la pelle orizzontalmente, producendo dettagliate immagini in bianco e nero, dall'epidermide fino al derma papillare superiore. Il contrasto delle immagini RCM è dovuto alla differenza nella riflettanza dei componenti tissutali e della melanina, rendendo così le lesioni melanocitiche il tessuto più adatto a tale esame (Carrera *et al.*, 2012).

Solitamente l'analisi viene effettuata su 3 livelli tissutali:

- strato epidermico superficiale
- giunzione dermo-epidermica
- derma superficiale

Alcuni dei potenziali vantaggi sono l'incremento dell'accuratezza diagnostica, una migliore valutazione della correlazione istologica- dermoscopica, valutazione dei margini chirurgici e controllo della risposta di terapie conservative nelle malattie della pelle (Kang *et al.*, 2010).

1.4.5 Metodiche di Stadiazione

Il melanoma cutaneo, durante la sua evoluzione da semplice lesione melanocitica a neoplasia vera e propria, è caratterizzato da una duplice fase di crescita, radiale e verticale: durante la fase radiale si osserva la proliferazione di melanociti nell'epidermide o nel derma papillare, senza la formazione di noduli neoplastici; nella fase verticale si verifica la crescita in modo perpendicolare rispetto alla cute e la diffusione verso il derma reticolare. Man mano che la crescita verticale prosegue la neoplasia acquisisce il potenziale di metastatizzazione.

Per determinare la grandezza della lesione e poter fare delle stime riguardanti la sopravvivenza del paziente vengono utilizzate diverse metodiche ed indici di crescita e diffusione della neoplasia.

1.4.5.1 Spessore di Breslow

La scala di Breslow (Fig.6) indica la profondità in mm di penetrazione del tumore nella cute.

È l'indice più attendibile e che correla meglio con la sopravvivenza del paziente.

1. Melanoma inferiore ad 1mm, sopravvivenza a 5 anni tra 95% e 100%
2. Compreso fra 1 e 1,69mm, basso rischio, sopravvivenza a 5 anni tra 80-96 %
3. Compreso fra 1,70 e 3,99mm, rischio moderato, sopravvivenza a 5 anni tra 60- 75 %
4. Superiore a 4mm, alto rischio, sopravvivenza a 5 anni tra 37-50 %.

1.4.5.2 Microstadiazione di Clark

Divide i melanomi a seconda dello strato cutaneo più profondo che invadono (Fig.6):

- Primo stadio: epidermide;
- Secondo e terzo stadio: derma papillare;
- Quarto stadio: derma reticolare;
- Quinto stadio: sottocute.

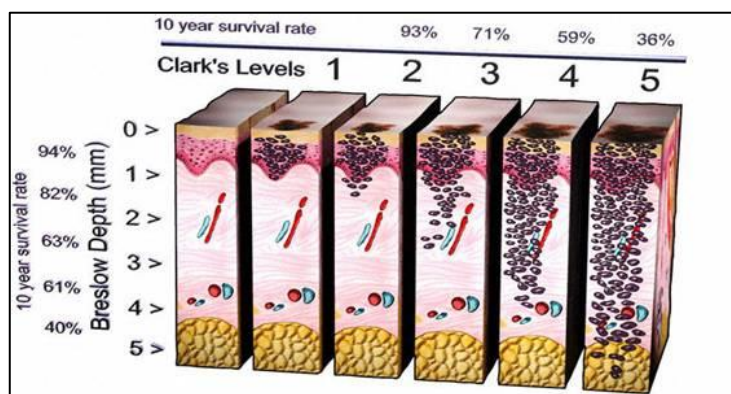


Figura 6. Microstadiazione di Clark e spessore di Breslow

1.4.5.3 Stadiazione TNM

La stadiazione clinica si basa sulla storia e sull'esame fisico, comprese le zone loco regionali e i linfonodi di drenaggio, esame completo della pelle, microstadiazione istopatologica, diagnostica per immagini, BLS e valutazione degli indici di Clark e Breslow. Si procede quindi alla valutazione completa di tutti i dati emersi precedentemente (Forschner *et al.*, 2010), andando a valutare la grandezza del tumore (T), il coinvolgimento linfonodale (N) e la presenza o meno di metastasi (M):

T: tumore

- X: non definibile
- 0: nessun segno del tumore primitivo
- 1: spessore < 1 mm
- a: livello di Clark 2 o 3 senza ulcerazione
- b: livello di Clark 4 o 5 o presenza di ulcerazione
- 2: spessore tra 1 e 2 mm (sottolivelli a o b definiti come prima)
- 3 spessore tra 2 e 3 mm (sottolivelli a e b come prima)
- 4 spessore maggiore di 4 mm (sottolivelli a e b come prima)

N: linfonodi

- 0: nessun linfonodo coinvolto
- 1: 1 linfonodo coinvolto
- 2: 2 o 3 linfonodi
- 3: più di 3 linfonodi coinvolti

M: metastasi

- M 0/1: assenza/presenza di metastasi a distanza (Pflugfelder *et al.*, 2010).

Alla fine di tutte queste procedure i pazienti possono esser suddivisi in 3 diversi gruppi:

- Stadio I-II: malattia localizzata
- Stadio III: malattia regionale
- Stadio IV: malattia metastatica

1.4.6 Diagnosi per immagini

L'esame ecografico sembra essere estremamente efficace ed economico nell'individuazione precoce delle metastasi linfonodali, con una sensibilità e specificità pari al 92% e il 90% (Garbe *et al.*, 2010). Recentemente è stata riscontrata una più alta sensibilità e specificità, rispettivamente del 99,2% e del 99,3%, dopo aver associato gli ultrasuoni a valutazione *ecocolor Doppler* della vascolarizzazione linfonodale.

Quando si sospetta la presenza di un linfonodo metastatico, gli ultrasuoni, in associazione con un esame citologico con ago aspirato (FNAC: *fine-needle aspiration cytology*), raggiungono una sensibilità del 92% ed una specificità del 100% (Voit *et al.*, 2011).

Altre indagini diagnostiche strumentali sono giustificate solo in caso di sospetto clinico o scoperte dubbie:

- Tomografia assiale computerizzata (TAC); metodica investigativa superiore ed espone ad alte dosi di radiazioni. Identifica metastasi viscerali e ai linfonodi. Gioca un ruolo importante nella valutazione di lesioni polmonari, pleuriche e mediastiniche ed è molto sensibile infatti riesce a rilevare anche noduli di dimensioni inferiori di 1cm di diametro.
- Tomografia ad Emissione di Positroni (PET) con glucosio radiomarcato: tecnica con maggiore accuratezza capace di localizzare lesioni tumorali con spessore superiore a 4mm e la sensibilità avanza con l'aumentare della stadiazione clinica.

Sospette metastasi possono anche essere studiate mediante FNAC o tramite biopsia chirurgica (Leung *et al.*, 2012).

1.5 Patogenesi

Negli ultimi anni è stato dimostrato che lo sviluppo e la progressione del melanoma, come quello di tutte le neoplasie maligne, sono basati sul coinvolgimento di specifici geni, nell'ambito di vari pathway molecolari, che risultano associati dal punto di vista funzionale. Approcci di analisi genetica e molecolare hanno consentito di identificare numerose alterazioni a carico di tali pathway, che sono coinvolti nella determinazione della storia biologica e clinica della malattia (patogenesi, prognosi, risposta terapeutica). Malgrado la notevole eterogeneità del melanoma dal punto di vista genetico e biologico, queste acquisizioni rendono possibile l'attuazione di una classificazione del melanoma in diversi "sottotipi molecolari", caratterizzati da differenti modalità di insorgenza e progressione, che risultano distinti dai sottogruppi tradizionali definiti dalle procedure di diagnosi convenzionale. Ciò viene a costituire la base per l'impiego di terapie più mirate ed efficaci.

1.5.1 Vie genético-molecolari coinvolte nella patogenesi del melanoma

Ad oggi, i seguenti geni, ed i *pathway* da essi dipendenti, sono stati dimostrati giocare un ruolo cruciale nella patogenesi del melanoma: CDKN2A (p16^{CDKN2A}-CDK4-RB e p14^{CDKN2A}-MDM2-p53 *pathway*), NRAS-BRAF (MAPK e PI3K-AKT *pathway*), cKIT e e MITF (Fig.7).

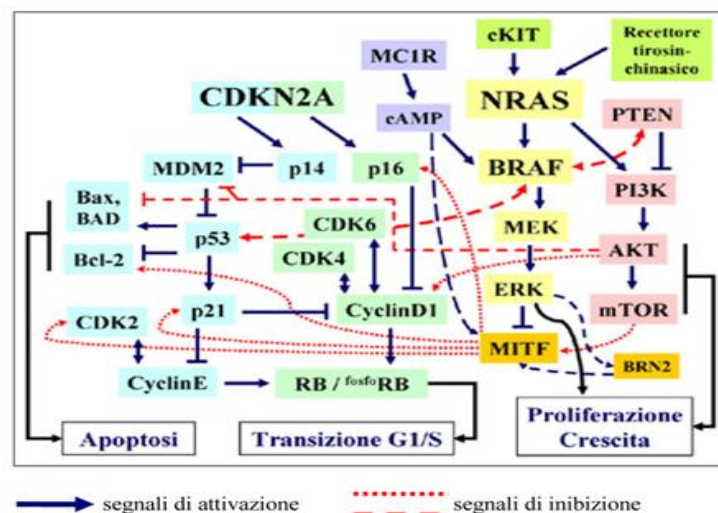


Figura 7. Principali *pathway* coinvolti nella patogenesi del melanoma

1.5.1.1 CDKN2A

Il gene *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A* (CDKN2A) svolge un ruolo fondamentale sia nella suscettibilità sia nella patogenesi del melanoma. Esso è localizzato sul cromosoma 9p21 e codifica per due proteine: p16^{CDKN2A} e p14^{CDKN2A} (Palmieri *et al.*, 2009).

Il gene CDKN2A è un oncosoppressore ed agisce con un meccanismo d'azione di tipo recessivo; pertanto, è necessaria l'inattivazione di entrambi gli alleli per lo sviluppo del melanoma. In particolare, mutazioni di questo gene sono 7-10 volte più frequenti nei pazienti con una forte storia di ricorrenza familiare di melanoma (tre o più membri della famiglia affetti), rispetto alla stragrande maggioranza (circa il 90%) di pazienti con malattia classificata come sporadica (Meyle *et al.*, 2009, Espinosa *et al.*, 2016). Nei pazienti con familiarità, circa il 40% dei probandi può risultare portatore di una mutazione germinale di CDKN2A, con prevalenze che variano notevolmente nelle differenti popolazioni e nelle diverse aree geografiche. Nei pazienti sporadici, il gene può risultare inattivo a livello somatico fino al 70% dei casi. In condizioni fisiologiche, p16^{CDKN2A} inibisce il sistema di protein-chinasi *Cyclin-Dependent Kinase 4* (CDK4)/*Cyclin D1* (CCND1), che, a sua volta, inibisce l'attività antiproliferativa della proteina RB (*retinoblastoma-susceptibility*) e permette la progressione nel ciclo cellulare. Nel melanoma, alterazioni del *pathway* p16^{CDKN2A}-CDK4-RB sono correlate alla progressione della malattia; assenti nei nevi, cominciano a manifestarsi nei tumori primari, fino ad aumentare nei melanomi metastatici e nelle linee cellulari di melanoma.

Le due principali alterazioni riscontrate a carico di tale *pathway* sono l'inattivazione di p16^{CDKN2A} e l'amplificazione di CCND1: la prima è dovuta a meccanismi genetici (mutazioni geniche, riarrangiamenti cromosomici) od epigenetici (metilazione di regioni promotrici), mentre la seconda si riscontra generalmente nei melanomi negativi per mutazioni nei geni BRAF e NRAS, che principalmente insorgono nelle mucose e nelle aree cutanee cronicamente esposte al sole. In una piccola frazione di melanomi metastatici (circa 15% dei casi), è stata tuttavia dimostrata la coesistenza di amplificazione di CCND1 e mutazioni del gene BRAF, che sembra conferire resistenza alla terapia con inibitori di BRAF (Casula *et al.*, 2009; Smalley *et al.*, 2008). Analogamente, p14^{CDKN2A} interferisce con le proteine Murine Double Minute 2 (MDM2) e p53, prevenendo la degradazione di quest'ultima e favorendo il suo controllo della progressione del ciclo cellulare; l'incremento del livello di espressione di p53 in risposta ad un danno genotossico previene infatti la divisione cellulare ed induce l'apoptosi (Box *et al.*, 2008). Nel melanoma, la riduzione dei livelli della proteina p53 contribuisce ad aumentarne l'aggressività e la refrattarietà alla terapia; l'inattivazione di p53 può essere dovuta a mutazioni di p14^{CDKN2A} o ad aumentata espressione di MDM2 o, in alternativa, al silenziamento del gene TP53 (principalmente, mediante un meccanismo funzionale epigenetico; la frequenza di mutazioni in tale gene è molto bassa).

1.5.1.2 NRAS-BRAF

RAS e BRAF sono due importanti molecole che mediano la risposta delle cellule agli stimoli mitotici extracellulari e giocano un ruolo centrale nella regolazione della crescita, sopravvivenza e proliferazione cellulare. I prodotti della famiglia dei geni RAS, piccole proteine legate alla membrana citoplasmatica, sono costituiti da 3 isoforme tessuto-specifiche: HRAS, KRAS e NRAS. Le mutazioni di NRAS sono quelle maggiormente riscontrate nel melanoma (nel 15-30% dei casi) (Giehl, 2005; Goel *et al.*, 2006). La stimolazione oncogenica di NRAS è in grado di attivare specifiche proteine citoplasmatiche con funzione chinasi poste a valle: RAF e fosfatidil-inositolo 3-Kinase (PI3K). La famiglia di chinasi RAF consiste di tre proteine (ARAF, BRAF e CRAF), che fanno tutte parte del *Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway* (Jaiswal *et al.*, 2009) (Fig.8). Nei melanociti, BRAF induce l'attivazione della chinasi MEK, la quale, a sua volta, attiva ERK, che costituisce l'effettore finale della cascata MAPK. Nel melanoma, il gene BRAF risulta mutato nel 40-60% dei casi; la mutazione prevalente (circa il 90% dei casi) è rappresentata dalla sostituzione di una valina con acido glutammico al codone 600 (BRAF^{V600E}). La variante BRAF^{V600E}, come le restanti mutazioni a carico della regione chinasi di BRAF, inducono, attraverso la fosforilazione (attivante) di ERK, una continua stimolazione della proliferazione cellulare e della crescita tumorale. Tuttavia, la dimostrazione che BRAF è mutato anche nei nevi comuni (Si *et al.*, 2014) suggerisce che la sua attivazione oncogenica sia una condizione necessaria, ma non sufficiente, per lo sviluppo del melanoma. Nei melanociti nevici, la presenza di mutazioni di BRAF è in grado di stimolare l'aumento di espressione di p16^{CDKN2A} (con normali livelli di p14^{ARF}), con conseguente induzione dei meccanismi di senescenza cellulare ed arresto del ciclo cellulare. Questo fenomeno appare come una reazione "protettiva", in risposta a tale inappropriato segnale mitogeno. A conferma dell'importanza di questo equilibrio funzionale, l'espressione di p16^{CDKN2A} risulta ridotta o assente in circa 1/3 dei melanomi con mutazione BRAF^{V600E}. Analogamente, l'attivazione oncogenica di BRAF è in grado di promuovere significativamente la trasformazione maligna di melanociti carenti in p53. Tutto questo conferma che BRAF mutato coopera con membri di entrambi i *pathway* di CDKN2A (p16^{CDKN2A} e p53). Recentemente, è stato dimostrato che alcune varianti genetiche del recettore di membrana *Melanocortin-1 Receptor (MC1R)* non sono in grado di stimolare adeguatamente la produzione della melanina capace di proteggere la pelle dai danni dei raggi ultravioletti. La combinazione tra la presenza di tali varianti di MC1R e l'esposizione intermittente ai raggi ultravioletti solari (i quali sembrano determinare un incremento della produzione di radicali liberi a livello cutaneo) è considerata responsabile dell'attivazione oncogenica di BRAF, attraverso un aumento indotto dei livelli intracellulari di AMP ciclico. A rendere ulteriormente complesso tale scenario è l'osservazione che, in presenza di mutazioni del gene NRAS, che sono state dimostrate essere mutuamente esclusive con le mutazioni del gene BRAF, la traduzione del segnale mitogeno nell'ambito del MAPK *pathway* è dirottato su CRAF, che pertanto viene ad acquisire un ruolo chiave nel mantenimento della stimolazione della proliferazione cellulare in questo sottogruppo di melanomi. Infatti, un aumentato livello di espressione di CRAF è responsabile dell'acquisizione di resistenza alla terapia con inibitori di BRAF. Questi dati hanno pertanto implicazioni nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sulla combinazione di trattamenti inibenti

simultaneamente BRAF e CRAF ovvero BRAF e PI3K, l'altro *pathway* attivato da NRAS mutato.

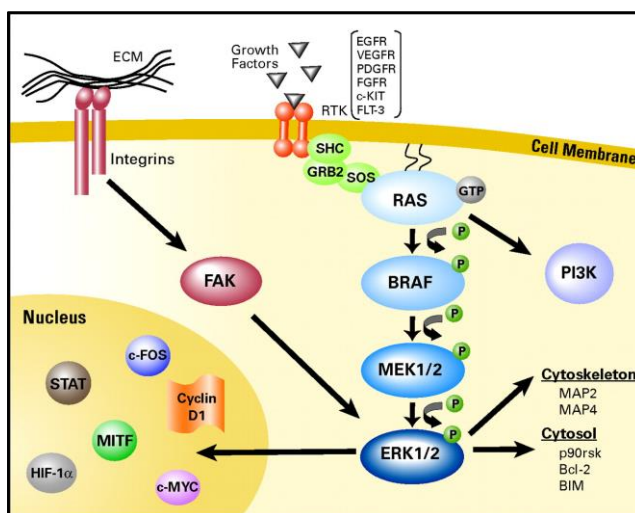


Figura 8. Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway

1.5.1.3 PI3K

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

In condizioni fisiologiche, l'attività fosfataseca della proteina PTEN riduce il livello intracellulare dei fosfoinositoli PIP2 e PIP3 prodotti dall'attivazione di PIK3 (Arcaro *et al.*, 2007). Quest'ultima determina infatti un aumento dei livelli intracellulari di PIP3 che vanno ad attivare AKT e, di conseguenza, il suo substrato mTOR, il quale è deputato a modulare la sintesi di proteine coinvolte nella sopravvivenza e crescita cellulare nonché nell'apoptosi. Nel melanoma, il gene PTEN è deletato nel 30-40% dei casi sporadici (con perdita della corrispondente proteina nel 5-20% dei melanomi primari) e nel 30-50% delle linee cellulari. Aumentata espressione di AKT3 è presente nel 50% dei nevi displastici, nel 70% dei melanomi primari e nel 70% delle metastasi. L'attivazione di AKT:

- a) promuove la proliferazione cellulare attraverso l'induzione e la stabilizzazione di CCND1;
- b) inibisce l'apoptosi mediante l'inattivazione di molte proteine ad attività pro-apoptica, quali BAD (antagonista di BCL-2, che invece ostacola i meccanismi di morte cellulare) e MDM2 (che causa la degradazione di p53).

