

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"**  
**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMORFOLOGICHE E FUNZIONALI**



**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA**  
**in**  
**MORFOLOGIA CLINICA E PATOLOGICA**  
**2005-2008 (XXI ciclo)**

Responsabile Prof. Stefania Montagnani

Tesi sperimentale

**Rapporto fra compartimento staminale e regolazione epigenetica della  
compattazione cromatinica ed aggressività biologica del melanoma maligno  
cutaneo**

**RELATORE**

**Ch.mo Prof. S. Staibano**

**CANDIDATO**

**Dott. M. Mascolo**

## Indice

1.	Epidemiologia e fattori di rischio	pag.	3-8
2.	Aspetti biologici e genetici	pag.	9-15
3.	Materiale e metodi	pag.	16-20
4.	Risultati	pag.	21-25
5.	Discussione	pag.	26-40
6.	Bibliografia	pag.	41-47
	Tabelle	pag.	48-51
	Iconografia	pag.	52-56

## **1. Epidemiologia e fattori di rischio**

Sebbene l'incidenza dei tumori (comparsa di nuovi casi), negli ultimi venti anni, abbia mostrato una lieve tendenza alla deflessione, rallentando il trend di crescita dei decenni precedenti e tendendo ad una stabilizzazione, il numero di neoplasie maligne diagnosticate ogni anno e, soprattutto, il numero di decessi per neoplasia rimane ancora troppo elevato.

Negli Stati Uniti, l'American Cancer Society ha previsto per il 2008 circa 1.437.180 nuovi casi e 565.650 morti per tumore, con una riduzione complessiva dei decessi tra il 2004 ed il 1990 per gli uomini del 18,4% e per le donne del 10,5%.<sup>[1,2]</sup>

In Italia vengono diagnosticati circa 300.000 nuovi tumori ogni anno, 162.756 tra gli uomini e 129.247 tra le donne, con un miglioramento complessivo della sopravvivenza di 7 punti percentuali negli uomini (dal 32% al 39%) e di 6 punti nelle donne (dal 50% al 56%).<sup>[3]</sup>

L'incidenza dei tumori maligni cutanei ha registrato, negli ultimi 20 anni, un lieve ma progressivo incremento. Questo trend è particolarmente marcato nella popolazione di origine caucasica del Nord Europa ed australiana.<sup>[1,4,5]</sup> Il melanoma maligno cutaneo (CMM) pur rappresentando il 5% di questi tumori, è responsabile del 71% di tutte le morti per neoplasia maligna cutanea.

Ogni anno vengono registrati circa 100.000 nuovi casi di CMM, di cui circa 62.480 negli Stati Uniti (con un tasso d'incremento annuo pari a circa il 3%).<sup>[1,2,4-9]</sup>

In Italia, nel periodo 1998-2002 il CMM ha rappresentato l'1,6% di tutti i tumori diagnosticati fra gli uomini ed il 2,1% fra quelli diagnosticati nelle donne; in termini di mortalità ha rappresentato l'0,9% del totale dei decessi neoplastici negli uomini e l'1% nelle donne.<sup>[3,10,11]</sup> Nella popolazione generale italiana il rischio cumulativo di ammalarsi di CMM nell'arco della vita (da 0 a 74 anni) non è trascurabile, dal momento che è pari a 1:120 per gli uomini e 1:123 per le donne (Tabella 1).<sup>[3]</sup>

Tabella 1(Dati di incidenza e mortalità AIRT 1998-2002).<sup>[3]</sup>

	Males <i>Maschi</i>	Females <i>Femmine</i>
	One case every X subjects <i>Ogni quanti soggetti si svilupperà un caso</i>	
All sites <i>Tutte le sedi</i>	3	4
Breast <i>Mammella</i>		11
Skin non melanoma <i>Cute non melanomi</i>	15	25
Lung <i>Polmone</i>	15	71
Prostate <i>Prostata</i>	16	
Colorectal <i>Colon-retto</i>	20	32
Urinary Bladder <i>Vescica</i>	24	140
VADS <i>VADS</i>	44	274
Stomach <i>Stomaco</i>	46	101
Liver <i>Fegato</i>	59	199
Corpus uteri <i>Corpo utero</i>		68
Non Hodgkin's lymphoma <i>Linfomi non Hodgkin</i>	69	94
Ovary <i>Ovaio</i>		97
Kidney <i>Rene</i>	62	148
Leukaemia <i>Leucemie</i>	101	163
Pancreas <i>Pancreas</i>	102	158
Melanoma <i>Melanoma</i>	120	123
Multiple myeloma <i>Mieloma multiplo</i>	191	274
CNS <i>SNC</i>	139	188
Oesophagus <i>Esofago</i>	211	1,178
Thyroid <i>Tiroide</i>	272	93
Testis <i>Testicolo</i>	273	
Gallbladder <i>Colecisti</i>	299	277
Hodgkin's lymphoma <i>Linfoma di Hodgkin</i>	374	447
Mesothelioma <i>Mesotelioma</i>	460	1,592
Soft tissue <i>Tessuti Molli</i>	498	634
Kaposi's sarcoma <i>Sarcoma di Kaposi</i>	933	3,621
Bone <i>Ossso</i>	1,100	1,370

VADS = Upper respiratory and digestive organs. CNS = Central nervous system

Il CMM è un tumore importante anche nelle classi di età più giovani; costituisce, infatti, la 4° neoplasia per incidenza nei giovani (7.2% nei maschi e 6.9% nelle donne fra 0 e 44 anni; tabella 2).<sup>[3]</sup>

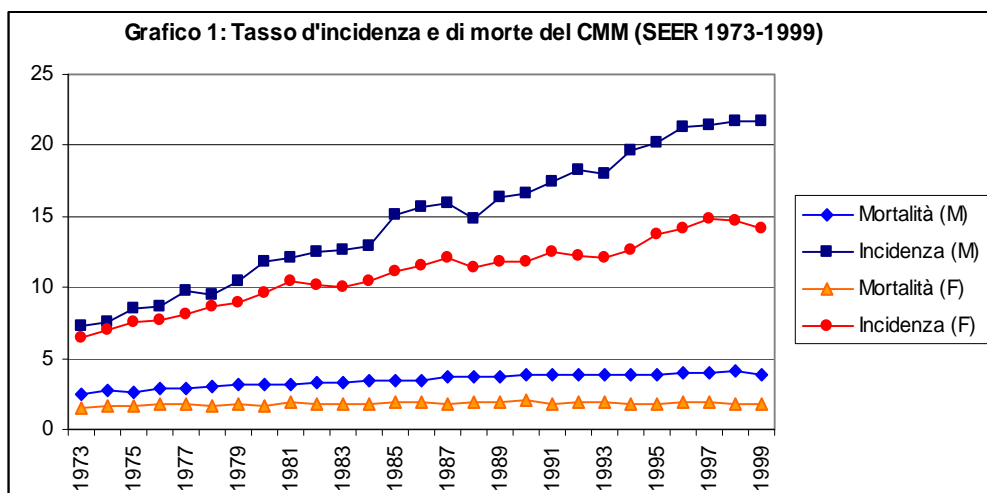
Tabella 2 (Dati di incidenza e mortalità AIRT 1998-2002; Tabella 2).<sup>[3]</sup>

I TUMORI IN ITALIA - RAPPORTO 2006						
	Males Maschi			Females Femmine		
	Age Età			Age Età		
	0-44	45-64	65+	0-44	45-64	65+
1°	Skin, non melanoma Cute, non melanoma (13.3%)	Skin, non melanoma Cute, non melanoma (15.0%)	Prostate Prostata (17.3%)	Breast Mammella (30.7%)	Breast Mammella (35.9%)	Breast Mammella (18.7%)
2°	Testis Testicolo (11.6%)	Lung Polmone (14.5%)	Skin, non melanoma Cute, non melanoma (15.5%)	Skin, non melanoma Cute, non melanoma (11.6%)	Skin, non melanoma Cute, non melanoma (11.8%)	Skin, non melanoma Cute, non melanoma (16.7%)
3°	NH-lymphoma Linfoma non Hodgkin (9.2%)	Prostate Prostata (9.8%)	Lung Polmone (14.9%)	Thyroid Tiroide (10.5%)	Colon Colon (6.5%)	Colon Colon (9.9%)
4°	Skin, melanoma Cute, melanoma (7.2%)	Urinary Bladder Vescica (9.0%)	Urinary Bladder Vescica (9.4%)	Skin, melanoma Cute, Melanoma (6.9%)	Corpus uteri Corpo utero (5.6%)	Stomach Stomaco (5.9%)
5°	Hodgkin's lymphoma Linfoma di Hodgkin (5.8%)	Colon Colon (7.3%)	Colon Colon (8.1%)	NH-lymphoma Linfoma non Hodgkin (4.0%)	Lung Polmone (4.1%)	Lung Polmone (5.2%)

Nonostante una approfondita conoscenza dei fattori di rischio esogeni (esposizione intermittente agli UV, ustioni solari) <sup>[12-14]</sup> ed endogeni (elevato numero di nevi, fototipo chiaro, presenza di nevi displastici) <sup>[9,15,16]</sup> e l'attivazione di campagne di prevenzione nella maggior parte dei paesi occidentali, con particolare diffusione in U.S.A. ed in Australia, in assoluto l'incidenza del CMM nella popolazione bianca dei paesi occidentali industrializzati continua ad aumentare ad un ritmo superiore a quella di qualsiasi altro tumore.

