



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biochimie

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**-BIOMARKERI ÎN MELANOM ȘI MECANISME MOLECULARE ÎN
CELULE TUMORALE REZISTENTE LA VEMURAFENIB-**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
Dr. ȘTEFANA MARIA PETRESCU

DOCTORAND:
IOANA MARIN (MILITARU)

2023

Cuprins

1. SCOPUL TEZEI.....	3
2. INTRODUCERE.....	5
2.1 Melanomul – aspecte generale, cauze, factori de risc și terapie	5
2.2 Procesul de pigmentație.....	6
2.3 Căi de semnalizare în melanom.....	7
2.4 Biomarkeri în melanom	8
2.5 Rezistența la inhibitori ai BRAF kinazei -Vemurafenib	9
3. REZULTATE.....	11
3.1 Biomarkeri pentru diferențierea melanomului amelanotic de cel hiperpigmentat	11
3.1.1 Expresia markerilor de pigmentație în liniile celulare de melanom.....	11
3.1.2 Determinarea capacității de migrare a celulelor de melanom.....	12
3.1.3 Biomarkeri specifici melanomului amelanotic.....	12
3.1.4 Procese celulare semnificativ alterate în liniile celulare amelanotice.....	14
3.1.5 Validarea datelor de proteomică	15
3.2 Mecanisme moleculare în celule tumorale rezistente la vemurafenib	17
3.2.1 Generarea liniilor celulare rezistente	17
3.2.2 Procese celulare în liniile celulare rezistente	19
3.2.3 Dependența de glucoză a celulelor rezistente	20
3.2.4 Rolul proteinei HIF1 α în promovarea rezistenței la vemurafenib	21
4. CONCLUZII.....	22

1. SCOPUL TEZEI

Lucrarea prezentată este structurată pe două părți și abordează două subiecte cu importanță în definirea aspectelor ce contribuie la prognosticul nefavorabil în melanom. Într-o primă parte am încercat să definim un panel de biomarkeri reprezentativ pentru melanomul amelanotic și astfel să facilităm detecția timpurie a acestui subtip de cancer. În ultimii ani a existat un interes crescut pentru definirea aspectelor ce țin de heterogenitatea melanomului. Necesitatea identificării de noi biomarkeri cu specificitate ridicată pentru diferitele subtipuri de melanom este evidențiată prin prognosticul nefavorabil determinat de diagnosticul întârziat în cele mai multe cazuri. Un subtip particular de melanom este reprezentat de cel amelanotic, caracterizat prin absența pigmentației sau o pigmentație foarte slabă a celulelor. Deseori melanomul amelanotic este dificil de diagnosticat, iar întârzierea stabilirii unui diagnostic corect face ca acesta să fie descoperit în stadii avansate. În vederea identificării biomarkerilor specifici ce ar putea ajuta în diagnosticarea precoce a melanomului amelanotic am realizat o analiză proteomică comparativă bazată pe spectrometrie de masă. Analiza a fost condusă pe cinci linii celulare de melanom metastatic ce diferă între ele prin intensitatea pigmentației celulelor. La nivel de proteom am identificat o serie de particularități definitorii pentru liniile celulare amelanotice A375 și SKMEL28, iar o serie de biomarkeri au fost propuși atât în scop diagnostic, cât și în vederea aprecierii capacității de migrare a celulelor canceroase. Specificitatea crescută a setului de biomarkeri propus a permis o mai bună diferențiere a melanomului amelanotic de cel pigmentat, iar analiza proteomică comparativă a evidențiat o serie de procese biologice ce conferă melanomului amelanotic un caracter agresiv. Cu toate acestea nu există un consens legat de prognosticul melanomului amelanotic, iar comparația cu melanomul pigmentat din punct de vedere al agresivității este dezbătută intens. În general, prognosticul clinic slab atribuit melanomului amelanotic a fost pus pe seama formelor avansate în momentul diagnosticării. Rezultatele analizei realizate în această primă parte indică o serie de caracteristici definitorii pentru celule de melanom amelanotic caracterizate printr-o capacitate de migrare crescută. Acest fenotip agresiv al celulelor de melanom nepigmentat poate fi explicat în principal prin biomarkerii identificați, cât și prin prisma proceselor celulare observate ca fiind puternic reglate în aceste celule.

Cea de-a doua parte a lucrării a fost reprezentată de studierea mecanismelor implicate în dezvoltarea rezistenței celulelor de melanom la inhibitori ai BRAF kinazei. În acest scop, au fost generate două linii celulare de melanom rezistente la vemurafenib pentru care a fost realizată într-o primă etapă o caracterizare generală. În plus, au fost evidențiate o serie de procese celulare și proteine ce ar putea juca un rol important în dezvoltarea rezistenței. O primă abordare a fost reprezentată de analiza proteomică comparativă a celulelor rezistente și a celor sensibile la vemurafenib. De asemenea, s-a studiat rolul factorului de transcripție HIF1 α în acest mecanism, iar o serie de procese dinamice ce vizează modelarea matricei extracelulare sau producția de exozomi au fost analizate.

Teza este structurată în 4 capitole principale. În INTRODUCERE sunt detaliate aspecte cu privire la patologia melanomului și mecanismele moleculare implicate în transformarea malignă a celulelor și progresia tumorală. Principalele tehnici de analiză utilizate sunt prezentate în capitolul MATERIALE ȘI METODE, iar rezultatele celor două subiecte abordate sunt prezentate în detaliu în capitolul REZULTATE. Concluziile celor două studii au fost rezumate în ultimul capitol, CONCLUZII, și prezintă cele mai importante observații.

2. INTRODUCERE

2.1 Melanomul – aspecte generale, cauze, factori de risc și terapie

Melanomul reprezintă cel mai agresiv tip de cancer de piele, fiind considerat principala cauza de deces în rândul pacienților diagnosticați cu cancer de piele. În ultimii ani, incidența crescută a acestui tip de cancer a evidențiat complexitatea factorilor cauzatori și nu în ultimul rând heterogenitatea marcantă a acestor tumori. În anul 2018 a fost înregistrată o incidență de aproximativ 3 ori mai mare a cazurilor de melanom nou diagnosticate comparativ cu anul 1975, fiind raportate aproximativ 25 de cazuri de melanom la 100000 de persoane (Saginala et al., 2021). Cu toate acestea, o frecvență relativ mare a cazurilor de melanom este restrânsă la anumite arii geografice, fiind foarte crescută în Australia și Noua Zeelanda (Sneyd and Cox, 2013). Principalul factor de risc în dezvoltarea melanomului este reprezentat de expunerea prelungită la soare, radiațiile UV fiind incriminate în modificările genetice ce favorizează apariția melanomului. Este afectată în principal populația cu piele albă, iar factorii genetici joacă un rol deosebit de important în dezvoltarea leziunilor canceroase. Melanomul este mult mai des întâlnit la persoanele ce prezintă un număr crescut de nevi și un istoric familial de melanom (Saginala et al., 2021). De asemenea, aspectul nevilor poate reprezenta un alt indiciu cu privire la posibilitatea acestor leziuni de a se maligniza (Zalaudek et al., 2009). Punctul de plecare îl constituie melanocitele, celulele producătoare de pigment ce sunt distribuite în principal la nivelul pielii, urechii interne, ochiului și leptomeningelui, iar mutații la nivelul acestor celule determină apariția melanomului (Domingues et al., 2018). Rata de supraviețuire scade semnificativ în momentul în care metastazele asociate tumorii primare sunt confirmate, iar diagnosticul greșit sau întârziat reprezintă principala cauză pentru prognosticul nefavorabil (Grant-Kels et al., 1999; Sandru et al., 2014).

Au fost definite patru tipuri de melanom în funcție de caracteristicile histopatologice: superficial, nodular, lentiginos și lentiginos acral. Cel mai întâlnit tip de melanom este reprezentat de cel superficial, fiind confirmat în aproximativ 70% din cazurile de melanom (Longo et al., 2012), pe locul al doilea situându-se melanomul nodular (Erkurt et al., 2009). Melanomul superficial este caracterizat prin creștere radială în primele etape, în timp ce melanomul nodular

prezintă o creștere verticală. O altă formă de melanom este definită de melanomul lentiginos, reprezentat de celule distribuite la interfața derm-epiderm și anexele pielii. Leziunile asociate acestui tip de melanom sunt de cele mai multe ori determinate de expunerea la radiațiile UV, în timp ce subtipul lentiginos acral este caracteristic extremităților și nu este cauzat de expunerea la soare (Arisi et al., 2018; Bristow et al., 2010; Sundararajan et al., 2023).

Diagnosticul implică identificarea caracteristicilor fenotipice specifice definite de sistemul de clasificare ABCDE (A-asimetrie, B-margini neregulate, C-culoare, D-diametru, E-evoluție), precum și stadializarea tumorii pe baza unor criterii histopatologice: indicele Clark, indicele Breslow și stadializarea TNM (T- extinderea tumorii primare, N-prezența metastazelor asociate nodulilor limfatici, M-prezența sau absența metastazelor distale) (Rotte and Bhandaru, 2016).