Riassumendo, l'effetto combinato della perdita di PTEN e dell'attivazione del sistema PI3K-AKT, che si verifica nel melanoma, risulta in una crescita aberrante delle cellule neoplastiche, con acquisizione di resistenza all'apoptosi e, quindi, di refrattarietà al trattamento chemioterapico.

1.5.1.4 MITF

Tra i prodotti genici che operano a valle del *pathway* di trasduzione del segnale BRAF-MEK-ERK, il più rilevante nel melanoma è rappresentato dal *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF). In aggiunta al suo coinvolgimento nella pigmentazione cutanea, MITF sembra giocare un ruolo di primaria importanza nella proliferazione e differenziazione dei melanociti (Wellbrock *et al.*, 2008) (Fig. 9).

Il meccanismo d'azione di MITF è tuttavia alquanto complesso: una bassa od assente espressione di tale proteina predispone la cellula all'apoptosi; livelli intermedi di espressione di MITF promuovono la proliferazione e la sopravvivenza cellulare; elevate quantità di MITF all'interno della cellula producono un effetto antiproliferativo. Nel melanoma, si sono probabilmente sviluppate strategie per mantenere i livelli intracellulari della proteina MITF in un range compatibile con gli altri meccanismi di tumorigenesi. A conferma di ciò, è stato dimostrato che l'attivazione costitutiva di ERK, stimolata da mutazioni oncogeniche di BRAF, risulta associata ad una marcata degradazione di MITF. E' stato pertanto ipotizzato che l'attivazione oncogenica di BRAF sia in grado di controllare i livelli intracellulari di MITF attraverso un fine bilanciamento di due meccanismi opposti: una riduzione diretta dei livelli di MITF mediante stimolazione della sua degradazione ed un aumento indiretto della quantità di tale proteina mediante attivazione di un fattore di trascrizione (BRN2), il quale, a sua volta, stimola l'espressione di MITF (Cheng *et al.*, 2015) (Fig. 9). Analogamente, nelle cellule di melanoma MITF interagisce con numerosi effettori che svolgono azioni contrapposte, quali CDK2 e BCL-2, che promuovono la progressione del ciclo cellulare e la riduzione dell'apoptosi, favorendo la proliferazione neoplastica, ovvero p21 e p16^{CDKN2A}, che invece inducono l'arresto del ciclo cellulare e l'attivazione dei meccanismi di senescenza cellulare. Bassi livelli intracellulari della proteina MITF sono stati riscontrati nei melanomi invasivi e sono stati associati ad una peggiore prognosi ed alla progressione clinica di malattia. L'amplificazione del gene MITF è stata osservata in circa il 15-20% dei melanomi metastatici portatori di mutazioni di BRAF. Tale fenomeno potrebbe essere dovuto ad una sorta di bilanciamento funzionale in risposta alla riduzione dei livelli della proteina indotta da BRAF mutato e la sua presenza è associata ad aumento della resistenza alla chemioterapia.

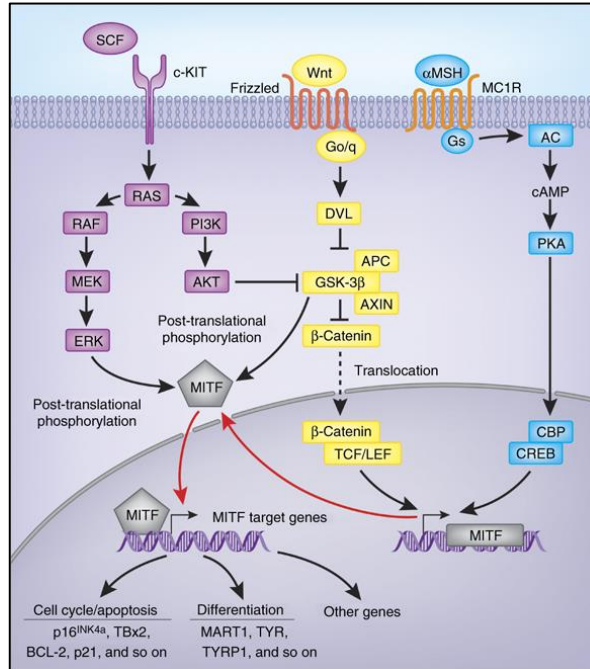


Figura 9. MITF determina il caratteristico fenotipo pigmentato delle cellule regolando proteine specifiche dei melanociti (ad esempio MART1) e geni coinvolti nella sopravvivenza di melanoblasti e nella proliferazione e sopravvivenza dei melanociti. La trascrizione genica di MITF e le sue modificazioni post-traslazionali sono fortemente influenzati da molteplici vie a monte, tra cui c-Kit , Wnt / β -catenina e α -MSH.

1.5.1.5 c-KIT

c-KIT è il recettore tirosin-chinasico per lo *stem cell factor*, che nei melanociti regola migrazione e sopravvivenza cellulare. Sebbene subisca frequentemente perdita di espressione nei melanomi, particolari alterazioni del recettore sono coinvolte nella patogenesi di alcuni sottogruppi di queste neoplasie. Anche se complessivamente meno frequenti delle mutazioni di BRAF e NRAS, specifiche variazioni di sequenza del gene c-KIT causano attivazione costitutiva del dominio chinasico, risultando in un'induzione continua della proliferazione cellulare, attraverso la stimolazione del MAPK *pathway* (Smalley *et al.*, 2009).

Le mutazioni di c-KIT sono state descritte nei melanomi acrali (10% dei casi), mucosali (15-20% dei casi) ed insorti nelle aree cutanee cronicamente esposte al sole (5% dei casi).

1.5.2 Altre vie di segnalazione intracellulare coinvolte nella biogenesi del melanoma

Lo scenario patogenetico presentato precedentemente non può essere considerato comprensivo di tutte le alterazioni molecolari che in questi ultimi anni sono state descritte nel melanoma. Tra queste, sono da menzionare le alterazioni dei seguenti effettori: **GNAQ/GNA11**, geni che codificano per proteine di trasmissione del segnale in grado di attivare MAPK e che risultano mutati nei nevi e melanomi blu nonché nel 50% circa dei melanomi uveali primitivi e metastatici (Van Raamsdonk *et al.*, 2009); **WNT**, che sembra contribuire all'inibizione dell'apoptosi nelle cellule di melanoma; è stato recentemente suggerito che il livello di espressione proteica della isoforma WNT2 possa rappresentare un marcatore di trasformazione maligna melanocitaria ed essere utilizzato per la diagnosi differenziale tra nevi e melanomi (Kashani-Sabet *et al.*, 2009); **iNOS**, che regola il livello intracellulare di ossido nitrico, un radicale libero coinvolto nella induzione della apoptosi, il cui aumento di

produzione può stimolare lo sviluppo e la progressione del melanoma (Sikora *et al.*, 2010); **NF- κ B** e **Hedgehog** sono frequentemente attivati nel melanoma,

contribuendo alla progressione della malattia, dati preclinici hanno dimostrato che l'inibizione del segnale Hedgehog ha il potenziale per ridurre l'invasività del cancro e

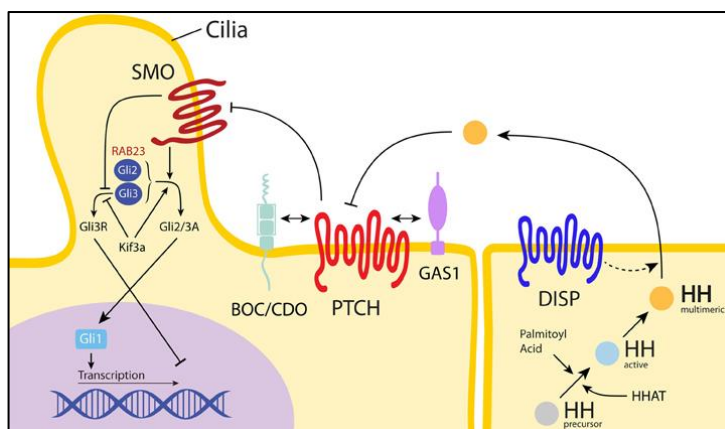


Figura 10. Pathway di Hedgehog. Il legame di Sonic Hedgehog (Shh) al suo recettore Patched (Ptch1)-1 dereprime Smoothened (Smo), causando il movimento dei Smo dalle vescicole intracellulari. Smo viene attivato e promuove l'attivazione delle proteine Gli (Gli1 / 2) che entrano nel nucleo e promuovono la trascrizione dei geni bersaglio (attivazione della via canonica). I fattori di trascrizione Gli possono anche essere attivati attraverso la via non canonica a causa di interferenze significative con altre vie di segnalazione importanti come quella di PI3K-Akt, KRAS, PKC δ e TGF β .

il suo potenziale metastatico (Palmieri *et al.*, 2009; Gonnissen 2013) (Fig.10); **c-MET**, un recettore di membrana attivato dal legame con HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), la cui aumentata espressione, spesso associata ad amplificazione genica, è coinvolta nell'aumento di invasività e malignità del melanoma (Yoon- Jin *et al.*, 2011). Inoltre, è stato recentemente dimostrato che il microambiente tumorale (alterata distribuzione e concentrazione di chemochine, mancata attivazione di immunità cellulo-mediata, induzione di meccanismi immuno-soppressivi) gioca un ruolo importante nel processo di formazione e mantenimento delle metastasi di melanoma (Gajewski *et al.*, 2011; Braeuer *et al.*, 2011).

Malgrado tale complessità, vanno acquisendo un ruolo sempre più determinante dal punto di vista patogenetico le interazioni tra le diverse vie genotico-molecolari precedentemente descritte.

Considerando nel suo complesso i diversi pathway come un'unica rete funzionale, sono compresi meglio i motivi per cui, nel melanoma, possano coesistere, oppure no, alterazioni imputabili all'influenza dei diversi geni. A titolo esemplificativo, le mutazioni di BRAF possono essere riscontrate insieme alle alterazioni di PI3K, ma nessuna di esse coesiste con quelle di NRAS: BRAF e PI3K sono attivati a valle di NRAS, per cui la presenza di mutazioni attivanti NRAS rende superflua l'attivazione di BRAF e PI3K. Analogamente, le mutazioni oncogeniche di BRAF riescono ad attivare più intensamente ERK, a valle del MAPK pathway, in presenza di alterazioni dei meccanismi intracellulari di controllo della senescenza e/o dell'apoptosi. Recentemente, si è tuttavia ipotizzata l'esistenza, in un numero non ancora quantificato di casi, di una seconda via di trasformazione neoplastica melanocitaria (di tipo "non lineare"), che vede il coinvolgimento di cellule staminali tessutali, le cui alterazioni darebbero direttamente origine a cellule di melanoma in fase di crescita superficiale oppure verticale ovvero, addirittura, in fase metastatica (Fukunaga-Kalabis *et al.*, 2011) (Fig.11).

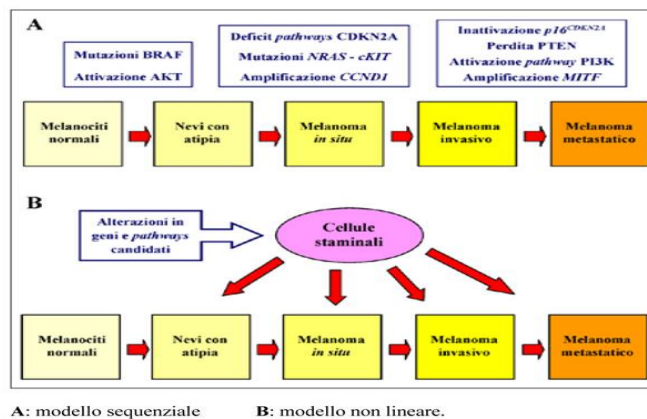


Figura 11. Modelli di sviluppo e progressione del melanoma

Questa seconda ipotesi si basa sull'evidenza di alcune incongruenze del modello di tumorigenesi progressiva in alcuni sottogruppi di melanomi, quali una maggiore incidenza di mutazioni BRAF nei melanomi a crescita verticale rispetto a quelli a crescita superficiale, nonché l'osservazione di amplificazioni delle regioni genomiche 9p21 e 1p22 in maniera prevalente nei melanomi nodulari (Zabierowski *et al.*, 2008).

1.6 Trattamento del melanoma

1.6.1 Trattamento chirurgico

La chirurgia è l'unico trattamento potenzialmente curativo per il melanoma primario. Dal punto di vista chirurgico la patologia può essere affrontata secondo 2 metodiche: l'escissione completa del tumore primario e l'escissione dei linfonodi locoregionali (Rastrelli *et al.*, 2013).

1.6.2 Trattamento locoregionale delle metastasi in transito

Si definiscono metastasi in transito quelle metastasi subcutanee o della pelle che compaiono oltre gli 0.3mm dalla lesione primaria e che arrivano fino ad interessare i linfonodi di drenaggio. Le metastasi in transito sono biologicamente indistinguibili dalle recidive locali, che invece si manifestano entro gli 0.3mm dalla lesione primaria e con un diametro >0.5mm (Rastrelli *et al.*, 2013).

Clinicamente si presentano come dei noduli singoli o multipli che possono essere localizzati nell'epidermide, nel derma o nel grasso sottocutaneo. Per i pazienti che presentano un unico nodulo metastatico il trattamento di elezione è la resezione chirurgica, mentre per quelli che presentano noduli multipli sono indicate altre terapie locoregionali, come ad esempio la Perfusione Ipertermica Locoregionale (PILR), l'Infusione Locoregionale (ILR) o l'Elettrochemioterapia (ECT).

In caso di metastasi in transito la chemioterapia sistemica adiuvante non risulta efficace, come pure la terapia radiante che si dimostra inefficace nel controllo della malattia regionale. L'incidenza delle recidive locali e delle metastasi in transito è circa del 3% (Rastrelli *et al.*, 2013).

1.6.2 Terapie coadiuvanti

Le terapie che possono fare da supporto dopo dissezione linfonodale e quindi dopo intervento chirurgico, sono indicate per pazienti con rischio da moderato ad elevato di recidive locali e metastasi. Al momento le uniche terapie che si sono dimostrate effettivamente efficaci sono due: la Radioterapia (Hong *et al.*, 2012) ed il trattamento con Interferone (Mocellin *et al.*, 2010; Ascierto *et al.*, 2013b), anche se sono stati fatti e sono in corso numerosi studi riguardanti i vaccini (Eggermont *et al.*, 2013).

1.6.3 Nuovi trattamenti farmacologici

I recenti progressi nel campo della biologia molecolare e della genomica hanno evidenziato l'eterogeneità molecolare dei tumori e facilitato un cambiamento nelle strategie antitumorali si passa, quindi, dai tradizionali "one-size-fits-all" agli approcci individualizzati alla terapia. Questa conoscenza ha portato allo sviluppo di nuove

strategie terapeutiche che si basano su terapia mirata verso mutazioni genetiche, con conseguente miglioramento dei tassi di risposta del tumore e effetti collaterali relativamente tollerabili. L'avvento della medicina personalizzata ha inaugurato una nuova era per la terapia del cancro con un impatto significativo sulla gestione del melanoma avanzato (Chakraborty *et al.*, 2013). Terapie molecolari mirate hanno mostrato risultati promettenti nel trattamento del melanoma, con profili di tossicità più bassi e migliore sopravvivenza globale rispetto alla terapia convenzionale.

La chemioterapia convenzionale con dacarbazina e temozolomide ha scarsi tassi di risposta circa del 7% -20% e una sopravvivenza media di 9 mesi, con profili di tossicità lieve. L'immunoterapia con Ipilimumab (anticorpo monoclonale diretto contro il CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), e gli anticorpi anti PDL-1, sembra essere promettente ma le principali limitazioni sono rappresentate, in questo momento, dal fatto che non vi è modo di prevedere i pazienti responsivi alla terapia, e presenta nuovi tipi di tossicità dovuta ad un'attivazione del sistema immunitario che consiste in fenomeni autoimmuni come tiroidite, tossicità gastroenterica con colite e diarrea e tossicità cutanea con rash e vitiligo (Tarhini *et al.*, 2010; Lutzky *et al.*, 2014).

Altre terapie promettenti includono come bersaglio diverse molecole in grado di promuovere l'angiogenesi, come il fattore di crescita vascolare endoteliale (Ott *et al.*, 2015).

Tuttavia, la possibilità di insorgenza di resistenza ai farmaci per le terapie molecolari mirate, rende necessaria la ricerca di bersagli molecolari supplementari per il trattamento del melanoma avanzato.

La scoperta di mutazioni di BRAF nel melanoma ha portato allo sviluppo di inibitori di BRAF per il trattamento del melanoma avanzato. Le mutazioni attivanti la serina / treonina chinasi, BRAF presenti nel 50% -60% dei melanomi ha stimolato lo sviluppo di terapie mirate che ha portato alla approvazione di Vemurafenib, un inibitore di BRAF, da parte della *Food and Drug Administration* nel mese di agosto 2011 con il nome commerciale di Zelboraf per il trattamento del melanoma maligno avanzato o metastatico BRAF mutato.

1.6.3.1 Razionale per l'inibizione di BRAF nel melanoma

Il melanoma in fase avanzata presenta generalmente difetti genetici multipli che interessano diversi *pathway* biochimici, è stato tuttavia sorprendente evidenziare che quelli con le mutazioni attivanti di BRAF mostrano le caratteristiche di dipendenza da un oncogene. Quando questa singola alterazione oncogenica diviene il bersaglio di acidi nucleici inibitori o di inibitori chimici di RAF in specifiche linee cellulari si ha l'arresto della crescita o l'induzione dell'apoptosi. Il comportamento di melanomi mutati per BRAF in modelli murini xenotrapiantati supporta questa evidenza preclinica e conferma il fatto che BRAF mutato possa essere considerato un attraente target per la terapia del melanoma, oltretutto il dominio chinasi della protein-chinasi serina/treonina è particolarmente utile per la progettazione razionale di inibitori selettivi.

Il Sorafenib, un inibitore ad ampio spettro non selettivo di BRAF con una struttura che contiene una di-aril urea, è stato originariamente sviluppato in

combinazione con il Carboplatino ed il Tassolo contro il tumore ai polmoni. L'attività contro il melanoma è stata dimostrata negli studi di fase I e così è stato ulteriormente sviluppato per questa indicazione in combinazione a Carboplatino e Paclitaxel. Siccome tale farmaco negli studi di fase II ha mostrato una risposta di circa il 30% il suo sviluppo ha raggiunto la fase III ma in questa fase sono stati riscontrati scarsi risultati (Eggermont et al., 2011). Studi sul Sorafenib mostrano la sua poca selettività e potenza nei confronti di RAF ma hanno evidenziato una buona selettività per VEGFR2, VEGFR3 e altre chinasi.