La “World Health Organization” (W.H.O.) prevede che nel 2008 verranno registrati circa 132.000 nuovi casi di CMM. L’affinamento delle tecniche diagnostiche, in gran parte dovuto alla standardizzazione dell’interpretazione dei quadri dermoscopic in epiluminescenza (ELM), ha portato all’identificazione delle lesioni melanocitiche a rischio in fase sempre più precoce di sviluppo, rispetto ai dieci anni precedenti; tuttavia, il tasso di mortalità per CMM non ha mostrato una significativa tendenza al decremento (grafico 1) <sup>[17]</sup>, confermando che la nota, estrema aggressività biologica della maggior parte di questi tumori, può essere già presente nelle fasi iniziali del loro sviluppo.

Questo è il motivo per cui la comunità scientifica continua ad insistere nella ricerca di nuovi marcatori biomolecolari, in grado di decifrare correttamente il grado di aggressività biologica dei singoli casi di CMM.





## **2 Aspetti biologici e genetici del melanoma cutaneo**

La valutazione prognostica del CMM è basata attualmente su criteri istologici (spessore della lesione secondo Breslow, livello di invasione sec. Clark; presenza di ulcerazione ed indice mitotico). Questi parametri non sono in grado di dare indicazioni valide in tutti i casi: fra i CMM sottili (< 1 mm di spessore: sopravvivenza a 5 anni del 96% dei casi) esiste un sottogruppo di lesioni che può dare metastasi precocemente ed, al contrario, CMM spessi (> 2mm) possono rimanere localizzati per molti anni.<sup>[18]</sup>

Studi di genomica e di proteomica hanno dimostrato nei CMM la presenza di alterazioni genetiche e/o di alterata espressione di diversi oncogeni e geni soppressori tumorali.<sup>[19,20]</sup>

Alterazioni molecolari pressoché costanti in questi tumori riguardano diversi geni direttamente coinvolti nel controllo della normale progressione del ciclo cellulare e della riparazione dei danni del DNA.<sup>[21-23]</sup>

Studi recenti hanno approfondito il ruolo svolto da alcune proteine chinasi (Ras, Raf, MEK ed ERK) nella cancerogenesi progressiva del melanoma maligno.

Il fatto che questa via biochimica sia determinante per il controllo positivo della crescita cellulare dei melanociti è testimoniato dall'evidenza che nel 90% dei melanomi si osserva una iperattivazione della proteina ERK; iperattivazione, potenzialmente in grado di determinare un'iperfunzionamento dell'intera via biochimica e, di conseguenza, una iperproliferazione cellulare.

Infatti, il gene che codifica per la proteina Ras è alterato nel 15% dei melanomi, ed uno dei geni che codificano per la proteina Raf (BRAF) è mutato nel 50-70% dei melanomi. In particolare, BRAF è in grado di determinare uno stimolo persistente di ERK, con conseguente iperproliferazione cellulare, ed uno stimolo autocrino alla produzione del VEGF (vascular-endothelial-growth-factor), un fattore di crescita che stimola la produzione di nuovi vasi sanguigni (neo-angiogenesi), un processo che facilita l'abbandono della sede

tumorale da parte delle cellule trasformate che, guadagnando il circolo sanguigno, determinano lo sviluppo di metastasi a distanza.

Ad oggi, il melanoma maligno rimane una delle cause principali di morte per tumore nei paesi occidentali in virtù anche della sua dimostrata farmaco-resistenza alle terapie in uso.

Nel corso degli ultimi anni, l'avvento di nuove tecnologie sperimentali (*gene-expression profiling*) e studi di proteomica, hanno permesso di conoscere ed approfondire aspetti diversi della biologia del melanoma maligno.

In aggiunta è stato possibile identificare ed isolare cellule staminali tumorali di melanoma e suggerirne un eventuale ruolo nel contesto del comportamento biologico del CMM <sup>[24-33]</sup>, allo scopo, in un prossimo futuro, di utilizzarle come bersaglio per terapie “target”.

La teoria della cellula staminale tumorale propone che tutte le neoplasie maligne siano costituite sia da cellule staminali tumorali, che hanno potenziale proliferativo elevato con capacità di *self-renewing*, e da cellule tumorali differenziate che costituiscono la gran parte della massa neoplastica, con minimo potenziale

proliferativo. L'esistenza della cellula staminale tumorale è stata dimostrata in molte neoplasie differenti, quali la leucemia mieloide acuta, il carcinoma della mammella ed il glioblastoma.<sup>[34-37]</sup>

È oramai certo che le metastasi originano dalle cellule staminali tumorali.

Ad oggi i markers di staminalità maggiormente descritti per le neoplasie in genere ed in particolar modo per il melanoma sono: la molecola di adesione cellulare dei leucociti attivati ALCAM/CD166, espressa dalle cellule staminali mesenchimali e riscontrata in linee cellulari umane di melanoma, che sembra correlare con lo spessore del melanoma nelle lesioni primitive, CD133, una glicoproteina transmembrana che è espressa nelle cellule staminali emopoietiche, nei progenitori endoteliali, nelle cellule staminali capaci di differenziare nelle cellule neurali la nestina, un filamento intermedio presente nel citoplasma di cellule staminali neuroepiteliali, espressa anche nelle metastasi da melanoma ed ABCG 2, un trasportatore di membrana inducente farmaco-resistenza.<sup>[25,28,32]</sup>

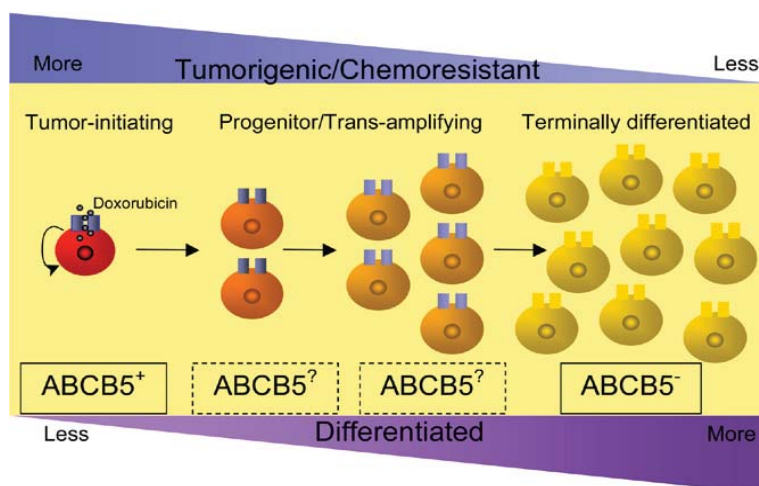
Diversi studi hanno sottolineato che la farmacoresistenza nel melanoma ed in particolar modo nelle metastasi da melanoma è in parte dovuta all'incapacità dei farmaci in uso di colpire selettivamente le cellule tumorali con capacità metastatizzante.

L'identificazione nel melanoma maligni primitivi e nelle metastasi da melanoma di un subset di cellule tumorali farmaco-resistenti e coesprimenti antigeni di staminalità (CD133-ABCB5) <sup>[24, 26, 32]</sup>, ha creato un nuovo impulso nella ricerca sperimentale degli ultimi cinque anni nel campo di tali neoplasie. La possibilità di isolare cellule staminali tumorali, con capacità “*self-renewing*”, nel tentativo di identificare nuove strategie terapeutiche “target”, è un obiettivo di così grande interesse da non poterlo tralasciare.

In questo ambito, Shatton et al., in uno studio del 2008, ha dimostrato che ABCB5, un mediatore di chemioresistenza, era espresso unicamente in cellule staminali tumorali (CD133+) di melanoma, mentre cellule differenziate (CD133-) non esprimevano tale mediatore (figura 1).<sup>[25]</sup> Tali cellule *MMIC* (malignant

melanoma initiating cells), se inoculate in topi, erano in grado di formare tumore.