2.2 Procesul de pigmentație

Procesul de pigmentație prezintă specificitate pentru melanocite, celule specializate în producția de melanină ce își au originea în celulele crestei neurale. Diferențierea celulelor crestei neurale în melanocite presupune într-o primă etapă formarea celulelor progenitoare bipotente melanoblast-gliale SOX10 pozitive. În continuare aceste celule se diferențiază în melanoblaști ce exprimă factorul de transcripție MITF, DCT și proteina KIT. Aceste celule se caracterizează printr-o capacitate de migrare crescută și o proliferare accelerată. În general celulele care migrează spre regiunea dorsolaterală în cursul embriogenezei se diferențiază în melanocite (Mull et al., 2015). Melanocitele astfel formate prezintă o semnătură specifică, iar markerii specifici pe care îi exprimă sunt reprezentați în principal de tirozinază (TYR), proteinele înrudite tirozinazei (TYRP-1 și TYRP-2), Pmel17, MART-1 și MITF. Procesul de melanogeneză are loc în melanozomi, organite înrudite lizozomilor, unde își au localizarea proteinele esențiale procesului de pigmentație. Procesul de maturare al melanozomilor este dependent de pH-ul intern al acestui compartiment, iar pentru formarea acestora sunt necesare valori cuprinse între 5 și 6,8 (D’Mello et al., 2016; Schallreuter et al., 2008). Biogeneza melanozomilor presupune mai multe etape, 4 stadii fiind descrise în decursul procesului de maturare al acestui compartiment. Primele două stadii se caracterizează prin absența pigmentației și formarea matricei fibrilare, ce va constitui suportul pentru depozitele de melanină în stadiile III și IV (Raposo and Marks, 2007). O dată finalizat

procesul de sinteză al melaninei, melanozomii sunt transferați din zona perinucleară spre periferia celulei printr-un transport reglat de proteinele motorii precum kinesin și dynein. Complexul de proteine reprezentat de melanophilin (MLPH), myosin Va (MYO-5A) și RAB27A facilitează legarea melanozomilor de filamentele de actină, această etapă fiind esențială pentru concentrarea melanozomilor maturi la nivelul terminațiilor dendritice ale melanocitelor (Wu et al., 2006). Transferul melanozomilor către keratinocite este astfel determinat de interacția unui melanocit cu aproximativ 40 keratinocite (Moreiras et al., 2021).

Proteinele cu rol major în biogeneza melanozomilor pot fi clasificate în componente ale matricei fibrilare de tip amiloid (Pmel17) și enzimele implicate în sinteza melaninei. Componentele matricei melanozomilor sunt caracteristice melanozomilor din primele două stadii, în timp ce enzimele melanogenetice sunt specifice melanozomilor maturi (Raposo and Marks, 2007).

2.3 Căi de semnalizare în melanom

Principalele căi de semnalizare din melanom sunt definitorii pentru agresivitatea celulelor canceroase, dar și pentru capacitatea acestora de a sintetiza melanină. Cele mai importante sunt reprezentate de calea de semnalizare a kinazelor activate de mitogeni (MAPK), calea de semnalizare AKT, căile de semnalizare implicate în reglarea ciclului celular și calea de semnalizare a proteinei p53. În plus, procesul de melanogeneză este reglat prin căi de semnalizare ce implică activitatea enzimelor melanogenetice și constituie o particularitate a melanocitelor (Palmieri et al., 2015).

Una dintre cele mai importante căi de semnalizare este reprezentată de cea a kinazelor activate de mitogeni (MAPK). Această cale de semnalizare reglează răspunsul celulelor canceroase în favoarea proliferării și tumorigenezei, dar și în vederea adaptării celulelor la diverși factori de mediu. În celulele mamaliene, au fost descrise trei familii de proteine MAPK: calea de semnalizare clasică mediată de proteinele ERK, calea de semnalizare JNK/SAPK și kinaza p38. Cea mai bine caracterizată cale este cea Raf-MEK-ERK (Zhang and Liu, 2002). Activarea acestei căi de semnalizare este determinată de legarea factorilor de creștere de receptorii tirozin-kinazici (RTK)

și activarea secvențială a proteinelor Ras, Raf, MEK și ERK. Mutații ce vizează proteinecheie precum BRAF, NRAS, KIT și NF1 au drept consecință hiperactivarea căii de semnalizare MAPK. Cea mai frecventă mutație, cea a genei BRAF, prezintă mai multe variante, dintre care substituția valinei cu acidul glutamic în poziția 600 (BRAFFV600E) este cel mai des întâlnită. Alte variante includ BRAFFV600D, BRAFFV600K și BRAFFV600R (Ascierto et al., 2012; Guo et al., 2021). Mutația BRAF este caracteristică melanomului cutanat și constituie un factor de prognostic nefavorabil (Long et al., 2011; Nassar and Tan, 2020). O altă caracteristică a melanomului este reprezentată de proliferarea necontrolată a celulelor, ce este determinată în principal de alterări ale ciclului celular ce implică mutații la nivelul proteinelor cheie. Un exemplu este reprezentat de mutațiile genei CDKN2A, genă ce codifică două proteine, p16Ink4a și p14Arf. O astfel de mutație va altera funcția normală a celor două proteine, iar progresia necontrolată a ciclului celular va reprezenta consecința afectării funcției normale a proteinelor RB1 și p53 (Guo et al., 2021).

2.4 Biomarkeri în melanom

Stabilirea unui diagnostic corect prezintă o importanță deosebită și implică definirea unor criterii de clasificare cu un grad înalt de specificitate. Un prognostic favorabil este deseori asociat cu un diagnostic timpuriu, însă heterogenitatea marcantă a melanomului îngreunează de cele mai multe ori procesul de diagnosticare. Astfel, definirea unui panel de biomarkeri specifici devine imperios necesară pentru diferitele subtipuri de melanom. Diagnosticul histologic presupune într-o primă etapă verificarea expresiei markerilor melanocitari de diferențiere, iar dintre aceștia cei mai importanți sunt reprezentați de tirozinază, Melan-A, HMB-45 și MITF (Jing et al., 2013; King et al., 1999; Orchard, 2000; Weinstein et al., 2014). În ceea ce privește diagnosticul diferențial în melanom, acesta se face în principal cu formațiuni benigne de tipul nevilor displazici, epiteliomului bazocelular, nevil albastru, angiokeratomul, hemangiomul și keratoza actinică pigmentată (Goldstein and Goldstein, 2001). Biomarkerii propuși în acest scop trebuie să prezinte o sensibilități crescut pentru melanom malign, iar câteva exemple sunt reprezentate de proteinele CSPG4, MLANA, BUB1 și CD63 (Lewis et al., 2005; Weinstein et al., 2014). Din necesitatea de a anticipa evoluția melanomului și a selecta terapia potrivită, o serie de biomarkeri cu rol prognostic au fost recomandați, iar printre aceștia se numără proteina Ki-67 (Frahm et al., 2001),

MCAM (Pacifico et al., 2005), S100B (Gogas et al., 2009), MMP-2, MMP-9 (Department of Radiopharmaceutical and Chemical Biology, Institute of Radiopharmaceutical Cancer Research, Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Dresden, Germany et al., 2017), MIA (Stahlecker et al., 2000), PAX3 (Liu et al., 2019) și osteopontin (Rangel et al., 2008). Au fost propuse diferite strategii, iar utilizarea unei combinații de biomarkeri reprezintă o alternativă cu o specificitate și sensibilitate superioară celei bazate pe utilizarea unui singur biomarker în stabilirea diagnosticului sau evaluarea prognosticului (Muinao et al., 2019; Trager et al., 2022).

2.5 Rezistența la inhibitori ai BRAF kinazei -Vemurafenib

Prezența mutației BRAF, frecvent întâlnită în rândul pacienților cu melanom, presupune o abordare terapeutică bazată în principal pe utilizarea de inhibitori specifici ai acestei oncogene. Mutația este întâlnită și în alte tipuri de cancer precum cancerul tiroidian, cancerul colorectal, cancerul pulmonar, cancerul de sân, cancerul hepatic sau cancerul ovarian, dar este absentă în melanomul uveal (Owsley et al., 2021; Rimoldi et al., 2003). Cele mai întâlnite mutații BRAF sunt reprezentate de substituția în poziția 600 a valinei cu acid glutamic (BRAFFV600E) sau lizină (BRAFFV600K) (Lokhandwala et al., 2019).

Terapia țintită prezintă, cel puțin în cazul melanomului, dezavantajul selectării unor populații celulare rezistente, distincte din punct de vedere al mecanismelor adaptative pe care aceste celulele le dezvoltă. O serie de studii demonstrează eficacitatea terapiei anti-BRAF prin reducerea nivelului de fosforilare al proteinei ERK după aproximativ 15 zile de tratament. Acest efect este însoțit de scăderea expresiei proteinei ciclului D1, activarea unor proteine cu rol de inhibitori ai ciclului celular precum proteina p27 și scăderea expresiei markerului de proliferare celulară Ki-67. Diferite ipoteze au fost formulate în contextul rezistenței la vemurafenib, iar existența unor mutații secundare la nivelul oncogenelor NRAS și MEK1 au fost incriminate în reactivarea căii MAPK (Trunzer et al., 2013). În plus, proliferarea susținută a celulelor selectate este dependentă de prezența inhibitorului în mediu, răspunsul putând fi modelat prin ajustarea posologiei (Das Thakur et al., 2013). De asemenea, morfologia celulelor este modificată, fibrele de stres fiind mult mai pronunțate, iar celulele mai alungite (Kim et al., 2016). Heterogenitatea celulelor de melanom este evidențiată și la nivel molecular prin răspunsul diferit pe care aceste

celule îl prezintă în momentul instalării rezistenței, iar cel mai frecvent au fost raportate reactivarea căilor MAPK, respectiv PI3K/AKT (Radić et al., 2022).

3. REZULTATE

3.1 Biomarkeri pentru diferențierea melanomului amelanotic de cel hiperpigmentat

3.1.1 Expresia markerilor de pigmentație în liniile celulare de melanom

În vederea diferențierii liniilor celulare în funcție de pigmentația acestora, analiza proteomică comparativă a fost condusă pe 2 linii celulare amelanotice (A375 și SKMEL28), 2 linii celulare moderat pigmentate (SKMEL23 și Me290) și o linie celulară hiperpigmentată (MNT1) (**Figura 1A**). O primă caracterizare a fost reprezentată de determinarea expresiei markerilor melanocitari de diferențiere (**Figura 1B**). Se poate observa un nivel de expresie crescut al proteinelor TYRP1, PMEL și TYR în linia celulară MNT1, în timp ce liniile celulare SKMEL28, SKMEL23 și Me290 prezintă o expresie crescută a proteinei DCT. Analiza LC-MS/MS a evidențiat în plus o expresie crescută în linia hiperpigmentată a proteinelor RAB38, RAB27A, RAB32 și ABCB6, proteine cu rol în procesul de maturare și transport al melanosomilor (**Figura 1C**).