Il Dabrafenib (GSK2118436) è un inibitore competitivo, reversibile di BRAF^{V60E/K/D} (IC₅₀ 0.5, 0.6, 1.9 nM rispettivamente), wt BRAF (IC₅₀ 12 nM) e CRAF (IC₅₀ 5 nM).la sopravvivenza senza progressione è di 27.4 settimane in soggetti che presentano la mutazione BRAF^{V60E} (Ascierto et al., 2013a).

Uno studio che ha preso in considerazione circa 20.000 composti con una massa molecolare compresa tra 150 e 350 daltons alla concentrazione di 200 µM ha permesso di portare in luce la capacità di PLX4720 **Vemurafenib** (Fig. 12) di inibire l'attività della chinasi BRAF^{V60E} a concentrazioni 10 volte inferiori in vitro rispetto a BRAF *wild-type*, ciò significa che quei tumori recanti la mutazione sono più sensibili all'inibizione da parte di PLX4720 (Tsai et al., 2008). Per quanto riguarda la fosforilazione di ERK, questa viene diversamente influenzata dopo un'ora di trattamento con il composto. Nelle cellule con la mutazione BRAF^{V60E} la fosforilazione di ERK è potentemente inibita mentre nelle cellule in cui non vi è l'oncogene BRAF la fosforilazione non viene minimamente modificata. Inoltre solo quelle linee cellulari di melanoma con il gene V60E producono un decremento dei livelli di crescita mentre le cellule di melanoma e i melanociti primari con BRAF *wild-type* crescono in maniera analoga ai controlli non trattati. L'efficacia del Vemurafenib è stata testata anche in modelli animali.

I risultati mostrano che trattando topi con una dose giornaliera di 20 mg/kg si ha un sostanziale blocco della crescita tumorale.

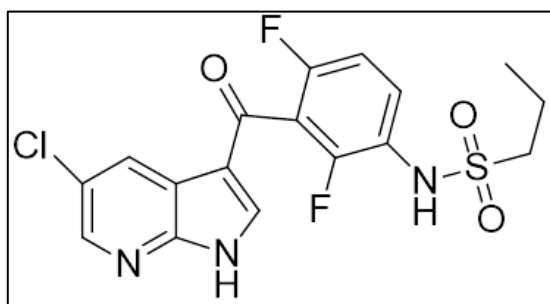


Figura 12. Struttura del Vemurafenib

Durante il trattamento, che ha la durata di 14 giorni, 4 dei 9 topi trattati sono caratterizzati da regressione tumorale, la crescita delle masse tumorali riprende quando la somministrazione del composto cessa. La somministrazione di una dose di

5 mg/kg di Vemurafenib ha, invece, modesti effetti sulla crescita tumorale. Per dimostrare *in vivo* la modulazione dei targets della protein-chinasi BRAF, i livelli di pERK sono stati misurati 2 ore dopo la somministrazione della dose finale nella quantità di 20 mg/kg al giorno 14, facendo ciò è stato stimato che la fosforilazione di ERK è inibita di circa il 43%, quindi la trasduzione dei segnali attraverso il *pathway* che coinvolge MAPK viene ridotta nelle cellule con la mutazione V600E. Lo studio randomizzato di fase III, a due bracci, su pazienti non trattati, definito BRIM-3, metteva a confronto il Vemurafenib, somministrato per via orale in dosi di 960 mg due volte al giorno, con il chemioterapico Dacarbazina, somministrata in dosi 1000 mg/m² tre volte a settimana. In questo trial intrapreso su 675 pazienti non operabili, non precedentemente trattati, che presentavano melanoma allo stage IIIC o melanoma metastatico allo stage IV con mutazione BRAF^{V600E}, la sopravvivenza senza la progressione della malattia (*PFS, Progression Free Survival*) e la sopravvivenza globale erano *end-points* coprimari. I risultati hanno mostrato che vi è un'associazione del 63% con la riduzione relativa del rischio di morte e del 74% con il rischio di progressione del tumore.

I più comuni effetti indesiderati dovuti all'assunzione del Vemurafenib sono artralgia, rash, affaticamento, alopecia, cheratocantoma o carcinoma delle cellule squamose cutanee (cSCC), fotosensibilità, nausea e diarrea. Possiamo concludere dicendo che il Vemurafenib è stato il primo composto che ha mostrato un miglioramento per quanto riguarda la sopravvivenza globale e la sopravvivenza senza la progressione del melanoma (McArthur *et al.*, 2014).

GDC-0973 è un potente ed altamente selettivo inibitore MEK1/2 che è attivato da BRAF. La logica alla base di questa terapia combinata è duplice: la prima riguarda l'aspettativa di un possibile effetto additivo o un effetto sinergico sulla sopravvivenza senza progressione, la seconda concerne la possibilità di evitare la tossicità che si evidenzia quando l'inibitore di BRAF è somministrato da solo.

Il melanoma è il terzo tumore più frequente in termini di metastasi al cervello, dopo il tumore alle cellule dei polmoni e renali. Le metastasi al cervello (*BM, Brain Metastases*) vengono diagnosticate in più del 10% dei pazienti malati di melanoma e vengono riscontrate mediante autopsia nel 73% dei soggetti che muoiono a causa di melanoma cutaneo disseminato. Pazienti con BM attive sono stati esclusi a priori dai *trials* correnti con il Vemurafenib, tuttavia esistono dati preliminari favorevoli sull'utilizzo di altri inibitori di BRAF in questo tipo di pazienti (Dummer *et al.*, 2011).

1.6.3.2 Inibitori di BRAF: *pathway* coinvolti nella resistenza ai farmaci

Anche se la maggior parte dei pazienti trattati con Vemurafenib mostra un'iniziale risposta al farmaco, in alcuni pazienti subito dopo la prima evidenza di risposta oggettiva al farmaco emerge la progressione della patologia che si manifesta rapidamente. Sembra che esistano dei meccanismi sia dipendenti dal *pathway* MAPK sia MAPK indipendenti attraverso i quali i tumori possono sopravvivere e adattarsi nel contesto della terapia con inibitori di BRAF. Nella maggioranza dei casi vi è evidenza biochimica della riattivazione del *pathway* MAPK, e questi meccanismi di resistenza comprendono l'amplificazione di BRAF^{V600E/K}, presenza di *splice variant* di BRAF, la

comparsa concomitante di mutazioni di NRAS, di MEK o di BRAF stessa (Johnson *et al.*, 2015). Altri meccanismi si hanno, invece, a carico del *pathway* PI3K, questi includono la soppressione dell'attività di PTEN oppure sovra-regolazione del recettore per il fattore di crescita derivante dalle piastrine (PDGF), del recettore per l'*insuline-like growth factor* (IGF) (Villanueva *et al.*, 2010), inoltre resistenza può anche essere acquisita a causa dell' over- espressione della proteina di membrana ABCG2, proteina responsabile dell'estrusione del farmaco dalla cellula (Fig.13). Considerando l'evidenza della progressione della malattia dopo il trattamento con il Vemurafenib numerosi studi clinici sono stati intrapresi per testare il farmaco in associazione ad altri inibitori e tali associazioni sono per lo più destinate a quei pazienti che hanno un'alta probabilità di recidiva o a quei soggetti in cui il tumore ha progredito. Per esempio, la combinazione con un inibitore di MEK ha permesso di ipotizzare un prolungamento della *Progression Free Survival* e sembra prevenire la comparsa di tossicità per la pelle (Trunzer *et al.*, 2013).

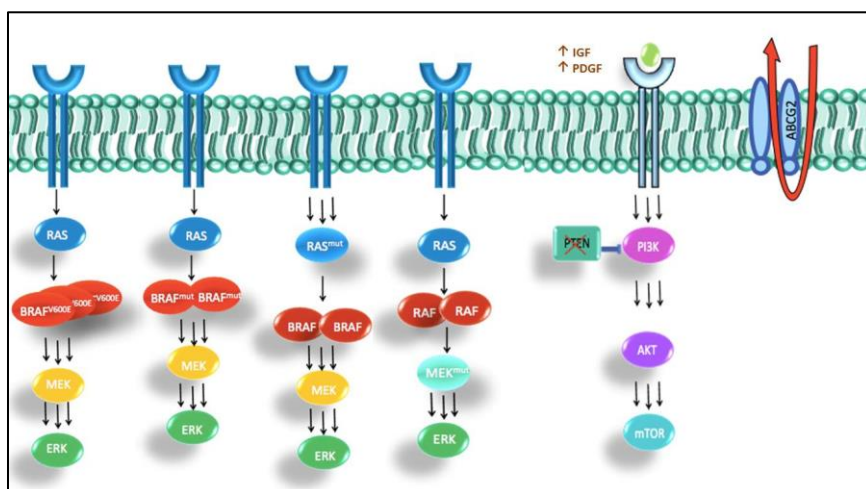


Figura 13. Principali meccanismi di resistenza acquisita al Vemurafenib

1.6.3 Direzioni future nella terapia molecolare mirata per il melanoma

Gli sforzi sono in corso per trovare altre terapie mirate all'interno della via MAPK che potrebbero essere utilizzate da sole o in combinazione con inibitori di BRAF.

Ci sono state indagini significative sull'inibizione di MEK. Studi di fase III di confronto **trametinib**, un inibitore MEK, con la chemioterapia nei pazienti con BRAF^{V600E/K} mutante con melanoma maligno hanno dimostrato un prolungamento della sopravvivenza generale e libera da progressione (Flaherty *et al.*, 2012a). La combinazione di Dabrafenib e trametinib ha dimostrato un miglioramento della

sopravvivenza libera da progressione e la riduzione del tasso di neoplasie cutanee secondarie (come il carcinoma a cellule squamose) (Flaherty *et al.*, 2012b).

Ma anche l'inibizione di MEK da sola è improbabile che sia l'unica risposta alla resistenza agli inibitori di BRAF. Tuttavia, gli inibitori MEK hanno mostrato risultati promettenti.

Un'altra opzione in fase di studio per la terapia mirata nel melanoma è il recettore tirosin-chinasi, c-KIT (o CD117). L'attivazione di mutazioni c-KIT si è evidenziata in circa il 20% -30% di alcuni sottotipi di melanoma, compresi i melanomi acrali e melanomi delle mucose, e melanomi che si sviluppano su pelle danneggiata (Carvajal *et al.*, 2011). La mutazione puntiforme più comune è L576P nell'esone 11, ma avvengono anche negli esoni 13, 17, e 18. Altri tumori, tra cui i tumori stromali gastrointestinali con mutazioni di c-kit sono sensibili all'inibitore della tirosina chinasi, **imatinib**. Pertanto, studi di fase II sono stati condotti con imatinib in pazienti con vari tipi di melanoma con mutazioni o amplificazioni c-KIT. I tassi di risposta sono stati del 16% -23% con un piccolo numero di risposte complete a lungo termine, con nessuna differenza nei tassi di risposta tra i vari sottotipi di melanoma. In particolare, le stesse mutazioni KIT (K642E e N822K) che hanno risposto al trattamento nei tumori stromali gastrointestinali mostrano risposta anche nel melanoma; ma la resistenza ai trattamenti con mutazioni KIT specifici (V654A e D820Y) si osservano in entrambi i tumori stromali gastrointestinali e il melanoma. Sono stati fatti tentativi di bloccare Ras indirettamente bloccando la sua farnesilazione post-traduzionale. Inibitori della farnesil transferasi, come **lonafarnib**, inibendo la farnesilazione di RAS bloccano la sua traslocazione alla membrana plasmatica. Lonafarnib, in combinazione con altri agenti chemioterapici come il sorafenib e cisplatino, ha mostrato risultati incoraggianti nel melanoma metastatico in vitro (Niessner *et al.*, 2011). Un unico studio clinico ha tentato di trattare il melanoma inibendo Ras via farnesil transferasi ma il trattamento ha mostrato significativa tossicità e la mancanza di efficacia (Gajewski *et al.*, 2012).

Combinazioni di opzioni terapeutiche esistenti e nuove dovranno essere esplorate

2.1 La proteina BAG3

BAG3 (bcl2-associated athanogene 3) è una proteina appartenente alla famiglia di co-chaperoni che interagiscono con il dominio ATPasico delle proteine Hsc70/Hsp70 (heat shock protein 70) attraverso il dominio BAG (110-124 aminoacidi) (Takayama *et al.*, 1999). Oltre al dominio BAG, la proteina BAG3 contiene anche un dominio WW e una regione PXXP (*proline-rich motifs*) attraverso i quali può interagire con partner diversi da Hsp70 (Doong *et al.*, 2003; Beere, 2005) (Fig.14a). La proteina BAG3 è stata originariamente identificata in lievito mediante un saggio di screening del doppio ibrido utilizzando come esca il dominio ATPasico di Hsp70 (Takayama *et al.*, 1999).

Ad oggi sono state descritte due forme della proteina BAG3: la *full-length* prodotta dal gene bag3 e avente una massa di 74 kDa e una più piccola, di circa 40 kDa ritrovata in associazione ai sinaptosomi neuronali, derivante o da *splicing* alternativo o da un processo proteolitico (Rosati *et al.*, 2011; Bruno *et al.*, 2008) (Fig.1b).

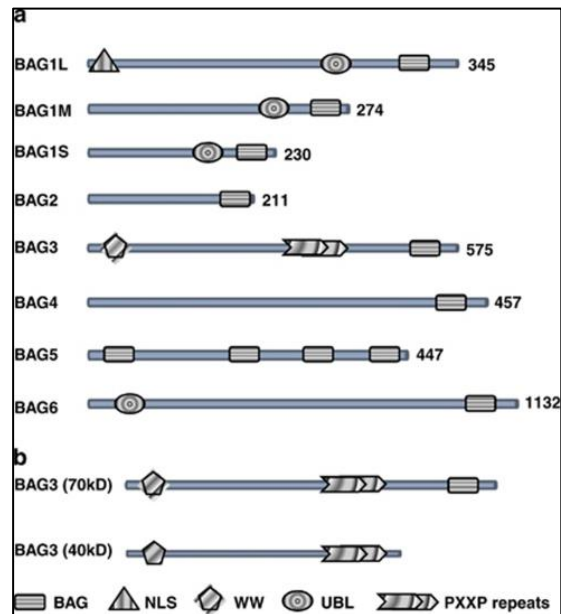


Figura 14. (a) La famiglia delle proteine BAG. Tutte le sei proteine BAG contengono un dominio BAG nella loro regione C terminale. Alcune proteine BAG contengono altri domini che includono il segnale di localizzazione nucleare (NLS), il dominio simil Ubiquitina (UBL), il dominio WW e uno ricco in prolina (PXXP). (b) Rappresentazione schematica della proteina BAG3 *full-length* e della *shorter form* trovata associata ai sinaptosomi.

La proteina BAG3 *full-length* è localizzata nel citoplasma, principalmente nel reticolo endoplasmatico rugoso; in seguito ad esposizione della cellula ad agenti

stressanti, può essere osservata una variante di questa forma con un peso molecolare leggermente differente, entrambe le forme coesistono in alcuni tipi cellulari e corrono come un doppietto in un Western Blot standard. L'origine di questo doppietto è ancora sconosciuta, ma potrebbe derivare da modifiche post- traduzionali come le fosforilazioni, BAG3 infatti contiene numerosi residui in serina e 10 residui in tirosina. La fosforilazione in tirosina di BAG3 avviene in seguito a stimolazione con EGF nelle linee cellulari umane di cancro ai polmoni (Young *et al.*, 2008). Recentemente è stata riportata anche la fosforilazione, alla serina 187, di BAG3 ad opera della protein chinasi C delta (PKC δ). Tale fosforilazione induce la transizione epitelio-mesenchima e aumenta l'invasività delle cellule di cancro alla tiroide, FRO (Li *et al.*, 2013).

La forma di 40 kDa è stata immunoprecipitata da un omogenato di sinaptosomi e caratterizzata successivamente mediante spettrometria di massa (Bruno *et al.*, 2008).

L'espressione del gene *bag3* è costitutiva nei miociti e in pochi altri tipi di cellule normali, mentre è particolarmente espresso in diversi tumori primari o linee cellulari tumorali (leucemie mieloidi e linfoidei, linfomi, mieloma, neuroblastoma, carcinoma del pancreas, della tiroide, della mammella e della prostata, melanoma, osteosarcoma, tumori del rene, colon e dell'ovaio e glioblastoma) (Rosati *et al.*, 2007; Pagliuca *et al.*, 2003; Rosati *et al.*, 2007; Rosati *et al.*, 2009; Ammirante *et al.*, 2010; Rosati *et al.*, 2012).

Tuttavia la sua espressione può essere indotta in diversi tipi di cellule normali (leucociti, cellule epiteliali e gliali, cellule della retina) in seguito all'esposizione a diversi fattori di stress, come agenti ossidanti, alte temperature, metalli pesanti, deprivazione di siero, infezioni virali (HIV-1), esposizione a campi ELF (electromagnetic field), stress elettrofilo, ultrasuoni pulsati (Rosati *et al.*, 2007; Pagliuca *et al.*, 2003; Rosati *et al.*, 2007; Rosati *et al.*, 2009; Ammirante *et al.*, 2010; Basile *et al.*, 2011).

L'aumento di espressione, in seguito a stimoli di stress, è regolato dal fattore trascrizionale HSF1 (heat shock transcription factor 1) (Franceschelli *et al.*, 2008).

Altri fattori trascrizionali conosciuti, in grado di regolare l'espressione di *bag3* sono Egr1 (Gentilella *et al.*, 2008) AibZIP (Androgen-Induced bZIP) (Ben *et al.*, 2007) e WT1 (Wilms' tumor suppressor gene) (Cesaro *et al.*, 2010).

Inoltre in alcuni tipi di cellule l'espressione della proteina BAG3 può essere indotta da numerosi farmaci chemioterapici (fludarabina, etoposide, inibitori del proteasoma) contribuendo in questo modo alla resistenza alla terapia farmacologica, infatti il silenziamento di *bag3* aumenta l'apoptosi della cellula neoplastica in risposta ai farmaci (Romano *et al.*, 2003; Chiappetta *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Ammirante *et al.*, 2010; Rosati *et al.*, 2012).

2.2 Ruolo della proteina BAG3 nella regolazione dell'apoptosi

Numerosi studi, condotti in linee tumorali di diversa origine, hanno dimostrato che il silenziamento o l'iperespressione della proteina BAG3 inducono, rispettivamente, un aumento o un' inibizione dell' apoptosi indotta da farmaci (Doong *et al.*, 2002; Chiappetta *et al.*, 2007; Rosati *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Jacobs *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2002; Ammirante *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2010; Cesaro *et al.*, 2010). La regolazione della sopravvivenza cellulare da parte della

proteina BAG3 è dovuta all'interazione con diversi partner molecolari e all'attivazione di diversi meccanismi.