Figura 1: Espressione di ABCB5 in cellule staminali di melanoma



Ref.: Zabierowski SE, Meenhard H. Learning the ABCs of Melanoma-Initiating Cells. *Cancer Cell* 2008; 13:185-18

Recentemente abbiamo mostrato che l'overespressione di PARP-1 (poli[ADP-ribosio] polimerasi), coinvolta nella regolazione della progressione del ciclo e, contemporaneamente, nella riparazione dei danni del DNA, appare significativamente correlata a melanomi caratterizzati da più elevata aggressività.<sup>[38]</sup>

Ci proponiamo in questo studio di valutare l'espressione di una subunità proteica (p60) del complesso CAF-1 (Fattore di Aggregazione Cromatinica-1) che recenti studi indicano come uno

dei più efficienti regolatori del normale processo di replicazione cellulare e del DNA-repair ad esso connesso.<sup>[39-41]</sup> Lo scopo dello studio è quello di approfondire la valutazione del coinvolgimento delle alterazioni dei pathway responsabili del DNA-repair nel CMM, il loro rapporto con l'ampliamento del compartimento proliferativo cellulare e, soprattutto, l'eventuale ruolo prognostico. Ulteriore scopo del progetto è, infine, quello di valutare l'esistenza di validi presupposti teorici per la proposizione di CAF/p60 come possibile target di terapia molecolare in pazienti con CMM.

Intendiamo, inoltre, identificare nella stessa serie di pazienti, la presenza (mediante valutazione immunohistochimica con anticorpi anti-CD133, CD166 e nestina) di cellule staminali tumorali, allo scopo di verificare se esistano le basi per utilizzare tali marcatori per una corretta valutazione del comportamento biologico del CMM.

### **3. Materiali e metodi**

#### **Selezione dei pazienti**

La popolazione studio è stata selezionata fra tutti i casi di melanoma maligno cutaneo primitivo escissi presso il Dipartimento di Chirurgia Plastica o il Dipartimento di Dermatologia, Unità di Precancerosi dell'Università Federico II di Napoli, nell'intervallo di tempo compreso fra Gennaio 1985 e Dicembre 1998. Tutti i casi di CMM selezionati erano insorti su aree fotoesposte. I pazienti non presentavano anamnesi familiare di cancro, né storia di esposizione a fattori predisponenti noti fisici o chimici. Requisito fondamentale per l'inclusione nello studio è stata la disponibilità di un follow-up non inferiore a 3 anni.

Sono stati inoltre inclusi nello studio 5 campioni bioptici di cute normale, relativi a pazienti che avevano subito procedure chirurgiche ricostruttive per patologie non neoplastiche e 15 casi di nevi melanocitici (5 giunzionali, 5 intradermici, 5 composti), al fine



di consentire la costruzione di una scala di valutazione semiquantitativa di espressione di p60 rispetto ai melanociti normali e neoplastici non maligni.

Per ogni caso un'inclusione paraffinata rappresentativa della neoplasia è stata selezionata dagli archivi del Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali dell'Università "Federico II" di Napoli, sezione di Anatomia Patologica e Citopatologia, ed utilizzata per ottenere sezioni seriate. Una delle sezioni è stata colorata con ematossilina/eosina per confermare la diagnosi iniziale, le altre sono state utilizzate per l'indagine immunoistochimica.

La valutazione dello spessore del melanoma è stata effettuata secondo i criteri del nuovo sistema di stadiazione AJCC, American Joint Committee on Cancer, 2001 ( $\leq 1.00$  mm; 1.01-2.00 mm; 2.01-4.00 mm;  $> 4.01$  mm).<sup>[42,43]</sup>

## **Immunoistochimica**

Per ogni campione sezioni di quattro micron sono state trattate con metodica immunoistochimica standard, dopo sparaffinatura in xilene e reidratazione mediante scala degli alcoli fino all'acqua distillata deionizzata, in breve l'attività della perossidasi endogena è stata inibita con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% per 30 minuti. Successivamente le sezioni sono state trattate con siero bovino diluito all'1% in PBS per 30 min. allo scopo di minimizzare le reazioni aspecifiche. A questo punto è stata effettuata l'incubazione per 1 ora a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi primari: anti-CD133, anti-CD166, anti-nestina ed anti-CAF-1/p60. In seguito è stata applicata la metodica convenzionale biotina-streptavidina (DAKO labeled streptavidin-biotin-complex/ horse-radish peroxidase; Carpenteria, CA). L'avvenuta reazione è stata evidenziata con diaminobenzidina allo 0.03% (3-3'-Diaminobenzidine tetrachloride; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Dopo un debole contrasto nucleare con ematossilina, le sezioni sono state poi montate con un mezzo sintetico (Entellan; Merck, Darmstadt, Germany).

Per ogni seduta di colorazione, per ciascuno degli anticorpi utilizzati, sono stati effettuati controlli positivi e negativi, utilizzando per CAF-1/p60 sezioni di carcinoma infiltrante della mammella rispettivamente incubate con tutti gli anticorpi utilizzati e con siero aspecifico.<sup>[39]</sup>

Per CAF-1/p60 è stato considerato positivo solo un definito segnale nucleare marrone; per CD 133, CD 166 e nestina un definito segnale citoplasmatico.

L'immunopositività è stata valutata come percentuale di cellule immunoreattive sul totale di cellule neoplastiche presenti in 10 campi rappresentativi a forte ingrandimento.

L'indice di positività per CAF-1/p60 è stato espresso semiquantitativamente secondo il seguente score: 0 (<5% di cellule positive); + (5%-<15%); ++ (15%-<30%); +++ ( $\geq$ 30%); quello per CD 133, CD 166 e nestina secondo il seguente score: - (<15% di cellule positive); + ( $\geq$  15% di cellule positive).

**Analisi statistica**

Come tempo libero da malattia è stato considerato il tempo tra la data dell'escissione del melanoma primitivo e quella della prima metastasi linfonodale, recidiva o metastasi a distanza. La valutazione della significatività statistica di ognuno dei parametri immunostochimici considerati nello studio rispetto ai dati clinicopatologici per ogni paziente e per categorie uniformi di lesioni è stata effettuata test chi quadro, test di Kaplan-Meier, "log rank test" ed analisi univariata.

Come valore di cut-off di significatività è stato considerato  $P < 0.05$ . E' stato utilizzato il software S-Plus 2000 (MathSoft Inc. United Kingdom).

## **4. Risultati**

### **Parametri clinico-patologici**

La popolazione-studio (tabella 3) è risultata costituita da 80 pazienti (43 di sesso maschile e 37 di sesso femminile), con età media pari a 44.5 anni (range 18-71 anni). Il follow-up medio è risultato pari a 108 mesi (range: 36-144 mesi). In ogni caso le lesioni erano state escisse con ampio margine di tessuto indenne. Lo spessore del melanoma è risultato  $\leq 1$  mm in 14 pazienti (17,5%); compreso fra 1.01 e 2.00 mm in 38 pazienti (47,5%) e compreso tra 2.02 e 4.00 mm in 28 pazienti (35%). In nessun caso la lesione misurava  $> 4$  mm di spessore.

Degli 80 pazienti, 15 hanno sviluppato malattia metastatica (7 metastasi ai linfonodi loco regionali, 1 metastasi cutanea, in 1 caso metastasi ai linfonodi loco-regionali e cutanea ed in 6 pazienti metastasi ai linfonodi loco-regionali ed a distanza.

Come previsto, l'intervallo libero da malattia correlava con lo spessore della lesione sec. Breslow: fra i pazienti con malattia metastatica, in 9 casi lo spessore della lesione era compreso tra 2,01 e 4.00, in 5 tra 1.01 e 2.00 e solamente in 1 paziente lo spessore era < 1mm sec. Breslow. Quindi nel sottogruppo 2.01-4.0 la percentuale di recidive era del 32,1% (9 pazienti su 28), nel sottogruppo 1.01-2.0 era del 13,1% (5 pazienti su 38) e nel sottogruppo < 1.0 mm del 7% (1 paziente su 14).

#### **Immunopositività per CAF-1/p60, CD 133, CD 166 e nestina nei melanociti normali**

Nei 5 campioni di cute normale, i melanociti giunzionali hanno mostrato focale, isolata positività per p60 (range compreso fra 1:7 e 1:20) e negatività per CD 133, CD 166 e nestina.

#### **Immunopositività per CAF-1/p60, CD 133, CD 166 e nestina nei nevi melanocitici**

I nevi melanocitici hanno mostrato positività per p60 compresa fra il 5% ed 10%(+), con valori più elevati nella componente nevica giunzionale e dermica superficiale. Pressoché assente l'espressione di p60 nella quota di melanociti dermici profondi.

Assente il segnale per CD133, isolato e focale quello per CD166 e nestina.

### **Immunopositività per CAF-1/p60, CD 133, CD 166 e nestina nei melanomi maligni**

Tutti i casi di CMM valutati hanno mostrato evidente overespressione di p60, sia nella fase di crescita radiale che verticale (range: 50-90%, +++), più evidente nei CMM di spessore maggiore (figura 2), ma osservabile anche in casi di spessore compreso intermedio (figura 3) ed in melanomi sottili (figura 4). In particolare, livelli di p60 pari a +++ sono stati evidenziati in 3 casi nella componente radiale e in 15 casi nella fase di crescita verticale; livelli di p60 pari a ++ sono stati riscontrati in 13 casi nella fase radiale di crescita ed in 19 casi in quella verticale, livelli di p60 pari

a + sono stati riscontrati in 64 casi nella fase radiale ed in 46 casi in quella verticale.