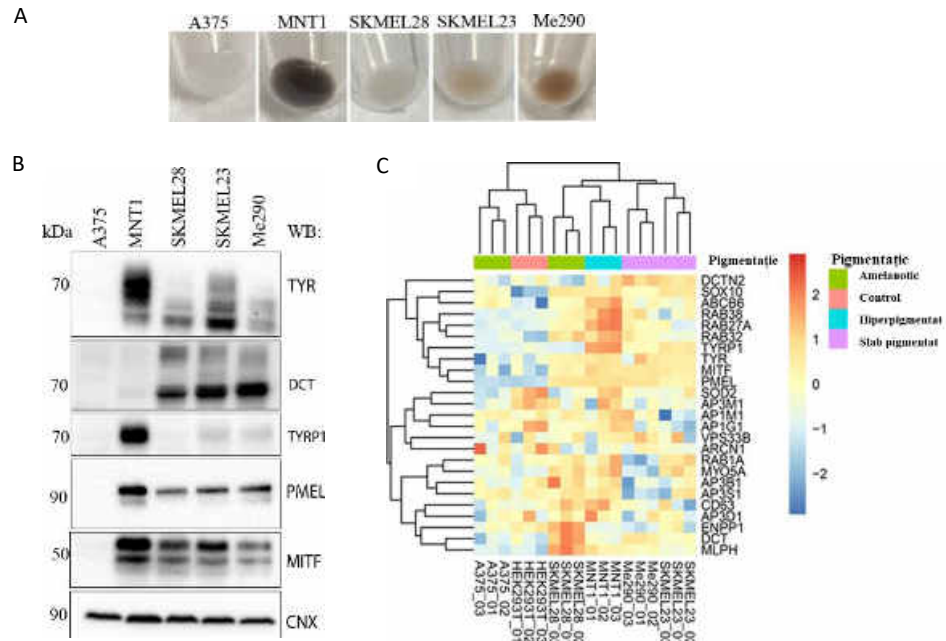


Figura 1. Pigmentația liniilor celulare de melanom și expresia proteinelor cheie implicate în procesul de pigmențație.

(A) Examinarea vizuală a celor 5 linii celulare de melanom din punct de vedere al intensității pigmențației. (B) Determinarea prin Western blot a expresiei proteinelor TYR, DCT, TYRP1, PMEL și MITF. Controlul intern este reprezentat de calnexină (CNX). (C) Reprezentarea heatmap a expresiei proteinelor adnotate pentru procesul de pigmențație (GO:0043473). Valoarea intensității LFQ (scorul z) pentru proteinele identificate a fost utilizată pentru reprezentare.

3.1.2 Determinarea capacității de migrare a celulelor de melanom

Capacitatea de migrare a celulelor a fost evaluată în vederea caracterizării liniilor celulare din punct de vedere al agresivității. O capacitate sporită de migrare a fost observată pentru liniile celulare A375 și SKMEL28 (**Figura 2A-B**). Astfel, se poate concluziona existența unei corelații directe între absența pigmențației și capacitatea de migrare sporită a acestor celule.

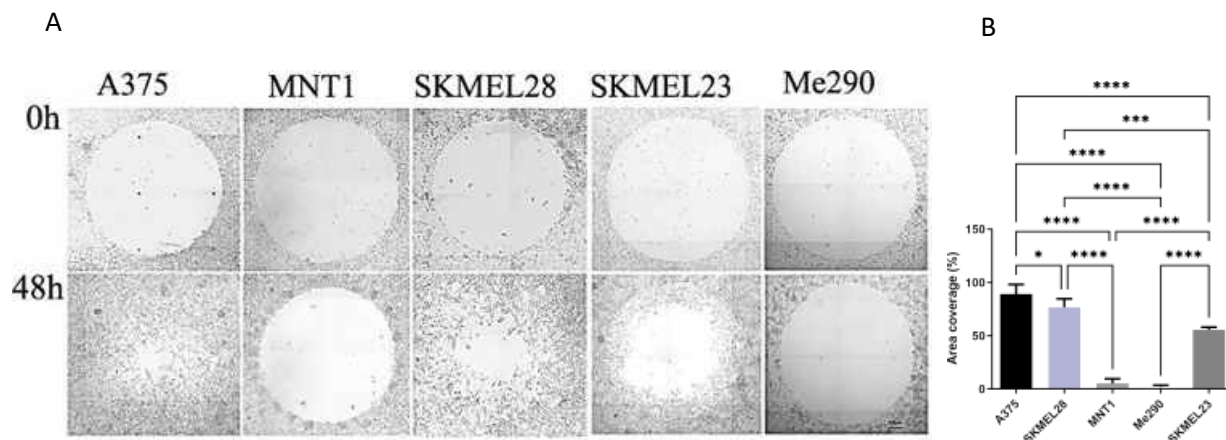


Figura 2. Evaluarea capacității de migrare a celulelor de melanom.

(A) Migrarea celulelor de melanom a fost evaluată prin determinarea suprafeței ocupate de celule la 48h. (B) Analiza statistică a fost condusă prin aplicarea analizei varianței unifactoriale (ANOVA, **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$).

3.1.3 Biomarkeri specifici melanomului amelanotic

O serie de biomarkeri corelați cu pigmenția celulelor au fost identificați prin analiza LC-MS/MS (Figura 3). De asemenea, expresia acestor proteine poate reprezenta un indiciu cu privire la agresivitatea liniilor celulare, iar proteinele identificate pot fi considerate biomarkeri de prognostic slab. Liniile celulare moderat pigmentate au prezentat un profil intermediar, proteinele identificate permițând diferențierea celor trei subtipuri celulare. În plus, cele două linii celulare amelanotice diferă la nivel de proteom prin expresia markerilor melanocitari și îndeosebi prin expresia factorului de transcripție MITF. Astfel, setul comun de proteine a fost determinat prin comparația liniilor celulare A375 și SKMEL28 cu linia celulară MNT1. 42 de proteine comune au fost identificate, iar cele mai importante diferențe au fost observate pentru proteinele AHNAK, PLEC, MYOF, ANXA1, ITGA6, CNN2. Modificări importante au fost observate și pentru proteinele ce intra în alcătuirea citoscheletului, iar studii recente menționează rolul factorului de transcripție MITF în organizarea citoscheletului. Cu toate acestea, ținând cont de profilul “MITF-low” al celulelor A375 și expresia crescută a acestui factor de transcripție în linia celulară SKMEL28, putem concluziona existența unui fenotip caracterizat prin absența pigmenției și existența unor procese biologice puternic reglate în aceste celule, independent de expresia proteinei MITF.

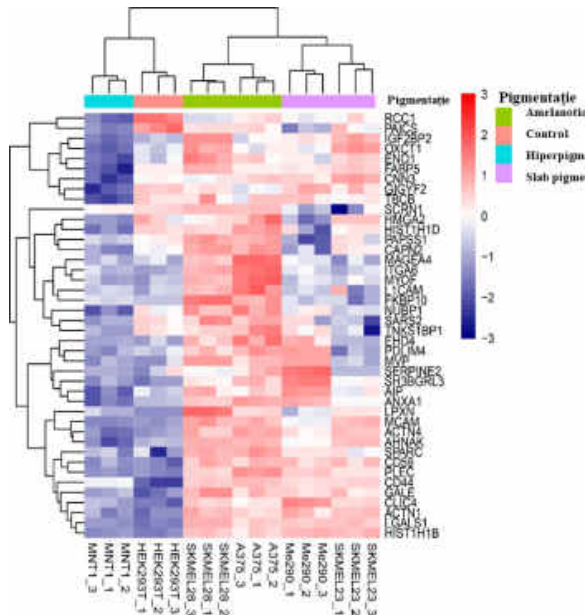


Figura 3. Proteinele semnificativ crescute în liniile celulare amelanotice.

Clusterizarea supervizată a celor 6 linii celulare pe baza proteinelor semnificativ crescute, comune celor două linii celulare de melanom amelanotic (A375 și SKMEL28) față de linia celulară MNT1 (scorul z pentru valorile aferente intensității LFQ).

3.1.4 Procese celulare semnificativ alterate în liniile celulare amelanotice

Cele mai importante diferențe cu privire la procesele celulare puternic reglate în liniile celulare amelanotice au fost reprezentate de procesul de adeziune celulară (**Figura 4A-B**), fiind evidențiată o expresie crescută a proteinelor ce fac parte din complexul de adeziune focală: PLEC, TGM2, PXN.

De asemenea, a fost observată o expresie crescută a proteinelor implicate în procesul de tranziție epitelial-mezenchimală, iar cele mai importante diferențe au fost observate pentru proteinele HMGA2, ROCK2 și RTN4 (**Figura 4C**). În mod similar celor două linii celulare amelanotice, linia celulară SKMEL23 a prezentat un profil intermediar din punct de vedere al expresiei markerilor de tranziție epitelial-mezenchimală, fiind astfel evidențiată capacitatea de migrare sporită a liniei celulare SKMEL23, comparabilă cu cea a A375 și SKMEL28. Analiza bazată pe identificarea proceselor biologice semnificativ reglate în liniile celulare amelanotice a evidențiat procesul de adeziune celulară ca fiind puternic reglat în aceste celule. Astfel, nivelul de expresie al integrinelor a fost determinat, iar o corelație directă a putut fi observată între expresia acestor proteine și absența pigmentației (**Figure 4D**). O serie de integrine au fost determinate prin analiza LC-MS/MS, iar expresia acestora este crescută în liniile celulare A375 și SKMEL28. Astfel, în linia A375 ITGA3, ITGA5, ITGA6, ITGB4 și ITGB5 au prezentat un nivel crescut de expresie, în timp ce proteinele ITGAV și ITGB3 au prezentat specificitate pentru linia celulară SKMEL28.