Un primo meccanismo dimostrato si basa sul suo ruolo di co-chaperone nell'indirizzare proteine al proteasoma. È stato dimostrato che BAG1, un altro membro della famiglia BAG, interagisce positivamente con Hsp70 e CHIP (C-terminus of the Hsc70-interacting protein) nel direzionare le proteine al proteasoma; BAG3 può interferire con questo processo competendo con BAG1 (Rosati *et al.*, 2007; Coulson *et al.*, 2005; Gentilella *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2008). Infatti, in cellule di melanoma e osteosarcoma, BAG3 protegge IKK- γ (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma) dalla degradazione proteasomale determinando una costante attivazione di NF- κ B e sopravvivenza cellulare (Ammirante *et al.*, 2010).

Un diverso meccanismo è stato, invece, osservato in cellule di glioblastoma, in cui BAG3 mantiene la proteina BAX (the Bcl-2-associated X protein) nel citosol, prevenendo la sua traslocazione mitocondriale (Festa *et al.*, 2011). Entrambi i meccanismi si basano su un'interazione tra BAG3 e Hsp70 (Festa *et al.*, 2011; Ammirante *et al.*, 2010).

Attraverso il legame a Hsp70, BAG3 potrebbe anche regolare positivamente o negativamente il folding di altre proteine che regolano il processo apoptotico.

Inoltre, è stato visto che Hsp70 è in grado di legare elementi ricchi in AU (AREs) nella regione 3' non tradotta dell'mRNA di alcune proteine, tra cui Bim (Matsui *et al.*, 2007), e di aumentarne la sua stabilità (Matsui *et al.*, 2007). Si potrebbe ipotizzare che BAG3 regoli l'attività di Hsp70 su Bim e su altri possibili mRNAs di proteine coinvolte in diversi meccanismi cellulari. Infine si potrebbero ipotizzare dei meccanismi indipendenti da Hsp 70, grazie alla presenza, nella proteina BAG3, dei domini WW o PXXP attraverso i quali può legare altre proteine influenzandone la stabilità, la localizzazione o l'attività (Fig.15).

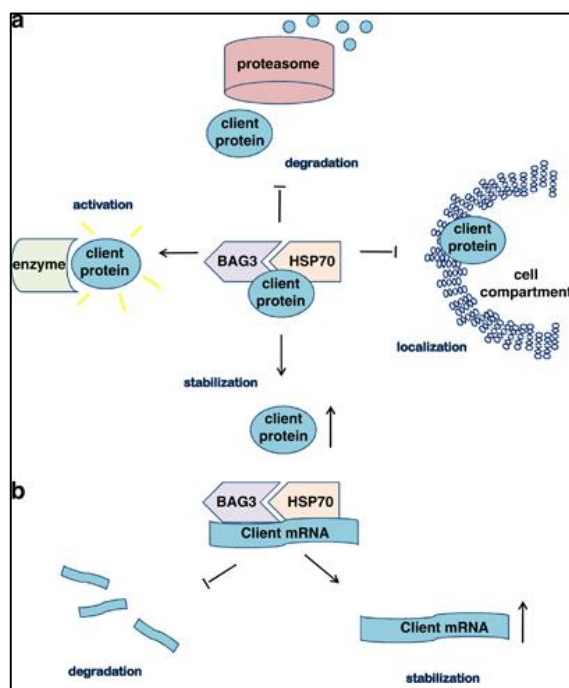


Figura 15. Meccanismi molecolari dell'attività della proteina BAG3 su (a) proteine e (b) mRNAs (Rosati et al., 2011).

2.3 Ruolo della proteina BAG3 nell'adesione e migrazione cellulare

E' stato dimostrato sperimentalmente che BAG3 è in grado di modulare anche altri due processi cellulari quali la motilità e l'adesione. Infatti, il silenziamento di bag3 riduce l'adesione e/o la motilità di cellule tumorali epiteliali (mammella, prostata) (Iwasaki *et al.*, 2007; Kassis *et al.*, 2009; Kassis *et al.*, 2006; Fontanella *et al.*, 2010). In cellule umane di tumore al seno (MDA435), l'overespressione di BAG3 determina una diminuzione della migrazione e dell'adesione di molecole della matrice; l'effetto è stato revertivo overesprimendo una proteina deleta del dominio PXXP, dimostrando così che nel meccanismo è coinvolta l'interazione di BAG3 con una proteina contenente il dominio SH3 (Kassis *et al.*, 2006). Studi di espressione hanno dimostrato che effettivamente BAG3 regola, in un modo PXXP-dipendente, l'espressione di CCN (Cyr61, connective tissue growth, NOV) 1, una proteina segnale di matrice che promuove l'adesione cellulare attraverso integrine ed eparan solfato contenenti proteoglicani (Kassis *et al.*, 2009).

Inoltre, BAG3 sembra regolare l'adesione cellulare attraverso il legame del dominio WW al motivo PPDY presente al C-terminale della proteina PDZGEF2 (guanine nucleotide exchange factor 2), la quale a sua volta attiva RAP1 (Ras-proximate-1), un regolatore di rimodellamento e delle giunzioni cellula-cellula.

Infatti, è stato visto che in un modello PDZGEF2 knockdown, BAG3 mostra una ridotta capacità nell'indurre l'adesione cellulare in cellule Cos7 (Iwasaki *et al.*, 2010).

Inoltre, recentemente, è stato dimostrato che BAG3, attraverso l'interazione con Hsc70/Hsp70 e CCT (chaperonin containing T-complex polipeptide, chiamato

anche TRiC per TCP-1 ring complex) è in grado di regolare il folding dell' actina, regolando in questo modo l' organizzazione del citoscheletro e influenzando non solo la sopravvivenza delle cellule e la migrazione, ma anche il traffico di membrana e la dinamica degli organelli intracitoplasmatici.

Analogamente a quanto descritto per l'apoptosi, anche la regolazione dell' adesione cellulare si basa, quindi, sulla capacità della proteina BAG3 di interagire con diverse proteine mediante i suoi domini strutturali.

2.4 Ruolo della proteina BAG3 nell'autofagia

Il ruolo svolto dalla proteina BAG3 nel rimodellamento del citoscheletro e nel traffico di membrana suggerisce la possibilità che possa essere coinvolta anche nei processi di autofagia. Con questo termine si fa riferimento ad un insieme di processi non specifici di degradazione di componenti della cellula (Moreau *et al.*, 2010).

Un tipo di autofagia selettivo è quello mediato da chaperone (CMA) in cui le proteine citosoliche che contengono un motivo pentapeptide, sono riconosciute dallo chaperone Hsc70 e trasferite ai lisosomi (Moreau *et al.*, 2010). Essendo la proteina BAG3 un co-chaperone di Hsc/Hsp70, è possibile immaginare un suo coinvolgimento in questo tipo di autofagia.

Altre forme di autofagia sono la micro- e la macroautofagia. Nella macroautofagia le cellule formano delle vescicole con un doppio strato di membrana, chiamate autofagosomi che sono trasportati lungo i microtubuli fino ad arrivare ai lisosomi dove viene degradato il loro contenuto. La microautofagia è, invece, un processo in cui i lisosomi inglobano direttamente componenti del citoplasma (Moreau *et al.*, 2010).

L'autofagia aumenta in condizioni di stress ed è un processo che mira a promuovere la sopravvivenza cellulare in condizioni come la formazione di aggregati proteici, privazione di nutrienti e fattori di crescita, stress del reticolo e infezione da patogeni.

BAG3 partecipa, insieme a HspB8, un membro della famiglia HspB di chaperon molecolari, alla degradazione, mediante macroautofagia, delle proteine mal ripiegate e aggregate. Infatti, HspB8 forma nelle cellule un complesso stabile con BAG3 e la formazione di questo complesso è essenziale per la degradazione della proteina Htt43Q poliglutammina (Huntingtin exon 1 fragment with 43 CAG repeats), una forma patologica di huntingtina che tende a formare aggregati (Carra *et al.*, 2009a; Carra *et al.*, 2009b). HspB8 e BAG3 inducono, in modo Hsp70 indipendente, la fosforilazione subunità α del fattore iniziatore eIF2 e questo a sua volta provoca un arresto traslazionale e stimola l'autofagia. Il meccanismo con cui il complesso BAG3/HspB8 induce la fosforilazione di eIF2 non è completamente conosciuto (Carra *et al.*, 2009a; Carra *et al.*, 2009b). Il legame di BAG3 a HspB8 è mediato da due motivi conservati Ile-Pro-Val (IPV) situato tra i domini WW e il Pro-rich del co-chaperone, infatti la delezione di questi motivi determina un blocco della degradazione di Htt43Q mediata da HspB8 (Fuchs *et al.*, 2009).

Attraverso la stessa regione, BAG3 può legarsi anche a HspB6/Hsp20, uno chaperone con importanti proprietà cardioprotettive e in grado di regolare la contrattilità dei miociti (Fan *et al.*, 2005, Dreiza *et al.*, 2010).

2.5 BAG3 e melanoma

Numerosi sono gli studi che accostano la proteina BAG3 alla sopravvivenza cellulare (Rosati *et al.*, 2011). In particolare, in cellule di melanoma, BAG3 è capace di interferire con il trasporto, mediato da HSP70, al proteasoma della subunità del complesso IKK, IKK γ , andando a promuovere quella che è l'attivazione di NF- κ B e l'inibizione della morte cellulare programmata. In uno studio effettuato *in vivo* su un modello di melanoma umano, il silenziamento del gene che codifica per la proteina BAG3 ha come risultato la significativa riduzione della crescita tumorale e il prolungamento della vita dell'animale (Ammirante *et al.*, 2010).

Inoltre l'espressione di BAG3 è stata studiata in campioni biotipici di melanoma umano (Franco *et al.*, 2012). Sono stati analizzati 62 campioni di melanoma cutaneo e l'espressione di BAG3 è stata confrontata con quelle di tessuti cutanei normali. Mentre tutti i tessuti normali apparivano negativi il 62.7% dei melanomi cutanei esprimeva la proteina BAG3 a livello intracellulare.

Inoltre è stato evidenziato che l'espressione di BAG3 aumentava nelle metastasi rispetto ai tumori primari (Fig. 16a). Nessuna correlazione era stata, invece, individuata tra i livelli di BAG3 e la presenza della mutazione BRAF^{V600E} (Fig. 16b).

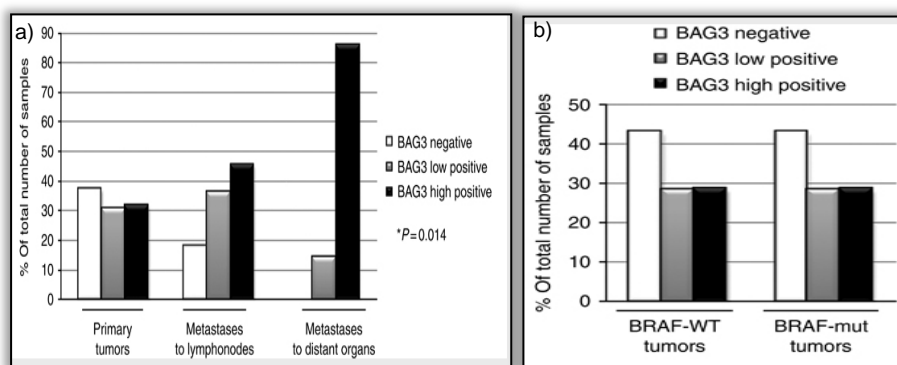


Figura 16. (a) Analisi dell'espressione di BAG3 in campioni di melanomi primari, metastasi ai linfonodi e metastasi ad organi distanti; (b) analisi dell'espressione di BAG3 in campioni di melanoma con BRAF *wild type* e BRAF^{V600E}.

Scopo della tesi

I tassi di sopravvivenza dei pazienti affetti da melanoma allo stadio avanzato stanno gradualmente migliorando anche grazie all'utilizzo di inibitori che hanno come target la proteina BRAF mutata. Tuttavia, una gran parte dei pazienti risulta non sensibile o acquisisce resistenza a tale trattamento. Purtroppo tale resistenza comporta la ricomparsa della malattia e conduce ad una prognosi infausta.

Si stanno ora facendo diversi tentativi nell'utilizzo di approcci che hanno come fondamento la terapia combinata, ma ulteriori ricerche devono essere realizzate allo scopo di fornire una migliore caratterizzazione delle molteplici aberrazioni coesistenti in cellule di melanoma resistenti. Al termine di questi studi si arriverà all'individuazione di nuove molecole da utilizzare come bersaglio terapeutico allo scopo di ridurre la propensione del tumore ad acquisire chemio resistenza e di conseguenza a migliorare la sopravvivenza dei pazienti.

Recenti evidenze assegnano alla proteina anti-apoptotica BAG3 un ruolo nel sostenere la crescita e la resistenza alla chemioterapia in alcuni tipi di tumore. In cellule di melanoma, BAG3 è in grado di modulare la veicolazione al proteasoma, HSP70- mediata, di IKK- γ , subunità del complesso IKK, sostenendo così l'attivazione di NF- κ B e inibendo l'apoptosi cellulare. In uno studio effettuato in vivo su un modello di melanoma, il silenziamento del gene *bag3* ha come risultato la significativa riduzione della crescita tumorale e il prolungamento della sopravvivenza dell'animale.

Diversi dati suggeriscono che la proteina BAG3 è over- espressa nelle metastasi di melanoma, tuttavia non è stata trovata alcuna correlazione tra l'espressione di BAG3 e la presenza della mutazione BRAF^{V600E}.

Con questo progetto ci siamo proposti di validare BAG3 come un potenziale bersaglio per il melanoma avanzato studiando l'espressione della proteina in campioni biotici di pazienti arruolati per il trattamento con l'inibitore di BRAF mutato Vemurafenib e non precedentemente trattati con alcun altro agente, studiando, inoltre, l'espressione di BAG3 e la sua correlazione con la sopravvivenza e la risposta dei pazienti al farmaco.

Allo scopo di verificare il possibile coinvolgimento della proteina BAG3 nei meccanismi di resistenza acquisita agli inibitori di BRAF mutato, ci siamo posti come obiettivo, di studiare l'effetto del silenziamento della proteina BAG3 sulle cellule di melanoma resistenti al trattamento con Vemurafenib.

3.1 Risultati e discussione

3.1.1 BAG3 è over- espressa nelle metastasi di pazienti caratterizzati dalla mutazione BRAF^{V600E}

Per studiare l'espressione di BAG3 in campioni di melanoma allo stadio avanzato abbiamo analizzato l'espressione della proteina in 41 campioni umani di tumori primari e metastasi di pazienti affetti da melanoma maligno mediante immunohistochimica (IHC).

La nostra analisi ha permesso di identificare diverse intensità per il segnale di BAG3 a cui è stato possibile assegnare uno score che andava da 0 a 2 (Fig.17). In particolare, score 0 è stato assegnato ai campioni BAG3- negativi, mentre score 1 indicava i campioni la cui colorazione aveva una bassa intensità ed, infine, score 2 è stato assegnato ai campioni che risultavano esprimere elevati livelli della proteina BAG3. Come mostrato in Fig.18a la nostra analisi ha rivelato che l'espressione di BAG3 aumentava significativamente dal tumore primario alle metastasi. In particolare, per lo score 0 abbiamo rilevato che l'espressione di BAG3 andava dal 34.2% dei tumori primari al 10.3% nelle metastasi, per lo score 1 abbiamo trovato che il 39.5% dei tumori primari e il 34.4% delle metastasi esprimeva BAG3 a livello intracellulare, mentre per lo score 2 abbiamo dimostrato che c'era un aumento significativo della percentuale di pazienti che presentava metastasi positive per BAG3, infatti l'espressione della proteina ammontava al 26.3% nei tumori primari e il 55.1% nelle lesioni metastatiche.

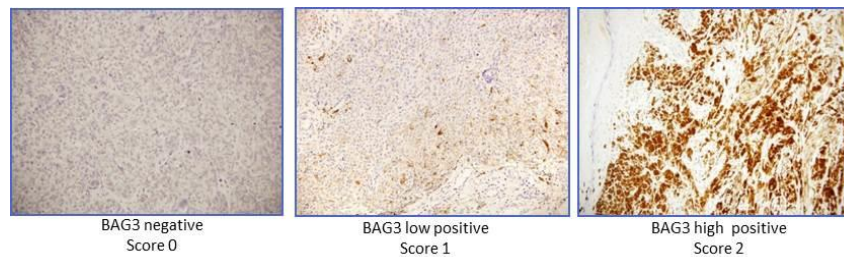


Figura 17. Immagini rappresentative di campioni di melanoma colorati mediante immunohistochimica con un anticorpo monoclonale anti- BAG3. I nuclei sono stati evidenziati mediante colorazione con ematossilina.

Abbiamo poi analizzato l'espressione di BAG3 nelle metastasi dei pazienti caratterizzati dalla mutazione BRAF^{V600E} e confrontata con quella dei pazienti che non presentavano la mutazione. Abbiamo dimostrato che l'espressione della proteina BAG3 aumenta significativamente nelle metastasi dei pazienti recanti la mutazione BRAF^{V600E} (Fig.18b).

I campioni negativi per BAG3 (score 0) includevano il 12.5% di pazienti caratterizzati dalla presenza della proteina BRAF *wild-type* e il 9.5% di pazienti che erano invece portatori della mutazione BRAF^{V600E}, i campioni con bassa intensità di colorazione per BAG3 (score 1) comprendevano il 5% di campioni con BRAF *wild-type* e il 2.5% di campioni con BRAF mutato. Infine, le metastasi che mostravano elevati livelli di BAG3 a livello intracellulare (score 2) comprendevano il 61.9% dei campioni che presentavano la mutazione BRAF^{V600E} (Fig.18b).

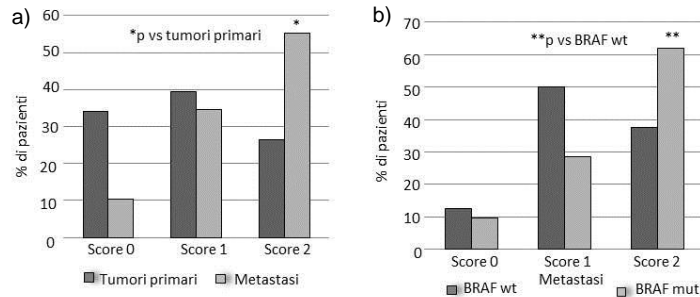


Figura 18.(a) Analisi dell'espressione di BAG3 nei tumori primari rispetto alle lesioni metastatiche; (b) Analisi dell'espressione di BAG3 in campioni metastatici caratterizzati dalla mutazione di BRAF rispetto a campioni che presentano BRAF *wild-type*. mut, mutazione; WT, *wild-type*. *p < 0.05 > 0.01; **, p < 0.01 > 0.001.

All'interno di questi campioni abbiamo identificato un sottogruppo composto da 26 pazienti per i quali avevamo informazioni sull'espressione di BAG3 nei tumori primari e nelle metastasi. Per questo sottogruppo di pazienti, la nostra analisi ha rivelato che l'espressione di BAG3 aumentava significativamente in 10 pazienti su 26 nelle metastasi rispetto ai tumori primari (Tab.1).