Il CD 133 è risultato espresso in 27 casi, di cui 3 in melanomi con spessore  $\leq 1$ mm sec. Breslow, 11 in melanomi compresi tra 1 e 2 mm e 13 in melanomi  $> 2$  mm (figure 5-6). Il CD166 è risultato positivo in 29 casi, di cui 4 in melanomi  $\leq 1$ mm, 11 in melanomi compresi tra 1 e 2 mm e 14 in melanomi  $> 2$  mm. La nestina è risultata positiva in 30 casi, 4 in melanomi  $< 1$ mm, 13 in melanomi compresi tra 1 e 2 mm e 13 in melanomi  $> 2$  mm.

L'analisi statistica dei risultati non ha evidenziato differenze significative di espressione di p60 fra la fase radiale e la fase verticale dei singoli casi di CMM ( $p < 0.05$ ). Estremamente significativa è risultata invece la differenza di espressione di p60 fra CMM senza progressione di malattia e con recidiva/metastasi/morte per malattia in corso di follow-up ( $p < 0.01$ ). Nessuna significatività è emersa dal raffronto fra l'espressione di p60, età e sesso dei pazienti ( $p > 0.05$ ).



Non significativo ( $p > 0.05$ ) il rapporto fra espressione di CD133, CD166, nestina e comportamento biologico dei CMM.

## **Discussione**

L'approfondita conoscenza del processo di carcinogenesi è il presupposto indispensabile per la formulazione e la messa a punto di strategie ottimali di prevenzione e cura del cancro.

L'esplosione dei dati molecolari registrata negli ultimi 20 anni ha consentito indubbiamente una soddisfacente visione "generale" del processo di trasformazione cellulare, chiarendo molti degli aspetti molecolari dei pathways di regolazione della proliferazione e della morte cellulare programmata (apoptosi).

Ci troviamo attualmente in una fase critica di questo processo di comprensione. Del tutto recentemente, alcuni gruppi di ricerca europei ed americani hanno avanzato l'ipotesi che debba essere necessario riconsiderare criticamente la classica teoria multistep della carcinogenesi (iniziazione-promozione-progressione-invasione-metastasi). Ad esempio, sono emerse evidenze che ci costringono a modificare il concetto di iniziatazione. Quest'ultima,

infatti, non è necessariamente caratterizzata dall'immortalizzazione di una cellula in origine differenziata e mortale: in diversi casi, l'iniziazione può essere la conseguenza della prevenzione della entrata in ciclo e differenziazione di una cellula staminale, "naturalmente" immortale.<sup>[37]</sup>

Questo implica ovviamente la necessità di considerare gli effetti di ciò anche sulle tappe successive della cancerogenesi, che necessiteranno quindi di ulteriore valutazione critica alla luce dei crescenti dati molecolari emergenti e, di sicuro, potrà contribuire, almeno in parte, alla comprensione della reinterpretazione della teoria della metastatizzazione, cui stiamo attualmente assistendo.

Negli ultimi anni, infatti, i dati di patologia sperimentale hanno dimostrato che il dogma classico della progressione step-by-step da cellula trasformata a cellula tumorale in grado di invadere e metastatizzare è, almeno in parte, errato. È altamente probabile che, nella maggior parte dei tumori umani, esista un clone di cellule neoplastiche in possesso del fenotipo metastatico già nelle fasi iniziali della crescita tumorale. La latenza con la quale tali cellule

daranno segno di sé con la formazione di metastasi a distanza clinicamente evidenti è intimamente correlata al concetto della “tumor dormancy”, variabile da tumore a tumore e da paziente a paziente e, in qualche modo, spiegabile anche con la probabile derivazione di una parte dei tumori dalle cellule staminali.

Allo stato attuale, resta comunque invariato il concetto che non esistono due neoplasie maligne di eguale istotipo che presentino un identico genotipo, pur condividendo alcune caratteristiche importanti del loro fenotipo. Queste differenze sono responsabili del diverso comportamento biologico di neoplasie identiche dal punto di vista morfologico e di uguale stadio. Rimane quindi attuale e fondamentale la necessità di individuare, per ogni tipo di tumore e per ogni singolo caso di neoplasia, quel set di alterazioni geno/fenotipiche (*tumor fingerprint*) in grado di definire il potenziale di aggressività biologica della neoplasia, in termini di propensione all’aggressività locale (invasività) e, in particolar modo, di capacità metastatizzante.

Il nostro studio non ha evidenziato alcun rapporto fra la presenza di cellule staminali tumorali ed il comportamento biologico dei CMM. Tuttavia, la possibilità di meglio chiarire il ruolo delle cellule staminali nel determinare l'aggressività dei singoli casi di CMM al fine di stabilire il loro potenziale ruolo di marcatori prognostici nei CMM è un obiettivo troppo importante da poterlo tralasciare.

Sono, quindi, necessari studi aggiuntivi allo scopo di approfondire i pattern molecolari di tumorigenesi, i meccanismi di progressione tumorale e di chemioresistenza nelle cellule staminali tumorali di CMM.

Questo dato negativo potrebbe essere in parte dovuto alla casistica limitata di CMM esaminati. Per tale motivo, ci proponiamo di stendere lo studio ad una casistica allargata, pluri-istituzionale, di CMM.

Molto più incoraggianti sono stati invece i risultati concernenti la regolazione epigenetica dello stato di aggregazione cromatinica mediato da CAF-1/p60, anche alla luce delle attuali conoscenze in tal senso.

Negli ultimi dieci anni si sono accumulate sufficienti evidenze (sperimentali e non) indicanti che, nella fase di progressione tumorale, le cellule neoplastiche hanno raggiunto uno stato di instabilità genomica tale da favorire il sequenziale accumulo di ulteriori alterazioni genetiche ed epigenetiche in grado di indurre il fenotipo invasivo-metastatico.<sup>[44]</sup>

Decine di modificazioni epigenetiche consentono di norma la corretta regolazione dell'espressione genica. L'acetilazione istonica e la metilazione del DNA sono quelle meglio caratterizzate.<sup>[45]</sup>

Le modificazioni post-sintetiche del DNA e delle proteine della cromatina rivestono estrema importanza in quanto, interferendo con la struttura della cromatina, ne determinano il suo rimodellamento, regolando l'accessibilità alle informazioni presenti sul DNA. Le alterazioni epigenetiche coinvolgenti il rimodellamento del DNA sono fondamentali per la patogenesi ed evoluzione di diverse patologie umane, in primo luogo delle sindromi mielodisplastiche e dell'eventuale evoluzione in leucemia di alcune di esse. Oltre al gene p15INK4A, (codificante per proteine che regolano

negativamente il ciclo cellulare mediante l'inibizione delle chinasi ciclino-dipendenti 4 e 6), nell'induzione delle mielodisplasie e nella genesi di diverse neoplasie solide umane, fra cui tumori dell'ovaio e della mammella, sono state riscontrate modificazioni epigenetiche di geni coinvolti nella riparazione del DNA, fra i quali MGMT e BRCA-1.

Questo dato ci ha spinto ad indagare l'esistenza di ulteriori alterazioni dei pathway di riparazione del DNA. E' noto infatti che esistono numerosi sistemi di controllo cellulare (Checkpoint Machinery=CPM) che hanno il compito fondamentale di individuare e riconoscere la presenza di danni al DNA, garantendo il mantenimento dell'integrità del genoma e la corretta progressione del ciclo cellulare.<sup>[46]</sup> I diversi CPM rispondono al danno del DNA in maniera univoca, bloccando cioè la progressione del ciclo cellulare per il tempo necessario alla riparazione. Questa strategia permette la replicazione e la segregazione di cromosomi altrimenti danneggiati, potenziale causa di instabilità genomica.<sup>[46,47]</sup> In ogni caso, l'identificazione e la riparazione dei danni al DNA si

svolgono all'interno del nucleo, nel cosiddetto "ambiente cromatinico", costituito da unità di base di DNA spiralizzato intorno ad ottametri istonici (nucleosomi) <sup>[46,48,49]</sup> associati a proteine cromatiniche non istoniche ed a proteine leganti gli istoni.<sup>[48]</sup>

La regolazione della spiralizzazione della cromatina serve non solo a compattare il DNA all'interno del nucleo, ma partecipa attivamente alla replicazione cellulare, alla riparazione del DNA ed alla regolazione dell'espressione genica.<sup>[49]</sup>

