



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale in
*BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA***

**RUOLO DELL'ENZIMA NICOTINAMIDE N-METILTRASFERASI
NEL MELANOMA CUTANEO**

**ROLE OF NICOTINAMIDE N-METHYLTRANSFERASE
IN CUTANEOUS MALIGNANT MELANOMA**

Tesi di Laurea Magistrale di
MORICONI LUIGI

Relatore
Chiar.mo Dott.
SARTINI DAVIDE

Correlatore
Chiar.ma Prof.
EMANUELLI MONICA

Correlatore
Chiar.ma Prof.
SALVOLINI ELEONORA

Sessione estiva

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

1 INTRODUZIONE	1
1.1 MELANOMA CUTANEO.....	1
1.1.1 Genesi e mutazioni	1
1.1.2 Fattori di rischio.....	6
1.1.3 Incidenza.....	9
1.1.4 Distribuzione anatomica	11
1.1.5 Mortalità	12
1.1.6 Prevenzione	12
1.1.7 Diagnosi.....	14
1.1.8 Fattori prognostici.....	16
1.1.9 Classificazione istopatologica	16
1.1.10 Stadiazione	17
1.1.11 Terapia chirurgica.....	18
1.1.12 Chemioterapia.....	20
1.1.13 Radioterapia.....	20
1.1.14 Terapia mirata.....	21
1.1.15 Immunoterapia.....	22
1.1.16 Terapie combinate	24
1.2 NICOTINAMIDE N-METILTRASFERASI	26
1.2.1 Il metabolismo dei farmaci	26
1.2.2 Omeostasi della nicotinamide.....	27
1.2.3 Caratterizzazione dell'NNMT umana	29
1.2.4 Ruolo dell'NNMT nelle patologie non neoplastiche.....	36
1.2.5 Ruolo dell'NNMT nella malattia di Parkinson.....	41
1.2.6 Ruolo dell'NNMT nelle neoplasie	43
1.3 SCOPO DEL LAVORO	52
2 MATERIALI E METODI	53
2.1 CAMPIONI TISSUTALI	53
2.1.1 Analisi immunoistochimica.....	53
2.1.2 Analisi statistiche.....	56
2.2 CELLULE IN COLTURA	57
2.2.1 Colture cellulari	57

2.2.2 Silenziamento dell'NNMT	57
2.2.3 Isolamento, quantificazione e retrotrascrizione dell'RNA totale	62
2.2.4 Real-Time PCR.....	63
2.2.5 Western blot.....	65
2.2.6 Saggio di Bradford per la determinazione della concentrazione proteica	67
2.2.7 Saggio MTT.....	68
2.2.8 Wound healing assay	68
3 RISULTATI	70
3.1 CAMPIONI TISSUTALI	70
3.1.1 Espressione dell'NNMT mediante analisi immunistochemica	70
3.2 ANALISI CELLULARI	74
3.2.1 Real-Time PCR.....	74
3.2.2 Western blot.....	75
3.2.3 Saggio MTT.....	76
3.2.4 Wound healing assay	78
4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	80
5 BIBLIOGRAFIA.....	83
6 ABBREVIAZIONI.....	123

1 INTRODUZIONE

1.1 MELANOMA CUTANEO

1.1.1 Genesi e mutazioni

L'origine del termine Melanoma risale al 400 a.C., quando Ippocrate descrisse delle lesioni nere con le parole μέλανος (“nero”) e ωμα (“inumano”, in seguito usato come suffisso per ‘tumore’) (1).

Il melanoma è un tumore derivante dalla trasformazione neoplastica dei melanociti e può svilupparsi a livello delle superfici delle mucose, del tratto uveale e delle leptomeningi. Tuttavia, il melanoma più comune è quello che insorge a livello cutaneo (2).

I melanociti, insieme ai cheratinociti, sono le cellule più abbondanti dell'epidermide, rappresentando rispettivamente circa il 5-10% e l'80% della popolazione cellulare di questo strato della cute.

In seguito al danno al DNA causato dalle radiazioni ultraviolette (UV), i cheratinociti producono l'ormone stimolante i melanociti (MSH) che si lega ad un recettore presente sui melanociti: il recettore della melanocortina 1 (MC1R). Dopo il legame, i melanociti producono e rilasciano la melanina, un pigmento che agisce da scudo per le radiazioni UV e che, di conseguenza, previene un'ulteriore alterazione del DNA (3). Per questo motivo tale recettore è coinvolto non solo nella pigmentazione e nell'abbronzatura adattativa, ma anche nei meccanismi che contrastano l'insorgenza del melanoma.

Le radiazioni UV possono indurre la trasformazione maligna dei melanociti attraverso un meccanismo diretto oppure un meccanismo indiretto.

Nella trasformazione diretta si verificano diverse mutazioni, che riguardano sia proto-oncogeni sia geni oncosoppressori, e nel complesso determinano l'insorgenza del tumore.

Nella trasformazione indiretta invece i melanociti si trasformano dapprima in nevi benigni che nell'80% dei casi hanno la mutazione BRAFV600E. Tali nevi rimangono indolenti per decenni grazie al sistema immunitario e questo spiega perché i nevi benigni raramente progrediscono fino al melanoma. Tuttavia, le radiazioni UV possono determinare l'insorgenza di mutazioni aggiuntive, come ad esempio quelle a carico dei geni TERT (trascrittasi inversa della telomerasi) e CDKN2A (inibitore 2A della chinasi ciclina-dipendente), che causano in ultima istanza la trasformazione maligna dei melanociti (4, 5) (Figura 1).

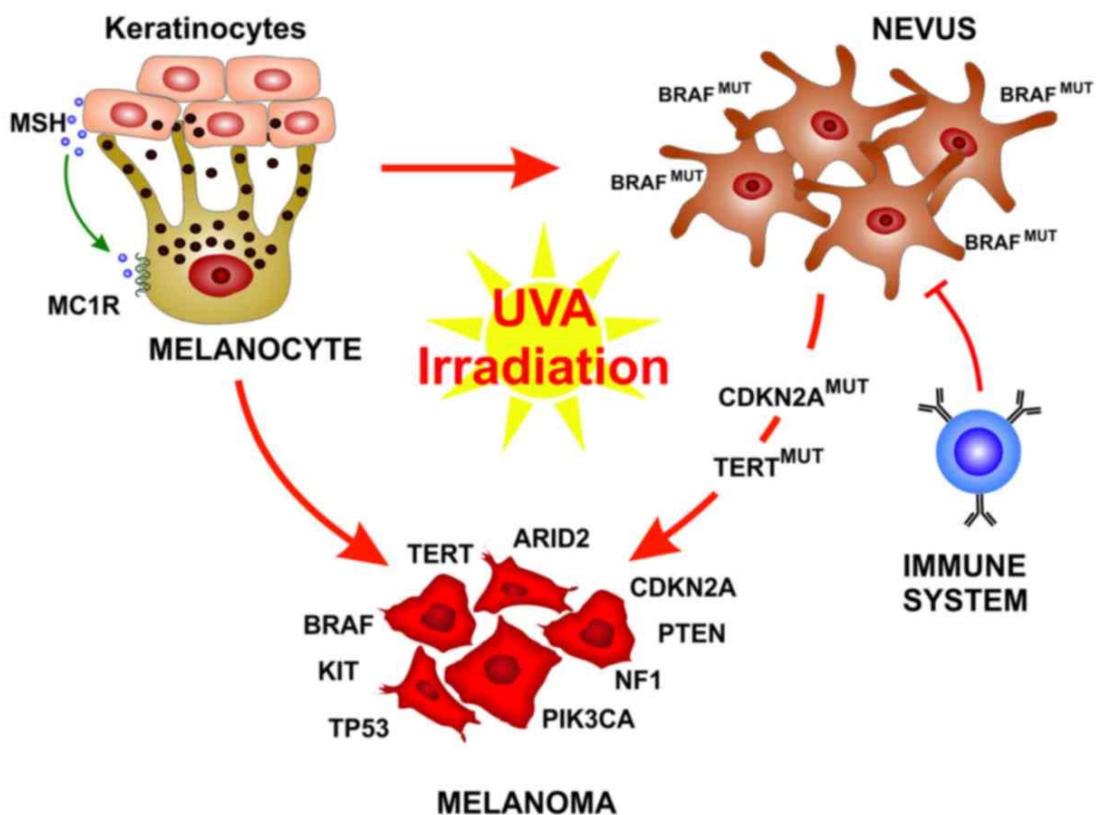


Figura 1. Meccanismo diretto ed indiretto di trasformazione maligna dei melanociti.

Le mutazioni più frequenti riscontrate nel melanoma riguardano diversi geni: BRAF, NRAS, NF1, PTEN, KIT, TP53, CDKN2A, TERT (6, 7). Tali mutazioni portano ad un'attivazione anomala dei due principali pathway di segnale nel melanoma: la via di trasmissione del segnale RAS/RAF/MEK/ERK, mediata dalla proteina chinasi MAPK, e il pathway fosfatidil inositolo 3-chinasi (PI3K)/AKT (8).

Il pathway MAPK è quello più frequentemente attivato nel melanoma (9) ed è coinvolto nella trasduzione dei segnali intracellulari indotti dai fattori di crescita e dagli ormoni, con conseguente attivazione dell'espressione di geni coinvolti nella proliferazione e nel differenziamento cellulare (10, 11).

Una percentuale che oscilla tra il 37% e il 50% dei melanomi è caratterizzata da una mutazione nel proto-oncogene BRAF (12). Tali mutazioni insorgono quasi sempre a livello della tripletta in posizione 600, che codifica per l'aminoacido valina. Circa l'80-90% delle mutazioni BRAF sono V600E (valina sostituita con acido glutammico), mentre il 5-12% sono V600K (sostituita da lisina) e $\leq 5\%$ sono V600D (sostituita da acido aspartico) o V600R (sostituita da arginina) (13, 14).

La proteina BRAF è una serin/treonin protein-chinasi costituita da 766 aa ed è costituita da tre domini: due con funzione regolatrice e un dominio catalitico, responsabile della fosforilazione di MEK nel pathway MAPK.

Numerosi studi sono stati condotti al fine di elucidare il coinvolgimento di BRAF nell'ambito di eventi di trasduzione del segnale intracellulare. Inizialmente, il legame tra un ligando (ad esempio un fattore di crescita) e un recettore tirosin-chinasico a monte della cascata porta ad una autofosforilazione del recettore stesso. Tale evento determina l'interazione tra il recettore fosforilato e la proteina RAS. Ciò induce l'attivazione della proteina RAS con conseguente

fosforilazione di BRAF. La proteina BRAF fosforilata è in grado di legare e fosforilare a sua volta MEK. Tale cascata di attivazione culmina con la fosforilazione e la successiva traslocazione di ERK nel nucleo, dove fosforila infine specifici fattori di trascrizione, con conseguenti ricadute sull'espressione di geni coinvolti nei processi di crescita e differenziamento cellulare.

Il pathway MAPK ha quindi un ruolo importante nelle cellule normali ma è fondamentale prevenirne uno stato di attivazione persistente. A tale scopo, in condizioni fisiologiche la cascata viene inibita a monte, mediante un meccanismo di feedback negativo. Tuttavia, nelle cellule tumorali che presentano mutazioni del gene BRAF, il processo di attivazione del pathway MAPK è diverso: infatti l'assenza di un fisiologico feedback negativo induce una permanente attivazione della cascata, che conduce ad una proliferazione cellulare incontrollata.

Nella mutazione BRAFV600E, la valina (idrofobica) è sostituita dall'acido glutammico (polare e idrofilico), con conseguenze sostanziali a carico del dominio catalitico. Ciò determina infatti un aumento dell'attività chinastica di circa 500 volte rispetto a quella riscontrabile a livello di BRAF wild-type. La maggior parte delle mutazioni BRAF non V600E agisce in maniera analoga (15, 16).

Il secondo gene più frequentemente mutato nel melanoma è NRAS che agisce sia sul pathway MAPK sia sul pathway PI3K, regolando il processo di divisione cellulare (6, 17, 18). Le mutazioni in NRAS e BRAF sono mutualmente esclusive, sebbene raramente possano essere concomitanti (18).

NF1 è il terzo gene più frequentemente mutato nel melanoma. Si tratta infatti è un oncosoppressore mutato nel 10-15% dei melanomi (19, 20) e funge da regolatore negativo del pathway MAPK.

Mutazioni nel gene KIT si riscontrano nel 2-8% dei melanomi. Il recettore tirosin-chinasi KIT è coinvolto nella crescita delle cellule tumorali, nell'invasione metastatica e nell'inibizione dell'apoptosi attraverso i pathways MAPK e PI3K (21, 22).

CDKN2A (inibitore 2A della chinasi ciclina-dipendente) codifica per proteine che agiscono da soppressori tumorali andando a regolare il ciclo cellulare.

TERT (trascrittasi inversa della telomerasi) è una delle due componenti della telomerasi, il complesso ribonucleoproteico coinvolto nel mantenimento dell'estremità dei telomeri. Mutazioni a carico del gene TERT sono correlate all'insorgenza del melanoma.

Alterazioni di PTEN, un gene oncosoppressore coinvolto nel controllo della progressione del ciclo cellulare (6), possono avvenire in seguito a mutazioni missenso e frameshift o delezioni cromosomiche. Inoltre, alla base dell'alterazione dell'espressione di PTEN sono stati scoperti sia modifiche epigenetiche sia meccanismi di regolazione post-trascrizionale (microRNA) (23).

TP53 è un soppressore tumorale che innesca l'arresto del ciclo cellulare, l'induzione dell'apoptosi e della senescenza cellulare, ed è coinvolta nei meccanismi di riparo del DNA.

Il melanoma cutaneo è classificato in base alla causa che ne determina l'origine in due tipologie distinte: il melanoma originato da esposizione cronica della cute al sole (CSD o chronic sun damage) e melanoma originato da esposizione intermittente (nCSD o non-chronic sun damage). Tali varietà presentano delle differenze. Infatti, i melanomi dovuti a CSD insorgono in età più avanzata (maggiore ai 55 anni) ed interessano soprattutto testa, collo,

regione dorsale e arti superiori. I drivers genetici che ne causano la formazione o sostengono la progressione, sono BRAF, NF1 e NRAS. Inoltre, i melanomi CSD sono caratterizzati da un alto carico mutazionale (24, 25, 26).

Al contrario i nCSD insorgono in individui più giovani (età inferiore ai 55 anni) e riguardano in particolare tronco ed estremità prossimali, quindi aree meno esposte al sole. Presentano spesso la mutazione BRAFV600E e di solito anche la mutazione nel gene KIT, ed hanno un carico mutazionale più basso rispetto ai CSD (25, 26).

1.1.2 Fattori di rischio

Il principale fattore di rischio del melanoma è rappresentato dall'esposizione alle radiazioni UV.

La radiazione UV è la porzione dello spettro elettromagnetico di lunghezze d'onda comprese tra 100 nm e 400 nm ed è suddivisa in radiazione ultravioletta A (315-400 nm), B (280-315 nm) e C (100-280 nm). Mentre le radiazioni C e la maggior parte di quelle B sono bloccate dallo strato di ozono nella stratosfera, una frazione di radiazioni B e tutte le radiazioni A raggiungono la superficie terrestre e quindi sono quelle coinvolte nell'insorgenza del melanoma (27).

In aggiunta, è da prendere in considerazione il fatto che nel Nord Europa e negli USA, a partire dagli anni '80, ha avuto inizio la pratica dell'abbronzatura al chiuso (28) e, a partire dal terzo millennio, tale tendenza si è diffusa anche in altri paesi, tra cui l'Australia (29). Di conseguenza per gli individui di carnagione chiara, la radiazione ultravioletta fornita dai lettini abbronzanti è diventata la principale fonte non-solare di esposizione alla radiazione ultravioletta A e in piccola percentuale a quella B.

L'esposizione ripetuta a grandi quantità di radiazioni seppur per brevi periodi di tempo (normalmente 10-20 minuti) ha un gran numero di effetti negativi sulla salute, molti dei quali sono coinvolti in processi di trasformazione neoplastica (30).

Fino a poco tempo fa, le radiazioni B erano considerate l'unica frazione carcinogena dello spettro solare in grado di raggiungere la superficie terrestre. Tuttavia, nel 2009 l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha classificato l'intero spettro ultravioletto e i sistemi di abbronzatura al chiuso come carcinogeni per l'uomo (gruppo 1) (31).

Inoltre, molte sindromi o condizioni genetiche sono associate ad un significativo incremento nel rischio di sviluppare il melanoma cutaneo. Tra queste, le principali sono:

- lo xeroderma pigmentoso, una condizione autosomica recessiva caratterizzata da una carenza dei meccanismi di riparo del DNA;
- la sindrome familiare con nevi atipici multipli e melanoma (FAMMM Familial Atypical Multiple Mole Melanoma), causata da mutazioni di CDKN2A (32);
- le mutazioni a carico di BRCA2, un oncosoppressore coinvolto nei meccanismi di riparo del DNA cellulare (33);
- i nevi melanocitici congeniti (34).