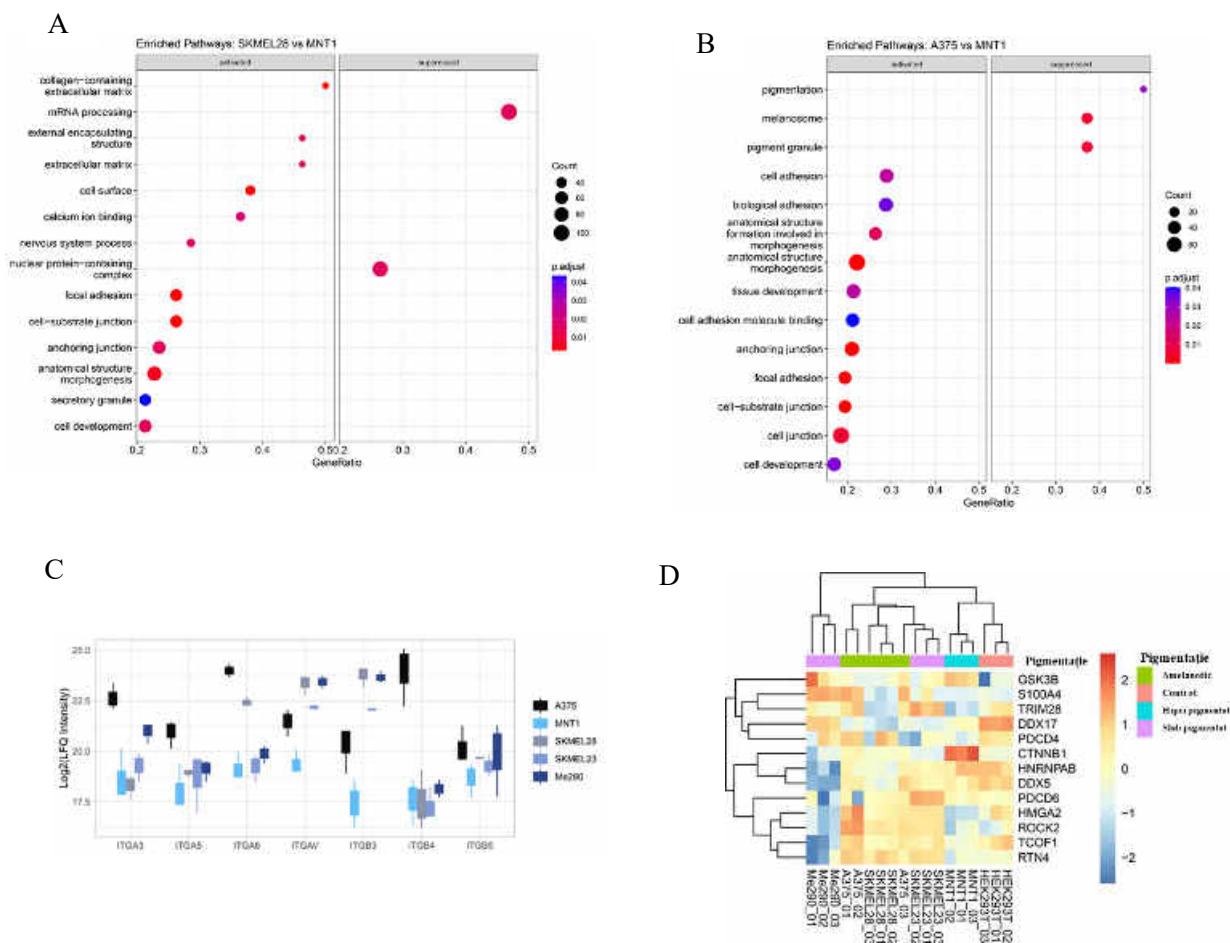


Figura 4. Analiza proceselor biologice în celulele rezistente.

(A-B) Termenii adnotați pentru procese biologice (BP), componentă celulară (CC) și funcții moleculare (MF) au fost considerați pentru analiză (valoarea p ajustat < 0.05 , corecție - metoda Benjamini și Hochberg (BH)). (C) Reprezentarea expresiei $\log_2(\text{intensitatea LFQ})$ pentru ITGA3, ITGA5, ITGA6, ITGAV, ITGB3, ITGB4 și ITGB5 în cele 5 linii celulare de melanom. (D) Reprezentarea heatmap ce prezintă clusterizarea nesupervizată a proteinelor adnotate pentru tranziția epitelial-mezenchimală (EMT).

3.1.5 Validarea datelor de proteomică

Datele de proteomică au fost validate prin utilizarea unor seturi publice de date de proteomică și transcriptomică. Astfel, primul set de date a cuprins date de proteomică cuprinzând 33 linii celulare de melanom, iar clusterizarea ierarhică nesupervizată a inclus pe lângă biomarkerii

propuși, proteinele TYR, TYRP1, MITF, RAB32, MLANA și DCT. O corelație negativă a fost observată între expresia acestor markeri și cea a proteinelor CRIP2, FSCN1, PTRF, PLOD1, ACTN4, ITGA5, ITGA6, CNN3, FN1, THBS1, EPHA2, SCR1, CAPN2, ASPH, PLEC, AHNAK, TGM2, MYOF, TNS3 (**Figura 5A**). În plus, o serie de proteine prezintă specificitate pentru liniile celulare puternic pigmentate, iar acestea sunt reprezentate de PRKD3, ACSL1, NR4A3, CDK2. Cel de-al doilea set de date de proteomică a inclus 10 linii celulare izolate de la pacienți, pentru care pigmentația celulelor este cunoscută (**Figura 5B**). Pentru liniile celulare amelanotice a fost observată o expresie crescută a proteinelor AHNAK, PLEC, ITGA5, ITGA3, ITGA6, ITGAV, MYOF, CD44, ANXA1, CAPN2, CSRP1, PDLI4, EPHA2, CLIC4, MVP, LGALS1, ACTN4, CPNS1, VASP, PTRF, ASPH, FSCN1, THBS1, TGM2, PLOD2, FN1 (FINC), APMAP și ACTN1. De asemenea, linia celulară pigmentată, C037, prezintă o expresie crescută a proteinelor LDHB, ACSL1, CTNNB1, CDK2, DUSP3, UAP1L, FKBP4 și COX41, fiind evidențiată posibilitatea existenței unei semnături specifice melanomului hiperpigmentat.

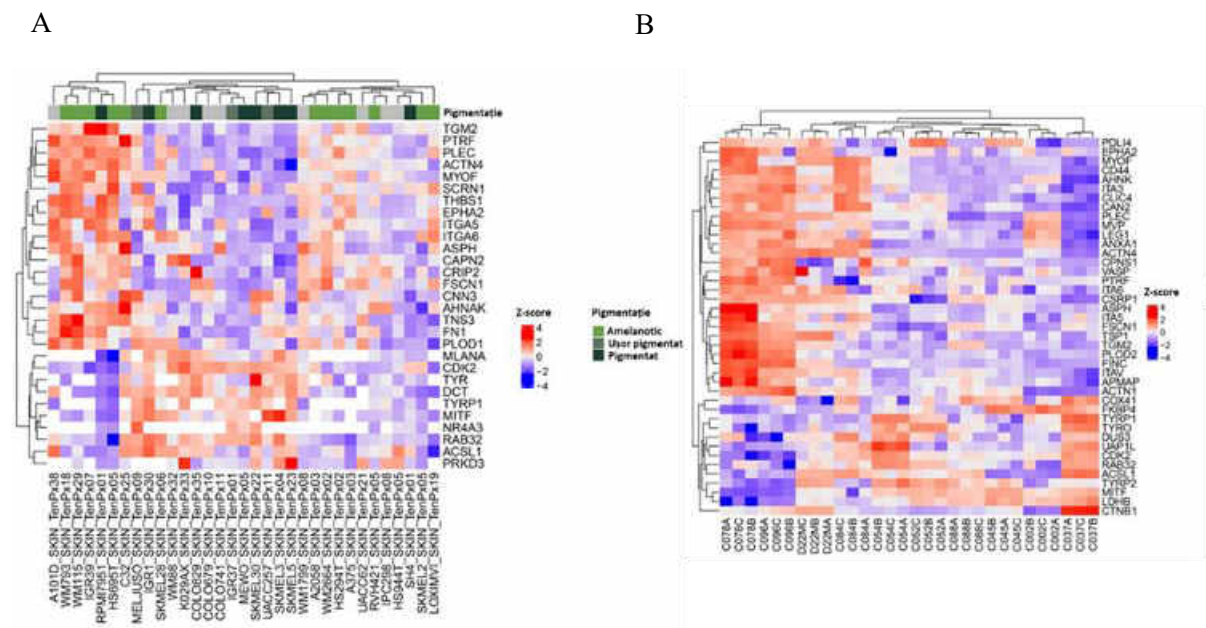


Figura 5. Clusterizarea nesupervizată evidențiază specificitatea semnăturii ce permite diferențierea fenotipului amelanotic de cel pigmentat.

(A) Gruparea în 3 clustere a celor 33 de linii celulare de melanom în funcție de 19 biomarkeri propuși și corelația cu proteinele implicate în procesul de pigmentație. (B) Gruparea celor 10 linii celulare de melanom

pe baza biomarkerilor propuși evidențiază existența a 3 subtipuri celulare caracterizate prin absența pigmentației, celule hiperpigmentate și un profil intermediar.