Il Fattore 1 di Aggregazione Cromatinica (CAF-1), istone chaperone da noi indagato in questo studio, svolge un ruolo altamente specializzato, sia durante la replicazione che durante la riparazione del DNA, mediando il primo step della compattazione cromatinica attraverso l'assemblaggio dei nucleosomi, legando gli istoni H3 ed H4 al DNA neosintetizzato.<sup>[46,48,49]</sup>

CAF-1, durante la fase S, è localizzato presso i siti intranucleari di replicazione e la sua forma attiva è presente anche in fase G1/G2; solo in mitosi, si dissocia dalla cromatina e diviene inattivo.<sup>[39,50]</sup>



Questa ripartizione intracellulare di CAF-1 è osservabile per ognuna delle tre subunità proteiche da cui è costituito.<sup>[39,43]</sup>

Mentre la p48 (RbAp48) è prevalentemente coinvolta nella regolazione negativa della crescita cellulare mediante stretta collaborazione con la proteina Rb<sup>[48]</sup>, le altre due subunità di CAF-1 svolgono invece azione regolatrice nei processi di di replicazione e riparazione del DNA. La p150 sembra maggiormente attiva nei processi di riparazione, mentre la p60 è più specificamente connessa al controllo della replicazione cellulare. Del tutto recentemente, p60 è stata proposta come nuovo marker di proliferazione cellulare, con un grado di sensibilità maggiore rispetto ai marcatori tradizionali.<sup>[39,51]</sup>

CAF-1 è davvero peculiare nella sua azione di assemblaggio, poiché assembla solo DNA che è andato incontro a replicazione. Ciò è dovuto al fatto che la sua attività richiede necessariamente l'interazione con l'Antigene Nucleare di Proliferazione Cellulare (PCNA), che, come è noto, specificamente marca il DNA di nuova sintesi<sup>[52,53]</sup> ed è a sua volta coinvolto nei processi di replicazione,

excision repair, ricombinazione, riparazione dei single strands breaks (SSB) e coesione di cromatidi fratelli.<sup>[53]</sup>

Per l'assemblaggio cromatinico mediato da CAF-1 è necessaria la colocalizzazione di CAF-1 e PCNA presso i siti di replicazione.

Il richiamo contemporaneo di PCNA e CAF-1 presso i siti danneggiati del DNA dipende dal numero delle lesioni ed è un processo energia-dipendente; l'interazione tra le due molecole provvede al coordinamento di una serie di segnali prodotti durante il danno.<sup>[53,54]</sup>

Un primo segnale porterebbe al reclutamento di p150 al di fuori della fase S e sarebbe strettamente connesso alla riparazione del danno cellulare. La subunità p60, come precedentemente accennato, sarebbe invece più specificamente coinvolta nella replicazione cellulare.<sup>[39,53]</sup>

I dati emersi dal presente studio hanno evidenziato per l'espressione di p60 una linea di tendenza coerente con i dati esistenti in letteratura. Nei nostri casi, l'espressione di p60 è risultata, infatti, particolarmente elevata nelle neoplasie caratterizzate da maggiore

indice mitotico e prevalente fase di crescita verticale. Ciò è comprensibile, in considerazione del ruolo di p60 nel complesso CAF-1. Quest'ultimo contribuisce al mantenimento della struttura cromosomica prima e dopo la formazione della forcina di replicazione e sembra essere coinvolto nella transitoria destabilizzazione dei nucleosomi richiesta per il passaggio della forcina di replicazione. CAF-1/p60 in particolare è in grado di interferire inoltre indirettamente con la replicazione, alterando la morfologia tridimensionale del DNA mediante l'introduzione di supereliche negative di DNA da parte dei nucleosomi, contribuiscono allo svolgimento del DNA; per questo il disgregamento dei nucleosomi è importante nella progressione della forcina di replicazione. Mentre CAF-1/p60 è down-regolata nelle cellule quiescenti, essa è overespressa in cellule neoplastiche.<sup>[39]</sup>

L'analisi semiquantitativa di espressione ha evidenziato, nei nostri casi che p60 è in grado di discriminare fra CMM con e senza recidiva e/o metastasi alla fine del follow-up, suggerendo un suo ruolo di rilievo nella valutazione prognostica dei CMM.

I nostri risultati indicano che esistono i presupposti per suggerire l'analisi dell'espressione di CAF-1/p60 nella valutazione prospettica del comportamento biologico dei CMM.

CMM con elevata espressione di p60, infatti, costituirebbero un sottogruppo di tumori ad elevata aggressività biologica, a parità dei principali parametri clinico-patologici, rispetto al gruppo di neoplasie con bassi valori di p60.

Questi risultati appaiono peraltro pienamente in linea con quelli da noi riportati di recente sulla perdita di funzione della poli-ADP-ribosilazione in un sottogruppo ad alto rischio di pazienti con CMM<sup>[38]</sup>, ciò confermano quindi l'esistenza di una severa compromissione di almeno due dei sistemi di controllo epigenetici dei pathways responsabili del "DNA-repair" in questi pazienti, associata ad una spinta proliferativa almeno in parte dovuta all'alterazione dei meccanismi di regolazione della condensazione e di despiralizzazione della cromatina. Ciò apre nuovi spiragli alla possibilità di previsione prognostica ed eventuale nuova impostazione terapeutica per un sottogruppo a rischio

particolarmente elevato di pazienti con CMM. Questa prospettiva è estremamente confortante, se si pensa che, nonostante l'indiscutibile avanzamento delle capacità di diagnosi precoce dei CMM, negli ultimi 15 anni non si è registrato alcun decremento significativo della mortalità globale per questa neoplasia. Ciò supporta l'idea che esistano melanomi con capacità di aggressività biologica elevatissima già nelle fasi iniziali di crescita verticale.

A tutt'oggi, la capacità evolutiva del CMM e la probabilità di risposta alla terapia dei singoli pazienti sono prevedibili con un livello di approssimazione ancora troppo elevato in base ai classici parametri isto-patologici, come lo spessore della lesione, il livello di invasione, la presenza di ulcerazione e l'indice mitotico: CMM sottili possono dare metastasi e, al contrario, melanomi spessi possono non dare origine a localizzazioni secondarie per un decennio.

Come precedentemente sottolineato, la patogenesi molecolare di questa neoplasia rimane in gran parte non spiegata: in particolare, le alterazioni genetiche responsabili della progressione del melanoma

sono poco chiare, così come la eterogeneità del suo decorso clinico. La identificazione di piccoli sottogruppi di geni e proteine espressi in casi selezionati di melanomi è un importante obiettivo, in particolare per quanto riguarda l'associazione tra geni, proteine e fenotipo della lesione. Sono state identificate molte molecole che giocano un ruolo importante nelle capacità di progressione e di metastatizzazione dei melanomi. Un aumentato numero di cellule positive per Ki67 (evidenziato con Mib1 su sezioni paraffinate), per Ciclina A, ciclina D, p35, MMP-2, integrine beta1 e beta2, è considerato un fattore prognostico negativo, così come la ridotta espressione da parte delle cellule neoplastiche di p16, p27, Melan A ed nm23. Tuttavia, soltanto un piccolo gruppo di queste proteine sembra poter rivestire importanza prognostica indipendente dallo spessore della lesione.

La nostra ipotesi è che esista una sottoclasse ad elevata aggressività di CMM, con severa compromissione dei meccanismi biomolecolari responsabili del DNA-repair. La popolazione cellulare di questi melanomi sarebbe quindi caratterizzata dal vorticoso accumulo di

danni sequenziali al materiale genetico, con esponenziale incremento dell'instabilità genomica ed una conseguente selezione di cloni ad elevata aggressività.

Inibitori selettivi di CAF-p60, modulando differenti bersagli specifici, potrebbero essere in grado di determinare un recupero del programma apoptotico ed un blocco della proliferazione cellulare in pazienti con CMM, inibendo lo stabilirsi di metastasi linfonodali e/o a distanza o rallentando la crescita cellulare di metastasi a distanza già stabilite. Lo screening immunohistochimico del tumore primitivo per espressione di CAF-p60, quindi, potrebbe rappresentare un agevole strumento di più fine valutazione prognostica dei pazienti con CMM primitivo, consentendo l'individuazione di sottoclassi ad alto rischio per malattia metastatica, da sottoporre a più stretto follow-up ed a nuovi protocolli di terapia target.