Queste ultime sono lesioni presenti alla nascita che devono essere seguite attentamente o rimosse a scopo profilattico. Bisogna considerare che più grandi sono e maggiore è il rischio di sviluppare il melanoma. Dato che i melanomi che derivano dai nevi melanociti congeniti di solito si sviluppano prima dei 10 anni, la rimozione di queste lesioni dovrebbe essere effettuata in giovane età (34).

Anche una storia familiare caratterizzata da un'anamnesi positiva per melanoma costituisce un fattore di rischio importante. Infatti, maggiore è il numero dei familiari di primo grado con melanoma, maggiore è il rischio di sviluppo della patologia (32).

Una storia di scottature con bolle nell'infanzia e nell'adolescenza è associata ad una probabilità doppia, rispetto al rischio basale, di sviluppare il melanoma (35). Tuttavia, anche una significativa esposizione agli UV prima dei 35 anni aumenta il rischio di insorgenza del melanoma (34).

Infine, l'immunosoppressione cronica aumenta le probabilità di insorgenza. Tale condizione può essere determinata da patologie quali l'AIDS, la leucemia linfocitica cronica, il linfoma non-Hodgkin e dal trattamento farmacologico in seguito al trapianto di organo (34).

Altri fattori di rischio, associati ad una aumentata insorgenza del melanoma, sono rappresentati da specifici tratti fenotipici: carnagione chiara, occhi di colore blu, verde o nocciola, capelli chiari o rossi, tendenza a bruciarsi più che ad abbronzarsi, presenza di un numero molto elevato di nevi e lentiggini (36). In particolare, per quanto concerne la carnagione (fototipo), è stato messo a punto un sistema di classificazione che prevede l'assegnazione di un numero che corrisponde al grado di colore della cute. Tale classificazione comprende tutte le categorie di individui, da quelli con carnagione molto chiara (fototipo I) a quelli con carnagione molto scura (fototipo VI) (37, 38, 39). Tale sistema di classificazione è stato ideato da Thomas B. Fitzpatrick nel 1975.

1.1.3 Incidenza

Il melanoma è il sesto tumore più frequentemente diagnosticato nell'uomo e rappresenta l'80% dei decessi imputabili ai tumori della cute (40).

L'incidenza del melanoma negli ultimi decenni è aumentata più velocemente rispetto a qualsiasi altro tumore (41-44). In particolare, questo incremento ha riguardato molte popolazioni caratterizzate da individui con la carnagione chiara presenti in varie regioni del mondo, come il Nord America, il Nord Europa, l'Australia e la Nuova Zelanda (42, 45-50). La variazione dell'incidenza è influenzata da diversi fattori: etnia, localizzazione geografica, età e sesso (41, 44, 51, 52-54).

È stato dimostrato che l'etnia ha un ruolo chiave. L'incidenza del melanoma è infatti maggiore nella popolazione caucasica di carnagione chiara e ciò è causato da una diminuita fotoprotezione imputabile alla bassa quantità di melanina (55). Negli individui con pigmentazione più scura invece, la maggiore quantità di melanina garantisce una protezione migliore, sia dalle radiazioni UV-A sia dalle UV-B (56, 57).

Le variazioni dell'incidenza in base alla localizzazione geografica sono dovute a differenze imputabili all'assorbimento dell'ozono, alla latitudine, all'altitudine, alla nuvolosità e alle stagioni. Nelle latitudini più basse l'incidenza annuale del melanoma è maggiore rispetto a quella riscontrata nelle latitudini più alte (39).

Nel 2012 la IARC ha dichiarato che il maggior tasso di incidenza del melanoma è stato riportato in Nuova Zelanda, seguita subito dall'Australia (41). I paesi che seguivano erano situati nel Nord Europa (Scandinavia) e nel Nord America.

In Australia, gli individui che vivono in zone prossime all'equatore, essendo esposti a notevole irraggiamento solare, presentano il tasso di incidenza di melanoma più elevato (58).

In particolare, nel Queensland (latitudine 27°S) si ha un tasso di incidenza più alto rispetto al New South Wales (latitudine 34°S) (59, 60).

In Europa è stato invece osservato un andamento in controtendenza (61), con un tasso di incidenza maggiore nei paesi nordici (come la Scandinavia) rispetto alle nazioni del sud (come Spagna e Italia) (41). Tale situazione è in parte determinata dalle diverse caratteristiche nella pigmentazione delle relative popolazioni. In Scandinavia sono presenti popolazioni a carnagione più chiara, mentre nel sud Europa popolazioni con carnagione più scura (41). Ciò sottolinea l'importanza di non limitarsi a considerare singolarmente i vari fattori che influenzano l'incidenza del melanoma.

In aggiunta è da considerare che paesi che hanno popolazioni eterogenee come gli USA, la Nuova Zelanda, l'Australia e la Repubblica Sudafricana, riescono a mascherare le variazioni nell'incidenza. Allo stesso modo paesi come l'Australia, poiché si sviluppano in un ampio range di latitudine, rendono più complessa la valutazione delle variazioni dell'incidenza.

Nella considerazione della localizzazione geografica, si deve tener conto anche dell'altitudine: le regioni con altitudine più elevata sono associate ad un'incidenza del melanoma più alta (62, 63).

Nel mondo l'incidenza per età aumenta costantemente e raggiunge il picco tra i 70 e gli 80 anni (41). Questo andamento è stato riscontrato in Australia, in Nuova Zelanda (64, 65) e in nord Europa (66, 67). Negli USA, invece, il picco massimo d'insorgenza si raggiunge intorno ai 60 anni (51). Il melanoma è tra i tumori più comunemente diagnosticati negli adolescenti e nei giovani adulti di tutto il mondo (41, 68).

Per quanto riguarda il sesso, le donne adolescenti e le giovani adulte sono più suscettibili al melanoma rispetto agli uomini (68-70). Alcuni studi confermano che ciò sia dovuto a un

maggior uso dei dispositivi di abbronzatura al chiuso tra le donne (71-73). Tuttavia, dopo i 40 anni il tasso di incidenza si inverte, diventando maggiore negli uomini (68-70). In generale, gli uomini sembrano essere più suscettibili delle donne allo sviluppo del melanoma. Alcuni studi ipotizzano che tale aumentata suscettibilità sia determinata in parte dagli androgeni (73-75).

In Italia il rischio di sviluppare il melanoma è di 1:63 negli uomini e 1:81 nelle donne; l'incidenza ha inoltre un andamento decrescente dal nord al sud. Tuttavia, tali dati devono essere considerati sottostimati a causa della presenza di melanomi superficiali di piccole dimensioni o *in situ* che vengono asportati, ma non analizzati a livello istopatologico, oppure per la mancata registrazione dei melanomi *in situ* nell'Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM) (76).

1.1.4 Distribuzione anatomica

Negli uomini appartenenti alla popolazione caucasica, il melanoma insorge più frequentemente sulla schiena e sulle spalle, mentre nelle donne sulle gambe (77-81). Dato che queste parti del corpo sono associate a una più bassa esposizione al sole, queste scoperte avvalorano la teoria che si basa sull'effetto dell'esposizione intermittente agli UV, secondo cui l'esposizione al sole intermittente ed intensa costituisce un maggior rischio del melanoma (82, 83).

Invece negli uomini e nelle donne australiani il melanoma si sviluppa di solito in regioni altamente esposte al sole, come la testa e il collo (84, 85). I tassi più bassi del melanoma sono sui glutei di entrambi i sessi e nel cuoio capelluto delle donne (77, 86).

Inoltre, i melanomi che si sviluppano sul tronco insorgono tra i 50 e i 60 anni, mentre i melanomi che si sviluppano sulla testa e sul collo insorgono intorno agli 80 anni (87-91).

1.1.5 Mortalità

Il tasso di mortalità del melanoma, come quello per l'incidenza, è influenzato dalla geografia, dall'etnia, dall'età e dal sesso (43, 44, 65, 68, 69, 92, 93).

Nelle popolazioni a carnagione chiara il tasso di mortalità è più alto (41). Nell'ultimo decennio è progressivamente aumentato nei paesi come la Nuova Zelanda, l'Australia e la Scandinavia (44), in cui risulta elevata l'incidenza di melanoma. Al contrario negli USA la mortalità di tale neoplasia ha subito un rallentamento (44). A livello mondiale gli uomini hanno tassi di mortalità maggiori delle donne e i tassi sono più alti negli individui oltre i 70 anni (41, 50).

Per decenni l'incidenza del melanoma nel mondo è progressivamente aumentata ed è previsto un suo ulteriore incremento (41-44, 94, 95). Al contrario i tassi di mortalità, compreso quello riscontrato in Italia, non hanno seguito lo stesso andamento (41, 51). Tale discrepanza tra i dati relativi ai due parametri sembrerebbe essere semplicemente imputabile al miglioramento delle tecniche di screening (94, 96).

1.1.6 Prevenzione

La prevenzione del melanoma viene distinta in primaria e secondaria. La prima ha lo scopo di ridurre l'esposizione al sole e garantire protocolli di etichettatura più rigidi per le creme solari (97, 98), mentre la seconda contempla gli esami della cute di tutto il corpo (99).

Prevenzione primaria. Nei Paesi ad alta incidenza sono state adottate misure per diminuire l'esposizione ai raggi UV. Nel Regno Unito, nel 2003 è stata lanciata una campagna nazionale chiamata SunSmart, per cercare di ridurre l'aumento dei casi del melanoma. Questa campagna esortava ad utilizzare creme solari con SPF (sun protection factor) ≥ 15 , ad indossare indumenti protettivi e cappelli, e ad evitare l'esposizione al sole nelle ore di maggiore incidenza dei raggi UV (100). Tuttavia, nonostante questi sforzi l'incidenza del melanoma nel Regno Unito è aumentata, in quanto la popolazione continua ad assumere comportamenti ad alto rischio (41). In Norvegia e in Svezia sono state lanciate campagne simili a quella inglese, ma anche in questi paesi non sono stati raggiunti i risultati sperati (101, 102). Il risultato più positivo è stato ottenuto in Australia (44, 103) dove nel 1980 è stata lanciata la campagna SunSmart (la stessa che più tardi è stata adottata anche dal Regno Unito) inserendola nei programmi delle scuole elementari e diffondendola nei luoghi di lavoro (103). Nei decenni successivi il tasso di incidenza del melanoma ha rallentato la sua crescita e tra i più giovani è addirittura diminuito (41, 44, 103). Non a caso l'Australia non è più al primo posto nella lista dei paesi a maggiore incidenza del melanoma a livello mondiale (41).

Prevenzione secondaria. Il principale metodo di prevenzione secondaria è l'esame visivo della cute. Nel 2003 nel Nord della Germania è stato attuato il programma SCREEN (Skin Cancer Research to Provide Evidence for Effectiveness of Screening), un progetto di screening della popolazione basato sull'esame della cute dell'intero corpo (WBE o Whole-Body skin Examination). Trascorso appena un anno dall'adozione di tale programma, è stata riscontrata una diminuzione del 48% della mortalità dovuta al melanoma (104). Anche l'Australia nel 2008 ha intrapreso una campagna di screening generale della popolazione (105), con conseguente diminuzione della mortalità imputabile a melanoma.

Per la sua capacità di metastatizzare rapidamente e colpire gli individui più giovani, il melanoma rappresenta un problema rilevante dal punto di vista sia della salute sia economico (45, 51, 94).

Sebbene tra le popolazioni ad alto rischio l'incidenza del melanoma probabilmente continuerà ad aumentare negli anziani (51), migliori sono le prospettive per quanto concerne l'incidenza tra i giovani (44, 60, 99).

1.1.7 Diagnosi

Di solito, le lesioni relative al melanoma vengono diagnosticate casualmente durante gli esami di routine della cute (106). In alcuni casi, i pazienti possono avvertire la presenza di un nodulo, di un prurito persistente, di sanguinamento, oppure di formazione di una crosta a livello di un nevo. Sfortunatamente molti melanomi sono asintomatici e possono causare i sintomi di infiammazione locale dopo che è già avvenuta la progressione (107). Una volta effettuata la diagnosi, è necessario valutare l'eventuale diffusione metastatica della patologia.

Qualsiasi lesione pigmentata che presenta caratteristiche ascrivibili alle categorie presenti all'interno del sistema denominato "ABCDE" (108) dovrebbe essere considerata sospetta (Figura 2). Il sistema ABCDE contempla la valutazione di caratteristiche quali l'Asimmetria della lesione, la regolarità dei Bordi, la variazione del Colore, il Diametro e l'Evoluzione, o tempistica di crescita, della lesione. L'area circostante deve essere valutata per possibili lesioni satellite o metastasi in transito (107). Infine, è necessaria un'accurata ispezione della superficie cutanea rimanente. Le lesioni con un'apparenza benigna vanno comunque documentate e bisogna analizzare anche tutti i linfonodi drenanti (38). Una volta che una

lesione viene considerata sospetta, la diagnosi deve essere confermata mediante biopsia e successivo esame istopatologico.

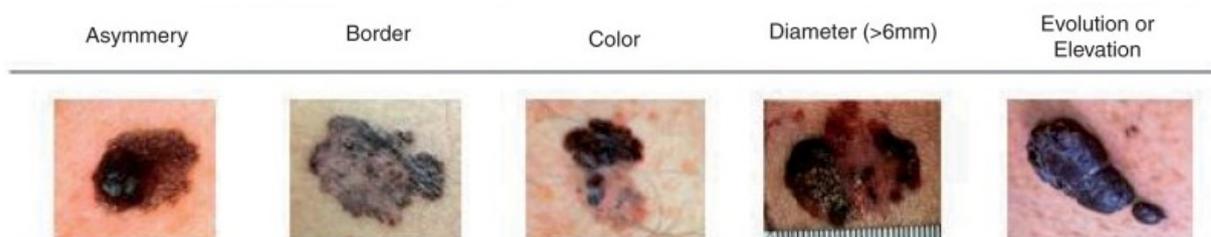


Figura 2. Sistema ABCDE per la diagnosi del melanoma.

Il campionamento della lesione può essere eseguito attraverso la biopsia escissionale oppure la biopsia parziale.

Considerando che la profondità verticale di invasione è un fattore prognostico molto importante, la biopsia escissionale dell'intero campione è il metodo più efficace per consentire una corretta diagnosi e pianificare il successivo trattamento.

In alternativa viene eseguita la biopsia parziale che può essere effettuata attraverso la tecnica *punch* o la tecnica *shave*. La biopsia punch permette di eseguire un saggio a pieno spessore (38). Tuttavia, è un intervento che spesso può prolungarsi a causa dell'applicazione di un'adeguata sutura della ferita. La biopsia shave invece è facile da effettuare e normalmente non richiede sutura, ma presenta dei rischi legati alla formulazione di errori per quanto concerne l'interpretazione istopatologica e la successiva stadiazione; ciò è dovuto al fatto che durante l'intervento viene asportato solo un segmento della lesione (38, 109).

Le analisi istopatologiche contribuiscono a formulare la diagnosi corretta, distinguendo in maniera netta il melanoma dalle lesioni benigne.

1.1.8 Fattori prognostici

Molte caratteristiche valutate durante l'analisi istopatologica rappresentano importanti fattori prognostici come lo spessore di Breslow (mm), il sottotipo istologico, il tasso mitotico dermale, lo stato dei margini (in periferia e in profondità), la presenza di ulcerazioni, di microsatellitosi, di linfociti infiltranti il tumore (TILs), la regressione cellulare, l'invasione angiolinfatica, la fase di crescita verticale, il neurotropismo, e la desmoplasia. In aggiunta dovrebbero essere riportati i livelli di spessore secondo il metodo di classificazione di Clark per lesioni di spessore <1 mm (37). Relativamente a quest'ultimo parametro, è necessario precisare che i livelli di Clark sono indicativi dell'approfondimento del melanoma negli strati dell'epidermide.

1.1.9 Classificazione istopatologica

I sottotipi istologici primari del melanoma includono il melanoma a diffusione superficiale, nodulare, la lentigo maligna, il melanoma lentiginoso acrale, la forma desmoplastica e quella amelanotica (110).

Il sottotipo a diffusione superficiale, comprende circa il 70% dei melanomi, è quello più comune e deriva da un nevo esistente. I melanomi nodulari sono caratterizzati dall'assenza della fase di crescita radiale, hanno un aspetto variabile e una vigorosa invasione verticale. La lentigo maligna è meno comune, di solito mostra una lenta progressione e frequentemente

appare in aree esposte al sole come faccia e testa. Il melanoma lentiginoso acrale ha un'alta incidenza in pazienti con una pigmentazione della cute più scura e normalmente si verifica sui palmi delle mani, sotto la pianta dei piedi e negli spazi subungueali. I melanomi desmoplastici sono lesioni non comuni che si riscontrano di solito in pazienti anziani e sono caratterizzati da poche cellule del mandrino e atipia cellulare minima. Il melanoma amelanotico è caratterizzato da assenza di pigmentazione ed è raro (38).