Paziente	Data di nascita	Sesso	Tumore primario	BAG3 score tumore primario	Metastasi	BAG3 score metastasi	Δ BAG3 score (*)
52	12/07/46	M	Negative	0	Negative	0	0
20	22/01/39	F	Negative	0	Negative	0	0
101	15/04/36	F	Negative	0	Negative	0	0
44	29/11/31	M	Low positive	1	Low positive	1	0
45	24/09/32	M	Low positive	1	Low positive	1	0
1	22/12/75	F	Low positive	1	Low positive	1	0
19	01/09/52	F	Low positive	1	Low positive	1	0
145	12/04/69	F	Low positive	1	Low positive	1	0
137	23/02/49	M	Negative	0	Low positive	1	1
58	31/05/60	F	Negative	0	Low positive	1	1
16	17/11/56	F	High positive	2	Low positive	1	-1
104	22/12/57	F	Low positive	1	High positive	2	1
35	01/03/69	M	Low positive	1	High positive	2	1
76	15/10/68	M	Low positive	1	High positive	2	1
140	07/08/29	M	Low positive	1	High positive	2	1
13	23/12/43	M	Negative	0	High positive	2	2
15	22/09/58	M	Negative	0	High positive	2	2
99	13/05/45	M	High positive	2	High positive	2	0
17	19/12/50	F	High positive	2	High positive	2	0
48	11/02/43	M	High positive	2	High positive	2	0
74	07/08/29	M	High positive	2	High positive	2	0
75	15/01/29	M	High positive	2	High positive	2	0
102	22/11/53	F	High positive	2	High positive	2	0
150	11/08/79	F	High positive	2	High positive	2	0
149	18/08/61	F	Low positive	1	High positive	2	1
47	05/12/65	M	Negative	0	High positive	2	2

Tabella 1. L'espressione di BAG3 aumenta dal tumore primario alle metastasi in 10 pazienti su 26. Δ BAG3 score = BAG3 score metastasi - BAG3 score tumore primario. *p vs o changes.

3.1.2 L'espressione di BAG3 correla con la prognosi in pazienti con linfonodi metastatici

I pazienti a cui viene diagnosticato il melanoma allo stadio III e che presentano linfonodi metastatici (LN) possono avere un decorso della malattia molto variabile. Questa significativa variabilità (24- 70% di sopravvivenza a 5 anni), è probabilmente dovuta a fattori prognostici noti, ma è anche legata ad una eterogenea espressione genica (Leong *et al.*, 2012).

La terapia di prima linea per questi pazienti è generalmente rappresentata da dissezione dei linfonodi regionali (TLND), e gli attuali approcci per stratificare i pazienti a questo stadio della malattia prevalentemente comprendono parametri clinici ed istologici quali il numero di LN positivi e l'estensione extracapsulare. Tuttavia, questi fattori non rispecchiano completamente l'esito della malattia e l'identificazione di biomarcatori molecolari potrebbero contribuire a ridurre l'eterogeneità del melanoma in fase III.

La proteina BAG3 è in grado di sostenere la sopravvivenza cellulare in diversi modelli sperimentali, questi modelli sperimentali includono anche il melanoma (Ammirante *et al.*, 2010).

Tutto ciò ci ha spinto a studiare l'espressione di BAG3 in un *Tissue Microarray* (TMA) che comprendeva linfonodi metastatici di pazienti affetti da melanoma allo stadio III.

Questo TMA comprendeva LN negativi utilizzati come controllo e linfonodi metastatici di 149 pazienti, tra i quali 76 avevano avuto una prognosi infausta (ricidiva o morte in un tempo inferiore a 2 anni) e 73 non avevano avuto recidiva per 45 anni.

Abbiamo deciso di analizzare i risultati della positività per BAG3 suddividendo i pazienti in sottogruppi in relazione ad uno dei principali fattori prognostici quale il

numero di LN positivi. I sottogruppi analizzati sono stati individuati in: pazienti con solo 1 LN positivo (N=46), pazienti con 2-3 LN positivi (N=35), ed infine vi era il gruppo rappresentato da pazienti con più di 4 LN positivi (N=48). Nel sottogruppo di pazienti con 2-3 LN positivi, abbiamo trovato una correlazione significativa tra la positività per BAG3 e la sopravvivenza globale (OS), la sopravvivenza specifica per la malattia (DSS) e la sopravvivenza libera da malattia (DFS) dopo l'intervento chirurgico. Infatti, utilizzando un *cut-off* del 42.5% di cellule BAG3-positive, abbiamo trovato che in campioni a bassa positività per BAG3 l' OS corrispondeva a una mediana di 52.8 mesi, mentre in campioni ad alta positività per BAG3 questa era di 29.2 mesi (Fig.19a). Risultati simili sono stati osservati per DSS (Fig.19b) e DFS (Fig.19c).

Anche se i risultati devono essere confermati su un numero più ampio di pazienti, abbiamo trovato una correlazione interessante tra l' espressione di BAG3 e la prognosi, in accordo con risultati simili ottenuti in un altro tipo di tumore, ovvero l'adencarcinoma del pancreas (Rosati *et al.*, 2012).

In conclusione, questi risultati identificano un sottogruppo di pazienti con melanoma in fase III, cioè, i pazienti con 2- 3 linfonodi positivi, il cui comportamento clinico è influenzato dall' espressione della proteina BAG3.

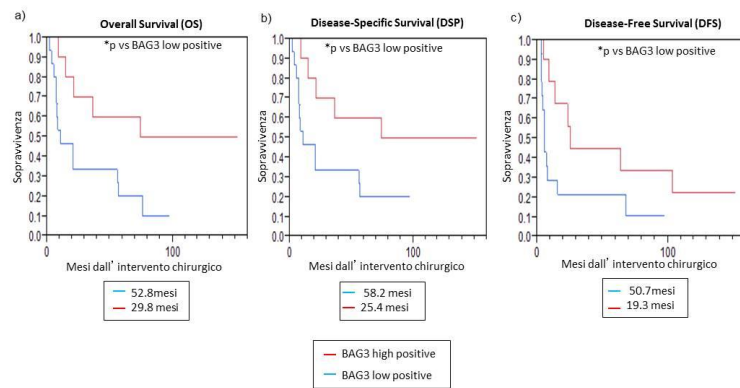


Figura 19. Analisi della correlazione dell'espressione di BAG3 con OS (a), DSS (b) e DFS (c) in pazienti con 2- 3 linfonodi positivi. La differenza tra i campioni BAG3 low positive e BAG3 high positive è stata determinata come precedentemente descritto (Franco *et al.*, 2012). L' analisi della sopravvivenza è stata effettuata con curve Kaplan- Meier utilizzando un software commerciale (SigmaPlot, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA), *p <0.05> 0.01

3.1.3 Il silenziamento di BAG3 sensibilizza cellule di melanoma al Vemurafenib attraverso la *down-modulazione* di pERK

Una linea cellulare di melanoma umano (A375) è stata utilizzata per studiare il ruolo di BAG3 in tale patologia, questa linea presenta la mutazione BRAF^{V600E}. La proteina mutata ha una attività chinasi basale 10 volte superiore rispetto a quella *wild-type*, con conseguente iper-attivazione del *pathway* MEK/ERK.

È stato precedentemente dimostrato che il silenziamento o la over-espressione di BAG3, rispettivamente, può indurre o inibire l'apoptosi spontanea o indotta da chemioterapici (Rosati *et al.*, 2011). Pertanto, abbiamo cercato di determinare se questo effetto potesse essere anche osservato nelle cellule A375 trattate con Vemurafenib.

A questo scopo, abbiamo trasfettato le cellule A375 con uno specifico siRNA per BAG3 o con una sequenza Non-Target e trattate con Vemurafenib (2 μ M). Come mostrato in Fig.20, il trattamento combinato ha indotto un aumento di cellule con nucleo ipodiploide in cellule in cui è stata down-modulata BAG3.

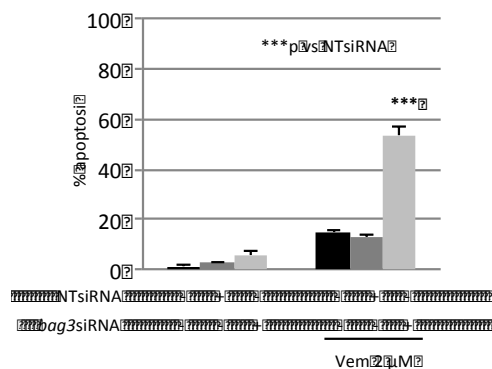


Figura 20. Cellule A375 sono state trasfettate per due volte consecutive con un siRNA specifico per BAG3 (*bag3siRNA*) o con un Non-Targeting (NTsiRNA) (200 nM). La seconda trasfezione e il secondo trattamento sono stati effettuati 72h dopo il primo. Dopo 120h dalla prima trasfezione le cellule sono state raccolte, marcate con ioduro di propidio e analizzate mediante citometria a flusso. La percentuale di cellule nella regione sub-apoptotica sono state quantificate per ogni condizione. Il grafico rappresenta la percentuale media di cellule in fase sub G₀/G₁(\pm SD). *** p <0.001.

È stato recentemente dimostrato, *in vitro* e *in vivo*, che la proteina BAG3 sostiene la crescita del carcinoma tiroideo anaplastico (ATC). Il meccanismo molecolare si basa sull'interazione di BAG3 con BRAF, in quanto BAG3 è capace di preservare BRAF dalla degradazione proteasomiale (Chiappetta *et al.*, 2012). Il carcinoma tiroideo anaplastico è caratterizzato dalla mutazione più frequente nel melanoma maligno cutaneo .

Questo ci ha spinti a valutare se i livelli di BRAF sono influenzati dalla *down-modulazione* di BAG3 in cellule di melanoma.

Le cellule A375 sono state trattate con uno specifico siRNA per BAG3 (*bag3siRNA*) o un siRNA Non- Target (NTsiRNA) ad una concentrazione finale di 200 nM e trattate con Vemurafenib (2 μ M) come descritto in precedenza. Come illustrato nella Fig.21, il trattamento delle cellule con siRNA per BAG3 ha comportato una riduzione dei livelli intracellulari di BRAF, rispetto ai livelli di BRAF nel controllo e nelle cellule trattate con NTsiRNA anche dopo il trattamento con Vemurafenib. La riduzione dei livelli di BRAF si traduce in una mancata fosforilazione di ERK. È interessante notare che il trattamento con Vemurafenib prolungato (120 ore) ha indotto una

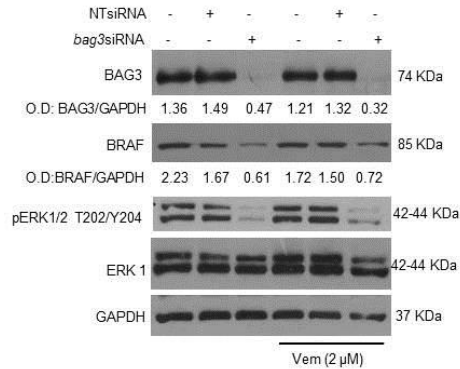


Figura 21. Cellule A375 sono state trasfettate come precedentemente descritto. Dopo 120h dalla prima trasfezione le cellule sono state raccolte, lisate e analizzate mediante Western Blot utilizzando anticorpi anti-BAG3, anti-BRAF, anti-pERK, anti-ERK, l'anticorpo anti-GAPDH è stato usato per controllare lo stato del caricamento. I livelli di BAG3 e BRAF sono stati analizzati mediante densitometria e normalizzati con quelli di GAPDH. (O.D.BAG3/O.D. GAPDH; O.D.B-RAF/O.D. GAPDH).

riattivazione di pERK1/2 nelle cellule A375, osservazione coerente con i risultati già presenti in letteratura (Paraiso *et al.*, 2010).

Questi risultati suggeriscono che il silenziamento di BAG3 e la co-somministrazione di Vemurafenib induce un aumento della percentuale di cellule con nuclei ipodiploidi riducendo la fosforilazione di ERK nelle cellule di melanoma.

Per dimostrare ulteriormente questa ipotesi abbiamo valutato se BAG3 potesse legarsi indirettamente a BRAF. Infatti, nelle cellule A375, la proteina BRAF è stata co-immunoprecipitata con BAG3 utilizzando un anticorpo specifico per BAG3. Inoltre,

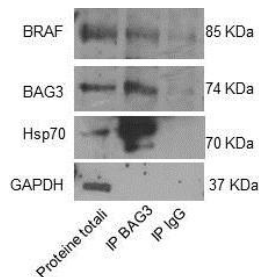


Figura 22. Lisati di A375 sono stati immunoprecipitati utilizzando un anticorpo monoclonale anti- BAG3. I complessi proteici sono stati poi rivelati utilizzando anticorpi anti- BAG3, anti- BRAF e anti-Hsp70. L'immunoprecipitato con immunoglobuline di topo è stato utilizzato come controllo negativo.

Hsp70 co-immunoprecipitata sia con BAG3 che con BRAF (Fig. 22). L'interazione biochimica di BAG3 con BRAF ha suggerito che BAG3 potrebbe interferire con il legame di BRAF ad Hsp70 e probabilmente con la consegna della chinasi al proteasoma come accade per ATC ed è quindi in accordo con i dati riportati in letteratura (Chiappetta *et al.*, 2012).

3.1.4 La prolungata esposizione al Vemurafenib della linea cellulare A375 dà luogo allo sviluppo di resistenza

L'esperienza clinica con Vemurafenib ha anche dimostrato che l'efficacia di un trattamento a lungo termine per i pazienti con melanoma è ostacolata dallo sviluppo di resistenza acquisita al farmaco (Chapman *et al.*, 2011). Era quindi importante determinare se cellule di melanoma che presentano la mutazione BRAF^{V600E} con resistenza acquisita al Vemurafenib potevano essere risensibilizzate al trattamento.

Per verificare ciò, abbiamo generato una linea cellulare resistente al Vemurafenib coltivando cellule A375 con concentrazioni crescenti (0.02- 2 μ M) dell'inibitore di BRAF. Abbiamo ottenuto una linea cellulare (A375VR) che era capace di crescere in presenza di un massimo di 3 μ M di Vemurafenib come mostrato nella Fig.23. In particolare, queste cellule presentavano dimensioni più grandi e la morfologia allungata rispetto alla linea parentale (dati non mostrati).

Quindi, abbiamo testato l'effetto del Vemurafenib alla concentrazione di 2 μ M,

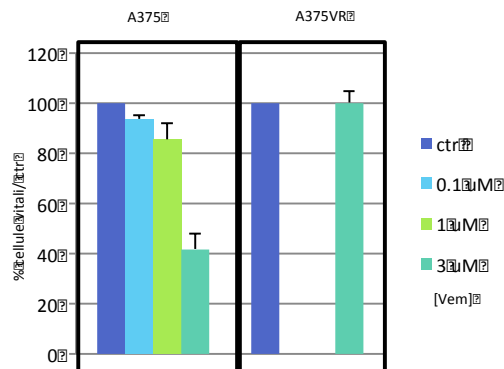


Figura 23. Cellule parentali e resistenti sono state coltivate in presenza delle dosi indicate di Vemurafenib per 120h. La vitalità cellulare relativa è stata valutata mediante saggio MTT.

dose alla quale le cellule resistenti erano comunemente coltivate, sulla fosforilazione di ERK nelle cellule resistenti rispetto alla linea parentale. Il trattamento con Vemurafenib della linea cellulare parentale ha portato all'inibizione della fosforilazione di ERK1/2 dopo 24 ore mentre le cellule resistenti non erano sensibili all'inibitore di BRAF in termini di down-modulazione della fosforilazione di ERK1/2.

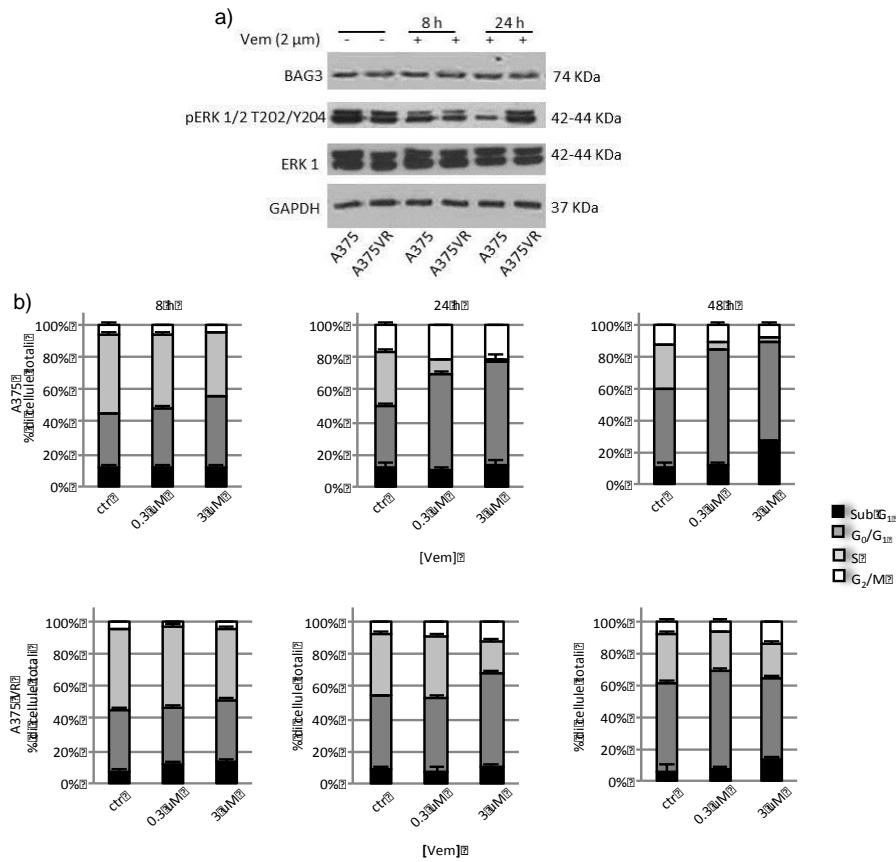


Figura 24. (a) Cellule A375 e A375VR sono state trattate con Vemurafenib 2 μM per 8 and 24h. Poi le cellule sono state lisate ed i livelli di BAG3, (pERK) e ERK 2 sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti- BAG3, anti- pERK, anti-ERK. l'anticorpo anti- GAPDH è stato usato per controllare lo stato del caricamento. (b) A375 e A375VR sono state trattate con differenti concentrazioni di Vemurafenib per i tempi indicatei. Poi le cellule sono state raccolte, colorate con ioduro di propidio e sono stati analizzati i profili del ciclo cellulare.

Abbiamo analizzato, inoltre, i livelli della proteina BAG3 in A375VR e li abbiamo confrontati con quelli della stessa proteina nella linea cellulare parentale, ma non abbiamo trovato differenze significative (Fig.24a) indicando che la proteina BAG3 non è direttamente responsabile del meccanismo di resistenza acquisita sviluppato nella nostra linea cellulare.