La nivel transcripțional au fost validați o parte din biomarkerii propuși, iar cele 18 proteine identificate ca fiind specifice melanomului amelanotic sunt reprezentate de ITGA6, ANXA1, MYOF, AHNAK, SPARC, FN1, CNN3, ASPH, CLIC4, TGM2, ITGA5, THBS1, SCRNI1, PDLIM4, PTRF, FSCN1, CRIP2 și EPHA2 (**Figura 6**).

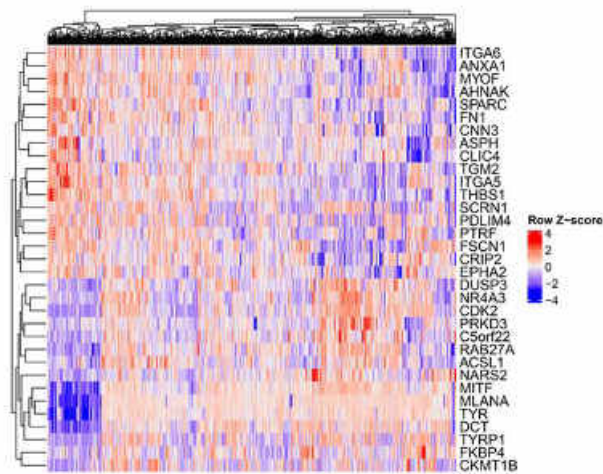


Figura 6. Validarea semnăturii moleculare la nivel de mARN în 442 probe biologice.

Heatmap reprezentând clusterizarea nesupervizată a 442 probe biologice evidențiază specificitatea semnăturii pentru fenotipul amelanotic, respectiv melanotic (RSEM z-score).

3.2 Mecanisme moleculare în celule tumorale rezistente la vemurafenib

3.2.1 Generarea liniilor celulare rezistente

În vederea studierii rezistenței la terapia cu vemurafenib, au fost generate două linii celulare rezistente prin tratarea celulelor de melanom, A375 și SKMEL28, cu doze crescătoare de medicament pentru o perioadă de 4 luni. Rezistența instalată a fost verificată prin determinarea nivelului de fosforilare al proteinei ERK1/2 și a valorii IC50 pentru fiecare linie celulară (**Figura 7A-B**). Heterogenitatea se manifestă și la nivelul mecanismelor celulare răspunzătoare pentru

rezistența la terapie, iar activarea căii de semnalizare mediată de proteina AKT este evidențiată în linia SKMEL28R (**Figura 7C**). În plus, o serie de caracteristici fenotipice au fost evidențiate în celulele rezistente, iar printre acestea se numără pierderea expresiei markerilor melanocitari în linia celulară SKMEL28R (**Figura 7D**).

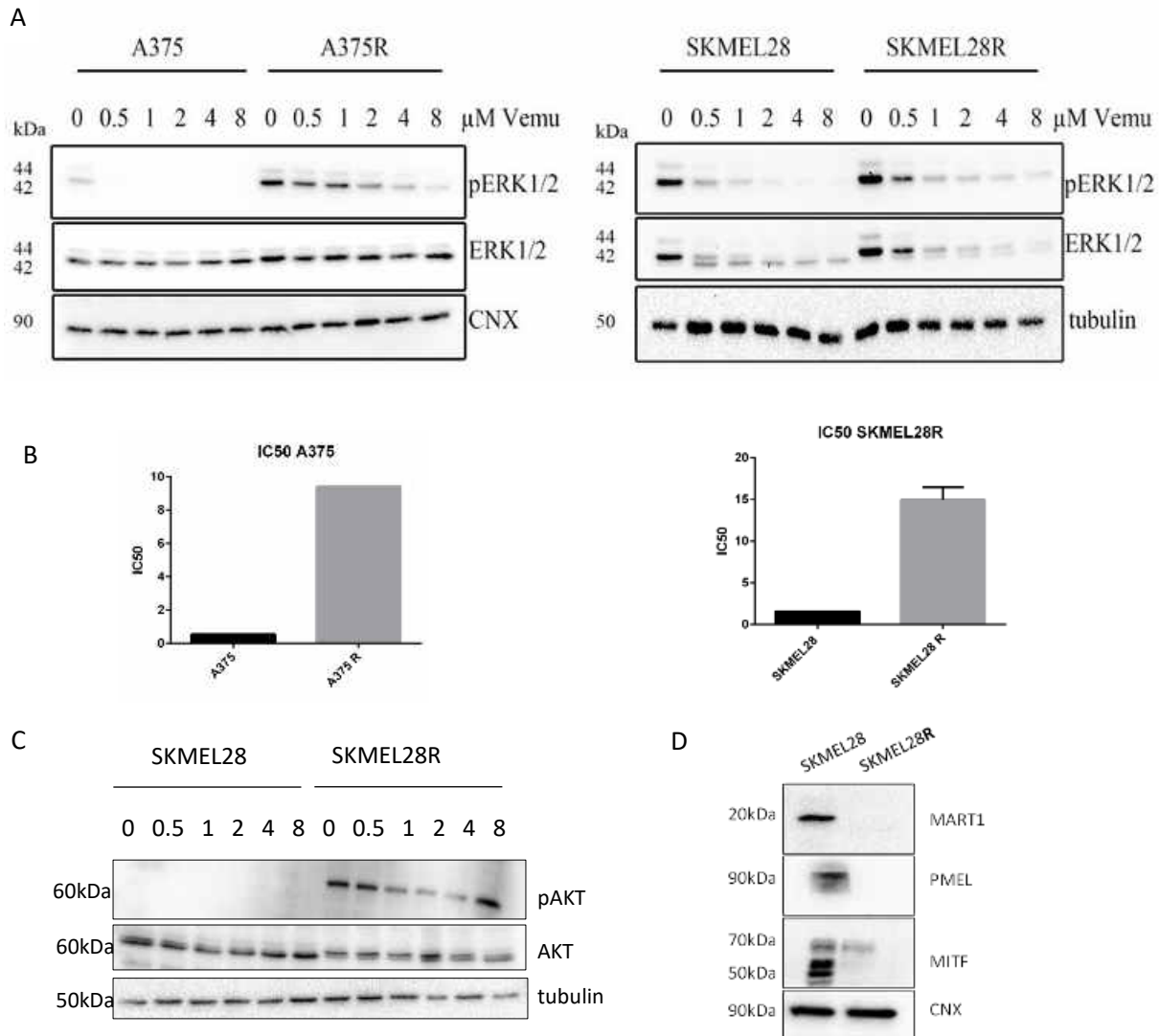


Figura 7. Evaluarea răspunsului celulelor de melanom sensibile și rezistente la vemurafenib.

(A) Celulele au fost recoltate, lizate, iar expresia proteinelor pERK1/2 și ERK a fost determinată prin Western blot. Controlul intern a fost reprezentat de calnexină. (B) Determinarea valorii IC50 pentru liniile celulare A375R și SKMEL28R. (C) Expresia proteinelor pAKT și AKT a fost determinată în liniile celulare SKMEL28 și SKMEL28R. Controlul intern a fost reprezentat de tubulină. (D) Nivelul de expresie al

proteinelor MART1, PMEL, MITF, TYR și DCT a fost determinat prin Western blot. Controlul intern a fost reprezentat de calnexină.

3.2.2 Procese celulare în liniile celulare rezistente

Reorganizarea citoscheletului celulelor rezistente a fost evidențiată prin analiza GSEA în ambele linii celulare rezistente (**Figura 8A**). Acest proces este acompaniată de creșterea expresiei proteinelor implicate în procesul de adeziune celulară. În plus, în linia celulară SKMEL28R atât procesul de pigmentație cât și respirația aerobă sunt negativ reglate. Reorganizarea citoscheletului celular, existența fibrelor de stres pronunțate și identificarea unei expresii crescute a proteinei YAP1 indică procesele celulare reglate în favoarea progresiei tumorale, dar și fenotipul agresiv al acestor celule. De asemenea, expresia proteinei cu rol în procesul de adeziune focală, zyxin, este crescută în liniile rezistente (**Figura 8B**). Pentru linia celulară SKMEL28R, procesul ce vizează interacția celule-matricea extracelulară este pozitiv reglat, astfel încât matricei extracelulare în celulele rezistente este evidențiată prin expresia crescută a proteinei fibronectină și formarea unei matrici dense (**Figura 8C-E**).

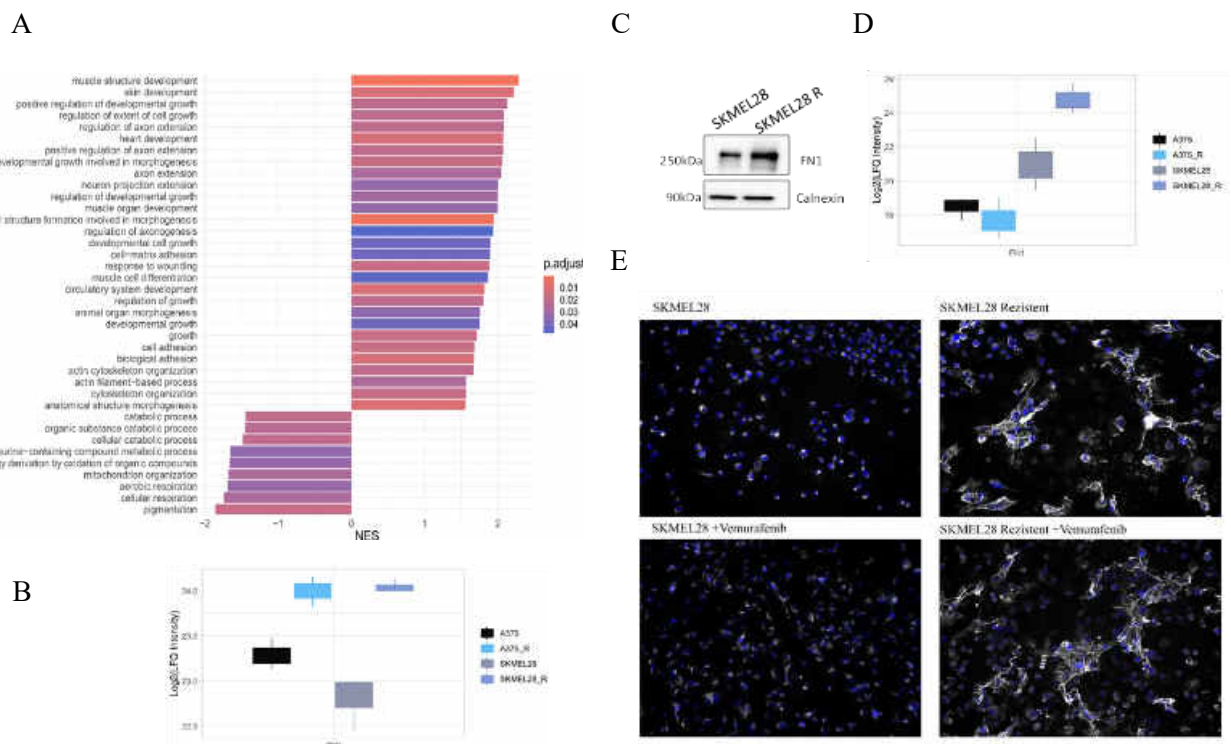


Figura 8. Procese celulare în celulele rezistente.