1.1.10 Stadiazione

Il TNM (Tumor-Nodes-Metastasis) è il sistema più diffuso per la classificazione dello stadio di un tumore, è stato creato dalla AJCC (American Joint Committee on Cancer) e dà importanti informazioni sulla prognosi e sulla sopravvivenza.

La stadiazione del melanoma dipende da valutazioni cliniche e da conferme istopatologiche (38, 111) e fornisce informazioni in merito all'accrescimento locale della neoplasia nonché alla sua diffusione nel resto del corpo. Il melanoma è caratterizzato da 5 stadi.

Lo Stadio 0 è relativo al melanoma *in situ* ed è caratterizzato dalla presenza di cellule tumorali identificate microscopicamente, ma che non sono penetrate nell'epidermide (112). Gli stadi I e II si riferiscono ad una lesione che si accresce nella zona in cui si è sviluppato il tumore primario (T), senza coinvolgimento di strutture limitrofe (linfonodi) o distanti (altre parti del corpo). Lo stadio III indica la diffusione del tumore primario ai linfonodi (N), mentre lo stadio IV certifica la presenza di metastasi (M) a distanza.

1.1.11 Terapia chirurgica

Se diagnosticato precocemente il melanoma localizzato può essere rimosso chirurgicamente con una buona prognosi (113). Quando diventa metastatico tuttavia, si trasforma in una neoplasia più aggressiva e difficile da trattare (114). Inoltre, la gestione del melanoma metastatico si complica se il tumore diventa non resecabile o se si ripresenta poco dopo la resezione (115).

Oltre la chirurgia, altre strategie terapeutiche comprendono la chemioterapia, la radioterapia, la terapia mirata e l'immunoterapia.

La chirurgia rimane il trattamento principale del melanoma primario ed è quasi sempre risolutiva. La sua modalità di esecuzione dipende dallo stadio e quindi differisce tra malattia localizzata, estesa a livello regionale e metastatica.

L'ampia escissione locale è la cura attuale per il melanoma cutaneo localizzato e il margine di escissione è determinato dallo spessore di Breslow (116).

Tra i possibili interventi chirurgici c'è la chirurgia micrografica di Mohs (MMS), una procedura che prevede l'escissione tangenziale graduale dei margini del campione fino alla cute apparentemente normale, seguita da un esame microscopico immediato dell'intero margine. È una tecnica utilizzata per la lentigo maligna e non è indicato per il melanoma invasivo. Il vantaggio di questa tecnica è che il tessuto viene risparmiato (117).

La principale caratteristica dei tumori maligni oltre all'aggressività locale, dovuta alla capacità di infiltrare tessuti e strutture circostanti, è quella di disseminare metastasi per via linfatica. Nella diffusione per via linfatica, le cellule tumorali migrano dal tumore primario ai linfonodi, dove stazionano temporaneamente. Successivamente possono passare in altri linfonodi fino a

riversarsi nel torrente circolatorio. A questo punto le cellule trasportate dal sangue possono colonizzare varie parti dell'organismo riproducendo il tumore da cui sono originate.

Il linfonodo sentinella è il primo linfonodo ad essere raggiunto dalle metastasi di un tumore che diffonde per via linfatica. È importante verificare l'eventuale coinvolgimento dei linfonodi locoregionali che drenano la linfa dal tumore. Tale verifica ha un notevole impatto sulla prognosi.

La biopsia dei linfonodi sentinella (SLNB) è fondamentale quando esiste il rischio di metastasi nei linfonodi regionali (118). Inoltre, è il miglior predittore di recidiva e di sopravvivenza (119). La SLNB è eseguita per i melanomi $\geq 1,0$ mm. Nei pazienti ad alto rischio con melanoma tra 0,75 e 1,00 mm raramente viene indicata, mentre nei pazienti con melanomi di spessore $< 0,75$ mm non viene mai considerata (120).

Le complicanze della SLNB comprendono infezione, linfedema, ematoma/sieroma e danno ai nervi sensoriali (121).

La linfoadenectomia è l'eliminazione di una serie di stazioni linfonodali poste nell'area di drenaggio di un tumore, dove è più probabile la presenza di metastasi.

Il coinvolgimento linfonodale regionale può essere diagnosticato citologicamente mediante aspirato con ago sottile o biopsia guidata da immagini. La linfoadenectomia è il trattamento preferito nei pazienti con coinvolgimento linfonodale regionale da melanoma (122). Poiché il melanoma ha un alto rischio di coinvolgimento di più linfonodi regionali all'interno di un bacino linfonodale, a volte è necessaria una linfoadenectomia regionale completa (123).

Mentre le metastasi satellite si verificano entro 2 cm dal tumore primario, le metastasi in transito comprendono qualsiasi metastasi della cute o sottocutanea che si trova a più di 2 cm

dalla lesione primaria, ma non oltre il bacino linfonodale regionale (124). Il modo più appropriato di eliminarle è costituito dalla metastasectomia (125).

1.1.12 Chemioterapia

La Dacarbazina (DTIC) è stato il primo trattamento chemioterapico approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per il melanoma metastatico (126). La Temozolomide, un derivato della DTIC, ha la capacità di attraversare la barriera emato-encefalica ed è quindi un farmaco molto utile per trattare le metastasi cerebrali (127).

1.1.13 Radioterapia

La radioterapia è utilizzata per curare pazienti con malattia agli stadi avanzati. Tale terapia è fondamentale in caso in cui il paziente non possa essere sottoposto ad intervento chirurgico oppure nel caso di lentigo maligna. Inoltre, per i pazienti con malattia che prevede interessamento linfonodale, la radioterapia adiuvante successiva alla linfadenectomia previene efficacemente le recidive locali e regionali. Invece per i pazienti con malattia metastatica, la radioterapia garantisce un'efficace riduzione dei sintomi (terapia palliativa).

La radioterapia agisce inducendo il danno al DNA delle cellule tumorali. Tuttavia, il melanoma è un tumore caratterizzato da una spiccata radioresistenza. Questo ostacolo è stato superato con l'evoluzione delle tecniche di imaging come la tomografia computerizzata ad alta risoluzione, l'imaging a risonanza magnetica (MRI), la tomografia a emissione di positroni (PET), e da miglioramenti nelle tecniche di emissione delle radiazioni (128).

La lentigo maligna ha un lento tasso di crescita e difficilmente metastatizza. La chirurgia è di solito il trattamento elettivo. Tuttavia, la popolazione più frequentemente affetta da tale forma è costituita dagli anziani, nei quali gli interventi chirurgici non sono consigliati (129). Inoltre, difficoltà aggiuntive sono date dalla localizzazione e dalla taglia della lesione. Quindi la radioterapia è il trattamento preferito per trattare tale forma di melanoma in quanto sicuro, tollerato ed efficace. Effetti collaterali come il cambiamento della pigmentazione, la telangiectasia e l'eritema sono lievi (130).

La radioterapia adiuvante viene eseguita dopo l'escissione chirurgica ed è consigliata nei pazienti che sono a rischio di recidiva e in quelli con melanoma neurotropico desmoplastico (DNM). Si ricorre alla radioterapia adiuvante anche in caso di spessore del tumore >4 mm, di ulcerazione oppure di satellitosi (131).

La radioterapia è molto efficace anche in qualità di terapia palliativa dei sintomi come dolore, effetto massa, emorragia legata al tumore e irritazione locale della cute o delle lesioni sottocutanee (132). Nuove tecniche come la radiochirurgia stereotassica (SRS) e la radioterapia stereotassica del corpo (SBRT) permettono un controllo locale con tossicità minime.

1.1.14 Terapia mirata

Le mutazioni di BRAF sono associate ad una proliferazione cellulare massiva e incontrollata, conseguente ad una deregolazione del processo apoptotico (133,134). Lo sviluppo di inibitori di BRAF (Vemurafenib e Dabrafenib) ha portato a un miglioramento significativo nella sopravvivenza (135-137). Inoltre, l'inibizione di BRAF ha un effetto di radiosensibilizzazione (138, 139). Tuttavia, tali trattamenti aumentano il rischio di tossicità delle

radiazioni nei confronti della cute, evento che viene scongiurato somministrando ridotte dosi del farmaco (139-142). Diversi studi hanno riportato un aumento della sopravvivenza in pazienti con metastasi cerebrali sottoposti a terapia combinata di inibitore di BRAF e SRS (143-145).

1.1.15 Immunoterapia

I checkpoint immunitari sono un meccanismo di controllo critico per disattivare le risposte delle cellule T e prevenire l'infiammazione distruttiva. I recettori di controllo del sistema immunitario più studiati sono la proteina-4 citotossica associata ai linfociti T (CTLA-4) e la proteina di morte cellulare programmata-1 (PD-1). Il blocco di questi checkpoint immunitari migliora le risposte immunitarie antitumorali mediate dalle cellule T, portando una migliore sopravvivenza e risposte durature nei pazienti.

Gli inibitori di CTLA-4 e PD-1 hanno mostrato un miglioramento della sopravvivenza dei pazienti con melanoma avanzato. In alcuni pazienti è addirittura avvenuta la regressione tumorale. Tuttavia, solo un sottogruppo di pazienti risponde agli inibitori di tali checkpoint immunitari. Ciò evidenzia la necessità di identificare biomarcatori che siano predittivi di risposta.

Sono stati sviluppati diversi anticorpi anti-CTLA-4. Il più promettente è l'Ipilimumab, un anticorpo monoclonale che lega CTLA-4, impedendogli di interagire con i suoi ligandi (CD80 e CD86) (146). È stato dimostrato che l'Ipilimumab aumenta la sopravvivenza dei pazienti trattati ed infatti è stato approvato dalla FDA per la terapia del melanoma in stadio avanzato non resecabile (147). La terapia con Ipilimumab ha addirittura portato risultati promettenti in pazienti con melanoma con metastasi cerebrali, che sono da sempre una popolazione di

pazienti difficile da trattare (148). Recentemente la FDA ha approvato l'utilizzo di Ipilimumab anche a fini adiuvanti (149).

Come il CTLA-4, il PD-1 inibisce l'attività delle cellule T ed è espresso dalle medesime cellule attivate. Mentre CTLA-4 inibisce le cellule T durante la fase di innesco della risposta immunitaria, sembra che PD-1 inibisca le cellule T attivate in uno stadio successivo nei tessuti periferici.

Sono stati sviluppati diversi anticorpi monoclonali anti-PD-1, tra cui Nivolumab e Pembrolizumab, che gli impediscono di interagire con i suoi ligandi PD-L1 (150, 151) e PD-L2 (152).

In uno studio è stata confrontata la terapia combinata Nivolumab e Ipilimumab, con quella condotta utilizzandovi 2 farmaci separatamente (153). La sopravvivenza libera da progressione (PFS) media era rispettivamente di 11,5 mesi, 6,9 mesi e 2,9 mesi.

Anche Nivolumab è stato in seguito approvato dalla FDA sia come monoterapia sia in combinazione con Ipilimumab.

Nonostante questi successi, solo una minoranza di pazienti con melanoma avanzato risponde al blocco del checkpoint, con un tasso di risposta del 10-40% con la monoterapia e fino al 58% con la terapia combinata. Pertanto, risulta necessario individuare biomarker predittivi per identificare i pazienti che hanno maggiori probabilità di trarre beneficio dal blocco dei checkpoint.

Biomarcatori associati all'efficacia del trattamento sono il carico mutazionale del tumore, la presenza di linfociti infiltranti il tumore, l'espressione di PD-L1 e il microbiota intestinale.

La mancata presentazione dell'antigene tumorale dovuta all'assenza di antigeni associati al tumore, è uno dei principali meccanismi attraverso i quali i tumori sfuggono al riconoscimento immunitario mediato dalle cellule T (154,155).

Anche i meccanismi che inibiscono il traffico delle cellule T nel tessuto tumorale causano resistenza agli inibitori del checkpoint immunitario. Ad esempio, le mutazioni di BRAF e di PTEN inducono la produzione di un numero di proteine immunosoppressive che limitano il raggiungimento dei siti tumorali da parte delle cellule T, impedendo quindi lo svolgimento delle relative funzioni effettrici (156,157).

Sono stati anche identificati meccanismi tumore-estrinseci di resistenza al blocco del checkpoint immunitario, inclusi ulteriori recettori del checkpoint immunitario come LAG-3, TIM-3, VISTA e TIGIT che sono espressi dalle cellule T e regolano negativamente le risposte immunitarie (158).

Gli ostacoli relativi a tali meccanismi di resistenza sono stati tuttavia in gran parte superati. Infatti, il trattamento con l'inibitore di BRAF, che è stato approvato dalla FDA per il trattamento del melanoma metastatico positivo per la mutazione BRAFV600E, ha dimostrato indurre un aumento dell'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), la presentazione dell'antigene tumorale e l'infiltrazione delle cellule T (159-163). Inoltre, sono stati sviluppati anticorpi in grado di esercitare un'azione inibitoria nei confronti di LAG-3, TIM-3, VISTA e TIGIT (158, 164).

1.1.16 Terapie combinate

La combinazione della radioterapia con la terapia immunologica determina un aumento della risposta immunitaria antitumorale.

L'impiego della radioterapia migliora la performance del sistema immunitario relativamente a differenti aspetti quali la presentazione dell'antigene, nonché la stimolazione e l'infiltrazione delle cellule T nei confronti del tumore, anche in siti distanti rispetto a quello in cui si è sviluppata la neoplasia primaria (165). Tale effetto, noto con il termine Abscopal, consiste nella regressione tumorale in seguito a radioterapia in un sito secondario rispetto a quello in cui si è originata la lesione primaria (166-170).

A tale proposito, sono stati valutati gli effetti conseguenti al trattamento di pazienti affetti da melanoma avanzato con Ipilimumab associato o meno a radioterapia. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la sopravvivenza complessiva e la sopravvivenza libera da progressione sono significativamente migliorate con la terapia combinata Ipilimumab-radioterapia. Inoltre, non è stato osservato nessun aumento di tossicità nel gruppo Ipilimumab-radioterapia rispetto al gruppo trattato con Ipilimumab da solo (171).

1.2 NICOTINAMIDE N-METILTRASFERASI

1.2.1 Il metabolismo dei farmaci

Una molecola estranea al metabolismo dell'organismo, definita per questo come 'xenobiotico' (dal greco ξένος "straniero" e βίος "vita"), nel momento in cui viene introdotta all'interno dell'organismo stesso, tende ad essere espulsa.

I farmaci rientrano tra i composti xenobiotici e per tale motivo sono espulsi dall'organismo dopo la loro assunzione. Essi possono essere escreti tal quali o subire modificazioni strutturali che ne facilitino l'eliminazione. È quindi di fondamentale importanza che il farmaco sia dotato di una struttura chimica che impedisca, o per le meno renda difficile, la sua immediata eliminazione in modo che possa raggiungere l'organo target ed espletare la propria funzione. I composti xenobiotici possono essere lipofili o idrofili: mentre i primi sono facilmente assorbiti, i secondi tendono ad essere escreti.

Il metabolismo dei farmaci viene espletato in diversi organi, ma la sede principale è rappresentata dal fegato. Tale complesso di reazioni è suddiviso in due distinti pathways: fase I e fase II. Nella fase I (funzionalizzazione) avvengono reazioni di idrolisi e ossidoriduzione, catalizzate da colinesterasi, arilesterasi, epossido idrolasi, alcool deidrogenasi, aldeide deidrogenasi, citocromo P450 monossigenasi, flavina monossigenasi e monoamina ossidasi. Le modifiche apportate in seguito a tali reazioni conferiscono alla molecola un carattere polare volto a garantirne un'escrezione più facile. Durante la fase II (coniugazione) il metabolita viene coniugato ad una molecola altamente polare. Nello specifico, in questa fase avvengono reazioni catalizzate da enzimi citosolici come le glutatione S-trasferasi, le N-acetiltrasferasi, le sulfotrasferasi, le UDP-glucoroniltrasferasi e le metiltrasferasi (172).

Nel metabolismo dei farmaci, e in generale dei composti xenobiotici, un ruolo chiave è svolto dalle metiltrasferasi che possono metilare lo zolfo (S), l'ossigeno (O) e l'azoto (N) (173). In particolare, le tiolo metiltrasferasi (TMT) e la tiopurina metiltrasferasi (TPMT) catalizzano la S-metilazione di composti ad azione farmacologica come la 6-mercaptopurina, la D-penicillamina e il captopril, mentre la catecol-O-metiltrasferasi (COMT) e la fenol O-metiltrasferasi (POMT) catalizzano le reazioni di O-metilazione dei gruppi fenolici delle catecolamine e di alcuni neurotrasmettitori. Infine, enzimi come l'istamina N-metiltrasferasi (HNMT) e la nicotinamide N-metiltrasferasi (NNMT) catalizzano le reazioni di trasferimento di un gruppo metile all'azoto (172).