## 6. Bibliografia

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58:71-96.
2. Cancer facts and figures 2005. Atlanta: American Cancer Society, 2005. Accessed online February 20, 2005, at: [http://www.cancer.org/downloads/STT/estimated\\_new\\_cancer\\_cases\\_and\\_deaths\\_by\\_sex\\_for\\_all\\_sites\\_US\\_2005.pdf](http://www.cancer.org/downloads/STT/estimated_new_cancer_cases_and_deaths_by_sex_for_all_sites_US_2005.pdf).
3. I tumori in Italia - Rapporto 2006. [www.registri-tumori.it/incidenza\\_1998-2002/gruppi.html](http://www.registri-tumori.it/incidenza_1998-2002/gruppi.html)
4. Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br. J. Dermatol.* 2002; 146 (Suppl. 61): 1-6.
5. Boni R, Schuster C, Nehrhoff B, et al. Epidemiology of skin cancer. *Neuroendocrinol Lett.* 2002; 23:48-51
6. Rager EL, Bridgeford EP, Ollila DW. Cutaneous Melanoma: Update on prevention, screening diagnosis, and treatment. *American Family Physician* 2005; 72:269-275.
7. Ries LA, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, et al., eds. SEER cancer statistic review, 1973-1999. Bethesda, Md.: National Cancer institute, 2002. Accessed online November 9, 2004, at: [http://seer.cancer.gov/csr/1973\\_1999/](http://seer.cancer.gov/csr/1973_1999/).
8. Parkin D.M., Pisani P., Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int. J. Cancer.* 1999; 80: 827-841.



9. Armstrong B.K., English D.R. Cutaneous malignant melanoma. In "Cancer Epidemiology and Prevention", D. Schottenfeld, J.F. Fraumeni Jr. (Eds.), Second Edition, Oxford University Press, New York, 1282- 1312, 1996.
10. Balzi D., Bidoli E., Franceschi S., et al. Stima dell'Incidenza e Mortalità per Tumore nelle Regioni Italiane, 1990. Centro di Riferimento Oncologico, Aviano, Italia, 1997
11. ; Zanetti R., Crosignani P., Ross S. Il cancro in Italia. I dati di incidenza dei Registri Tumori, 1988-1992. Volume secondo. Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori. Associazione Italiana di Registri Tumori. Pensiero Scientifico Editore, Torino (1997).
12. IARC. Solar and ultraviolet radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 55. IARC, Lyon, 73-95, 217-28, 1992.
13. Elwood J.M., Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int. J. Cancer.* 1997; 73: 198-203.
14. Gilchrest B.A., Eller M.S., Geller A.C., Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *New Engl. J. Med.* 1999; 340: 1341-1348.
15. Bliss J.M., Ford D., Swerdlow A.J., et al. Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. *Int. J. Cancer.* 1995; 62:367-376, 1995.
16. Tucker M.A., Halpern A., Holly E.A., et al. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA.* 1997; 277: 1439-1444.
17. Welch G, Woloshin S, Schwartz Lm. Skin biopsy rates and incidence of melanoma: population based ecological study. *BMJ.* 2005 Sep 3;331(7515):481. Epub 2005 Aug 4.

18. Von Der Masse H, Osterlind A, Drzewiecki KT et al. Malignant melanoma of the Skin in Denmark-epidemiology, diagnosis and treatment. *Ugeskr Lager.* 1992;154: 1949-1953.
19. Nobori T., Miura K., Wu D.J., et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature.*1994; 368: 753-756.
20. Eggermont AM, Keilholz U, Autier P, Ruiter DJ, Lehmann F, Lienard D. EORTC Melanoma Group. The EORTC melanoma group: a comprehensive melanoma research programme by clinicians and scientist. European Organization for Research and treatment of Cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38: 114-119
21. Renan. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog.* 1993: 139-146.
22. Staibano S, Lo Muzio L, Pannone G, Somma P, Farronato G, Franco R, Bambini F, Serpico R, De Rosa G. P53 and hMSH2 expression in basal cell carcinomas and malignant melanomas from photoexposed areas of head and neck region. *Int J Oncol.* 2001;19:551-9.
23. Lo Muzio L, Nocini P, Mignogna MD, Pannone G, Staibano S, Procaccini M, Rubini C, Fioroni M, Fanali S, Piattelli A. Immunocytochemical detection of hMSH2 and hMLH1 expression in oral melanoma. *Anticancer Res.* 2000;20:741-8
24. Zabierowski SE, Meenhard H. Learning the ABCs of Melanoma-Initiating Cells. *Cancer Cell* 2008; 13:185-18
25. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 2008; 451: 345-349
26. Frank, N. Y. et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 2005; 65, 4320-4333.

27. Frank, N. Y. et al. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.* 2003; 278, 47156–47165.
28. van Kempen, L. C. et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am. J. Pathol.* 2000; 156, 769–774.
29. Klein M, W, Wu BP, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJP, Tahan SR. et al. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod. Pathol.* 2007; 20, 102–107
30. Frank, N. Y. et al. Regulation of myogenic progenitor proliferation in human fetal skeletal muscle by BMP4 and its antagonist Gremlin. *J. Cell Biol.* 2006; 175, 99–110.
31. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle AA, et al.. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 2005; 65, 9328–9337
32. Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, Corsini E, Benetti A, Cavazzin C et al. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *Eur J Cancer* 2007; 43: 935-46
33. Mihic-Probst D, Kuster A, Kilgus S, Bode-Lesniewska B, Ingold-Heppner B, Leung C et al. Consistent expression of the stem cells renewal factor BMI-1 in primary and metastatic melanoma. *Int J Cancer* 2007; 121: 1764-1779.
34. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3983–3988.
35. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730–737.

36. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367:645–648
37. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63:5821–5828.
38. Staibano S, Pepe S, Lo Muzio L, Somma P, Mascolo M, Argenziano G, Scalvenzi M, Salvatore G, Fabrocini G, Molea G, Bianco AR, Carlomagno C, De Rosa G. PARP-1 expression in malignant melanomas from phoyoexposed areas of the head and neck region. *Hum Pathol.* 2005; 36:724-31
39. Polo SE, Yheocharis SE, Klijaieko J, Savignoni A, Asselain B, Almouzni G. CAF-1, a marker of clinical value to distinguish quiescent from proliferative cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 2371-81.
40. Staibano S, Mignogna C, Lo Muzio L, Mascolo M, Salvatore G, Di Benedetto M, Califano L, Rubini C, De Rosa G. Chromatin Assembly Factor-1 (CAF-1)-mediated regulation of cell proliferation repair: a link with the biological behaviour of squamous cell carcinoma of the tongue. *Histopathology.* 2007;50:911-19
41. Staibano S, Mascolo M, Mancini FP, Kisslinger A, Salvatore G, Di Benedetto M, Chieffi P, Altieri V, Prezioso D, Ilardi G, De Rosa G, Tramontano D. Overexpression of Chromathin Assembly Factor-1 (CAF-1) is predictive of adverse behaviour of prostatic cancer. *Histopathology* 2008, in press
42. Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, et al.: Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 3635-3648.
43. Balch CM. Cutaneous Melanoma, in Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al (eds). *AJCC Cancer staging manual.* 6 th ed. New York, NY: Springer Verlag. 2002; 209-217.

44. Trosko JE, Chang CC, Upham BL, Tai MH. Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication. *Ann NY Acad Sci.* 2004; 1028: 192-201.
45. Noma K, Allis CD, Grewall SI. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns as the heterochromatin domain boundaries. *Science.* 2001; 293:1150-5
46. Merheineke K, Krude T. Nucleosome assembly activity and intracellular localization of human CAF-1 change during the cell division cycle. *J Biol Chem.* 1998; 273: 15279-15286.
47. Hoek M, Stillman B. CAF-1 is essential for coupled chromatin assembly and DNA replication in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:12183-88
48. Henikoff S. Versatile assembler. *Nature* 2003; 423: 814-17
49. Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 2004; 116: 51-61.
50. Renan. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog.*1993: 139-146.
51. Taddei A, Roche D, Sibarita JB, Turner BM, Almouzni G. Duplication and maintenance of heterochromatin domains. *J Cell Biol* 1999; 147: 1153-66.
52. Moggs J, Grandi P, Quivy JP, Jonsson ZO, Almouzni G. A CAF-1-PCNA mediated Chromatin Assembly Pathway triggered by sensing DNA damage. *Molecular Cell Biology* 2002; 22:1206-18.
53. Krude C. The kinetochore connection. *Current Biol* 2002; 12: 256-8.
54. Martini E, Roche DM, Merheineke K, Verreault A, Almouzni G. Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 after UV irradiation of Human cells. *J Cell Biol* 1998; 143: 563-75.