(A) Procesele biologice semnificativ modificate în linia celulară rezistentă SKMEL28R. (B) Représentarea boxplot a variabilei cantitative LFQ pentru proteina zyxin în cele 4 linii celulare. (C) Analiza prin Western blot a expresiei fibronectinei în liniile celulare SKMEL28 și SKMEL28R. Controlul intern a fost reprezentat de calnexină. (D) Expresia fibronectinei (\log_2 (Intensitatea LFQ)) determinată în cele patru linii celulare de melanom prin spectrometrie de masă. (E) Analiza prin imunofluorescența a fibronectinei în celulele SKMEL28 sensibile și rezistente la vemurafenib, în prezență sau absență de medicament (24h).

3.2.3 Dependența de glucoză a celulelor rezistente

În ceea ce privește dependența celulelor rezistente față de nutrienți, o concentrație scăzută de glucoză în mediu generează stres celular. Identificarea procesului de respirație aerobă ca fiind negativ reglat în celulele rezistente SKMEL28 indică preferința acestor celule pentru procesul de glicoliză aerobă în defavoarea procesului de fosforilare oxidativă pentru producția de energie. În consecință aceste celule vor utiliza concentrații crescute de glucoză pentru a susține necesarul energetic al celulei. Astfel, a fost evidențiată o expresie crescută a factorului de transcripție ATF4 în celulele rezistente (**Figura 9A-B**). De asemenea, activitatea metabolică a celulelor rezistente este puternic influențată de disponibilul redus de glucoză, fiind redusă substanțial (**Figura 9C**).

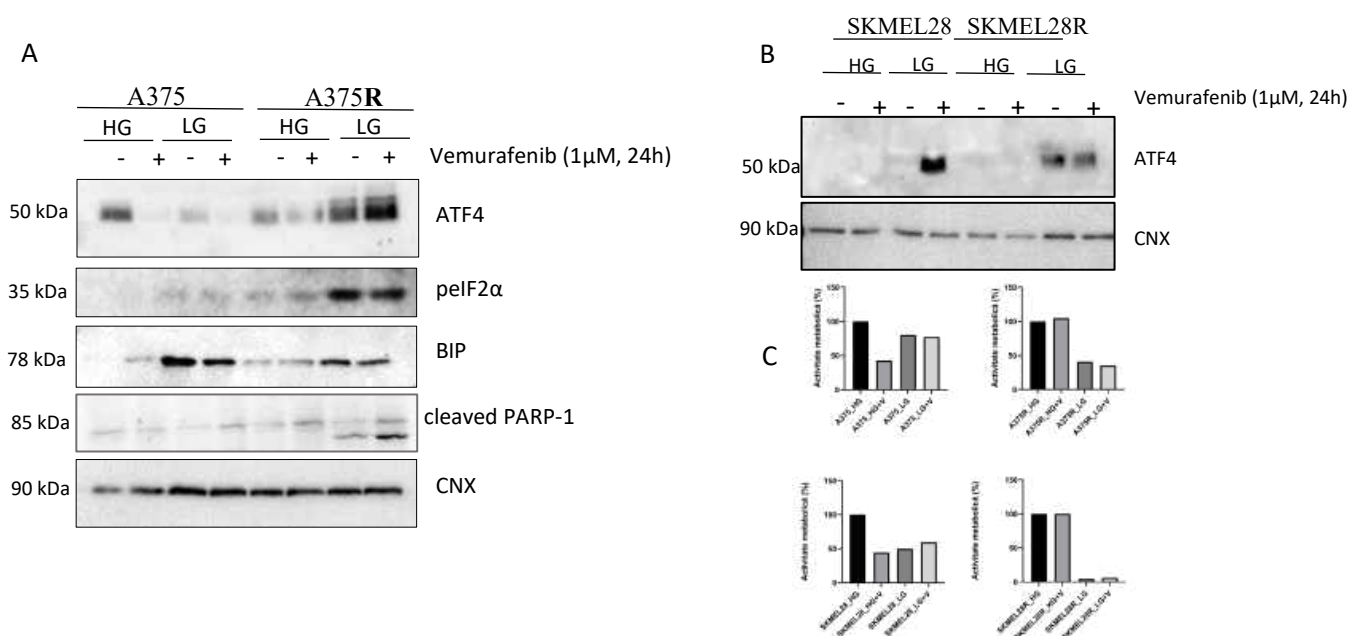


Figura 9. Dependența celulelor de melanom rezistente de glucoză

(A) Expresia proteinelor (ATF4, peIF2 α , BIP, cleaved PARP-1) implicate în răspunsul celulelor la stres și apoptoză a fost cuantificat prin Western blot din lizatele celulare obținute după cultivarea celulelor pentru 24h în prezență de 4.5g/L respectiv 1g/L glucoză în mediu de cultură. (B) Expresia ATF4 a fost determinată prin Western blot în liniile celulare SKMEL28 și SKMEL28R. Controlul intern a fost reprezentat de calnexină (CNX). (C) Evaluarea activității metabolice a celulelor sensibile și rezistente la vemurafenib în prezență de concentrații crescute (4.5g/L) sau scăzute(1g/L) de glucoză.

3.2.4 Rolul proteinei HIF1 α în promovarea rezistenței la vemurafenib

Rolul factorului de transcripție HIF1 α a fost studiat în contextul rezistenței la vemurafenib, iar cele mai importante observații vizează funcția acestei proteine în reglarea expresiei proteinelor matricei extracelulare. Astfel, expresia crescută a fibronectinei în linia celulară SKMEL28R este posibil să fie reglată în condiții de normoxie de activarea constitutivă a factorului de transcripție HIF1 α (**Figura 10**).

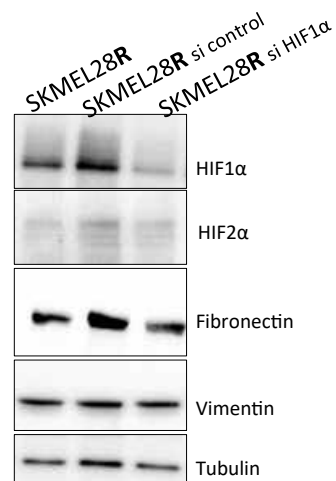


Figura 10 Analiza prin Western blot a expresiei proteinelor HIF1 α , HIF2 α , fibronectină și vimentin. Controlul intern a fost reprezentat de tubulină.

4. CONCLUZII

Definirea aspectelor ce contribuie la heterogenitatea marcantă a melanomului, precum și elucidarea mecanismelor prin care aceste celule se acomodează la terapia cronică cu inhibitori specifici ai BRAF kinazei a reprezentat scopul acestei teze. Rezultatele prezentate introduc o serie de caracteristici specifice melanomului amelanotic și permit o mai bună caracterizare a acestui subtip de cancer. De asemenea, o serie de mecanisme implicate în dezvoltarea rezistenței la vemurafenib au fost caracterizate, iar răspunsul celulelor rezistente a fost testat în diferite condiții de stres. În prima parte a studiului, analiza proteomică comparativă ne-a permis să identificăm un panel de biomarkeri ce prezintă specificitate pentru un subtip agresiv de melanom amelanotic. Dincolo de specificitatea crescută a setului de biomarkeri propus, aceste proteine pot defini și capacitatea de migrare crescută a acestor celule, putând fi reprezentative pentru agresivitatea liniilor de melanom amelanotic analizate.