1.2.2 Omeostasi della nicotinamide

La vitamina B3, conosciuta anche come nicotinamide, niacinamide, niacina o vitamina PP, è il precursore dei composti piridinici come il NAD⁺ (Nicotinamide Adenin Dinucleotide) e il NADP⁺ (Nicotinamide Adenin Dinucleotide Fosfato). Queste due molecole sono di fondamentale importanza nella cellula perché coinvolte in gran parte delle reazioni di ossidoriduzione, in cui svolgono il ruolo di trasportatori di ioni idrogeno ed elettroni. Tali composti prendono parte anche ad altri processi che determinano la rottura del legame β -N-glicosidico, con conseguente liberazione di nicotinamide. Questi processi comprendono:

- la deacetilazione degli istoni e di fattori trascrizionali, effettuata da enzimi NAD-dipendenti come le sirtuine (o istone-deacetilasi) (174, 175),

- la produzione di cADPR e NaADP che rappresentano molecole effettrici, derivanti dalla catalisi della molecola CD38, in grado di stimolare la mobilitazione delle riserve intracellulari di calcio (175),
- l'ADP-ribosilazione di proteine da parte delle mono-ADP-ribosiltrasferasi (ARTs) e delle poli(ADP-riboso) polimerasi (PARPs) (174).

La nicotinamide presente nell'organismo proviene da diverse fonti. Infatti, può essere introdotta con la dieta e in seguito venire assimilata a livello gastro-intestinale attraverso un meccanismo di trasporto transmembranario dose-dipendente (176). In alternativa può essere sintetizzata mediante il pathway della chinurenina, una via metabolica che conduce alla conversione di L-triptofano in acido chinolinico e NAD⁺ (177). Tuttavia la quantità di nicotinamide ottenuta da questa via è abbastanza ridotta poiché il tasso di conversione precursore:vitamina è di 60:1 (178). Un'ultima fonte sono le riserve di NAD⁺ presenti nel fegato (storage NAD⁺) dove la catalisi espletata dalle NAD-glicoidrolasi determina il rilascio della nicotinamide direttamente nel circolo ematico.

Il fegato riveste un ruolo fondamentale nel mantenimento costante dei livelli di nicotinamide, poichè rappresenta anche la sede principale in cui ha luogo il processo che segna il destino catabolico della nicotinamide, attraverso la reazione di metilazione dell'azoto piridinico. In seguito all'espletamento di tale catalisi, la nicotinamide viene concentrata a livello renale e successivamente escreta per via urinaria. La nicotinamide metilata può inoltre andare incontro ad una reazione di ossidazione, con conseguente formazione di composti di natura piridonica anch'essi escreti con le urine (179).

1.2.3 Caratterizzazione dell'NNMT umana

L'enzima nicotinamide N-metiltrasferasi (NNMT) agisce a livello della fase II del metabolismo dei farmaci. Tale proteina è localizzata nel citosol ed è in grado di metilare l'azoto piridinico della nicotinamide e altri di analoghi strutturali della piridina, utilizzando l'S-adenosil-L-metionina come donatore di gruppo metilico. Come precedentemente anticipato, la nicotinamide metilata (N1-metilnicotinamide o MNA) può subire due destini differenti: essere ossidata da parte dell'aldeide ossidasi, con formazione di composti quali l'N1-metil-2-piridone-5-carbossiamide e l'N1-metil-4-piridone-3-carbossiamide, oppure essere eliminata tal quale attraverso la via urinaria (180). In seguito alla donazione del gruppo metile alla nicotinamide, la S-adenosil-L-metionina viene convertita in S-adenosil-L-omocisteina che successivamente viene scissa in omocisteina ed adenosina (Figura 3).

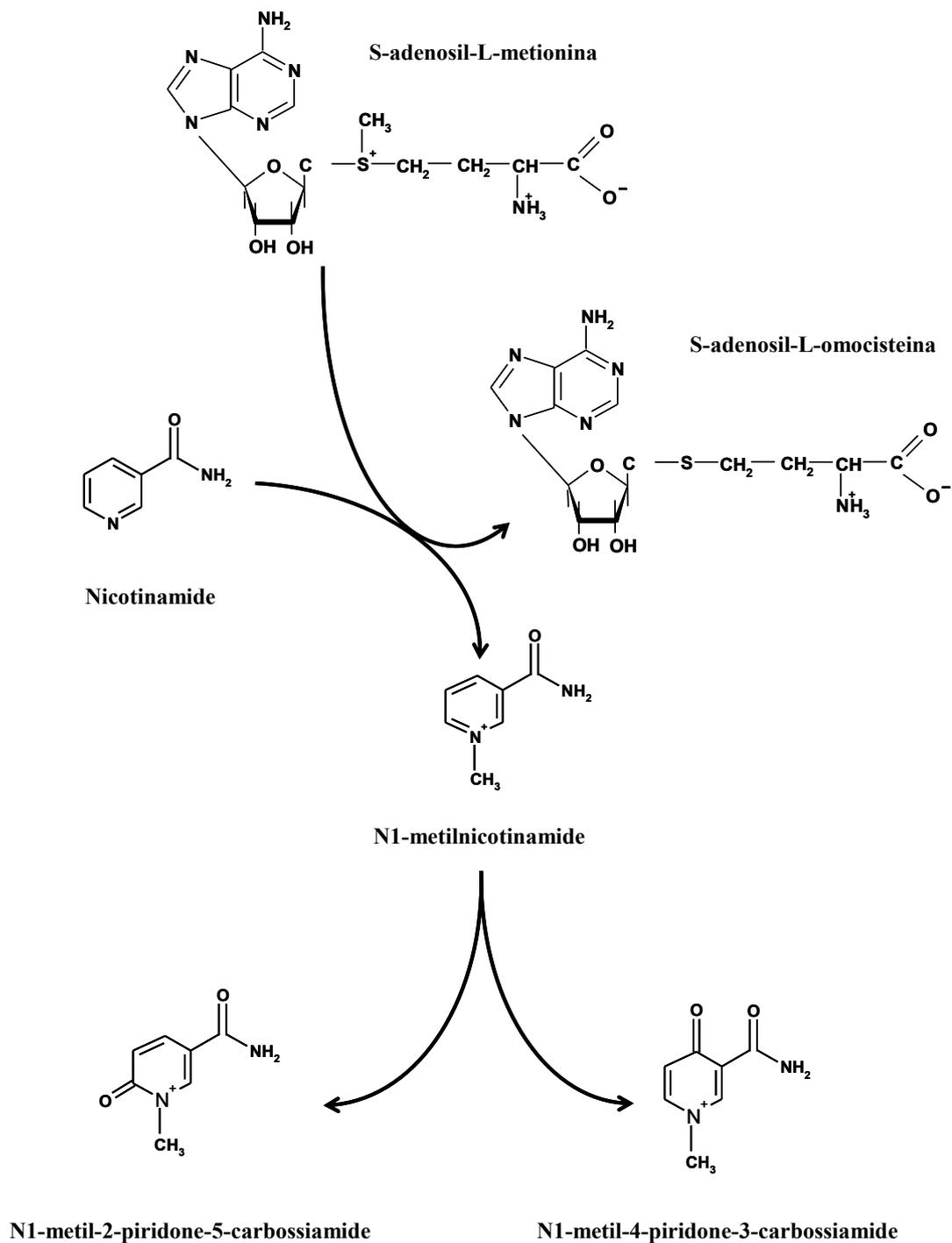


Figura 3. Reazione di metilazione della nicotinamide e di ossidazione dell’N1-metilnicotinamide, catalizzate rispettivamente dall’NNMT e dall’aldeide ossidasi.

La caratterizzazione dell'NNMT umana è stata in prima istanza condotta su estratti di tessuto epatico, attraverso un saggio che prevede:

- l'allestimento di una miscela contenente [^{14}C] CH_3]S-adenosil-L-metionina,
- l'estrazione dell'N1-metilnicotinamide mediante alcol isoamilico al 60% in toluene, con acido 1-eptansolfonico in qualità di modificatore di fase,
- la separazione e l'identificazione dell'N1-metilnicotinamide attraverso cromatografia a fase inversa in HPLC,
- il dosaggio della radioattività attraverso l'ausilio di uno scintillatore liquido.

L'enzima mostra una localizzazione citoplasmatica e lavora in condizioni ottimali ad un valore di pH intorno a 7,4. I valori di K_m calcolati per la nicotinamide e per l'S-adenosil-L-metionina sono rispettivamente 347 μM e 1,76 μM . L'attività specifica dell'enzima negli estratti da tessuto epatico era pari a $51,5 \pm 32,5$ U/mg. A carico dei campioni tissutali analizzati è stata identificata una notevole variabilità dei valori di attività (181); tuttavia tali evidenze sono state riscontrate a livello di altre metiltrasferasi e sono state attribuite a fenomeni di polimorfismo genetico (172). La popolazione analizzata in questo studio è caratterizzata da una distribuzione di frequenza che presenta un andamento bimodale ed il 25% dei campioni ha mostrato elevati valori di attività specifica. Tali risultati avvalorano l'ipotesi secondo cui la regolazione dell'attività dell'NNMT può essere influenzata dalla presenza di mutazioni puntiformi a livello del gene codificante l'enzima. Tuttavia, l'analisi della sequenza nucleotidica del gene per l'NNMT, relativa alla 3'- e 5'-UTR, alle regioni esoniche, introniche e del promotore, ha mostrato che le differenze nei livelli di attività dell'enzima precedentemente rilevate, non sono attribuibili alla presenza di polimorfismi.

Successivamente l'analisi degli effetti determinati dai prodotti di reazione, dagli inibitori di altre metiltrasferasi o ioni metallici, ha mostrato che l'N1-metilnicotinamide e l'S-adenosil-L-omocisteina esercitano il potere inibitorio maggiore (182).

La purificazione parziale della proteina nativa da tessuto epatico è avvenuta attraverso cromatografia a scambio ionico seguita da gel filtrazione. Il campione ottenuto è stato sottoposto ad elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) e, in seguito a "photoaffinity labeling", è stata determinata una massa molecolare relativa all'NNMT pari a 29,6 kDa.

Il cDNA per l'NNMT è costituito da una regione di 792 bp codificante per una proteina di 264 aminoacidi (Figura 4). La proteina umana ricombinante è stata caratterizzata a livello biochimico mediante clonaggio ed espressione in cellule COS-1, e successivo confronto con l'enzima nativo parzialmente purificato da tessuto epatico. Da questa analisi comparativa (enzima nativo ed enzima ricombinante) è emerso che i valori dei parametri cinetici determinati non differiscono in maniera significativa. Infatti:

- le K_m per la nicotinamide pari a 0,43 mM e 0,38 mM,
- le K_m per l'S-adenosil-L-metionina pari a 1,8 μ M e 2,2 μ M,
- le IC_{50} per l'N1-metilnicotinamide pari a 60 μ M e 30 μ M (183).

Ulteriori analisi hanno dimostrato che il gene codificante l'NNMT umana è localizzato sul cromosoma 11, nella regione q23.1. La sua sequenza nucleotidica è costituita da 3 esoni e 2 introni con una lunghezza complessiva di 16,5 Kb. Il sito d'inizio della trascrizione è stato identificato in posizione -108 rispetto alla prima tripletta codificante, 30 nucleotidi a valle di una atipica sequenza TATA box (TCTAA) (184). Il gene è posto sotto il controllo di un promotore forte, posizionato 700 nucleotidi a monte del sito d'inizio della trascrizione (185).

Successivi studi hanno dimostrato che HNF-1 β , TGF- β 1, STAT3 e IL-6 sono fattori in grado di influenzare l'attività trascrizionale del gene per l'NNMT.

```

1  atggaatcaggcttcacctccaaggacacctatctaagccattttaac  48
1  M E S G F T S K D T Y L S H F N  16
49 cctcgggattacctagaaaaatattacaagtttggttctaggcactct  96
17 P R D Y L E K Y Y K F G S R H S  32
97 gcagaaagccagattcttaagcaccttctgaaaaatcttttcaagata 144
33 A E S Q I L K H L L K N L F K I  48
145ttctgcctagacgggtgtgaaggagacctgctgattgacatcggctct 192
49 F C L D G V K G D L L I D I G S  64
193ggccccactatctatcagctcctctctgcttgtgaatcctttaaggag 240
65 G P T I Y Q L L S A C E S F K E  80
241atcgtcgtcactgactactcagaccagaacctgcaggagctggagaag 288
81 I V V T D Y S D Q N L Q E L E K  96
289tggctgaagaaagagccagaggcctttgactgggtccccagtggtgacc 336
97 W L K K E P E A F D W S P V V T 112
337tatgtgtgtgatcttgaaggaacagagtcaagggtccagagaaggag 384
113 Y V C D L E G N R V K G P E K E 128
385gagaagttgagacaggcgggtcaagcagggtgctgaagtgtgatgtgact 432
129 E K L R Q A V K Q V L K C D V T 144
433cagagccagccactgggggccccttaccctccggctgactgcgtg 480
145 Q S Q P L G A V P L P P A D C V 160
481ctcagcacactgtgtctggatgccgcctgccagacctccccacctac 528
161 L S T L C L D A A C P D L P T Y 176
529tgcagggcgctcaggaacctcggcagcctactgaagccagggggcttc 576
177 C R A L R N L G S L L K P G G F 192
577ctggtgatcatggatgcgctcaagagcagctactacatgattggtgag 624
193 L V I M D A L K S S Y Y M I G E 208
625cagaagttctccagcctccccctgggcccggaggcagtagaggctgct 672
209 Q K F S S L P L G R E A V E A A 224
673gtgaaagaggctggctacacaatcgaatggtttgaggatctcgcaa 720
225 V K E A G Y T I E W F E V I S Q 240
721agttattcttccaccatggccaacaacgaaggacttttctccctgggt 768
241 S Y S S T M A N N E G L F S L V 256
769gcgaggaagctgagcagaccctgtga 792
257 A R K L S R P L - 264

```

Figura 4. Sequenza codificante dell'NNMT umana. I colori differenti rappresentano i diversi esoni. È indicata anche la sequenza amminoacidica della proteina tradotta.

STAT3 è un fattore trascrizionale attivo in forma fosforilata. Studi eseguiti su cellule embrionali renali hanno indicato un aumento dell'attività del promotore dell'NNMT in seguito ad attivazione (mediante fosforilazione) di STAT3 indotta da LIF (Leukemia Inhibitory Factor) ed interleuchina 6 (IL-6). Su cellule di carcinoma mammario, epatico e coloretale sono stati inoltre intrapresi studi che hanno mostrato elevati livelli di NNMT in seguito a trattamento con IL-6 (186).

L'associazione tra l'overespressione di HNF-1 β e quella dell'NNMT è stata riscontrata in linee cellulari di carcinoma tiroideo di tipo papillare. Infatti, in seguito all'introduzione di mutazioni puntiformi nella regione del promotore dell'NNMT ospitante il sito di legame per HNF-1 β , è stata osservata una diminuzione dell'attivazione del promotore che ha consentito di dimostrare il ruolo chiave svolto da HNF-1 β nell'attività trascrizionale dell'NNMT (187).

Studi condotti nell'insulinoma hanno suggerito che anche la citochina TGF- β 1 è coinvolta nella regolazione dell'espressione dell'NNMT. Infatti, i risultati hanno dimostrato che i livelli di TGF- β 1 e dell'NNMT sono ridotti nel tumore rispetto al tessuto sano (188).

Elevati livelli di RNA messaggero per l'NNMT sono riscontrabili nel fegato, ma una discreta abbondanza è stata riscontrata anche in altri organi e tessuti come placenta, rene, polmone, muscolo scheletrico, cuore, milza, prostata, timo, testicolo, intestino, ovaio, stomaco, tiroide, midollo spinale, linfonodi, trachea, ghiandola surrenale, midollo osseo (174, 183) e in particolari aree del sistema nervoso.

La risoluzione della struttura tridimensionale dell'NNMT è stata ottenuta da analisi di diffrazione a raggi X, condotte su cristalli ricavati a partire dalla proteina ricombinante umana purificata ad omogeneità. Inoltre, esperimenti di mutagenesi sito-diretta hanno permesso di comprendere che i residui aminoacidici tirosina 20 (Y20) e acido aspartico 197 (D197) svolgono un ruolo fondamentale nell'espletamento della catalisi enzimatica (Figura 5) (189).