Inoltre, abbiamo analizzato i profili dei cicli cellulari della linea parentale e di quella resistente trattate con Vemurafenib a due concentrazioni differenti (0.3 e 3 μM) e tre diversi tempi (8, 24, e 48 ore) (Fig.24b). Il trattamento a breve termine (8 ore) con Vemurafenib delle cellule parentali ha avuto poco effetto sul profilo del ciclo cellulare nelle cellule A375 mentre il trattamento prolungato (24-48 ore) ha portato ad una forte riduzione delle cellule in fase S a tutti i dosaggi e ad un accumulo di cellule in fase sub G₁ alla dose di 3 μM dopo 48 ore. Questo non si verificava, invece, nella linea resistente. In conclusione possiamo dire che le cellule resistenti erano capaci di

superare l'effetto citostatico accompagnato da morte cellulare indotto dal Vemurafenib.

3.1.5 La *down-modulazione* di BAG3 risensibilizza le A375VR al Vemurafenib

Per studiare il coinvolgimento della proteina BAG3 nella resistenza acquisita al Vemurafenib abbiamo valutato l'effetto della somministrazione combinata di Vemurafenib e siRNA per BAG3 su cellule A375VR utilizzando una colorazione con ioduro di propidio.

A questo scopo, abbiamo trattato le cellule A375VR con un siRNA specifico per BAG3 o Non-Target siRNA in combinazione con Vemurafenib (2 μ M) per 72, 96 e 120 ore.

Nella Fig.25 è mostrato che le A375VR sono state significativamente risensibilizzate al Vemurafenib se trattate con uno specifico bag3siRNA dopo 72 ore e hanno raggiunto un'apoptosi del 40% dopo 120 ore di esposizione continua all'inibitore di BRAF e bag3siRNA. Poichè la più elevata percentuale di cellule con nucleo ipodiploide è stata individuata 120 ore dopo la prima trasfezione questo è stato il tempo scelto per gli esperimenti successivi.

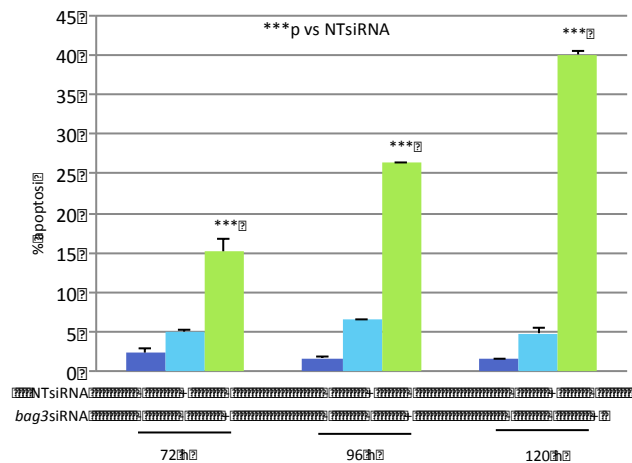


Figura 25. Cellule A375VR sono state trasfettate con un siRNA specifico per BAG3 o con un Non- Targeting (NT) siRNA (200 nM) Per 72, 96 e 120h. Ai tempi indicati le cellule sono state raccolte, marcate con ioduro di propidio e analizzate mediante citometria a flusso. La percentuale di cellule nella regione sub-apoptotica sono state quantificate per ogni condizione. Il grafico rappresenta la percentuale media di cellule in fase sub G_0/G_1 (\pm SD). *** $p < 0.001$.

3.1.6 Il *pathway* di EGFR e l' over-espressione di BRAF sostiene la resistenza in cellule di melanoma

Per identificare i *pathways* implicati nella resistenza acquisita al Vemurafenib abbiamo piastrato le A375VR a bassa densità e selezionato 5 differenti cloni (A375VR#5, A375VR#6, A375VR#7, A375VR#8 e A375VR#9) tenuti sempre in coltura in presenza di Vemurafenib (2 μ M).

Come già riportato, il *pathway* attivato dal recettore per EGF (Epidermal growth factor receptor-EGFR) svolge un ruolo fondamentale nella resistenza delle cellule di melanoma al Vemurafenib (Girotti *et al.*, 2013).

Ad ulteriore conferma di questi dati, abbiamo analizzato i livelli di pEGFR e EGFR mediante Western Blotting nei cloni ottenuti e li abbiamo confrontati con quelli di A375 e A375VR. Come mostrato nella Fig.28, le A375VR presentano un aumento della fosforilazione (pEGFR) e dei livelli totali della proteina EGFR rispetto alle A375. Inoltre, i cloni sono stati caratterizzati da diversi livelli di pEGFR e EGFR. Abbiamo anche dimostrato che la fosforilazione di AKT, un bersaglio a valle del recettore per EGF, è aumentata in cellule resistenti e cloni. La nostra analisi ha confermato che è stata aumentata la fosforilazione di alcuni trasduttori di segnale e attivatori di trascrizione. In particolare si è aumentata nelle cellule e cloni resistenti la fosforilazione di STAT3, infatti le proteine appartenenti alla famiglia STAT sono attivate da citochine e recettori per fattori di crescita (Fig.26).

Recenti studi hanno identificato un nuovo meccanismo che conferisce resistenza al Vemurafenib, questo meccanismo è stato coerente con un aumento del numero di copie di geni BRAFV600E che a sua volta ha portato ad una sovraespressione di proteine BRAF^{V600E} (Shi *et al.*, 2012).

Per identificare ulteriormente i meccanismi che sono stati implicati nel guidare la resistenza nel nostro modello sperimentale abbiamo valutato dal Western Blot l'espressione di BRAF nelle sottolinee resistenti al Vemurafenib. Come mostrato in Fig.28 non vi è alcuna differenza di espressione della proteina BRAF tra le linee cellulari A375VR e la loro controparte parenterale, ma gli altri 5 subcloni che abbiamo generato esprimevano diversi livelli della proteina BRAF.

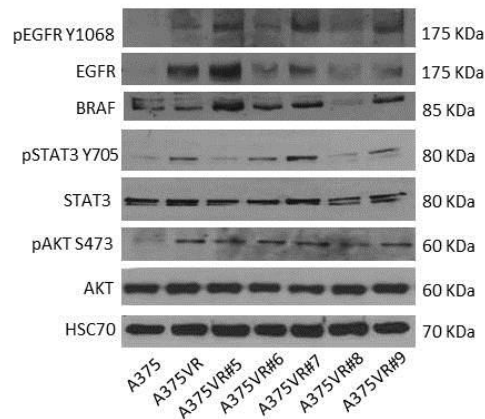


Figura 26. Analisi mediante Western Blot dei livelli di pEGFR, EGFR, BRAF, pAKT, AKT, pSTAT3 (Y705), STAT3 e Hsc70 in cellule A375, A375VR, A375VR#5, A375VR#6, A375VR#7, A375VR#8 e A375VR#9.

3.1.7 La *down-modulazione* di BAG3 induce un diverso grado di ri-sensibilizzazione al Vemurafenib in cloni di melanoma resistenti.

Al fine di indagare in che modo la diversa espressione di pEGFR, EGFR, pAKT, pSTAT3 e BRAF potrebbe influenzare la risposta dei cloni resistenti al Vemurafenib alla down-modulazione di BAG3 abbiamo trasfettato A375VR#5, A375VR#6, A375VR#7, A375VR#8 e A375VR#9 con uno specifico siRNA per BAG3 o Non Target siRNA e trattati con Vemurafenib alla dose di 2 μ M come descritto in precedenza per le A375. Dopo 120 ore dalla prima trasfezione e trattamento abbiamo valutato la percentuale di cellule con nuclei ipodiploidi mediante colorazione con ioduro di propidio. Abbiamo rilevato che la *down-modulazione* di BAG3 è in grado di risensibilizzare i diversi cloni e questa risensibilizzazione è differente da clone a clone.

In particolare A375VR#6 era il clone più suscettibile alla down-modulazione di BAG3 infatti ha raggiunto 42.5% di apoptosi dopo 120 ore di trasfezione (Fig.27). Proprio per questa sua maggiore suscettibilità il clone A375VR#6 è stato scelto per gli esperimenti successivi.

D'altro canto il clone A375VR#8 risulta non rispondere al trattamento con Vemurafenib anche dopo silenziamento della proteina BAG3, inoltre tale clone presentava livelli più bassi della proteina BRAF rispetto al clone A375VR#6, questo dato, che deve tuttavia essere confermato da ulteriori evidenze sperimentali, potrebbe suggerire che nelle nostre condizioni il meccanismo che sostiene la resistenza al Vemurafenib si basa sull'amplificazione di BRAF e che la proteina BAG3 riesce a revertire tale resistenza veicolando al proteasoma proprio la proteina BRAF.

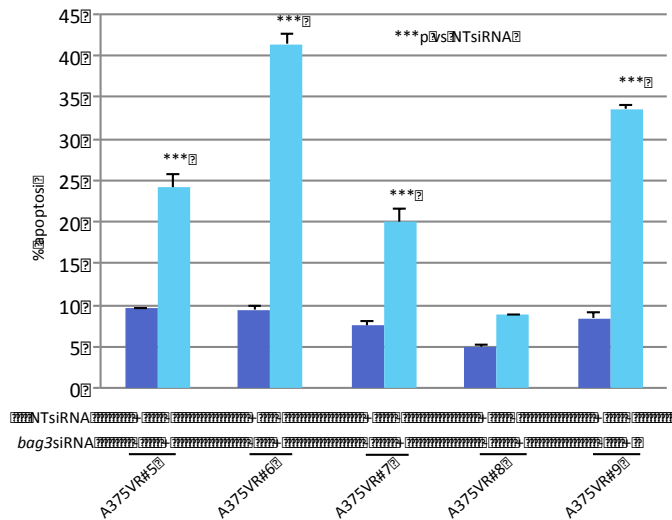


Figura 27. Cellule A375VR#5, A375VR#6, A375VR#7, A375VR#8 e A375VR#9 sono state trasfettate per due volte consecutive con un siRNA specifico per BAG3 o con un non-targeting (NT) siRNA (200 nM). La seconda trasfezione è stata effettuata dopo 72h dopo la prima e sono state trattate con Vemurafenib (2 mM). Dopo 120h dalla prima trasfezione le cellule sono state raccolte, marcate con ioduro di propidio e analizzate mediante citometria a flusso. La percentuale di cellule nella regione sub-apoptica sono state quantificate per ogni condizione. Il grafico rappresenta la percentuale media di cellule in fase sub G₀/G₁ (\pm SD). *** p<0.001.

3.1.8 Il silenziamento di BAG3 ripristina la sensibilità delle A375VR#6 al Vemurafenib attraverso la via di pERK

Per indagare il meccanismo molecolare attraverso il quale il silenziamento di BAG3 potrebbe ripristinare la sensibilità Vemurafenib delle cellule di melanoma caratterizzati da resistenza acquisita al Vemurafenib abbiamo condotto un'analisi utilizzando la tecnica del phospho- protein array. Abbiamo trattato cellule A375VR#6 con uno specifico siRNA per BAG3 (*bag3*siRNA) o con una sequenza scrambled (Non- Targeting siRNA) in presenza di Vemurafenib (2 μ M) per due volte consecutive come descritto in precedenza. Dopo 120 ore di trattamento le cellule sono state raccolte, lisate e analizzati mediante *phospho-protein array*.

Tale analisi ha messo in luce che in seguito a silenziamento di BAG3 si ha la riduzione della fosforilazione di numerose proteine coinvolte nella sopravvivenza cellulare (Fig.30), tra queste numerose proteine ci siamo soffermati sulla riduzione della fosforilazione delle proteine ERK, RSK, CREB, p70s6 e STAT3S727 in quanto sono tutti bersagli che si trovano a valle della protein-chinasi BRAF.

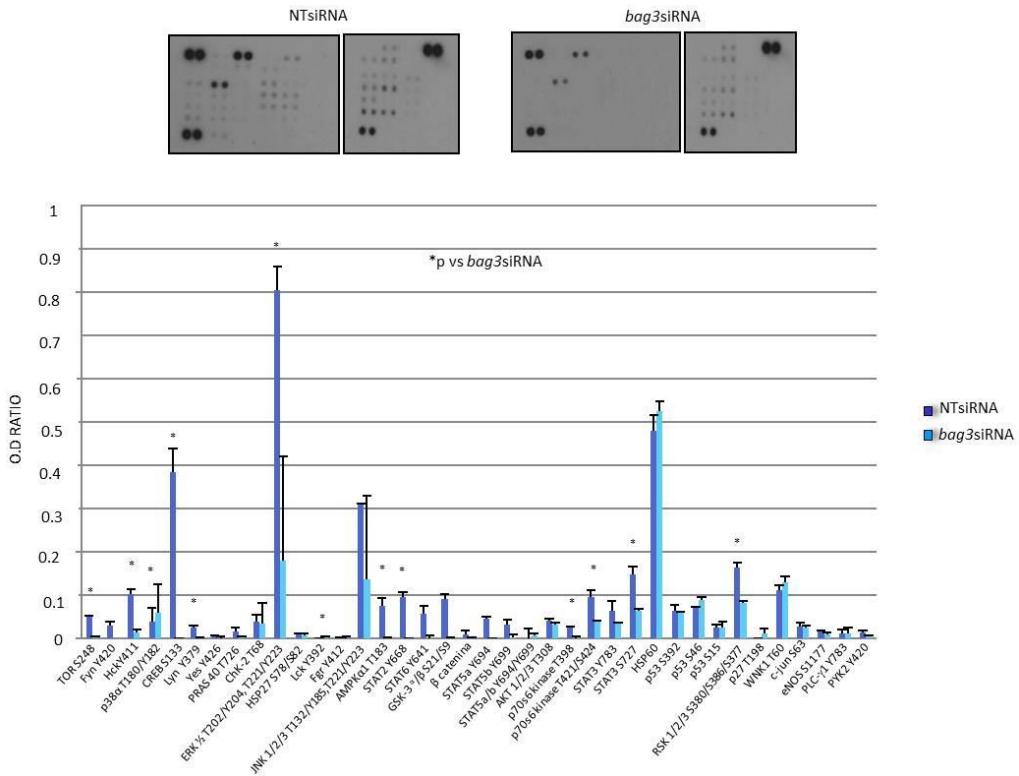


Figura 28. Cellule A375VR#6 sono state trasfettate come descritto precedentemente. Dopo 120 h le cellule sono state lisate e analizzate con il kit phospho-array kit seguendo le istruzioni del produttore. Gli spot ottenuti sono stati analizzati con il software TotalLab Quant 1.0. * $p < 0.05 > 0.01$

Questi risultati confermano la nostra ipotesi secondo cui la proteina BAG3 può risensibilizzare cellule resistenti al trattamento con l'inibitore di BRAF mutato agendo proprio sul *pathway* delle MAPK.

Abbiamo poi confermato mediante immunofluorescenza che le fosforilazioni di CREB e STAT3S727 sono diminuite nella linea cellulare A375VR#6 dopo silenziamento del gene che codifica per la proteina BAG3 (Fig.29).

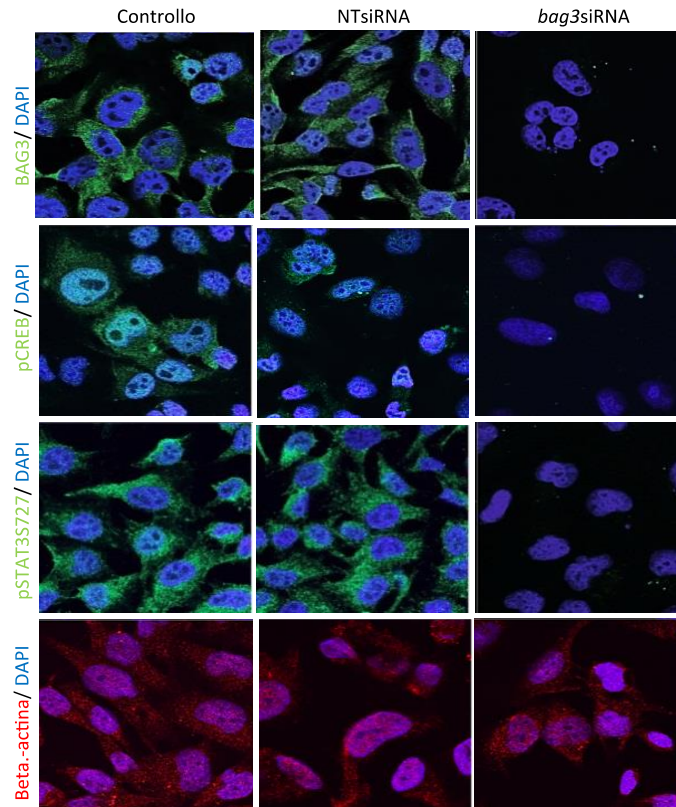


Figura 29. Analisi mediante microscopia confocale di pCREB, pSTA3S727 e BAG3 in cellule A375VR#6 dopo trattamento con *bag3*siRNA o NTsiRNA. Beta-actina è stata utilizzata come controllo negativo.

Inoltre, inducendo il silenziamento di BAG3 abbiamo ottenuto un aumento dei marcatori di apoptosi come *cleaved caspase 3* e abbiamo dimostrato che anche in tale clone BAG3 interferisce con i livelli di BRAF (Fig.30).

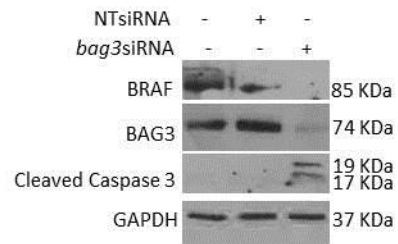


Figura 30. Analisi mediante Western Blot dei livelli di BAG3, BRAF, *Cleaved caspase 3*. GAPDH è stato utilizzato per monitorare i livelli di caricamento.

Conclusioni

In questa tesi è stato studiato il ruolo della proteina BAG3 nel melanoma cutaneo umano, ed in particolare in biopsie di pazienti affetti da melanoma allo stadio avanzato sia primario che metastatico.

I risultati confermano l' over- espressione di BAG3 nelle metastasi dei pazienti rispetto ai tumori primari, questa osservazione è in accordo con dati precedentemente pubblicati (Franco *et al.*, 2012) ed inoltre è in accordo con dati che mettono in relazione la proteina BAG3 con la motilità cellulare ed il processo di metastatizzazione (Iwasaki *et al.*, 2007; Kassis *et al.*, 2009).

I risultati mostrano, inoltre, che la proteina BAG3 è sovra- espressa nelle metastasi dei pazienti caratterizzati dalla mutazione BRAF^{V600E} e che l'espressione di BAG3 correla con la prognosi in pazienti con linfonodi metastatici.

Questi risultati suggeriscono che BAG3 è significativamente espressa in una percentuale di melanomi metastatici e quindi tale proteina potrebbe rappresentare un possibile target per il trattamento del melanoma metastatico, e l'over- espressione di BAG3 nelle metastasi dei pazienti recanti la mutazione BRAF^{V600E} suggerisce che la positività per BAG3 potrebbe costituire un approccio per la stratificazione dei pazienti portatori della mutazioni di BRAF che sviluppano resistenza ad agenti specifici come il Vemurafenib. In aggiunta l'analisi di BAG3 in biopsie linfonodali potrebbe contribuire alla stratificazione dei pazienti per specifici approcci terapeutici.