**Tabella 3: Dati clinico-patologici popolazione selezionata**

Caso no.	Età (anni)	Sex	Stadiazione AJCC	Follow-up
1	58	F	≤=1.00	12
2	36	M	≤=1.00	12
3	67	M	≤=1.00	12
4	45	F	≤=1.00	12
5	50	F	≤=1.00	11
6	49	F	≤=1.00	11
7	42	M	≤=1.00	10
8	43	F	≤=1.00	9
9	43	M	≤=1.00	9
10	49	M	≤=1.00	7
11	40	M	≤=1.00	7
12	41	M	≤=1.00	7
13	39	M	≤=1.00	6 R
14 *	37	F	≤=1.00	6
15	66	F	1.01 - 2.00	12 N
16	65	F	1.01 - 2.00	12
17	56	M	1.01 - 2.00	12
18	49	M	1.01 - 2.00	12
19	48	M	1.01 - 2.00	12
20	39	F	1.01 - 2.00	12
21	47	F	1.01 - 2.00	12 N,M,D
22	51	M	1.01 - 2.00	11
23	53	M	1.01 - 2.00	11
24	56	M	1.01 - 2.00	11
25	51	F	1.01 - 2.00	10
26	45	F	1.01 - 2.00	10
27	53	M	1.01 - 2.00	10
28	67	M	1.01 - 2.00	10
29	54	M	1.01 - 2.00	10
30	34	M	1.01 - 2.00	9
31	44	F	1.01 - 2.00	9
32	43	F	1.01 - 2.00	9
33	71	F	1.01 - 2.00	9
34	34	M	1.01 - 2.00	9
35	43	F	1.01 - 2.00	9
36	51	F	1.01 - 2.00	9
37	50	M	1.01 - 2.00	9
38	39	F	1.01 - 2.00	9 N
39	29	F	1.01 - 2.00	9
40...	42	M	1.01 - 2.00	7
41	37	F	1.01 - 2.00	7 R,N
42	65	M	1.01 - 2.00	7
43	43	M	1.01 - 2.00	7 N
44	44	F	1.01 - 2.00	6
45	18	F	1.01 - 2.00	4
46	22	M	1.01 - 2.00	4
47	24	M	1.01 - 2.00	4
48	32	M	1.01 - 2.00	4
49	30	F	1.01 - 2.00	4
50	38	F	1.01 - 2.00	4
51	37	M	1.01 - 2.00	3
52	40	M	1.01 - 2.00	3
53	40	M	2.01-4.00	12
54	36	M	2.01-4.00	12
55	39	M	2.01-4.00	11
56	50	F	2.01-4.00	11
57	48	F	2.01-4.00	11
58	45	M	2.01-4.00	11 N,M, D
59	43	F	2.01-4.00	10
60	53	F	2.01-4.00	10
61	47	M	2.01-4.00	10 N
62	54	M	2.01-4.00	10
63	50	M	2.01-4.00	10
64	69	F	2.01-4.00	10
65	54	M	2.01-4.00	10
66	53	M	2.01-4.00	9
67*	42	F	2.01-4.00	9 N,M,D
68*	37	F	2.01-4.00	9 N,M
69*	45	F	2.01-4.00	9
70*	49	F	2.01-4.00	9 N,M,D
71*	32	M	2.01-4.00	7 N
72*	38	F	2.01-4.00	6 N
73*	38	M	2.01-4.00	3
74*	32	M	2.01-4.00	3 N,M
75*	40	M	2.01-4.00	3
76*	46	F	2.01-4.00	3 N
77*	50	M	2.01-4.00	2
78*	24	F	2.01-4.00	2
79*	30	M	2.01-4.00	2
80 *	32	F	2.01-4.00	2

R: recidive; N: metastasi linfonodali; M: metastasi; D: morte per malattia

**Tabella 4: Espressione di CAF-1 p60, CD133, CD166 e nestina in melanomi < 1 mm sec. Breslow**

Case	Age (yrs)	Sex	Staging , AJCC	CAF-1/p60	CD133	CD166	Nestin	Follow-up (yrs)
1	58	F	≤/1.00	++	-	-	+	12
2	36	M	≤/1.00	+	-	-	-	12
3	67	M	≤/1.00	++	-	+	-	12
4	45	F	≤/1.00	+	+	-	-	12
5	50	F	≤/1.00	+	-	-	-	11
6	49	F	≤/1.00	+	-	-	-	11
7	42	M	≤/1.00	+	-	-	-	10
8	43	F	≤/1.00	+	-	-	-	9
9	43	M	≤/1.00	+	-	-	+	9
10	49	M	≤/1.00	+	-	+	-	7
11	40	M	≤/1.00	+	+	+	+	7
12	41	M	≤/1.00	+	-	-	-	7
13	39	M	≤/1.00	+++	+	+	+	6 R
14	37	F	≤/1.00	+	-	-	-	6

45,64 yrs

9,35 yrs

**R:** recidive; **N:** metastasi linfonodali; **M:** metastasi; **D:** morte per malattia.

**Tabella 5: Espressione di CAF-1 p60, CD133, CD166 e nestina in melanomi di spessore compreso tra 1 e 2 mm sec. Breslow**

Case	Age (yrs)	Sex	Staging, AJCC	CAF-1/p60	CD133	CD166	Nestina	Follow-up (yrs)
15	66	F	1.01 – 2.00	+++	-	-	-	12 N
16	65	F	1.01 – 2.00	+	-	-	-	12
17	56	M	1.01 – 2.00	+	-	-	-	12
18	49	M	1.01 – 2.00	+	-	-	-	12
19	48	M	1.01 – 2.00	++	-	-	-	12
20	39	F	1.01 – 2.00	+	-	-	-	12
21	47	F	1.01 – 2.00	+++	+	+	+	12 N,M,D
22	51	M	1.01 – 2.00	++	-	-	-	11
23	53	M	1.01 – 2.00	++	-	-	-	11
24	56	M	1.01 – 2.00	+	-	-	-	11
25	51	F	1.01 – 2.00	++	-	-	-	10
26	45	F	1.01 – 2.00	++	-	-	-	10
27	53	M	1.01 – 2.00	++	-	-	-	10
28	67	M	1.01 – 2.00	+	-	-	-	10
29	54	M	1.01 – 2.00	+	-	-	-	10
30	34	M	1.01 – 2.00	++	-	-	-	9
31	44	F	1.01 – 2.00	++	-	-	-	9
32	43	F	1.01 – 2.00	+	-	-	-	9
33	71	F	1.01 – 2.00	+	-	-	-	9
34	34	M	1.01 – 2.00	+	-	-	+	9
35	43	F	1.01 – 2.00	+	-	-	+	9
36	51	F	1.01 – 2.00	++	+	-	-	9
37	50	M	1.01 – 2.00	+	-	+	-	9
38	39	F	1.01 – 2.00	+++	+	+	+	9 N
39	29	F	1.01 – 2.00	+	+	+	-	9
40	42	M	1.01 – 2.00	++	+	-	-	7
41	37	F	1.01 – 2.00	+++	+	+	+	7 R,N
42	65	M	1.01 – 2.00	+	+	-	+	7
43	43	M	1.01 – 2.00	+++	+	+	+	7 N
44	44	F	1.01 – 2.00	+	-	+	+	6
45	18	F	1.01 – 2.00	++	+	+	+	4
46	22	M	1.01 – 2.00	+	-	+	-	4
47	24	M	1.01 – 2.00	++	-	-	-	4
48	32	M	1.01 – 2.00	+	+	+	+	4
49	30	F	1.01 – 2.00	+	-	-	-	4
50	38	F	1.01 – 2.00	+	-	+	+	4
51	37	M	1.01 – 2.00	+	+	-	+	3
52	40	M	1.01 – 2.00	+	-	+	+	3

45 yrs

7,64 yrs

R: recidive; N: metastasi linfonodali; M: metastasi; D: morte per malattia



**Tabella 6: Espressione di CAF-1 p60, CD133, CD166 e nestina in melanomi di spessore compreso tra 2 e 4 mm sec. Breslow**

Case	Age (yrs)	Sex	Staging, AJCC	CAF-1/p60	CD133	CD166	Nestin	Follow-up (yrs)
53	40	M	2.01-4.00	+	-	-	-	12
54	36	M	2.01-4.00	+	-	-	-	12
55	39	M	2.01-4.00	+	-	-	--	11
56	50	F	2.01-4.00	++	-	-	--	11
57	48	F	2.01-4.00	++	-	-	+	11
58	45	M	2.01-4.00	+++	+	+	+	11 N,M, D
59	43	F	2.01-4.00	+	+	-	-	10
60	53	F	2.01-4.00	++	-	-	+	10
61	47	M	2.01-4.00	+++	+	-	-	10 N
62	54	M	2.01-4.00	+	-	+	-	10
63	50	M	2.01-4.00	++	-	-	+	10
64	69	F	2.01-4.00	+	-	+	-	10
65	54	M	2.01-4.00	+	-	-	+	10
66	53	M	2.01-4.00	+	-	-	-	9
67	42	F	2.01-4.00	+++	+	+	+	9 N,M,D
68	37	F	2.01-4.00	+++	+	+	+	9 N,M
69	45	F	2.01-4.00	+	+	+	-	9
70	49	F	2.01-4.00	+++	+	+	+	9 N,M,D
71	32	M	2.01-4.00	+++	+	+	+	7 N
72	38	F	2.01-4.00	+++	+	+	+	6 N
73	38	M	2.01-4.00	+	-	-	+	3
74	32	M	2.01-4.00	+++	+	+	+	3 N,M
75	40	M	2.01-4.00	+	+	+	-	3
76	46	F	2.01-4.00	+++	+	+	+	3 N
77	50	M	2.01-4.00	+	-	+	-	2
78	24	F	2.01-4.00	++	-	-	-	2
79	30	M	2.01-4.00	+	+	+	-	2
80	32	F	2.01-4.00	+	-	-	-	2