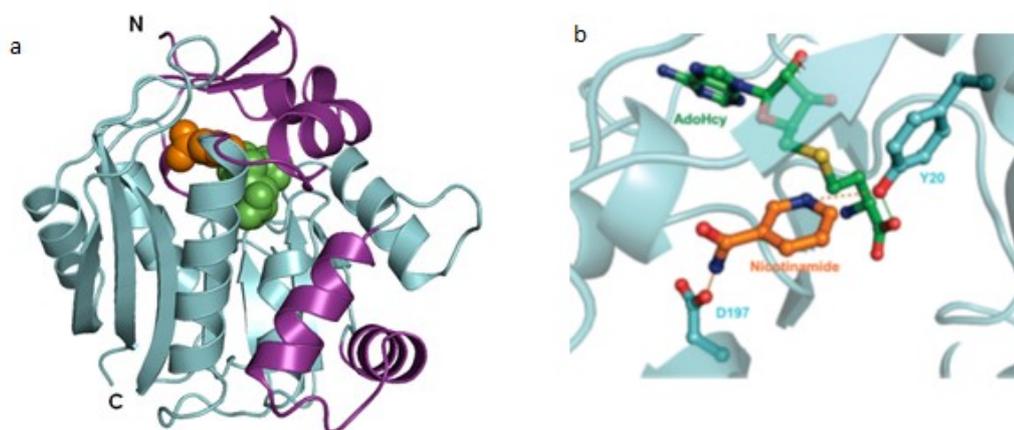


Figura 5. Struttura tridimensionale dell'NNMT umana ricombinante in complesso con nicotinamide e S-adenosil-L-omocisteina (a). Sito attivo e principali residui aminoacidici (Y20 e D197) coinvolti nella catalisi enzimatica (b).

Nonostante la nicotinamide rappresenti il substrato d'elezione dell'NNMT, i risultati di uno studio condotto sulla proteina suina nativa, purificata ad omogeneità, dimostrano che l'enzima agisce cataliticamente su composti piridino-simili (190). Per tale motivo sono state condotte analisi successive in modo da approfondire tale aspetto legato alla specificità di substrati dell'enzima. I risultati ottenuti evidenziano che l'attività metilante dell'NNMT umana ricombinante può inoltre essere esercitata a carico del norharman (NH), un composto piridino-derivato in grado di esercitare un effetto inibitorio notevole nei confronti del complesso I della catena respiratoria. L'accumulo di tale molecola a livello del sistema nervoso centrale, in modo specifico a livello dei neuroni dopaminergici, rappresenta un tratto eziopatogenetico del morbo di Parkinson (PD). In particolare, l'enzima catalizza la reazione di metilazione dell'NH portando alla formazione del 2-N-metilnorharman (MeNH) e mostra nei confronti di tale substrato un'affinità ancora maggiore rispetto a quella rilevata per la nicotinamide (191).

Inoltre, l'NNMT è in grado di metilare la 4-fenilpiridina, con conseguente formazione dello ione N-metil-4 fenil piridinio (MPP⁺), una neurotossina il cui accumulo, a livello dei neuroni dopaminergici, rappresenta un ulteriore tratto istopatologico caratterizzante il PD (192).

Di recente è stato messo a punto un rapido saggio per la determinazione dell'attività dell'NNMT che consente di individuare substrati alternativi e inibitori dell'enzima. Questo saggio, eseguito tramite l'accoppiamento della cromatografia liquida con la spettrometria di massa (UHP-HILIC-MS), ha consentito sia di valutare un ampio spettro di composti piridino-simili come potenziali substrati dell'enzima ma anche di identificare l'efficacia di molecole in grado di esercitare azione inibitoria nei confronti dell'enzima (193, 194).

1.2.4 Ruolo dell'NNMT nelle patologie non neoplastiche

Nei pazienti affetti da cirrosi sono stati riscontrati elevati livelli di MNA rispetto ai soggetti sani, sia in condizioni basali sia in seguito a carico orale di nicotinamide. Questi dati evidenziano che la metilazione della nicotinamide è esaltata dallo stato cirrotico (195).

L'MNA mostra spiccate proprietà anti-infiammatorie e anti-trombotiche. A livello dermatologico, la sua applicazione topica è risultata efficace per la cura di disturbi come l'*acne vulgaris* e la dermatite da contatto (196). Probabilmente la capacità di ridurre l'adesione delle cellule pro-infiammatorie a livello dell'endotelio vascolare da parte dell'MNA, è alla base di questa azione anti-infiammatoria (197).

In topi in cui è stata indotta l'insorgenza di trombosi arteriosa e venosa, il trattamento con MNA esercita un effetto anti-aggregante attraverso l'azione della prostaciclina (PGI₂) prodotta mediante cicloossigenasi-2 (COX-2) (198). Nei topi affetti da aterosclerosi invece, è emerso un aumento dell'attività dell'NNMT epatica e dei livelli plasmatici di MNA, in

maniera proporzionale alla progressione della malattia. Considerando le proprietà possedute dall'MNA, l'overespressione dell'NNMT nell'aterosclerosi potrebbe rappresentare un meccanismo in grado di contrastare i processi di infiammazione vascolare, associati a tale disturbo (199). Altri studi eseguiti su topi in cui è stata indotta l'epatite in seguito a somministrazione orale di concanavalina A (ConA), hanno anch'essi dimostrato un incremento della concentrazione di MNA plasmatica e dell'attività dell'enzima a livello epatico. Tali dati sottolineano ulteriormente il ruolo anti-infiammatorio ed epatoprotettivo dell'MNA, espletato attraverso meccanismi PGI₂-dipendenti (200). Inoltre, in topi sottoposti ad esercizio fisico prolungato, è stato riscontrato un incremento dell'MNA plasmatica ed un aumento dell'attività dell'NNMT nel fegato. Tuttavia, lo stesso trattamento in topi knockout per IL-6 non ha determinato cambiamenti nell'attività epatica dell'NNMT, mentre ha indotto un aumento dell'MNA nel plasma. Tali evidenze indicano che IL-6 è in grado di promuovere la trascrizione dell'NNMT, evento che determina un incremento dell'attività catalitica dell'NNMT nel fegato (201). Esperimenti su topi IL-6(+/+) e IL-6(-/-) in cui è stata indotta l'epatite mediante ConA, hanno dimostrato che il rilascio dell'MNA nella fase precoce dell'epatite è IL-6 dipendente (202).

In linee cellulari trasformate di carcinoma epatico umano (Huh7), in cui è stata indotta l'espressione delle proteine del core del virus dell'epatite C (HCV), sono stati rilevati aumentati livelli dell'NNMT (203). Successivamente è stato notato un aumento dell'espressione del gene per l'NNMT a carico di campioni biotici di tessuto renale umano asportato in seguito a rigetto acuto dopo allotrapianto.

Nell'insieme tutte queste evidenze suggeriscono che l'aumento dei livelli dell'NNMT è strettamente associato allo stato infiammatorio (174). In studi recenti su topi in cui è stata indotta insufficienza epatica acuta tramite acetaminofene (paracetamolo o APAP) è stato

esaminato il ruolo svolto dall'NNMT. Nel tessuto epatico di topi esprimenti specifiche isoforme proteiche della cheratina 8 (K8) e che mostravano una maggiore suscettibilità allo sviluppo di tale patologia, sono stati riscontrati livelli di NNMT ridotti rispetto ai controlli. L'associazione di tali caratteristiche mostra che l'enzima svolge un ruolo protettivo nei confronti dell'insorgenza e della progressione di tale disturbo (204).

Inoltre, in studi sull'ipertensione polmonare arteriosa (PAH) sono stati analizzati i livelli di attività dell'NNMT e dell'MNA nel plasma. Dopo trattamento con monocrotalina, i topi che sviluppavano questo disordine ipertensivo hanno mostrato un aumento dei livelli di attività dell'NNMT epatica e polmonare oltre che un aumento dell'MNA plasmatica, ed entrambe le condizioni sono risultate essere strettamente correlate con la progressione della malattia. Sulla base del ruolo vaso-protettivo esercitato dall'MNA, l'attivazione del pathway NNMT-MNA potrebbe rappresentare una strategia di compensazione in grado di contrastare l'avanzamento della PAH (205).

Analisi eseguite sul tessuto muscolare di soggetti affetti da bronco pneumopatia cronica ostruttiva (COPD) hanno rilevato un'aumentata espressione dell'NNMT (206) che sembra essere correlata alla gravità della patologia (207). In seguito, studi condotti su cellule mioblastiche in coltura hanno indicato come l'overespressione dell'NNMT determini un aumento della capacità proliferativa e della migrazione cellulare, e in aggiunta protegga le stesse cellule dai danni indotti dai radicali dell'ossigeno. Ciò suggerisce che l'elevata espressione dell'enzima nei muscoli scheletrici di pazienti affetti da COPD favorisca probabilmente la rigenerazione delle cellule muscolari e costituisca un meccanismo di difesa nei confronti dello stress ossidativo, associato a tale disturbo (208).

La protezione dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte dell'NNMT è stata dimostrata anche nel danno delle cellule tubulari prossimali renali e nella conseguente

disfunzione renale. In particolare, è stato evidenziato come l'MNA riduca la lipotossicità a carico delle cellule tubulari renali in termini di stress ossidativo, apoptosi, necrosi, infiammazione e fibrosi (209). Tuttavia, l'aumento di espressione dell'enzima non sempre costituisce un meccanismo di difesa nei confronti dei ROS. In uno studio condotto su topi trattati con fenobarbitolo, un agente in grado di favorire l'insorgenza dello stress ossidativo attraverso l'attivazione degli enzimi della famiglia del citocromo P450, è stato mostrato un aumento dell'attività dell'NNMT causato dal fenobarbitolo. Tale fenomeno comporta una riduzione dei livelli di nicotinamide destinata alla sintesi di NADH e NADPH, cofattori che intervengono nella catalisi di enzimi che svolgono funzioni antiossidanti. In base agli effetti osservati, l'overespressione dell'NNMT comporterebbe una perdita dei sistemi di protezione nei confronti dello stress ossidativo (210).

Considerando che l'omocisteina è il derivato di uno dei due prodotti di reazione dell'NNMT, sono stati eseguiti studi per valutare la possibile correlazione tra il livello di espressione dell'enzima e l'iperomocisteinemia. In analisi svolte su campioni di tessuto adiposo umano e murino, e su adipociti murini, è stato riscontrato un incremento dei livelli di espressione e di attività dell'enzima associati a un elevato rilascio di omocisteina. In esemplari murini, la somministrazione di una dieta ricca di grassi ha determinato un aumento dell'attività enzimatica. Tale evidenza supporta l'ipotesi secondo la quale l'obesità potrebbe essere associata ad una maggiore espressione ed attività catalitica dell'enzima. Pertanto, l'aumento dei livelli di attività della NNMT determina un incremento della produzione e del rilascio di omocisteina, con conseguente aumento del rischio d'insorgenza di malattie cardiovascolari (211).

Per indagare il ruolo dell'NNMT nella sindrome metabolica, sono stati condotti studi nel tessuto adiposo di ratti Wistar Ottawa Karlsburg W (WOKW), che rappresentano un modello

animale idoneo allo studio di tale disturbo, e di ratti Dark Agouti (DA) di controllo. In questi studi, volti a valutare i livelli di espressione dell'enzima, i livelli aumentati di mRNA, della proteina e dell'attività catalitica dell'enzima rilevati nel tessuto adiposo dei ratti WOKW hanno evidenziato l'importante ruolo svolto dall'enzima nella patogenesi della sindrome metabolica (212).

Nel tessuto adiposo bianco e nel fegato di topi diabetici ed obesi, l'espressione dell'NNMT è aumentata rispetto ai controlli. Inoltre, in seguito all'induzione dell'aumento del dispendio energetico cellulare, il successivo knockdown dell'enzima sembra esercitare un effetto protettivo nei confronti dei danni correlati all'obesità indotta dalla dieta (213). Recenti studi effettuati sul tessuto adiposo di soggetti affetti da insulino-resistenza, mostrano un incremento dell'espressione dell'NNMT e tale aumento risulta essere correlato alla gravità del disturbo (214).

In aggiunta l'NNMT può rappresentare un biomarcatore di arteriopatia obliterante periferica, poiché nei soggetti affetti da questo disturbo sono stati registrati livelli di espressione dell'enzima più alti rispetto a quelli di soggetti sani (215).

Il fegato quindi è l'organo nel quale l'NNMT è maggiormente espressa. Ciò nonostante, il ruolo ricoperto dall'enzima nel metabolismo degli epatociti non è ancora chiaro. In un recente studio eseguito su epatociti murini è stato dimostrato che le alterazioni nel metabolismo del glucosio e del colesterolo, sono determinati dalla modulazione dei livelli di espressione dell'NNMT e che tali effetti sono mediati dall'MNA. Nello specifico fornendo ai topi una dieta ricca di lipidi, il trattamento con MNA comporta una riduzione dei livelli di colesterolo (serico ed epatico) e di trigliceridi (a livello epatico). Ciò è dovuto alla stabilizzazione della proteina SIRT1 da parte dell'MNA, che è in grado di ridurre la degradazione dell'istone deacetilasi, impedendone l'ubiquitinazione (216).

1.2.5 Ruolo dell'NNMT nella malattia di Parkinson

In diverse aree del sistema nervoso centrale, l'NNMT viene espressa in maniera costitutiva. Fisiologicamente i livelli di mRNA relativi all'enzima sono elevati nel midollo spinale, nella medulla e nel lobo temporale, risultano invece ridotti nella porzione cerebellare e nei nuclei subtalamico e caudato. Nel lobo temporale e nel midollo spinale oltre alla proteina è possibile rilevare la sua attività enzimatica (217). L'area cerebellare di soggetti deceduti in seguito a malattia di Parkinson è caratterizzata da un aumento dei livelli proteici dell'NNMT. Tale incremento ha suggerito di svolgere ricerche per identificare un potenziale coinvolgimento dell'NNMT in questo disturbo neurodegenerativo (218).

Diversi studi hanno indagato la possibile neurotossicità dell'MNA e le conseguenze metaboliche della catalisi del substrato preferenziale o di altri substrati alternativi dell'NNMT (219-222). Ad oggi, i dati a disposizione in tale ambito indicano la capacità dell'enzima di indurre una risposta cellulare che contrasta la condizione di stress associata alla malattia di Parkinson. A tal fine andando ad utilizzare come modello sperimentale la linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y, è stato scoperto che l'induzione dell'espressione dell'NNMT comporta una diminuzione della morte cellulare associata ad un aumento dell'attività del complesso I mitocondriale. In aggiunta è stato riscontrato un aumento dei livelli intracellulari di ATP e del rapporto ATP/ADP, indice di disponibilità energetica. Nelle cellule SH-SY5Y prive dell'espressione endogena dell'NNMT, l'incubazione con MNA determina l'insorgenza degli stessi effetti generati dall'espressione dell'enzima. Inoltre, sia il trattamento con MNA sia l'espressione dell'NNMT conferiscono alle cellule una maggior protezione nei confronti dell'effetto citotossico indotto da inibitori del complesso I, quali l'MPP⁺ e il rotenone (223). Studi successivi, condotti sulla medesima linea cellulare e su neuroni dopaminergici mesencefalici murini, hanno evidenziato che l'overespressione

dell'NNMT e il trattamento con MNA inducono un aumento del numero degli assoni e del grado di ramificazione, modificando di conseguenza la morfologia neuronale (224). La linea cellulare SH-SY5Y è stata sottoposta ad altri studi che hanno dimostrato sia l'effetto citoprotettivo dell'NNMT nei confronti di composti ad azione neurotossica (225), sia il ruolo di mediatore della sirtuina 3 nella promozione dell'attività del complesso I mitocondriale e nella sintesi di ATP indotte dall'NNMT (226).

Con lo scopo di elucidare il ruolo svolto dall'NNMT nell'eziopatogenesi del Parkinson, in seguito alla scoperta della sua capacità di metilare l'NH, sono stati intrapresi studi a carico delle cellule SH-SY5Y. Nel liquido cefalorachidiano e nel sistema nervoso centrale di pazienti affetti dalla malattia di Parkinson sono infatti rilevabili elevati livelli di NH. Poichè l'azoto piridinico riscontrabile a livello dell'NH può subire l'N-metilazione da parte dell'NNMT con conseguente formazione di MeNH, un inibitore del complesso I della catena respiratoria, è sorta l'ipotesi secondo cui l'enzima sia in grado di promuovere la progressione della malattia, in quanto responsabile dell'accumulo di composti ad azione neurotossica. Tuttavia, i risultati ottenuti hanno smentito questa ipotesi. È stato infatti dimostrato che la tossicità causata dall'MeNH è minore di quella esercitata dall'NH. L'attività metilante dell'enzima permetterebbe quindi la rimozione dell'NH, proteggendo la cellula dall'azione neurotossica esercitata da tale composto. In aggiunta, le cellule esprimenti l'enzima e trattate con MeNH sono caratterizzate da un incremento della vitalità e dei livelli di concentrazione di ATP, rispetto a cellule in cui l'espressione costitutiva dell'NNMT è assente (191). Nel complesso tutte queste evidenze non solo smentiscono il potenziale ruolo pro-eziopatogenetico dell'enzima nella malattia di Parkinson, ma addirittura gli conferiscono un'importanza significativa nell'ambito dei meccanismi volti a contrastare l'avanzamento del disturbo neurodegenerativo.