In tale tesi è stato altresì investigato il possibile ruolo della proteina BAG3 nei meccanismi di resistenza che i pazienti acquisiscono in seguito a trattamento con Vemurafenib.

Abbiamo messo a punto *in vitro* le condizioni per riprodurre un modello di melanoma umano caratterizzato da resistenza acquisita all'inibitore di BRAF^{V600E}, ed in tale modello abbiamo dimostrato che la down- modulazione dei livelli di BAG3 è in grado di ripristinare la sensibilità di linee cellulari resistenti al Vemurafenib al trattamento con l'inibitore di BRAF mutato stesso, il meccanismo alla base di tale risensibilizzazione sembra risiedere nella capacità di BAG3 di interferire con i livelli di BRAF.

Tutti questi risultati ci inducono a pensare che indagando una potenziale correlazione tra l'espressione BAG3 e la risposta agli agenti terapeutici si potrebbe prevedere la risposta dei pazienti al trattamento con agenti specifici e che il silenziamento di BAG3 potrebbe essere utilizzato come terapia combinata ed innovativa per abbattere o comunque ridurre la resistenza ad agenti specifici come il Vemurafenib.

4.1 Colture cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti sulla linea cellulare A375 che è stata ottenuta dalla banca di cellule ATCC (Manassas, VA). Le cellule sono state mantenute in coltura utilizzando DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contenente 10% di siero fetale bovino (FBS), penicillina (100 unità/ml), streptomicina (100 unità/ml), a 37°C ad un'atmosfera controllata al 5% di CO₂.

4.2 Lisi cellulare

Le cellule dopo due lavaggi con PBS 1X (*phosphate buffered saline*), sono state raccolte e centrifugate a 5900 g per 1'. Il pellet ottenuto è stato risospeso in una soluzione di lisi, HNT buffer (20 mM Hepes PH 7.5; 150 mM NaCl; 0.1% Triton) a cui sono stati aggiunti inibitori delle proteasi e inibitori delle fosfatasi (Sigma Aldrich) e tenute in ghiaccio per circa 30 minuti. Per ottenere la rottura completa delle membrane cellulari, le cellule sono state sottoposte anche ad un forte stress termico attraverso 3 cicli di gelo (in azoto liquido a -196°C) e scongelamento (in bagnetto a 37°C).

Successivamente i lisati, costantemente tenuti in ghiaccio, sono stati centrifugati a 13400 g per 15 minuti a 4°C e il surnatante, contenente tutte le proteine cellulari, è stato recuperato.

4.3 Western Blot

In base ai risultati ottenuti dalla determinazione quantitativa, ciascun campione è stato preparato aggiungendo ad alcuni µl di proteine totali, Laemmli buffer 1X (diluizione del Laemmli 4x (200 mM Tris PH 6.8, 8% w/v SDS, 0.4% w/v blu di bromofenolo, 40% v/v glicerolo), additivo di β-mercaptoetanolo, una sostanza denaturante. In seguito a trattamento con calore a 99° C per 5 minuti, ciascun campione è stato caricato su gel-SDS poliacrilamide (Bio-Rad) e le proteine separate in base al loro peso molecolare tra le maglie del gel. Il gel è stato fatto correre a voltaggio costante e successivamente trasferito su filtro di nitrocellulosa mediante Trans-Blot TurboTransfer System (Bio-Rad). L'efficienza del trasferimento è stata controllata colorando il filtro di nitrocellulosa con Rosso Ponceau, mentre per bloccare i tutti i siti di interazione idrofobica disponibili, la membrana di nitrocellulosa (blot) è stata incubata con Milk in polvere privo di grassi al 10% w/v (Bio-Rad LABORATORIES, Hercules, CA) per 1 ora a temperatura ambiente (TA). Il blot è stato, quindi, incubato per tutta la notte in una soluzione diluita contenente l'anticorpo primario diretto contro la proteina d'interesse. Le IgG contenute nell'antisiero si legano solo se riconoscono il loro antigene e, per poter visualizzare questa interazione, il filtro di nitrocellulosa è stato incubato ulteriormente per 1 ora a TA in una soluzione contenente l'anticorpo secondario, in grado cioè di riconoscere la porzione costante della molecola di IgG utilizzata come anticorpo primario. Sia l'incubazione dell'anticorpo primario che di quello secondario è stata seguita da 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno con TBS 1X-0.1% Tween. Inoltre, l'utilizzo dell'anticorpo secondario opportunamente coniugato alla perossidasi ha consentito di individuarlo una volta che si fosse legato all'anticorpo primario e i segnali rilevati per chemiluminescenza utilizzando una doppia soluzione contenente luminolo e acido para-cumarico (Santa Cruz) sono stati impressionati su lastra autoradiografica (FUJI MEDICAL X-RAY FILM) e hanno, quindi, indicato la posizione della proteina d'interesse.

4.4 Apoptosi

Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (1×10^4 cellule per pozzetto) e trattate con $2 \mu\text{M}$ di Vemurafenib e/o trasfettate con piccole molecole di RNA a doppio filamento chiamate siRNA (small interfering RNA) o Non Target siRNA (NTsiRNA). Alla fine del trattamento, la percentuale di cellule in fase sub G_1 è stata analizzata mediante colorazione con ioduro di propidio. Ciascun punto sperimentale è stato analizzato in triplicato e i dati riportati sono la media di almeno tre esperimenti indipendenti. Le barre di errore rappresentano la Deviazione Standard.

4.5 Trasfezione

La sequenza specifica dei siRNA di BAG3 è 5'-ATCGAAGAGTATTTGACCAAA-3' mentre quella del NT siRNA è 5'-CAGUCGCGUUUGCGACUGG-3' e sono stati sintetizzati da MWG Biotech (Ebersberg, Germania). Le cellule sono state trasfettate con siRNA ad una concentrazione finale di 200 nM usando TransFectin (Bio-Rad, Hercules, CA). L'efficienza di trasfezione è stata valutata in ogni esperimento mediante analisi Western Blot.

4.6 Co-immunoprecipitazione

Per l'immunoprecipitazione di BAG3 l'anticorpo monoclonale anti-BAG3, AC-2, è stato coniugato con Dynabeads (Invitrogen) seguendo le istruzioni del produttore. 500 μg di proteine totali sono stati immunoprecipitati a 4°C per tutta la notte e poi analizzati mediante Western Blot utilizzando un anticorpo policlonale primario anti-BAG3, un anticorpo anti-BRAF, un anticorpo anti-Hsc70 e un anticorpo anti-GAPDH.

4.7 Saggio di vitalità cellulare e analisi del ciclo cellulare

Cellule sincronizzate sono state piastrate ad una densità di 5×10^3 cellule / cm^2 e dopo 2 ore sono state trattate con concentrazioni indicate di Vemurafenib (vedi legende delle figure). La vitalità cellulare è stata misurata mediante saggio MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromide] (M2128). L'analisi del ciclo cellulare è stata eseguita dopo incubazione delle cellule con soluzione PI (2,5 mg/ml di ioduro di propidio, 0,75 mM citrato di sodio pH 8,0, 0,1% Triton). La fluorescenza è stata misurata mediante citometria a flusso (FACScan Becton Dickinson, BD, Franklin Lakes, NJ, USA). La percentuale di cellule in ciascuna fase è stata calcolata utilizzando il software ModFit LT (BD).

4.8 Anticorpi, altri reagenti e kit

L'anticorpo policlonale e gli anticorpi monoclonali murini anti-BAG3 sono stati ottenuti da BIOUNIVERSA srl, SA, Italia. Anticorpi che riconoscono ERK1 (sc-94), BRAF (sc-166), STAT3 (sc-80109), GAPDH (sc-32233), Hsc-70 (sc-7298) e Beta-actina (sc-477789) sono stati acquistati dalla ditta Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA); invece, anticorpi che riconoscono pERK1/2 (Thr202/Thr404; #9101), pSTAT3 (Ser727; #9136), pAKT (ser473; #9271), AKT (#9272), EGFR (#4267) e *cleaved caspase 3* sono stati acquistati dalla ditta Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA), l'anticorpo anti-pEGFR (Y1068; # 04-339) è stato acquistato dalla ditta Millipore

(Darmstadt, Germania). Le immunoglobuline di topo (IgG) (ABIN 398.652) sono state ottenute da Antibodies online.

Il Vemurafenib è stato acquistato da Selleckem.

Il kit utilizzato per determinare il profilo di proteine fosforilate (ARY003B) dopo silenziamento del gene che codifica per BAG3 è stato acquistato dalla ditta R&D System (Minneapolis, USA).

4.9 Campioni biotipici

I campioni tumorali sono stati ottenuti da una serie di pazienti che hanno subito la resezione chirurgica per il melanoma maligno metastatico e per la loro analisi ci siamo avvalsi della collaborazione del Dr. Giuseppe Palmieri (Unit of Cancer Genetics, Institute of Biomolecular Chemistry, Sassari, Italia).

Mentre per la correlazione tra l'espressione di BAG3 e la prognosi dei pazienti abbiamo analizzato un TMA che ci è stato fornito dal Dr. Dave Hoon (John Weyne Cancer Institute, Santa Monica, CA, USA).

4.10 Immunoistochimica

Sezioni di tessuto dello spessore di 4 μm sono stati montati su vetrini ricoperti da poli-L-lisina e sono stati analizzati mediante immunoistochimica (IHC) con l'anticorpo monoclonale anti-BAG3, AC-1 (BIOUNIVERSA srl, SA, Italia). Il Protocollo prevedeva la deparaffinazione in BIOCLEAR, reidratazione attraverso una scala a concentrazioni decrescenti di etanolo fino all'acqua, l'incubazione con perossido di idrogeno al 3% per 5 minuti per inattivare le perossidasi endogene, lo smascheramento enzimatico in tampone CC1 (Ventana Medical System), pH 8.0, per 36 minuti a 95 ° C.

Dopo il risciacquo con soluzione salina (PBS 1X), i campioni sono stati bloccati con siero fetale bovino al 5% in PBS 0.1%/BSA e poi incubati per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo anti- BAG3 (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Per lo sviluppo della reazione è stata usata la classica tecnica streptavidina- biotina e la 3,3'-diaminobenzidina (DAB) è stata utilizzata come substrato/cromogeno per lo sviluppo dell' attività perossidasi. Infine, i nuclei delle cellule sono stati colorati con ematossilina ed i vetrini copri oggetto sono stati montati usando un mezzo di montaggio sintetico.

4.11 Immunofluorescenza indiretta

Le cellule sono state cresciute su vetrini in *multi-well* da sei pozzetti ad una confluenza del 60-70% e sono state trasferite; i vetrini sono stati lavati con PBS 1x, fissati con il 3,7% di formaldeide in PBS 1x per 30 minuti a temperatura ambiente e poi incubati per 5 minuti con PBS 1x 0,1 M glicina. Dopo il lavaggio, le cellule fissate sui vetrini sono state permeabilizzate con 0,1% Triton X-100 per 5 min, lavate di nuovo, e incubate con una soluzione di blocco (5% *normal horse serum* in PBS 1x) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio, le cellule sono state incubate a 4 °C con una diluizione 1:100 degli anticorpi anti- pSTAT3, anti- pCREB e anti- actina e con l' anticorpo monoclonale anti-BAG3 AC-1 alla concentrazione di 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. I vetrini sono poi stati lavati 3 volte con PBS 1x ed incubati con una diluizione 1:500 di anticorpo secondario anti-rabbit DyLight coniugato al fluoroforo 488 (Jackson ImmunoResearch) e anti-mouse DyLight coniugato al fluoroforo 594 (Jackson ImmunoResearch) a temperatura ambiente per 1h. I vetrini sono stati nuovamente lavati per 3 volte in PBS e

poi in acqua distillata e montati utilizzando glicerolo al 70%(v /v). I campioni sono stati analizzati utilizzando un microscopio confocale a scansione laser (Leica SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Germania). Le immagini sono state acquisite in modalità di scansione sequenziale. Per la produzione delle figure i dati definitivi sono stati assemblati utilizzando Adobe Photoshop 7 e Adobe Illustrator 10.

4.12 Analisi statistiche

I risultati sono espressi come media \pm S.D. I dati sono stati analizzati mediante ttest con il software statistico MedCalc versione 13.3.3 (Ostenda, Belgio). I valori di p da 0.01 a 0.05, da 0.001 a 0.01, o <0.001 sono stati considerati rispettivamente significativi (*), molto significativi (**) o altamente significativi (***)

BIBLIOGRAFIA

AIRTUM Working Group. I tumori in Italia, rapporto AIRTUM **2010**: La prevalenza dei tumori in Italia Epidemiol Prev 2014.

Ammirante M, Rosati A, Arra C, Basile A, Falco A, Festa M, Pascale M, d'Avenia M, Marzullo L, Belisario MA, De Marco M, Barbieri A, Giudice A, Chiappetta G, Vuttariello E, Monaco M, Bonelli P, Salvatore G, Di Benedetto M, Deshmane SL, Khalili K, Turco MC, Leone A. **2010**, IKK γ protein is a target of BAG3 regulatory activity in human tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 7497-502.

Aoude LG, Wadt K, Bojesen A, Crüger D, Borg A, Trent JM, Brown KM, Gerdes AM, Jönsson G, Hayward NK. **2013**. A BAP1 Mutation in a Danish Family Predisposes to Uveal Melanoma and Other Cancers. *PLoS One.***8**, e72144.

Arcaro A, Guerreiro AS. **2007** The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: genetic alterations and therapeutic implications. *Curr Genomics.* **8**, 271-306.

Ascierto PA, Gogas HJ, Grob JJ, Algarra SM, Mohr P, Hansson J, Hauschild A. **2013a**. Adjuvant interferon alfa in malignant melanoma: an interdisciplinary and multinational expert review. *Crit Rev Oncol Hematol.* **85**, 149-61.

Ascierto PA, Minor D, Ribas A, Lebbe C, O'Hagan A, Arya N, Guckert M, Schadendorf D, Kefford FR, Grob JJ, Hamid O, Amaravadi R, Simeone E, Wilhelm T, Kim KB, Long GV, Martin A, Mazumdar J, Goodman VL, and Trefzer U. **2013b**. Phase II Trial (BREAK-2) of the BRAF Inhibitor Dabrafenib (GSK2118436) in Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol.* **31**, 3205-3211.

Basile A, Zeppa R, Pasquino N, Arra C, Ammirante M, Festa M, Barbieri A, Giudice A, Pascale M, Turco MC, Rosati A. **2011** Exposure to 50 Hz electromagnetic field raises the levels of the anti-apoptotic protein BAG3 in melanoma cells. *J Cell Physiol.* **226**, 2901-7.

Beere HM, **2005**. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest.* **115**, 2633-9.

Box NF, Terzian T. **2008**. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **21**, 525-33.

Braeuer RR, Zigler M, Villares GJ, Dobroff AS, Bar-Eli M. **2011**. Transcriptional control of melanoma metastasis: the importance of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol.* **21**, 83- 8.

Breslow A. Thickness. **1970**. Cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis in the cutaneous melanoma. *Ann Surg;* **172**, 902-908.

Bruno AP, Festa M, Dal Piaz F, Rosati A, Turco MC, Giuditta A, *et al.* **2008**. Identification of a synaptosome-associated form of BAG3 protein. *Cell Cycle.* **7**, 3104–3105.

Carra S, Brunsting JF, Lambert H, Landry J, Kampinga HH. **2009b**. HspB8 participates in protein quality control by a non-chaperone-like mechanism that requires eIF2{alpha} phosphorylation. *J Biol Chem*. **284**, 5523–5532.

Carra S. **2009a**. The stress-inducible HspB8-Bag3 complex induces the eIF2alpha kinase pathway: implications for protein quality control and viral factory degradation? *Autophagy*. **5**, 428–429.

Carrera C., Puig S., Malveyh J. **2012** In vivo confocal reflectance microscopy in melanoma. *Dermatol Ther*. **25**, 410-22.

Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, et al. **2011** KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA*. **305**, 2327-34.

Cassidy PB, Grossman D, Leachman **2013** Selenium for the prevention of cutaneous melanoma. *Nutrients*. **5**,725-49.

Casula M, Muggiano A, Cossu A, Budroni M, Caracò C, Ascierto PA, Pagani E, Stanganelli I, Canzanella S, Sini MC, Palomba G, The Italian Melanoma Intergroup (IMI), Palmieri G. **2009** Role of key-regulator genes in melanoma susceptibility and pathogenesis among patients from South Italy. *BMC Cancer*. **3**, 9-352.

Chakraborty R, Wieland CN, Comfere NI. **2013** Molecular targeted therapies in metastatic melanoma. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. **7**, 49-56.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O' Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA. **2011**. BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAFV600E mutation. *N Engl J Med*. **364**, 2507-16.

Cheng H and Aplin AE. **2015**. *Game of isoforms: PI3K β -sparing inhibitor is coming*. *Pigment Cell & Melanoma Research*. **28**, 133-4.

Chiappetta G, Ammirante M, Basile A, Rosati A, Festa M, Monaco M, et al. **2007**. The antiapoptotic protein BAG3 is expressed in thyroid carcinomas and modulates apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **92**,1159-63.

Chiappetta G, Basile A, Arra C, Califano D, Pasquinelli R, Barbieri A, De Simone V, Rea D, Giudice A, Pezzullo L, De Laurenzi V, Botti G, Losito S, Conforti D, Turco MC. **2012**. BAG3 down-modulation reduces anaplastic thyroid tumor growth by enhancing proteasome-mediated degradation of BRAF protein. *J Clin Endocrinol Metab*. **97**, E115-20.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. **1989**. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst*. **81**, 1893-904.

Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. **2005**. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* **353**, 2135-47.

Doong H, Rizzo K, Fang S, Kulpa V, Weissman AM, Kohn EC, **2003**. CAR-1/BAG-3 abrogates heat shock protein-70 chaperone complex-mediated protein degradation: accumulation of poly-ubiquitinated HSP90 client proteins. *J Biol Chem.* **278**, 28490-500.

Dreiza CM, Komalavilas P, Furnish EJ, Flynn CR, Sheller MR, Smoke CC *et al.* **2010** The small heat shock protein, HSPB6, in muscle function and disease. *Cell Stress Chaperones.* **15**,1-11.

Du ZX, Meng X, Zhang HY, Guan Y, Wang HQ. **2008**. Caspase-dependent cleavage of BAG3 in proteasome inhibitors-induced apoptosis in thyroid cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.***369**, 894–898.

Dummer R, Rinderknecht J, Goldinger SM, Wagner I, Mitchell L, Veronese M, Nick LS, Hilfiker P, Gobbi S. **2011**. An open- label pilot study of vemurafenib in previously treated metastatic melanoma patients with brain metastases. *J Clin Oncol.* **50**,611- 21.

Eggermont AM, Suci S, Rutkowski P, Marsden J, Santinami M, Corrie P, Aamdal S, Ascierto PA, Patel PM, Kruit WH, Bastholt L, Borgognoni L, Bernengo MG, Davidson N, Polders L, Praet M, Spatz A. **2013**. Adjuvant ganglioside GM2-KLH/QS-21 vaccination versus observation after resection of primary tumor > 1.5 mm in patients with stage II melanoma: results of the EORTC 18961 randomized phase III trial. *Journal of Clinical Oncology.* **31**, 3831-7.