43,42

7,29

R: recidive; N: metastasi linfonodali; M: metastasi; D: morte per malattia

Figura 2

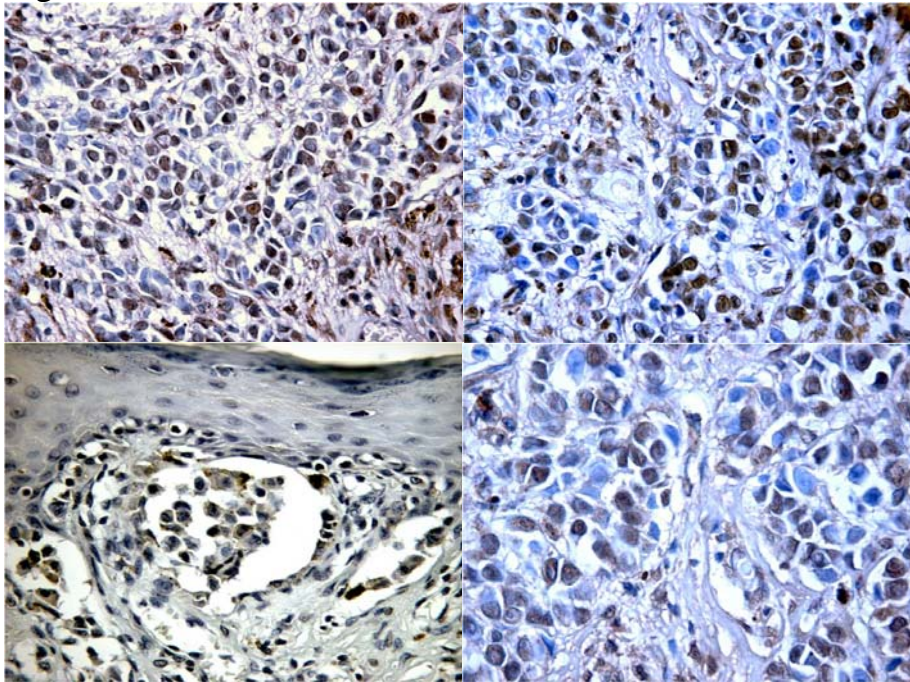


Figura n. 3

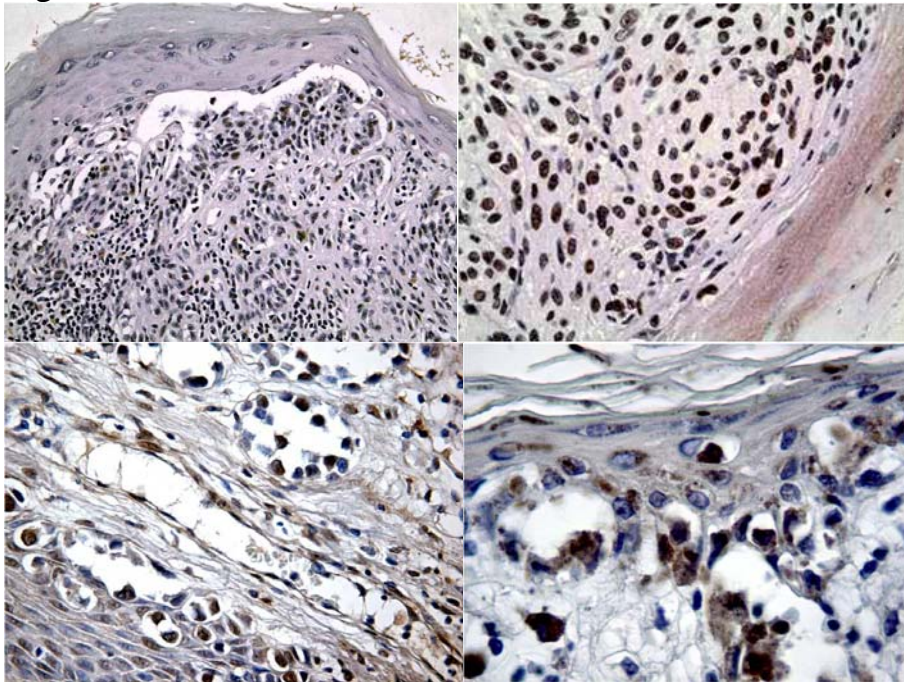


Figura n. 4

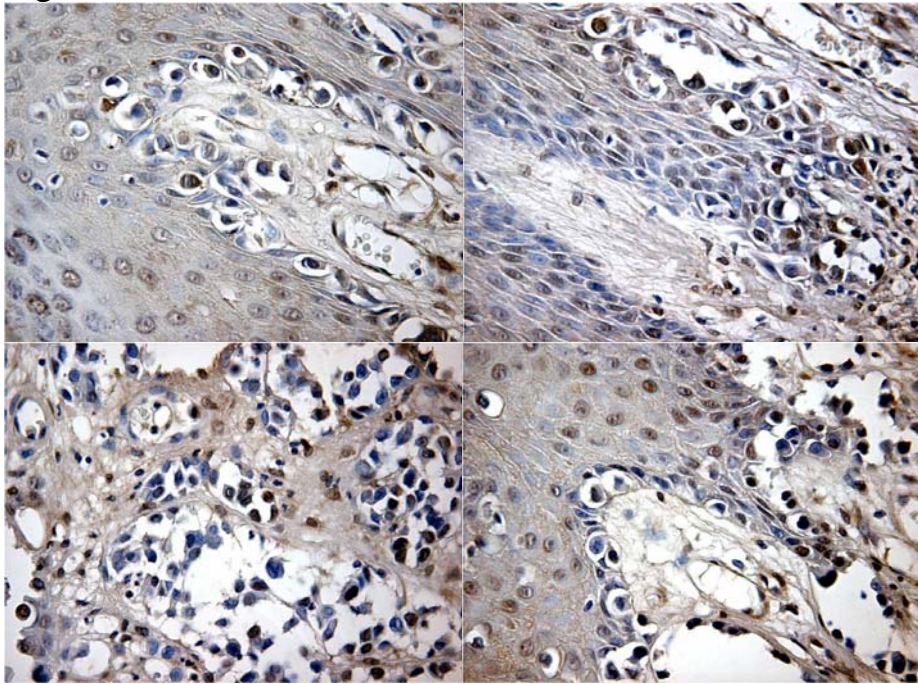




Figura 5

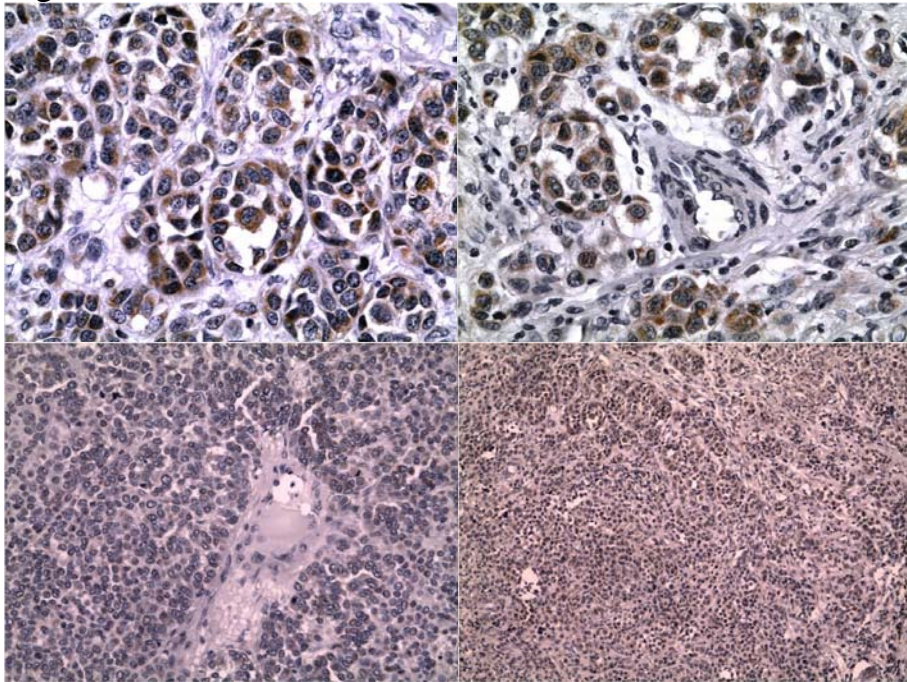


Figura 6