1.2.6 Ruolo dell'NNMT nelle neoplasie

L'espressione dell'NNMT risulta significativamente aumentata nel carcinoma orale squamocellulare (OSCC); inoltre i suoi livelli sono inversamente correlati allo stadio, al pT, al grado istologico e alla presenza di metastasi linfonodali (227, 228). L'analisi dell'espressione proteica, effettuata a carico di campioni salivari, ha evidenziato un aumento dei livelli dell'enzima in soggetti affetti da OSCC rispetto a quelli rilevati in individui sani. Tale risultato ha posto le basi per lo sviluppo di un test per la diagnosi precoce e non-invasiva di questa neoplasia (229). Per comprendere il ruolo svolto dall'NNMT nel metabolismo della cellula tumorale relativa a tale neoplasia, sono stati eseguiti esperimenti di silenziamento dell'enzima nelle linee cellulari KB e PE/CA PJ-15 attraverso l'induzione del meccanismo dell'RNA interference (RNAi). La riduzione del livello di espressione dell'NNMT ha determinato una diminuzione della crescita cellulare e del potenziale tumorigenico *in vivo*, evidenziando un possibile coinvolgimento dell'enzima nella proliferazione e nei meccanismi di tumorigenicità della cellula neoplastica (230, 231). Al contrario, l'induzione dell'overespressione dell'NNMT nella linea cellulare HSC-2 è in grado di conferire alla cellula di OSCC una maggiore capacità proliferativa *in vitro* (232).

Uno studio recente focalizzato a comprendere l'associazione tra NNMT e le cellule staminali tumorali (cancer stem cells o CSCs) ha valutato l'espressione dell'enzima nelle cellule tumorali staminali ottenute a partire dalla linea cellulare di carcinoma della laringe Hep-2. I dati ottenuti indicano un'overespressione dell'NNMT nelle popolazioni arricchite in CSCs rispetto alle cellule parentali e conferiscono all'enzima un ruolo rilevante nel metabolismo della cellula tumorale, in considerazione del fatto che le CSCs vengono considerate le principali responsabili dei fenomeni di chemioresistenza e radioresistenza e inoltre sono coinvolte nella possibile recidiva del tumore (233).

L'upregolazione dell'NNMT è stata ormai rilevata in diverse neoplasie, tuttavia il suo ruolo nel processo di tumorigenesi è ancora in parte sconosciuto. Un'indagine a carattere metabolomico ha mostrato che nelle cellule cancerose caratterizzate da un'attività elevata dell'NNMT, si riscontra una significativa riduzione dei livelli di S-adenosil-L-metionina con conseguente alterazione dello stato di metilazione globale della cellula. Si ritiene che questo fenomeno modifichi il quadro epigenetico della cellula neoplastica, causando uno stato di ipometilazione degli istoni potenzialmente associato all'induzione dell'espressione di fattori protumorigenici (234, 235).

Studi di espressione genica, condotti in campioni di glioblastoma multiforme (GBM), hanno consentito di rilevare elevati livelli di RNA messaggero per l'NNMT rispetto ai controlli. I controlli erano costituiti da campioni di tessuto cerebrale rimossi chirurgicamente da pazienti affetti da forme epilettiche particolarmente severe (236). In aggiunta sono stati rilevati elevati livelli di attività dell'enzima e del suo prodotto di reazione in linee cellulari di glioma umano trattate con interferone gamma (237).

L'espressione dell'enzima e del suo potenziale ruolo è stata inoltre valutata in cellule di carcinoma mammario. In particolare, sono state condotte analisi che hanno evidenziato la presenza dell'NNMT in linee cellulari adriamicina-resistenti (MCF-7/ADR), mentre l'espressione dell'enzima non è stata rilevata invece a livello delle cellule progenitrici (MCF-7), sensibili al trattamento con questo farmaco ad azione chemioterapica (238, 239). Un ulteriore studio condotto su linee cellulari di carcinoma mammario ha consentito di rilevare le seguenti evidenze:

- la downregolazione dell'NNMT nelle linee cellulari Bcap-37 e MDA-MB-2 causa una notevole riduzione della crescita cellulare, della capacità di formare colonie *in vitro*, e della tumorigenicità *in vivo*,

- tali linee sono inoltre caratterizzate da una maggiore percentuale di cellule che vanno incontro ad apoptosi e da un significativo aumento della produzione di ROS rispetto alle cellule di controllo,
- l'overespressione dell'NNMT nelle linee cellulari MCF-7 e SK-BR-3 è associata ad un'umentata proliferazione cellulare, ad una maggiore capacità di formare colonie ed una riduzione dell'apoptosi.

I risultati appena elencati indicano che il silenziamento genico dell'NNMT può rappresentare una strategia molecolare per il trattamento del cancro alla mammella (240).

Ulteriori studi si sono focalizzati sulla comprensione dei meccanismi molecolari relativi alla patogenesi del cancro della tiroide, mediante analisi dei profili di espressione genica di linee cellulari di carcinoma tiroideo di tipo papillare, anaplastico, follicolare e midollare. I risultati hanno evidenziato un'overespressione del gene per l'NNMT nell'istotipo papillare. Sono inoltre stati rilevati elevati valori di attività enzimatica rispetto a quelli relativi ad altre tipologie cellulari, al tessuto sano e alle colture primarie di cellule tiroidee. Analisi immunohistochimiche hanno permesso di ottenere risultati che sono in accordo con quelli dell'attività catalitica: a livello tissutale la proteina è abbondante nel carcinoma papillare e follicolare, ma non viene rilevata nel tessuto sano e nell'adenoma follicolare. Inoltre, le indagini immunohistochimiche hanno confermato la localizzazione citoplasmatica dell'NNMT (241).

L'analisi dei profili di espressione genica è stata eseguita anche in pazienti affetti da carcinoma del pancreas e tale analisi, realizzata a partire dall'RNA isolato dal succo pancreatico, ha messo in luce un'elevata espressione del gene per l'NNMT rispetto ai soggetti affetti da patologie non neoplastiche relative al tratto gastrointestinale superiore (242). Successivamente, è stato condotto uno studio su tessuti provenienti da pazienti affetti da

carcinoma pancreatico e da soggetti affetti da pancreatite, al fine di valutare i livelli di espressione dell'NNMT nonché di esaminare la valenza prognostica dell'enzima. Dai risultati si è evinta un'upregolazione dell'NNMT nel tessuto canceroso rispetto al tessuto di controllo. In aggiunta i livelli di espressione dell'enzima nel tessuto canceroso sono significativamente correlati ai principali parametri clinico-patologici come lo stadio, la taglia e il grado di differenziamento del tumore (243). Infine, uno studio condotto sulla linea cellulare di adenocarcinoma pancreatico PANC-1, sottoposta a deprivazione di glucosio, ha dimostrato che il silenziamento dell'NNMT comporta una riduzione della proliferazione delle cellule tumorali, mentre la sua overespressione promuove la crescita e l'invasività delle stesse cellule. Queste evidenze sottolineano il ruolo chiave dell'enzima nella proliferazione cellulare e nel potenziale metastatico delle cellule cancerose pancreatiche sottoposte a stress metabolico (244). L'analisi del metaboloma della linea cellulare PANC-1 mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LS-MS) ha riscontrato elevati livelli di MNA. Questo aumento è significativamente associato ad elevati livelli di mRNA per l'NNMT (245).

Sono state svolte analisi su campioni tissutali provenienti da soggetti affetti da carcinoma coloretale che hanno evidenziato elevati livelli proteici di NNMT nel tessuto canceroso rispetto a quello sano. Al fine di esplorare il potenziale ruolo dell'enzima come marker periferico di questo tipo di carcinoma è stato eseguito uno screening a livello serico a carico di un elevato numero di campioni provenienti da soggetti sani e da pazienti affetti da carcinoma coloretale. I risultati hanno mostrato la presenza di elevati livelli di NNMT nel siero dei soggetti patologici. Considerando che l'NNMT è una proteina citosolica non soggetta a secrezione, il fatto che sia rilevata nel siero fa supporre che nei soggetti affetti da carcinoma coloretale la lesione neoplastica intestinale possa determinare un rilascio dell'enzima a livello

periferico o che la presenza di condizioni patologiche a livello epatico non ancora manifeste (micrometastasi associata a necrosi degli epatociti) induca la traslocazione di parte della proteina nel siero. Di conseguenza la determinazione dei livelli plasmatici dell'NNMT potrebbe avere un'importante significato nella diagnosi precoce del carcinoma coloretale (246). Sulle linee cellulari di carcinoma coloretale HT-29 e SW480 è stata valutata la funzione biologica dell'NNMT mediante rispettivamente esperimenti di silenziamento genico e di overespressione. I risultati hanno dimostrato che l'upregolazione dell'enzima non solo promuove la proliferazione cellulare, aumenta la capacità di formare colonie *in vitro* e la tumorigenesi *in vivo*, ma induce anche una riduzione dell'apoptosi e dei livelli intracellulari di ROS, contestualmente ad un aumento dei livelli di ATP. Inoltre, in seguito a trattamento con MNA si osservano effetti analoghi. Per questo motivo tali risultati suggeriscono un potenziale coinvolgimento dell'NNMT nel bilancio energetico della cellula e nella produzione di ROS (247).

Studi eseguiti su linee cellulari dell'adenocarcinoma coloretale hanno avuto l'obiettivo di valutare l'effetto dell'NNMT sulla sensibilità del 5-fluorouracile (5-FU), un farmaco utilizzato nei protocolli di chemioterapia adoperati per curare questa neoplasia. I risultati indicano che l'espressione dell'enzima esalta la refrattarietà di queste linee cellulari al trattamento con 5-FU. Ciò è principalmente dovuto al fatto che l'NNMT è in grado di determinare un abbassamento dei livelli di ROS, la cui produzione in tale contesto è indotta dal trattamento con 5-FU. Per tale motivo si verifica un'inattivazione del pathway ASK1-p38MAPK che conduce ad una riduzione del tasso di apoptosi 5-FU-associata (248).

Studi di natura proteomica eseguiti su campioni di carcinoma gastrico hanno permesso di rilevare elevati livelli di NNMT nel tessuto canceroso rispetto a quello sano (249). Tale overespressione è stata confermata da studi successivi che, in aggiunta, hanno indagato anche

il potenziale prognostico dell'NNMT. Sulla base dei risultati ottenuti è stata dimostrata l'esistenza di una correlazione tra i livelli di espressione dell'enzima ed i parametri strettamente associati alla sopravvivenza, tra cui la dimensioni del tumore, la presenza di metastasi linfonodali e lo stadio. Inoltre, la downregolazione dell'enzima nelle linee cellulari di carcinoma gastrico comporta una riduzione della proliferazione, della migrazione e dell'invasione cellulare (250).

Elevati livelli serici di NNMT sono stati rilevati tramite il test ELISA in pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) rispetto a soggetti sani e a pazienti affetti da COPD. Grazie ad analisi statistiche svolte in seguito, è stata evidenziata l'importanza della valutazione combinata dei livelli serici dell'NNMT e dell'antigene carcinoembrionario (CEA) per aumentare la sensibilità diagnostica del NSCLC (251). L'analisi dei livelli di espressione dell'enzima NNMT (Real-Time PCR, Western blot e saggio per la determinazione dell'attività catalitica) è stata successivamente condotta in campioni di tessuto tumorale e peritumorale prelevato vicino (1-2 cm) e lontano (>5 cm) rispetto al margine della neoplasia, ottenuti da soggetti affetti da NSCLC. Dai risultati acquisiti si è potuto rilevare un aumento statisticamente significativo dell'espressione dell'NNMT nel tessuto tumorale rispetto a quello peritumorale a livello di messaggero, di proteina e di attività specifica (252). Inoltre, esperimenti di silenziamento genico dell'enzima nella linea cellulare A549 relativa a tale carcinoma, hanno consentito di valutare l'effetto indotto dalla riduzione dei livelli di espressione dell'enzima sul fenotipo della cellula neoplastica. I risultati ottenuti hanno evidenziato che il knockdown dell'NNMT comporta una sensibile riduzione della tumorigenicità *in vitro* (253).

A differenza di quanto riportato finora, in campioni di carcinoma epatocellulare sono riscontrati ridotti livelli di messaggero per l'NNMT rispetto al tessuto sano adiacente. Inoltre,

i livelli di espressione dell'enzima risultano direttamente correlati con lo stadio tumorale e inversamente con la sopravvivenza. Tali osservazioni designano l'NNMT come possibile marcatore prognostico (254).

Per quanto riguarda le neoplasie a carattere urologico, analisi sull'enzima sono state eseguite a carico del tumore della vescica, del rene e della prostata. Nella linea di carcinoma vescicale radioresistente (MGH-UI) sono stati rilevati elevati livelli di messaggero per l'NNMT rispetto a quanto evidenziato nel suo subclone radiosensibile (S40b). Ciò ha sottolineato che l'enzima riveste un ruolo nella responsività cellulare al trattamento radioterapico e il possibile coinvolgimento dell'NNMT nel determinare questa radioresistenza potrebbe essere dovuto alla sua attività catalitica. Infatti, gli elevati livelli di espressione dell'enzima potrebbero determinare una riduzione intracellulare dei livelli di nicotinamide, noto radiosensibilizzante in grado di amplificare il danno prodotto dalle radiazioni a livello cellulare (255). In tale ambito, studi successivi sono stati condotti su CSCs. Cloni di CSCs di origine mesenchimale che overesprimono l'NNMT hanno mostrato una spiccata resistenza al trattamento radioterapico, permettendo di formulare l'ipotesi che gli elevati livelli di enzima possano essere responsabili di radioresistenza. Infatti, l'attività dell'NNMT, poiché abbassa i livelli intracellulari di nicotinamide, determina la rimozione dell'inibizione che questo composto esercita verso le PARPs, e consentendo così la riparazione del DNA danneggiato. Nei cloni radioresistenti sono stati inoltre rilevati elevati livelli di espressione di NAMPT, enzima coinvolto nella sintesi del NAD⁺ a partire dalla nicotinamide. Elevati livelli di NAMPT si tradurrebbero in una maggiore disponibilità di NAD⁺, substrato della PARP nei processi di ADP-ribosilazione (256). In linee cellulari di carcinoma della vescica sono stati eseguiti esperimenti di silenziamento dell'NNMT che hanno mostrato una riduzione della migrazione e della proliferazione cellulare, suggerendo un possibile ruolo dell'enzima nella progressione

tumorale (257). In campioni di tessuto canceroso di pazienti affetti da carcinoma uroteliale della vescica, uno studio recente ha mostrato alti livelli di espressione e di attività enzimatica dell'NNMT. Successive analisi, effettuate su cellule di sfaldamento dell'urotelio provenienti da campioni urinari di pazienti affetti da neoplasia vescicale e da soggetti sani, hanno previsto la valutazione dell'espressione dell'enzima a livello sia di messaggero sia di proteina. I risultati hanno indicato un aumento dei livelli di espressione dell'NNMT nei campioni tumorali rispetto ai controlli. In base a tali scoperte, la determinazione dei livelli di espressione urinaria dell'enzima può essere usata nella diagnosi precoce e non-invasiva del carcinoma uroteliale della vescica (258, 259).

In pazienti affetti da carcinoma renale a cellule chiare sono stati rilevati elevati livelli di messaggero per l'NNMT nel tessuto renale canceroso rispetto a quello sano (260, 261). Analisi immunoistochimiche condotte su campioni di carcinoma renale hanno mostrato una correlazione inversa tra i livelli di espressione dell'enzima e la sopravvivenza dei pazienti (262). Attraverso 2D-PAGE ed analisi immunoistochimica è stata confermata la presenza di elevati livelli di NNMT nei campioni di carcinoma renale a cellule chiare rispetto ai campioni di controllo, nonché una correlazione inversa tra l'espressione dell'enzima e il grado del tumore. Successivamente sul plasma di pazienti affetti da carcinoma renale e di soggetti sani sono stati eseguiti test ELISA che hanno confermato la presenza di maggiori livelli di enzima nei campioni tumorali (263). Un ulteriore studio effettuato su linee cellulari di carcinoma renale a cellule chiare ha messo in evidenza che l'espressione dell'NNMT è in grado di promuovere la capacità invasiva della cellula. Al contrario, in seguito al silenziamento dell'NNMT si assiste ad una diminuzione della crescita tumorale e del potenziale metastatico *in vivo* della cellula tumorale (264). I risultati di un altro studio condotto sul carcinoma renale ha mostrato elevati livelli serici di NNMT nei soggetti patologici rispetto ai controlli,

proponendo l'NNMT come promettente biomarker per la diagnosi precoce dei tumori renali, sia in termini di specificità sia di sensibilità (265).