El Ghissassi F, Baan R, Straif K, , Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglianò V,WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. **2009**. A review of human carcinogens-part D: radiation. *Lancet Oncol.* **10**, 751-2.

Espinosa P, Pfeiffer RM, García-Casado Z, Requena C, Landi MT, Kumar R, Nagore E. **2016**. Risk factors for keratinocyte skin cancer in patients diagnosed with melanoma, a large retrospective study. *Eur J Cancer.* **53**, 115-24.

Fan GC, Chu G, Kranias EG, **2005**. Hsp20 and its cardioprotection. *Trends Cardiovasc Med;* **15**,138–41.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. **2013**. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* **49**, 1374-403.

Festa M, Del Valle L, Franco R, Scognamiglio G, Khalili K, De Laurenzi L, *et al.* **2011**. BAG3 protein is overexpressed in human glioblastoma and is a potential target for its therapy *Am J Pathol.***178**, 2504-12.

Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, Hamid O, Schuchter L, Cebon J, Ibrahim N, Kudchadkar R, Burris HA 3rd, Falchook G, Algazi A,

Lewis K, Long GV, Puzanov I, Lebowitz P, Singh A, Little S, Sun P, Allred A, Ouellet D, Kim KB, Patel K, Weber J. **2012b**. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*. **367**, 1694-703.

Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov LV, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, Dummer R, Trefzer U, Larkin JM, Utikal J, Dreno B, Nyakas M, Middleton MR, Becker JC, Casey M, Sherman LJ, Wu FS, Ouellet D, Martin AM, Patel K, Schadendorf D; METRIC Study Group. **2012a**. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. **367**, 107-14.

Forschner A1, Eigentler TK, Pflugfelder A, Leiter U, Weide B, Held L, Meier F, Garbe C. **2010**. Melanoma staging: facts and controversies. *Clinics in Dermatology*. **28**, 275–280.

Franceschelli S, Rosati A, Lerose R, De Nicola S, Turco MC, Pascale M, **2008**. Bag3 Gene Expression Is Regulated by Heat Shock Factor 1. *J. Cell. Physiol*. **215**, 575-7.

Franco R, Scognamiglio G, Salerno V, Sebastiani A, Cennamo G, Ascierto PA, Botti G, Turco MC, Rosati A. **2012**. Expression of the anti-apoptotic protein BAG3 in human melanomas. *J Invest Dermatol*. **32**, 252-4.

Fuchs M, Poirier DJ, Seguin SJ, Lambert H, Carra S, Charette SJ, *et al*, **2009**. Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction. *Biochem J*. **425**, 245–55.

Fukunaga- Kalabis M, Roesch A, Herlyn M. **2011**. From cancer stem cells to tumor maintenance in melanoma. *J Invest Dermatol*. **131**, 1600- 4.

Gajewski TF, Salama AK, Niedzwiecki D, Johnson J, Linette G, Bucher C, Blaskovich MA, Sebt SM, Haluska F; Cancer and Leukemia Group B. **2012** Phase II study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in advanced melanoma (CALGB 500104) *J Transl Med*. **10**, 10:246.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, *et al*. **2005**. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer*. **41**, 2040–59.

Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, Grob JJ, Malvey J, Newton-Bishop J, Stratigos A, Pehamberger H, Eggermont A. **2010**. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus based interdisciplinary guideline. *European Journal of Cancer*. **46**, 270–283.

Gentilella A, Passiatore G, Deshmane S, Turco MC, Khalili K, **2008**. Activation of BAG3 by Egr-1 in response to FGF-2 in neuroblastoma cells. *Oncogene*. **28**, 5011-18.

Giehl K. **2005**. Oncogenic Ras in tumor progression and metastasis. *Biol Chem*. **386**, 193-205.

Girotti MR, Pedersen M, Sanchez-Laorden B, Viros A, Turajlic S, Niculescu-Duvaz D, Zambon A, Sinclair J, Hayes A, Gore M, Lorigan P, Springer C, Larkin J, Jorgensen C, Marais R. **2013**. Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Discov*. **3**, 158- 67.

Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. **2006**. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* **126**, 154-60.

Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. **2013**. Hedgehog signaling in prostate cancer and its therapeutic implication. *International journal of molecular sciences.* **14**, 13979-4007.

Gudbjartsson DF, Sulem P, Stacey SN, Goldstein AM, Rafnar T, Sigurgeirsson B, Benediktsdottir KR, Thorisdottir K, Ragnarsson R, Sveinsdottir SG, Magnusson V, Lindblom A, Kostulas K, Botella-Estrada R, Soriano V, Juberías P, Grasa M, Saez B, Andres R, Scherer D, Rudnai P, Gurzau E, Koppova K, Kiemeny LA, Jakobsdottir M, Steinberg S, Helgason A, Gretarsdottir S, Tucker MA, Mayordomo JI, Nagore E, Kumar R, Hansson J, Olafsson JH, Gulcher J, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. **2008**. ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. *Nat Genet.* **40**, 1029.

Hill VK, Gartner JJ, Samuels Y, Goldstein AM. **2013**. The genetics of melanoma: recent advances. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **14**, 257-79.

Hong A., Fogarty G. **2012**. Role of radiation therapy in cutaneous melanoma. *The Cancer Journal.* **18**, 203–207.

Iwasaki M, Tanaka R, Hishiya A, Homma S, Reed JC, Takayama S. **2010**. BAG3 directly associates with guanine nucleotide exchange factor of Rap1, PDZGEF2, and regulates cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun.* **400**, 413–418.

Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, Eastham-Anderson J, Cupp JE, Liang Y, Davis DP, Hoeflich KP, Seshagiri S. **2009**. Combined targeting of BRAF and CRAF or BRAF and PI3K effector pathways is required for efficacy in NRAS mutant tumors. *PLoS One.* **4**, e5717.

Johnson DB, Menzies AM, Zimmer L, Eroglu Z, Ye F, Zhao S, Rizos H, Sucker A, Scolyer RA, Gutzmer R, Gogas H, Kefford RF, Thompson JF, Becker JC, Berking C, Egberts F, Loquai C, Goldinger SM, Pupo GM, Hugo W, Kong X, Garraway LA, Sosman JA, Ribas A, Lo RS, Long GV, Schadendorf D. **2015**. Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. *Eur J Cancer.* **51**, 2792-9.

Kang H.Y., Bahadoran P., Ortonne J.P. **2010**. Reflectance confocal microscopy for pigmentary disorders. *Experimental Dermatology.* **19**, 233–239.

Kashani-Sabet M, Range J, Torabian S, Nosrati M, Simko J, Jablons DM, Moore DH, Haqq C, Miller III Jr, Sagebiel RW. 2009. A multi-marker assay to distinguish malignant melanomas from benign nevi. *Proc Natl Acad Sci USA.* **14**, 6268-72.

Kassis JN, Guancial EA, Doong H, Virador V, Kohn EC. **2006**. CAIR-1/BAG-3 modulates cell adhesion and migration by downregulating activity of focal adhesion proteins. *Exp Cell Res.* **312**, 2962–2971.

- Kassis JN, Virador VM, Guancial EA, Kimm D, Ho AS, Mishra M, *et al.* **2009**. Genomic and phenotypic analysis reveals a key role for CCN1 (CYR61) in BAG3-modulated adhesion and invasion. *J Pathol.* **218**,495–504
- Law MH, Bishop DT, Lee JE, Brossard M, Martin NG, *et al.* **2015**. Genome-wide meta-analysis identifies five new susceptibility loci for cutaneous malignant melanoma. *Nat Genet.* **47**, 987-95.
- Lazovich D, Vogel RI, Berwick M, Weinstock MA, Anderson KE, Warshaw EM. **2010**. Indoor tanning and risk of melanoma: a case-control study in a highly exposed population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **19**, 1557-6.
- Le Boit P.E., Burg G., Weedon D, Sarasain A. (Eds.): World Health Organization. Classification of Tumours. *Pathology and Genetics of Skin Tumours*. IARC Press: Lyon 2006
- Lee MY, Kim SY, Choi JS, Choi YS, Jeon MH, Lee JH, *et al.* **2002**. Induction of Bis, a Bcl-2-binding protein, in reactive astrocytes of the rat hippocampus following kainic acid-induced seizure. *Exp Mol Med.* **34**,167-71.
- Leong SP, Mihm MC Jr, Murphy GF, Hoon DS, Kashani-Sabet M, Agarwala SS, Zager JS, Hauschild A, Sondak VK, Guild V, Kirkwood JM. **2012**. Progression of cutaneous melanoma: implications for treatment. *Clin Exp Metastasis.* **29**,797-9.
- Leung AM, Hari DM, Morton DL. **2012**. Surgery for distant melanoma metastasis. *The Cancer Journal.* **18**,176–184.
- Li N, Du ZX, Zong ZH, Liu BQ, Li C, Zhang Q, Wang HQ. **2013** PKC δ -mediated phosphorylation of BAG3 at Ser187 site induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness in thyroid cancer FRO cells. *Oncogene.* **32**, 4539-48.
- Liu P, Xu B, Li J, Lu H. **2009**. BAG3 gene silencing sensitizes leukemic cells to Bortezomib-induced apoptosis. *FEBS Lett.* **583**, 401–406.
- Lutzky J. **2014**. Checkpoint inhibitors in the treatment of cutaneous malignant melanoma. *Chin Clin Oncol.* **3**, 30.
- Mackie RM. **1990**. Clinical recognition of early invasive malignant melanoma. *British Medical Journal.* 301, 1005–1006.
- McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, Ribas A, Hogg D, Hamid O, Ascierto PA, Garbe C, Testori A, Maio M, Lorigan P, Lebbé C, Jouary T, Schadendorf D, O'Day SJ, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dréno B, Sosman JA, Flaherty KT, Yin M, Caro I, Cheng S, Trunzer K, Hauschild A. **2014**. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol.* **15**, 323-32.
- Meyle KD, Gulberg P. **2009**. Genetic risk factors for melanoma. *Hum Genet.* **126**, 499-510.
- Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. **2010**. Interferon alpha adjuvant therapy

in patients with high- risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. **102**, 493–501.

Moreau K, Luo S, Rubinsztein DC. **2010** Cytoprotective roles for autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. **22**, 206-11.

Niessner H1, Beck D, Sinnberg T, Lasithiotakis K, Maczey E, Gogel J, Venturelli S, Berger A, Mauthe M, Toulany M, Flaherty K, Schaller M, Schadendorf D, Proikas-Cezanne T, Schitteck B, Garbe C, Kulms D, Meier F. **2011**. The farnesyl transferase inhibitor lonafarnib inhibits mTOR signaling and enforces sorafenib-induced apoptosis in melanoma cells. *J Invest Dermatol*. **131**, 468-79.

Njauw CN1, Kim I, Piris A, Gabree M, Taylor M, Lane AM, DeAngelis MM, Gragoudas E, Duncan LM, Tsao H. **2012**. Germline BAP1 inactivation is preferentially associated with metastatic ocular melanoma and cutaneous-ocular melanoma families. *PLoS One*. **7**, e35295.

Ott PA, Hodi FS, Buchbinder EI. **2015**. Inhibition of Immune Checkpoints and Vascular Endothelial Growth Factor as Combination Therapy for Metastatic Melanoma: An Overview of Rationale, Preclinical Evidence, and Initial Clinical Data. *Front Oncol*. **5**, 202.

Pagliuca MG, Lerose R, Cigliano S, Leone A, **2003**. Regulation by heavy metals and temperature of the human BAG-3 gene, modulator of Hsp70 activity. *FEBS Lett*. **541**, 11-5.

Palmieri G, Capone ME, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, Sini MC, Palla M, Mozzillo N, Ascierto PA. **2009**. Main roads to melanoma. *J Transl Med*. **7**, 86.

Paraiso KH, Fedorenko IV, Cantini LP, Munko AC, Hall M, Sondak VK, Messina JL, Flaherty KT, Smalley KS. **2010**. Recovery of phospho- ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. *Br J Cancer*. **102**, 1724-30.

Pflugfelder A1, Weide B, Eigentler TK, Forschner A, Leiter U, Held L, Meier F, Garbe C. **2010**. Incisional biopsy and melanoma prognosis: facts and controversies. *Clinics in Dermatology*. **28**, 316–318.

Rastrelli M, Alaibac M, Stramare R, Chiarion Sileni V, Montesco MC, Vecchiato A, Campana LG, Rossi CR. **2013**. Melanoma M (Zero): Diagnosis and Therapy. *ISRN Dermatology*.

Rigel D.S., Russak J., Friedman R. **2010**. The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs *CA Cancer J Clin*. **60**, 301-316.

Romano MF, Festa M, Pagliuca G, Lerose R, Bisogni R, Chiurazzi F, *et al*, **2003**. BAG3 protein controls B-chronic lymphocytic leukaemia cell apoptosis. *Cell Death Differ*. **10**, 383-5.

Rosati A, Bersani S, Tavano F, Dalla Pozza E, De Marco M, Palmieri M, *et al*. **2012**. Expression of the antiapoptotic protein BAG3 is a feature of pancreatic

adenocarcinoma and its overexpression is associated with poorer survival. *Am J Path.* **181**, 1524-29.

Rosati A, Graziano V, De Laurenzi V, Pascale M, Turco MC. **2011**. BAG3: a multifaceted protein that regulates major cell pathways. *Cell Death and Disease.* **2**, e141.

Rosati A, Khalili K, Deshmane SL, Radhakrishnan S, Pascale M, Turco MC, *et al.* **2009**. BAG3 protein regulates caspase-3 activation in HIV-1-infected human primary microglial cells. *J Cell Physiol.* **218**, 264- 267.

Rosati A., Ammirante M., Gentilella A., Basile A., Festa M., Pascale M., Marzullo L., Belisario M.A., Tosco A., Franceschelli S., Moltedo O., Pagliuca G., Lerosse R. and Turco MC. **2007**. Apoptosis inhibition in cancer cells: a novel molecular pathway that involves BAG3 protein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1337- 42.

Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee MK, Lee H, Koya RC, Ng C, Chodon T, Scolyer RA, Dahlman KB, Sosman JA, Kefford RF, Long GV, Nelson SF, Ribas A, Lo RS. **2012**. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun.* **6**, 3:724.

Si L, Wang X, Guo J. **2014**. Genotyping of mucosal melanoma. *Chin Clin Oncol.* **3**, 34.

Sikora AG, Gelbard A, Davies A, Sano D, Ekmekcioglu S, Kwon J, Hailemichael Y, Jayaraman P, Myers JN, Grimm EA, Overwijk W. **2010**. Targeted inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits growth of human melanoma in vivo and synergizes with chemo-therapy. *Clin Cancer Res.* **15**, 1834-44.

Singh S, Nagpal SJ, Murad MH, Yadav S, Kane SV, Pardi DS, Talwalkar JA, Loftus EV Jr. **2014**. Inflammatory Bowel Disease is Associated with an Increased Risk of Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Gastroenterol and Hepatology.* **12**, 210-810.

Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M, Xiao M, Desai B, Egyhazi S, Hansson J, Wu H, King AJ, Van Belle P, Elder DE, Flaherty KT, Herlyn M, Nathanson KL. **2008**. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther.* **7**, 2876-83.

Stanganelli I, Ascierto P, Bono R, De Giorgi V, Pimpinelli N, Chiarion-Sileni V, Palmieri G, Pizzichetta MA, Testori A. **2013**. Diagnostic services for melanoma in Italy *Dermatology.* 226 Suppl 1,3-6.

Takayama S, Xie Z, Reed JC. **1999**. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem.* **274**, 781-786.

Tarhini AA, Iqbal F. **2010**. CTLA-4 blockade: therapeutic potential in cancer treatments. *Onco Targets Ther.* **3**, 15-25.

Trunzer K, Pavlick AC, Schuchter L, Gonzalez R, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Kim KB, Weber JS, Hersey P, Long GV, Lawrence D, Ott PA, Amaravadi RK, Lewis KD, Puzanov I, Lo RS, Koehler A, Kockx M, Spleiss O, Schell-

Steven A, Gilbert HN, Cockey L, Bollag G, Lee RJ, Joe AK, Sosman JA, Ribas A. **2013** Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* **31**, 1767-74.

Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, Bremer R, Gillette S, Kong J, Haass NK, Sproesser K, Li L, Smalley KS, Fong D, Zhu YL, Marimuthu A, Nguyen H, Lam B, Liu J, Cheung I, Rice J, Suzuki Y, Luu C, Settachatgul C, Shellooe R, Cantwell J, Kim SH, Schlessinger J, Zhang KY, West BL, Powell B, Habets G, Zhang C, Ibrahim PN, Hirth P, Artis DR, Herlyn M, Bollag G. **2008**. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* **105**, 3041–3046.

Udayakumar D, Tsao H. **2009**. Melanoma genetics: an update on risk associated genes. *Hematol Oncol Clin N Am.* **23**, 415–429.

van Akkooi AC1, Bouwhuis MG, van Geel AN, Hoedemaker R, Verhoef C, Grunhagen DJ, Schmitz PI, Eggermont AM, de Wilt JH. **2007**. Morbidity and prognosis after therapeutic lymph node dissections for malignant melanoma. *Eur J Surg Oncol.* **33**, 102-8.

van der Rhee JI, Boonk SE, Putter H, Cannegieter SC, Flinterman LE, Hes FJ, de Snoo FA, Mooi WJ, Gruis NA, Vasen HF, Kukutsch NA, Bergman W. **2013**. Surveillance of second degree relatives from melanoma families with a CDKN2A germline mutation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **22**,1771-7.

Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC. **2009**. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature.* **457**, 599-602.

Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, Wubbenhorst B, Xu X, Gimotty PA, Kee D, Santiago-Walker AE, Letrero R, D'Andrea K, Pushparajan A, Hayden JE, Brown KD, Laquerre S, McArthur GA, Sosman JA, Nathanson KL, Herlyn M. **2010**. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell.* **18**, 683-95.

Voit CA1, van Akkooi AC, Eggermont AM, Schäfer-Hesterberg G, Kron M, Ulrich J, Sterry W, Schoengen A, Rademaker J. **2011**. Fine needle aspiration cytology of palpable and non palpable lymph nodes to detect metastatic melanoma. *Journal of the National Cancer Institute.* **103**, 1771–1777.

Wellbrock C, Rana S, Paterson H. **2008**. Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLOS ONE.* **3**, e2734.

Yoon-Jin L, Dae-Hyun K, Sang-Han L, Dong-Wook K, Hae-Seon N, Moon Kyun C. **2011**. Expression of the c-Met proteins in malignant skin cancers. *Ann Dermatol.* **23**, 33-8.

Young P, Anderton E, Paschos K, White R, Allday MJ, **2008**. Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA) 3A induces the expression of and interacts with a subset of chaperones and co-chaperones. *J Gen Virol*. **89**,866–77

Zabierowski SE, Herlyn M. **2008**. Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma. *J Clin Oncol*. **26**, 2890-4.