Proteinele propuse ca și candidați pentru diagnosticul melanomului amelanotic sunt reprezentate în principal de: AHNAK, ANXA1, CAPN2, MYOF, ASPH, THBS1, TGM2, ACTN4, ITGA6, FSCN1, PLEC, EPHA2, FN1. Dificultatea definirii caracterului amelanotic al celulelor este demonstrată prin profilul prezentat de linia celulară SKMEL28. Existența markerilor melanocitari de diferențiere nu reflectă absența pigmentației pentru această linie celulară. Absența pigmentației în cazul liniei SKMEL28 reprezintă consecința unor defecte în maturarea melanosomilor și implicit în sinteza melaninei. Analiza proteomică comparativă nu a permis decelarea absenței pigmentației pentru această linie celulară. În schimb, expresia proteinei TYRP1 a fost corelată cu pigmentația accentuată a celulelor MNT1. Necesitatea definirii unui sistem de clasificare complex al celulelor de melanom este demonstrat prin imposibilitatea aprecierii pigmentației celulelor doar prin prisma markerilor cunoscuți până în prezent. O corelație directă cu absența pigmentației a fost demonstrată pentru integritate. Mai mult, proteinele implicate în procesul de adeziune focală, precum și cele implicate în organizarea citoscheletului sunt slab exprimate în linia celulară MNT1. Astfel, procesele celulare ce implică o expresie crescută a proteinelor ce interacționează cu actina sau cele implicate în modelarea matricei extracelulare sunt puternic reglate în liniile celulare A375 și SKMEL28. În plus expresia proteinelor adnotate pentru

tranziția epitelial-mezenchimală grupează liniile celulare în funcție de capacitatea de migrare a acestora. Validarea datelor de proteomică a presupus utilizarea unor seturi de date publice ce au permis diferențierea liniilor celula de melanom în funcție de profilul de pigmentație al celulelor. Astfel, specificitatea biomarkerilor identificați a fost testată pe trei seturi de date de proteomică și transcriptomică și a permis evidențierea unei corelații directe între expresia proteinelor identificate și absența pigmentației. În plus, o serie de proteine au prezentat o expresie crescută în linia celulară hiperpigmentată MNT1, iar un nivel crescut al acestor proteine a fost pus pe seama unei pigmentații accentuate a celulelor. Aceste proteine sunt reprezentate de DUSP3, NR4A3, CDK2, PRKD3, C5orf22, ACSL1, NARS2, FKBP4 și CKMT1B. Rezultatele s-au publicat în *Frontiers in Oncology*, 26 Ianuarie 2023, Secțiunea Molecular and Cellular Oncology, volumul 12 - 2022.

În cea de-a doua parte a acestei lucrări am studiat mecanismele implicate în rezistența la vemurafenib. Cele două linii celulare utilizate în prima parte pentru definirea biomarkerilor specifici melanomului amelanotic au fost suspuse tratamentului cu inhibitorul BRAF kinazei pentru 4 luni. Rezistența instalată a fost verificată prin determinarea valorii IC50 și persistența activării căii de semnalizare MAPK. Analiza proteomică comparativă a fost condusă pe liniile celulare sensibile și rezistente la medicament. Pentru ambele linii celulare rezistente s-au observat modificări în expresia proteinelor implicate în procesul de adeziune celulară. De asemenea, o altă componentă importantă a rezistenței la vemurafenib este reprezentată de activitatea transcripțională a factorul de transcripție HIF1 α . Acesta se exprimă constitutiv în liniile celulare rezistente și astfel reglează mecanismele adaptative ale celulelor. În plus, scăderea sensibilității celulelor de melanom la vemurafenib în condiții de hipoxie indică rolul major pe care hipoxia îl joacă în promovarea progresiei tumorale și reglarea răspunsului celulelor la terapie. În ceea ce privește răspunsul la stres al liniilor celulare A375R și SKMEL28R acesta este diferit de cel prezentat de liniile celulare parentale și este caracterizat în principal prin reducerea expresiei ATF4. Dependența celulelor rezistente față de o concentrație optimă de glucoză este evidențiat prin creșterea expresiei ATF4, prezența formei clivate a PARP și reducerea semnificativă a proliferării celulelor în prezența unei concentrații scăzute de glucoză. Astfel, se poate concluziona o necesitatea crescută a celulelor rezistente pentru nutrienți în vederea susținerii proliferării celulare în condițiile tratamentului cronic.

Rezultatele sugerează că în celulele rezistente micromediul tumoral este transformat, iar cel mai important efect observat a fost reprezentat de o cantitate semnificativ mai mare de exozomi

secretați de cele două linii celulare rezistente. Existența unor mecanisme ce presupun o comunicare intercelulară intensificată reprezintă un indiciu cu privire la prezența unui reglaj complex.

Utilizarea paclitaxelului poate reprezenta o strategie terapeutică benefică în vederea reducerii riscului de instalare a rezistenței la vemurafenib. Expresia unor proteine identificate cu o expresie crescută în liniile rezistente este redusă într-o manieră doză-dependentă în celulele rezistente tratate cu paclitaxel.

Rezultatele studiilor efectuate în cadrul tezei demonstrează caracterul heterogen al melanomului și răspunsul complex al celulelor canceroase la terapia țintită. Se evidențiază astfel necesitatea abordării unei strategii personalizate bazată pe caracterizarea detaliată a celulelor de melanom. Specificitatea setului de biomarkeri propuși în prima parte a tezei poate prezenta valoare însemnată atât în vederea stabilirii unui diagnostic precoce cât și în aprecierea prognosticului în melanom. Nu în ultimul rând răspunsul celulelor la terapie poate indica selectarea unor populații celulare rezistente și adaptarea celulelor prin activarea unor mecanisme compensatorii de supraviețuire.

Cele mai importante observații susținute de rezultatele prezentate în acest studiu sunt reprezentate de:

- definirea unui panel de biomarkeri specifici pentru formele agresive de melanom amelanotic;
- definirea unui fenotip caracterizat prin reorganizarea citoscheletului în celulele de melanom nepigmentate;
- identificarea unei semnături specifice melanomului hiperpigmentat;
- diferențierea liniilor pigmentate de cele amelanotice în seturi de date publice de proteomică;
- evidențierea prin analiză bioinformatică a proceselor biologice comune celor două linii celulare amelanotice semnificativ modificate față de cea pigmentată;
- generarea liniilor rezistente la vemurafenib și evaluarea răspunsului celular la terapia țintită;
- identificarea prin analiza LC-MS/MS a unui set de proteine cu expresie crescută în liniile rezistente;
- evidențierea prin analiza bioinformatică a proceselor de adeziune, proliferare și organizare a citoscheletului ca fiind puternic reglate în celulele rezistente;
- identificarea factorului de transcripție HIF1 α ca unul din promotorii principali ai rezistenței la vemurafenib;

- evidențierea unei expresii crescute a fibronectinei în linia rezistentă SKMEL28 și secreția accentuată a proteinei în mediul extracelular;
- necesarul unei concentrații optime de glucoză pentru susținerea proliferării celulelor rezistente și efectul proapoptotic mediat de factorul de transcripție ATF4 în prezența unei concentrații scăzute de glucoză;

LISTA PUBLICAȚIILOR

ARTICOLE ȘTIINȚIFICE

1. **Militaru IV**, Rus AA, Munteanu CVA, Manica G, Petrescu SM. New panel of biomarkers to discriminate between amelanotic and melanotic metastatic melanoma. *Front Oncol.* 2023 Jan 26;12:1061832. doi: 10.3389/fonc.2022.1061832. **IF: 4.7, AIS:1.00.**
2. Rus AA, **Militaru IV**, Popa I, Munteanu CVA, Sima LE, Petrescu SM. NPC1 plays a role in the trafficking of specific cargo to melanosomes. *Journal of Biological Chemistry.* 2023. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105024. **IF: 5.5, AIS: 1.454.**

CAPITOLE DE CARTE

Albulescu, R. et al. (2019) ‘Mass Spectrometry for Cancer Biomarkers’, in I. Y. Abdurakhmonov (ed.) *Proteomics Technologies and Applications*. IntechOpen. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.85609>.

POSTERE

1. **Militaru IV**, Munteanu CVA, Petrescu SM. “New Potential Melanoma- Associated Prognostic Biomarkers Before and After Vemurafenib Treatment”, 2021, Protein Society 35th Annual Symposium.
2. **Militaru IV**, Munteanu CVA, Petrescu SM. “A proteomic study of the relationship between hypoxia and Braf inhibitors treated melanoma cells”, RSBMB Annual International Meeting, 2020, Romania.
3. **Militaru IV**, Chiritoiu GN, Munteanu CVA, Petrescu SM, Pena F. “PDI proteins contribute to the formation of extracellular matrix”, 2019, RSBMB Annual International Meeting, Romania.

4. **Militaru IV**, Ivan M, Petrescu SM. “Knockdown of hypoxia-inducible factors by lentivirus-mediated shRNA” RSBMB Annual International Meeting, 2018, Romania.

BIBLIOGRAFIE

- Arisi, M., Zane, C., Caravello, S., Rovati, C., Zanca, A., Venturini, M., Calzavara-Pinton, P., 2018. Sun Exposure and Melanoma, Certainties and Weaknesses of the Present Knowledge. *Front. Med.* 5, 235. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00235>
- Ascierto, P.A., Kirkwood, J.M., Grob, J.-J., Simeone, E., Grimaldi, A.M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F.M., Mozzillo, N., 2012. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med* 10, 85. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-85>
- Bristow, I.R., de Berker, D.A., Acland, K.M., Turner, R.J., Bowling, J., 2010. Clinical guidelines for the recognition of melanoma of the foot and nail unit. *J Foot Ankle Res* 3, 25. <https://doi.org/10.1186/1757-1146-3-25>
- Das Thakur, M., Salangsang, F., Landman, A.S., Sellers, W.R., Pryer, N.K., Levesque, M.P., Dummer, R., McMahon, M., Stuart, D.D., 2013. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature* 494, 251–255. <https://doi.org/10.1038/nature11814>
- Department of Radiopharmaceutical and Chemical Biology, Institute of Radiopharmaceutical Cancer Research, Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Dresden, Germany et al. (2017) ‘Biomarkers in Malignant Melanoma: Recent Trends and Critical Perspective’, in Department of Surgical Oncology, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA et al. (eds) *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. Codon Publications, pp. 39–56. Available at: <https://doi.org/10.15586/codon.cutaneoumelanoma.2017.ch3>.
- D’Mello, S., Finlay, G., Baguley, B., Askarian-Amiri, M., 2016. Signaling Pathways in Melanogenesis. *IJMS* 17, 1144. <https://doi.org/10.3390/ijms17071144>
- Domingues, B., Lopes, J., Soares, P., Populo, H., 2018. Melanoma treatment in review. *ITT* Volume 7, 35–49. <https://doi.org/10.2147/ITT.S134842>