Analisi immunohistochimiche hanno evidenziato un'overespressione dell'enzima nel carcinoma prostatico rispetto all'iperplasia prostatica benigna. Indagini successive, mirate ad identificare le correlazioni tra i livelli dell'NNMT ed i parametri clinico-patologici, hanno dimostrato che l'espressione dell'enzima è inversamente correlata al grado di differenziamento (Gleason score), suggerendo un potenziale coinvolgimento dell'NNMT nelle fasi precoci della trasformazione maligna del tessuto prostatico. Di recente sono state svolte analisi nei confronti di soggetti affetti da forme più avanzate di carcinoma prostatico che hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione diretta tra i livelli di espressione dell'NNMT e la sopravvivenza. Questi ultimi risultati suggeriscono che l'analisi dell'espressione dell'enzima potrebbe essere utilizzata nella formulazione della prognosi dei pazienti affetti da tale neoplasia (266).

1.3 SCOPO DEL LAVORO

Alla luce degli studi riportati in letteratura, che descrivono un aumento dell'espressione dell'NNMT in molte neoplasie, è risultato interessante intraprendere un lavoro ricerca volto all'esplorazione del potenziale coinvolgimento dell'enzima nel melanoma cutaneo, suddividendo la parte sperimentale in due fasi distinte. In prima istanza, è stato affrontato lo studio dell'espressione dell'NNMT mediante analisi immunohistochimica, condotta su 34 campioni di melanoma e su 34 nevi, utilizzati come controlli. Nel corso della seconda fase, al fine comprendere il ruolo svolto dall'enzima nel metabolismo della cellula tumorale, sono stati effettuati esperimenti di silenziamento dell'NNMT nella linea cellulare di melanoma metastatico umano A375. Per raggiungere tale scopo, le cellule sono state trasfettate con plasmidi codificanti shRNAs che hanno come bersaglio la sequenza dell'RNA messaggero per l'NNMT. Dopo aver saggiato l'efficienza del silenziamento dell'enzima, le cellule sono state assoggettate a saggi volti alla valutazione di aspetti squisitamente correlati alla tumorigenicità, quali la proliferazione (saggio MTT) e la migrazione (wound healing assay) cellulare. Tali analisi sono state condotte al fine di esplorare se la riduzione dell'espressione dell'NNMT fosse in grado di alterare il fenotipo della cellula neoplastica, al fine di verificare la possibilità di utilizzare l'enzima quale target molecolare nella terapia del melanoma cutaneo.

2 MATERIALI E METODI

2.1 CAMPIONI TISSUTALI

2.1.1 Analisi immunoistochimica

L'analisi immunoistochimica è stata effettuata su 68 campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), ottenuti dal Dipartimento di Scienze Biomediche e di Sanità Pubblica dell'Università Politecnica delle Marche.

Dei 68 campioni analizzati, 34 erano relativi a casi di melanoma primario e 34 erano nevi, utilizzati come controlli. Nell'ambito dei 34 pazienti affetti da melanoma, 21 erano uomini e 13 erano donne; l'età media era pari a circa 62 anni. I nevi, utilizzati in qualità di campioni di riferimento, sono stati ottenuti da pazienti che non differivano significativamente per età e sesso rispetto a quelli relativi ai campioni patologici. Le caratteristiche demografiche e i parametri clinico-patologici relativi ai campioni patologici sono riportate nella Tabella 1.

<u>CATEGORIE</u>	
CASI	34
SESSO	
Uomini	21
Donne	13
ETÀ	
Media	62
Range	28 - 96
SPESSORE DI BRESLOW (mm)	
Media	1.76
Range	0.1 - 8
LIVELLO DI CLARK	
I	2
II	5
III	12
IV	13
V	2
NUMERO DI MITOSI (mitosi/mm ²)	
Assenza di mitosi	18
1-5	8
> 5	8
REGRESSIONE	
No	27
Sì	7
ULCERAZIONE	
No	29
Sì	5
FLOGOSI	
No	17
Sì	17
SOTTOTIPO	
Diffusione superficiale	21
Nodulare	9
Acrale lentiginoso	2
Melanoma in situ	2

Tabella 1. Caratteristiche demografiche e parametri clinico-patologici dei pazienti affetti da melanoma.

Mediante l'utilizzo del microtomo, dai blocchetti di tessuto FFPE sono state ottenute sezioni dello spessore di 5 μm , che successivamente sono state montate su vetrini ricoperti da poly-L-lisina. Dopo l'essiccamento a caldo, le sezioni sono state sottoposte a deparaffinizzazione in xilene e a reidratazione mediante immersione in una serie di alcoli a concentrazione decrescente. In seguito, per lo smascheramento dell'antigene, i vetrini sono stati incubati con la soluzione EnVision FLEX Target Retrieval a pH basso (Dako, Carpinteria, California, USA). L'attività perossidasi endogena è stata inibita mediante il trattamento delle sezioni con perossido di idrogeno al 3% per 7 minuti. Dopo un lavaggio di 5 minuti con il tampone EnVision FLEX Wash Buffer (Dako), le sezioni sono state incubate a temperatura ambiente per 1 ora con anticorpo policlonale di coniglio anti-NNMT umana con una diluizione 1:1500 (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). In seguito ad un ulteriore lavaggio, le sezioni sono state sottoposte ad incubazione con EnVision FLEX/HRP (Dako) per 20 minuti. I vetrini sono stati quindi assoggettati a trattamento con la soluzione di lavaggio e sottoposti ad incubazione per 10 minuti con la diaminobenzidina contenuta nella soluzione EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako). Le sezioni sono state colorate con ematossilina di Mayer (Bio-Optica, Milano, Italia) e montate permanentemente sui vetrini. Ogni sezione è stata esaminata al microscopio ottico. Un campione di ccRCC è stato usato come controllo positivo, mentre i vetrini che fungevano da controlli negativi invece sono stati ottenuti sostituendo l'anticorpo primario con le IgG di coniglio.

Tutte le analisi sono state condotte indipendentemente da due esperti non informati sulle caratteristiche clinico-patologiche dei campioni, utilizzando un microscopio ottico collegato ad una fotocamera digitale Nikon DS-Vi1 (Nikon Instruments, Europe BV, Kingston, Surrey, England). Per valutare la variabilità inter- ed intra-osservatore, ogni vetrino è stato analizzato 3 volte. L'accordo fra i due esperti è stato sempre superiore al 95% ed eventuali discrepanze

sono state sanate utilizzando un microscopio ottico a doppia testa, per la valutazione simultanea del caso. Le cellule colorate sono state contate in almeno 10 campi di ampiezza pari a circa 0,7 mm², usando un ingrandimento totale di 400x. L'espressione dell'enzima è stata valutata ed espressa in termini di percentuale di cellule positive rispetto a quelle osservate. Successivamente, i valori percentuali sono stati raggruppati utilizzando un sistema di classificazione a cinque livelli (o score): 0 (0-10%), 1 (10-30%), 2 (30-50%), 3 (50-80%) e 4 (80- 100%).

2.1.2 Analisi statistiche

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il software GraphPad Prism, versione 6.00 per Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA). Le differenze tra i gruppi e le correlazioni tra i livelli di espressione dell'NNMT e i parametri clinicopatologici sono state determinate utilizzando il test U di Mann-Whitney e il test di Spearman. Un valore di p inferiore a 0,05 è stato considerato statisticamente significativo.

2.2 CELLULE IN COLTURA

Per valutare il ruolo dell'NNMT nel metabolismo della cellula tumorale, sono stati effettuati esperimenti *in vitro* utilizzando come modello la linea cellulare A375 di melanoma cutaneo metastatico umano.

2.2.1 Colture cellulari

La linea cellulare A375 di melanoma cutaneo metastatico umano è stata ottenuta dall'American Type Culture Collection (ATCC, CCL-185 Rockville, MD, USA). Le cellule A375 crescono in adesione in DMEM High Glucose, addizionato di siero fetale bovino al 10%, gentamicina 50 µg/ml e glutammina 2 mM. Questa linea cellulare è stata mantenuta in coltura a 37°C in incubatore con atmosfera umidificata al 95% di ossigeno e al 5% di anidride carbonica.

2.2.2 Silenziamento dell'NNMT

A carico della linea cellulare A375 è stato effettuato il silenziamento dell'NNMT attraverso l'RNA interference (RNAi), un meccanismo di silenziamento genico post-trascrizionale basato sull'azione di molecole di RNA a doppia elica (dsRNA) che si legano all'RNA messaggero in maniera sequenza specifica causandone la degradazione. L'RNAi può essere eseguito attraverso l'impiego di 2 tipologie di silenziatore: gli short interfering RNAs (siRNAs) o gli short hairpin RNAs (shRNAs).

Il primo consiste di un oligo a doppio filamento che, una volta acquisito dalla cellula bersaglio mediante trasfezione, determina la degradazione sequenza-specifica dell'RNA

messaggero relativo al gene target (267). Nel secondo caso invece si sfruttano molecole di shRNAs, generalmente codificate a partire da plasmidi utilizzati per trasfettare le cellule oggetto di studio. Una volta all'interno della cellula eucariotica, tali plasmidi vengono riconosciuti dall'RNA Polimerasi III, che è in grado di condurre alla trascrizione delle sequenze relative agli shRNAs. Tali molecole sono costituite da un filamento senso, uno spacer (ansa o loop) ed un filamento antisenso. I filamenti senso e antisenso si appaiano tra loro portando alla formazione di una tipica struttura a “forcina” (hairpin) che, una volta riconosciuta da complessi multienzimatici specifici, va incontro dapprima alla degradazione del loop e successivamente al processo di unwinding, che consiste nella separazione dei due filamenti complementari. Il filamento antisenso andrà quindi a legarsi ad una sequenza complementare presente dell'RNA messaggero del gene target, inducendone la successiva degradazione (Figura 6) (268).

Le cellule A375 sono state seminate in piastre 24-well (4×10^4 cellule per pozzetto). Il giorno successivo alla semina, le cellule hanno raggiunto una confluenza del 70-80%, valore ottimale relativo a tale parametro per essere assoggettate con successo a trasfezione. Le cellule sono state quindi trasfettate mediante l'utilizzo dell'agente di trasfezione liposomiale FuGENE HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, USA). Per ogni campione è stata allestita una miscela di volume pari a 25 μ l contenente 0,5 μ g di DNA plasmidico, 1,5 μ l di FuGENE e terreno DMEM privo di siero e di antibiotico. La miscela a questo punto è stata incubata a temperatura ambiente per 10 minuti e successivamente aggiunta a ciascun pozzetto, contenente 500 μ l di terreno. I plasmidi utilizzati per il silenziamento dell'NNMT sono: pLKO.1-164, pLKO.1-330 e pLKO.1-711 (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO) (Figura 7). Tali vettori si differenziano poiché ognuno di essi ospita la sequenza nucleotidica relativa ad un shRNA contenente un filamento antisenso complementare ad una specifica regione del

messaggero dell'NNMT. Le cellule sono state inoltre trasfettate con una miscela contenente ciascuno dei tre precedenti plasmidi in parti uguali, mantenendo invariati i rapporti tra DNA e FuGENE (1:3). Infine, per valutare l'eventuale interferenza sull'espressione genica data dal solo plasmide, le cellule sono state trasfettate anche con il plasmide pLKO.1-puro (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO) privo dell'insero codificante per l'shRNA. Le cellule utilizzate come controllo (mock), invece, sono state trattate con il solo reagente di trasfezione.

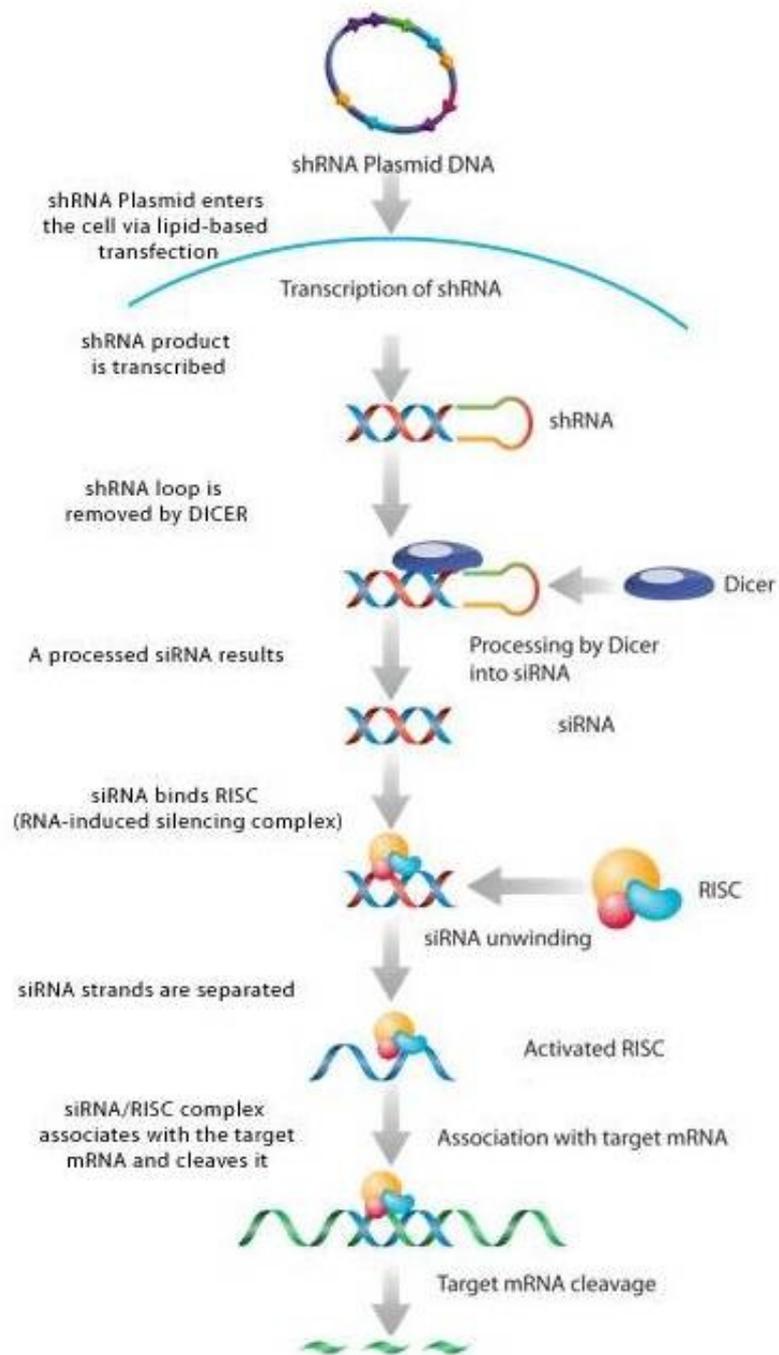


Figura 6. Silenziamento genico mediante plasmidi codificanti shRNAs.

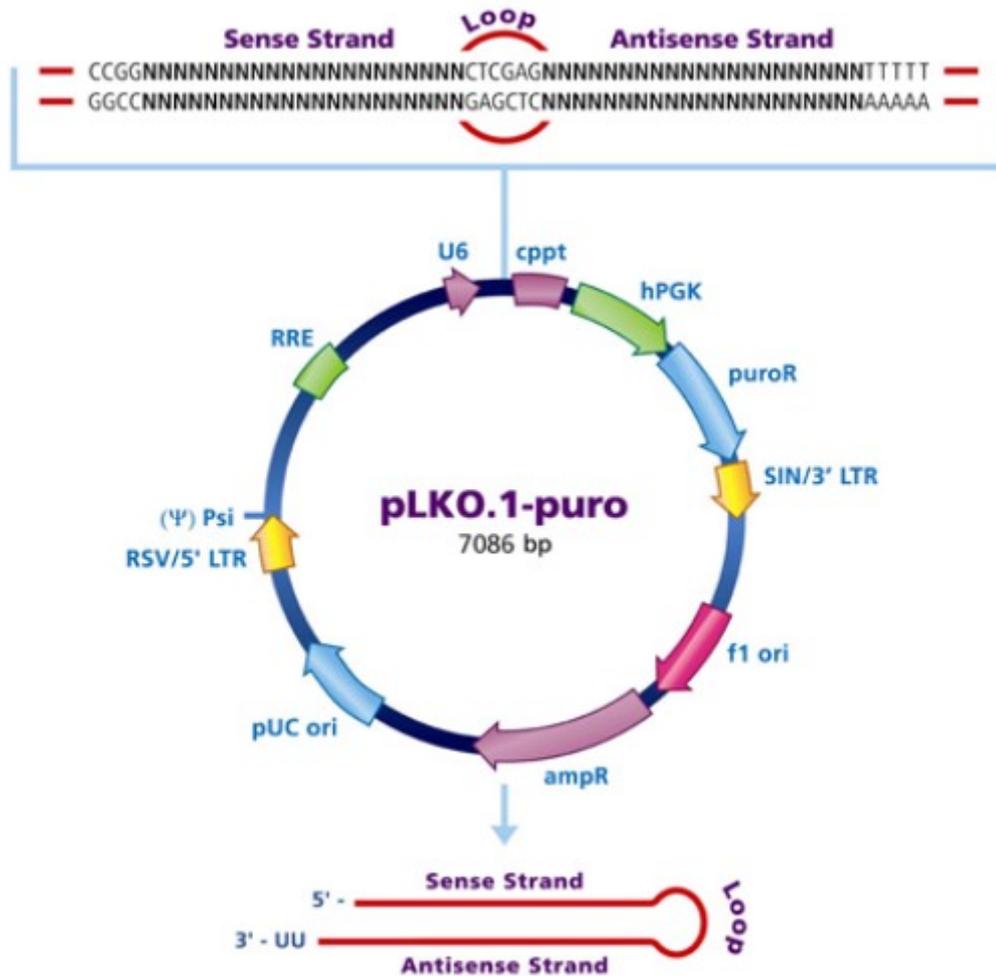


Figura 7. Rappresentazione del plasmide pLKO.1-puro. A valle del promotore U6 è indicata la regione in cui è inserita la sequenza nucleotidica di un generico shRNA, utilizzato per il silenziamento genico.