- Erkurt, M.A., Aydogdu, I., Kuku, I., Kaya, E., Basaran, Y., 2009. Nodular melanoma presenting with rapid progression and widespread metastases: a case report. *J Med Case Reports* 3, 50. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-3-50>
- Frahm, S.-O., Schubert, C., Parwaresch, R., Rudolph, P., 2001. High proliferative activity may predict early metastasis of thin melanomas. *Human Pathology* 32, 1376–1381. <https://doi.org/10.1053/hupa.2001.29658>
- Gogas, H., Eggermont, A.M.M., Hauschild, A., Hersey, P., Mohr, P., Schadendorf, D., Spatz, A., Dummer, R., 2009. Biomarkers in melanoma. *Annals of Oncology* 20, vi8–vi13. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp251>
- Goldstein, B.G., Goldstein, A.O., 2001. Diagnosis and management of malignant melanoma. *Am Fam Physician* 63, 1359–1368, 1374.
- Grant-Kels, J.M., Bason, E.T., Grin, C.M., 1999. The misdiagnosis of malignant melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* 40, 539–548. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(99\)70435-4](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(99)70435-4)
- Guo, W., Wang, H., Li, C., 2021. Signal pathways of melanoma and targeted therapy. *Sig Transduct Target Ther* 6, 424. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00827-6>
- Jing, X., Michael, C.W., Theoharis, C.G.A., 2013. The use of immunocytochemical study in the cytologic diagnosis of melanoma: Evaluation of three antibodies. *Diagn. Cytopathol.* 41, 126–130. <https://doi.org/10.1002/dc.21791>
- Kim, M.H., Kim, Jongshin, Hong, H., Lee, S., Lee, J., Jung, E., Kim, Joon, 2016. Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP / TAZ activation. *EMBO J* 35, 462–478. <https://doi.org/10.15252/emboj.201592081>
- King, R., Weilbaecher, K.N., McGill, G., Cooley, E., Mihm, M., Fisher, D.E., 1999. Microphthalmia Transcription Factor. *The American Journal of Pathology* 155, 731–738. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65172-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65172-3)
- Lewis, T.B., Robison, J.E., Bastien, R., Milash, B., Boucher, K., Samlowski, W.E., Leachman, S.A., Dirk Noyes, R., Wittwer, C.T., Perreard, L., Bernard, P.S., 2005. Molecular classification of melanoma using real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer* 104, 1678–1686. <https://doi.org/10.1002/cncr.21372>
- Liu, Y., Cui, S., Li, W., Zhao, Y., Yan, X., Xu, J., 2019. PAX3 is a biomarker and prognostic factor in melanoma: Database mining. *Oncol Lett.* <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10155>

- Lokhandwala, P.M., Tseng, L.-H., Rodriguez, E., Zheng, G., Pallavajjala, A., Gocke, C.D., Eshleman, J.R., Lin, M.-T., 2019. Clinical mutational profiling and categorization of BRAF mutations in melanomas using next generation sequencing. *BMC Cancer* 19, 665. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5864-1>
- Long, G.V., Menzies, A.M., Nagrial, A.M., Haydu, L.E., Hamilton, A.L., Mann, G.J., Hughes, T.M., Thompson, J.F., Scolyer, R.A., Kefford, R.F., 2011. Prognostic and Clinicopathologic Associations of Oncogenic *BRAF* in Metastatic Melanoma. *JCO* 29, 1239–1246. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.4327>
- Longo, C., Casari, A., Pellacani, G., 2012. Superficial Spreading Melanoma, in: Hofmann-Wellenhof, R., Pellacani, G., Malvehy, J., Soyer, H.P. (Eds.), *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 151–178. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21997-9_13
- Moreiras, H., Seabra, M.C., Barral, D.C., 2021. Melanin Transfer in the Epidermis: The Pursuit of Skin Pigmentation Control Mechanisms. *IJMS* 22, 4466. <https://doi.org/10.3390/ijms22094466>
- Muinao, T., Deka Boruah, H.P., Pal, M., 2019. Multi-biomarker panel signature as the key to diagnosis of ovarian cancer. *Heliyon* 5, e02826. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02826>
- Mull, A., Zolekar, A., Wang, Y.-C., 2015. Understanding Melanocyte Stem Cells for Disease Modeling and Regenerative Medicine Applications. *IJMS* 16, 30458–30469. <https://doi.org/10.3390/ijms161226207>
- Nassar, K.W., Tan, A.C., 2020. The mutational landscape of mucosal melanoma. *Seminars in Cancer Biology* 61, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.09.013>
- Orchard, G.E., 2000. [No title found]. *The Histochemical Journal* 32, 475–481. <https://doi.org/10.1023/A:1004192232357>
- Owsley, J., Stein, M.K., Porter, J., In, G.K., Salem, M., O’Day, S., Elliott, A., Poorman, K., Gibney, G., VanderWalde, A., 2021. Prevalence of class I–III BRAF mutations among 114,662 cancer patients in a large genomic database. *Exp Biol Med (Maywood)* 246, 31–39. <https://doi.org/10.1177/1535370220959657>
- Pacifico, M.D., Grover, R., Richman, P.I., Daley, F.M., Buffa, F., Wilson, G.D., 2005. Development of a Tissue Array for Primary Melanoma with Long-Term Follow-Up:

- Discovering Melanoma Cell Adhesion Molecule as an Important Prognostic Marker: Plastic and Reconstructive Surgery 115, 367–375. <https://doi.org/10.1097/01.PRS.0000148417.86768.C9>
- Palmieri, G., Ombra, M., Colombino, M., Casula, M., Sini, M., Manca, A., Paliogiannis, P., Ascierio, P.A., Cossu, A., 2015. Multiple Molecular Pathways in Melanomagenesis: Characterization of Therapeutic Targets. *Front. Oncol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00183>
- Radić, M., Vlašić, I., Jazvinščak Jembrek, M., Horvat, A., Tadijan, A., Sabol, M., Dužević, M., Herak Bosnar, M., Slade, N., 2022. Characterization of Vemurafenib-Resistant Melanoma Cell Lines Reveals Novel Hallmarks of Targeted Therapy Resistance. *IJMS* 23, 9910. <https://doi.org/10.3390/ijms23179910>
- Rangel, J., Nosrati, M., Torabian, S., Shaikh, L., Leong, S.P.L., Haqq, C., Miller, J.R., Sagebiel, R.W., Kashani-Sabet, M., 2008. Osteopontin as a molecular prognostic marker for melanoma. *Cancer* 112, 144–150. <https://doi.org/10.1002/cncr.23147>
- Raposo, G., Marks, M.S., 2007. Melanosomes — dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 786–797. <https://doi.org/10.1038/nrm2258>
- Rimoldi, D., Salvi, S., Liénard, D., Lejeune, F.J., Speiser, D., Zografos, L., Cerottini, J.-C., 2003. Lack of BRAF mutations in uveal melanoma. *Cancer Res* 63, 5712–5715.
- Rotte, A., Bhandaru, M., 2016. Melanoma—Diagnosis, Subtypes and AJCC Stages, in: *Immunotherapy of Melanoma*. Springer International Publishing, Cham, pp. 21–47. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48066-4_2
- Saginala, K., Barsouk, Adam, Aluru, J.S., Rawla, P., Barsouk, Alexander, 2021. Epidemiology of Melanoma. *Medical Sciences* 9, 63. <https://doi.org/10.3390/medsci9040063>
- Sandru, A., Voinea, S., Panaitescu, E., Blidaru, A., 2014. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J Med Life* 7, 572–576.
- Schallreuter, K.U., Kothari, S., Chavan, B., Spencer, J.D., 2008. Regulation of melanogenesis - controversies and new concepts. *Experimental Dermatology* 17, 395–404. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00675.x>
- Sneyd, M.J., Cox, B., 2013. A comparison of trends in melanoma mortality in New Zealand and Australia: the two countries with the highest melanoma incidence and mortality in the world. *BMC Cancer* 13, 372. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-372>

- Stahlecker, J., Gauger, A., Bosserhoff, A., Büttner, R., Ring, J., Hein, R., 2000. MIA as a reliable tumor marker in the serum of patients with malignant melanoma. *Anticancer Res* 20, 5041–5044.
- Sundararajan, S., Thida, A.M., Yadlapati, S., Koya, S., 2023. *Metastatic Melanoma*, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Trager, M.H., Geskin, L.J., Samie, F.H., Liu, L., 2022. Biomarkers in melanoma and non-melanoma skin cancer prevention and risk stratification. *Experimental Dermatology* 31, 4–12. <https://doi.org/10.1111/exd.14114>
- Trunzer, K., Pavlick, A.C., Schuchter, L., Gonzalez, R., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., Flaherty, K.T., Kim, K.B., Weber, J.S., Hersey, P., Long, G.V., Lawrence, D., Ott, P.A., Amaravadi, R.K., Lewis, K.D., Puzanov, I., Lo, R.S., Koehler, A., Kockx, M., Spleiss, O., Schell-Steven, A., Gilbert, H.N., Cockey, L., Bollag, G., Lee, R.J., Joe, A.K., Sosman, J.A., Ribas, A., 2013. Pharmacodynamic Effects and Mechanisms of Resistance to Vemurafenib in Patients With Metastatic Melanoma. *JCO* 31, 1767–1774. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.7888>
- Weinstein, D., Leininger, J., Hamby, C., Safai, B., 2014. Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *J Clin Aesthet Dermatol* 7, 13–24.
- Wu, X., Sakamoto, T., Zhang, F., Sellers, J.R., Hammer, J.A., 2006. In vitro reconstitution of a transport complex containing Rab27a, melanophilin and myosin Va. *FEBS Letters* 580, 5863–5868. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.047>
- Zalaudek, I., Manzo, M., Savarese, I., Docimo, G., Ferrara, G., Argenziano, G., 2009. The Morphologic Universe of Melanocytic Nevi. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 28, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.sder.2009.06.005>
- Zhang, W., Liu, H.T., 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12, 9–18. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>