Dopo 48 ore dall'inizio della trasfezione, il terreno è stato rimosso dai pozzetti contenenti le cellule in coltura e sostituito con un'aliquota contenente puromicina (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO). Il plasmide pLKO.1-puro contiene infatti la sequenza nucleotidica relativa all'elemento genetico in grado di conferire alle cellule eucariotiche la resistenza a tale

agente. L'aggiunta nel terreno di coltura della puromicina ha segnato quindi l'inizio del processo di selezione dei cloni cellulari puromicina-resistenti, che si è protratto per un periodo di circa due settimane. Durante questo lasso di tempo, all'interno dei pozzetti relativi al trattamento con il solo reagente di trasfezione, le cellule sono morte, mentre nei campioni trasfettati con i plasmidi per il silenziamento dell'NNMT o con il vettore vuoto, dopo un'iniziale fase di morte cellulare generalizzata, i cloni ospitanti i vettori hanno iniziato a replicarsi. Al completamento del processo di selezione, i cloni cellulari sono stati espansi ed analizzati al fine di verificare l'avvenuto silenziamento dell'enzima. Le cellule selezionate sono state mantenute in terreno DMEM completo contenente puromicina 1 µg/ml ed utilizzate per lo svolgimento delle successive analisi cellulari.

L'efficienza del silenziamento genico dell'NNMT è stata valutata a livello di mRNA mediante Real-Time PCR e a livello proteico mediante Western blot.

2.2.3 Isolamento, quantificazione e retrotrascrizione dell'RNA totale

Il materiale di laboratorio necessario per l'estrazione dell'RNA totale è stato trattato con una soluzione di dietilpirocarbonato (DEPC) allo 0,1% in acqua MilliQ ed è stato successivamente sterilizzato in autoclave a 120°C per 30 minuti, al fine di inibire l'attività delle ribonucleasi. Con il medesimo scopo, il piano di lavoro e gli strumenti non autoclavabili sono stati trattati con RNase Zap (Sigma).

Le cellule sono state staccate utilizzando tripsina-EDTA e contate con l'impiego della camera di Burker e del Trypan Blu. Alla conta è seguita una centrifugazione a 300 x g per 5 minuti a 4°C. I pellet cellulari (1×10^6) ottenuti sono stati utilizzati per l'estrazione dell'RNA totale mediante l'utilizzo del kit SV Total RNA Isolation System (Promega). L'isolamento

dell'RNA ha previsto diversi passaggi: lisi cellulare, denaturazione dei complessi nucleoproteici, inattivazione dell'attività ribonucleasica endogena e rimozione del DNA genomico e delle proteine contaminanti.

Per determinare la concentrazione e la purezza del campione, l'RNA isolato è stato sottoposto ad analisi spettrofotometrica tramite l'utilizzo dello strumento NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Per questa analisi sono stati valutati i valori di assorbanza a 3 diverse lunghezze d'onda: 230 nm, 260 nm e 280 nm. In aggiunta sono stati verificati i rapporti tra i valori di assorbanza misurati alle differenti lunghezze d'onda (260/280 nm; 260/230 nm) per poter valutare eventuali contaminazioni dei campioni da parte rispettivamente di proteine o di guanidina tiocianato.

Un'aliquota di RNA totale pari a 1 µg è stata sottoposta a retrotrascrizione attraverso il kit M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) e random primers. Il cDNA ottenuto in questo modo è stato utilizzato come template per le analisi eseguite tramite Real-Time PCR.

2.2.4 Real-Time PCR

Il silenziamento dell'NNMT a carico delle cellule di melanoma cutaneo metastatico è stato verificato mediante Real-Time PCR, utilizzando come template il cDNA precedentemente sintetizzato.

La Real-Time PCR è una metodica che consente l'amplificazione e contemporaneamente la quantizzazione del DNA utilizzato come stampo (269). Il DNA presente nel campione viene amplificato mediante reazione a catena della polimerasi e l'avanzamento della reazione viene monitorato grazie all'emissione di fluorescenza da parte di specifici marcatori fluorescenti, il cui accumulo a livello del prodotto di reazione segue la stessa cinetica della reazione di

amplificazione. Pertanto, all'aumentare dell'accumulo del prodotto di reazione aumenta il segnale fluorescente che viene acquisito da un lettore ottico accoppiato al termociclatore e successivamente rielaborato da uno specifico software. La chimica adottata per la rilevazione dei prodotti di amplificazione ha previsto l'impiego dell'EvaGreen, quale molecola fluorescente in grado di intercalarsi al doppio filamento di DNA.

In una reazione di amplificazione la quantità di prodotto che si forma dopo un ciclo termico raddoppia al ciclo successivo. Di conseguenza misurando l'incremento di fluorescenza, dovuto alla formazione di nuovo prodotto all'avanzare dei cicli, è possibile ricavare la curva di amplificazione del template di interesse, avente un andamento sigmoidale. Nella fase esponenziale crescente di tale curva è possibile individuare un ciclo di amplificazione a cui corrisponde un valore di fluorescenza che è misura della quantità di prodotto che si è formato: il ciclo soglia (Ct). Graficamente il Ct è determinato dalla proiezione sull'asse delle ascisse del punto in cui la curva interseca la linea di base, al di sopra della quale qualsiasi incremento di fluorescenza diventa significativo.

Per l'analisi dell'espressione dell'NNMT è stato adottato il metodo di quantizzazione relativa che consente di valutare le differenze nei livelli di espressione di un gene tra un campione ed il relativo controllo, mediante il confronto dei cicli soglia. Per poter effettuare tale confronto è necessario scegliere un gene di riferimento diverso dal gene di interesse (GOI) che possa fungere da standard interno sia per il campione sia per il controllo: il gene housekeeping (HKG). Calcolati i valori di Ct relativi al GOI e all'HKG si procede alla determinazione del ΔCt ($\Delta Ct = Ct_{GOI} - Ct_{HKG}$). Il parametro che quantifica l'espressione relativa del GOI nel campione (S) rispetto al controllo (C) è pari a $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove $\Delta\Delta Ct = S\Delta Ct - C\Delta Ct$ (270).

L'analisi dell'espressione dell'NNMT nei campioni è stata effettuata utilizzando il CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Relativamente a ciascun campione sono state

allestite miscele di reazione di 20 μ l (in duplicato) contenenti 1 μ l di cDNA, 10 μ l di EvaGreen Supermix (Bio-Rad) e i primers specifici ad una concentrazione finale di 500 nM. Il protocollo prevede lo svolgimento di 40 cicli di amplificazione, ciascuno dei quali costituito da una fase di denaturazione a 95°C per 30 secondi e da una fase di annealing-elongazione a 58°C per 30 secondi. Le sequenze nucleotidiche relative alle coppie di primers impiegati per l'amplificazione dei geni di interesse e per il gene housekeeping (β -actina), sono le seguenti:

- NNMT (forward) \rightarrow 5'-GAATCAGGCTTCACCTCCAA-3',
- NNMT (reverse) \rightarrow 5'-TCACACCGTCTAGGCAGAAT-3',
- β -actina (forward) \rightarrow 5'-TCCTTCCTGGGCATGGAGT-3',
- β -actina (reverse) \rightarrow 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'.

2.2.5 Western blot

Per la valutazione dell'espressione della proteina, le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA, contaminate mediante l'utilizzo di Trypan Blue e della camera di Burker, e successivamente centrifugate a 300 x g per 5 minuti a 4°C. I pellet cellulari (3×10^6) sono stati risospesi in 300 μ l di un tampone di lisi (PBS contenente Nonidet-P40 10 mg/ml, desossicolato di sodio 5 mg/ml, SDS 1 mg/ml, ortovanadato di sodio 1 mM, PMSF 1 mM e aprotinina 2 μ g/ml) e sottoposti ad omogeneizzazione utilizzando una siringa da insulina.

In seguito, i campioni sono stati centrifugati a 16.000 x g per 10 minuti a 4°C ed è stato prelevato il surnatante (estratto proteico). Un quantitativo pari a 50 μ g dell'estratto proteico ottenuto da ciascun campione è stato sottoposto ad elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) secondo il metodo di Laemmli (271), impiegando un running gel ad una concentrazione di poliacrilamide pari al 15%.

Una volta che la corsa elettroforetica ha avuto termine, è stato effettuato il trasferimento delle proteine dal gel ad una membrana di polivinilidenefluoruro (PVDF). Il gel è stato immerso per 10 minuti nel tampone di trasferimento (CAPS 10 mM pH 11, metanolo al 10%). La membrana di PVDF poiché è altamente idrofobica, è stata prima immersa in metanolo per alcuni secondi, poi in acqua per 2-3 minuti ed infine mantenuta nel tampone di trasferimento per almeno 30 minuti.

A questo punto è stato assemblato il sistema di trasferimento costituito da un supporto formato da due lastre di plastica su cui sono stati posti in successione uno sopra l'altro una spugnetta e due fogli di carta da filtro delle dimensioni pari a 9x5 cm. Sopra i fogli di carta da filtro sono stati depositi il gel, la membrana di PVDF (delle stesse dimensioni del gel), due fogli di carta da filtro ed infine un'altra spugnetta. Per garantire il trasferimento i quattro fogli di carta da filtro e le due spugnette, prima di essere disposti nell'ordine appena descritto, sono stati precedentemente imbevuti nel tampone di trasferimento. Il supporto, contenente i vari componenti saldamente ravvicinati tra loro, è stato inserito tra due elettrodi paralleli all'interno di una vasca per elettroforesi contenente il tampone di trasferimento rivolgendo il lato relativo alla membrana di PVDF verso l'anodo. Poiché le proteine sono cariche negativamente, migreranno verso il polo positivo passando dal gel alla membrana di PVDF. Il trasferimento è stato protratto per 30 minuti a 250 mA, a 4°C.

Le membrane su cui sono state trasferite le proteine sono state incubate a 4°C overnight con una soluzione di bloccaggio costituita da PBS 1X, siero di latte al 5% e Tween-20 allo 0,05% (soluzione A). Il giorno seguente le membrane PVDF sono state sottoposte a 3 lavaggi da 5 minuti ciascuno con una soluzione costituita da PBS 1X con aggiunta di Tween 20 allo 0,5% (soluzione B). Successivamente sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi policlonali di coniglio anti-NNMT (Sigma), diluiti 1:1000 nella soluzione A. Sono

stati quindi effettuati 5 lavaggi da 5 minuti ciascuno con la soluzione B ed è seguita un'incubazione da 2 ore a temperatura ambiente con anticorpi secondari anti-rabbit coniugati con perossidasi (Sigma), diluiti 1:150.000 nella soluzione A. Sono stati infine eseguiti altri 5 lavaggi da 5 minuti ciascuno con la soluzione B e si è quindi proceduto alla rivelazione del segnale chemiluminescente relativo all'NNMT mediante un'incubazione di 5 minuti con SuperSignal West Femto Maximum Sensivity Substrate (ThermoFisher).

L'acquisizione del segnale chemiluminescente relativo alla proteina NNMT è avvenuta mediante l'impiego del rilevatore di immagini ChemiDoc XRS+ System (BIO-RAD). Successivamente le immagini digitali sono state assoggettate ad analisi densitometrica mediante il software Image Lab (Bio-Rad).

2.2.6 Saggio di Bradford per la determinazione della concentrazione proteica

La valutazione della concentrazione proteica è stata eseguita mediante il saggio di Bradford (272), utilizzando il reattivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), costituito da una soluzione acquosa di Blu Brillante di Comassie G-250 (BBC), metanolo ed acido fosforico.

La formazione del legame tra il colorante (BBC) presente nel reattivo di Bradford e le proteine del campione determina lo spostamento del massimo di assorbimento della soluzione da 465 nm a 595 nm, lunghezza d'onda alla quale viene effettuata la lettura dei campioni. Allestendo una curva di taratura utilizzando degli standards a concentrazione nota, è possibile ricavare per interpolazione la concentrazione delle proteine presenti nei campioni.

2.2.7 Saggio MTT

Per valutare l'influenza del silenziamento dell'enzima sulla proliferazione cellulare è stato utilizzato il saggio biochimico MTT. Tale metodica sfrutta la capacità della deidrogenasi mitocondriale di scindere l'anello tetrazolico del composto MTT [bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], aggiunto al terreno di coltura, in modo da generare un sale di formazano dal colore blu scuro-violetto che si accumula all'interno della cellula vitale. I campioni vengono successivamente trattati con un opportuno solvente per ottenere lisati cellulari che presentano una colorazione la cui intensità è proporzionale alla quantità di formazano prodotta e, di conseguenza, al numero delle cellule vitali presenti nel pozzetto.

I campioni cellulari sono stati seminati in 96-well (1×10^3 cellule/pozzetto). Dopo 24 ore dalla semina è stato eseguito il primo test dell'MTT, corrispondente al punto zero della curva di crescita (0h). Una soluzione di MTT (5 mg/ml in PBS) è stata diluita (1:12) in terreno di coltura completo e le cellule presenti in ciascun pozzetto sono state incubate con 100 μ l di tale terreno contenente per 2 ore a 37°C in ambiente umido con il 5% di CO₂. In seguito all'incubazione, il terreno è stato rimosso e sono stati aggiunti 100 μ l di dimetilsolfossido (DMSO) a ciascun pozzetto. La lettura dei valori di assorbanza è stata effettuata ad una lunghezza d'onda di 570 nm utilizzando un lettore automatico per piastre. Questa procedura è stata ripetuta a 24h, 48h e 72h dal primo test (punto zero).

2.2.8 Wound healing assay

Per valutare la migrazione delle cellule di melanoma, è stato utilizzato il Wound Healing Assay. Il saggio in questione mima la capacità di migrazione delle cellule durante la rimarginazione delle ferite *in vivo* (273). Il test prevede di effettuare un taglio su un

monstrato di cellule, catturarne l'immagine e infine monitorare a intervalli temporali regolari e ben definiti la chiusura del taglio inferto. A tale scopo, le cellule sono state seminate in 6-well (3×10^5 cellule/pozzetto) e al raggiungimento di una confluenza del 100% sono state sottoposte al saggio. Il taglio è stato effettuato verticalmente al centro del pozzetto con un puntale sterile da 200 μ l. Eventuali detriti cellulari sono stati eliminati con un lavaggio in PBS e successivamente è stato aggiunto terreno fresco con una concentrazione di siero fetale bovino pari allo 0.5%. L'acquisizione delle immagini è stata effettuata al momento del taglio e a 4h, 8h, 24h e 28h dallo stesso, mediante fotocamera digitale collegata al microscopio ottico. Le immagini ottenute sono state analizzate con il programma image J.

3 RISULTATI

3.1 CAMPIONI TISSUTALI

3.1.1 Espressione dell'NNMT mediante analisi immunistochemica

La valutazione dell'espressione dell'NNMT è stata effettuata mediante analisi immunistochemica su 34 campioni di melanoma e 34 campioni di nevi, utilizzati come gruppo di controllo. Dei 34 nevi 27 non presentavano positività citoplasmatica all'anticorpo anti-NNMT, mentre i restanti 7 mostravano una debole immunoreattività. Per quanto riguarda l'epitelio sano, la percentuale media di cellule positive era inferiore al 5%. I dati ottenuti indicano un significativo ($p < 0,0001$) aumento di espressione dell'enzima nei campioni di melanoma rispetto al gruppo di controllo. Tale risultato appariva riproducibile anche prendendo in considerazione lo score (Figura 8).

Le successive analisi statistiche sono state condotte al fine di esplorare la presenza di eventuali correlazioni tra i livelli di espressione dell'NNMT ed i parametri clinico-patologici relativi ai campioni esaminati, quali lo spessore di Breslow, il livello di Clark, la presenza e il numero di mitosi, la flogosi, la regressione e l'ulcerazione. I risultati ottenuti mostrano la presenza di una correlazione inversa statisticamente significativa ($p < 0,05$) tra l'espressione dell'enzima e lo spessore di Breslow, il livello di Clark, la presenza e il numero di mitosi e lo stato di ulcerazione, considerando sia la percentuale di cellule positive sia lo score (Figure 9 e 10). Al contrario non vi è nessuna correlazione tra i livelli dell'NNMT e la presenza di flogosi e la regressione.

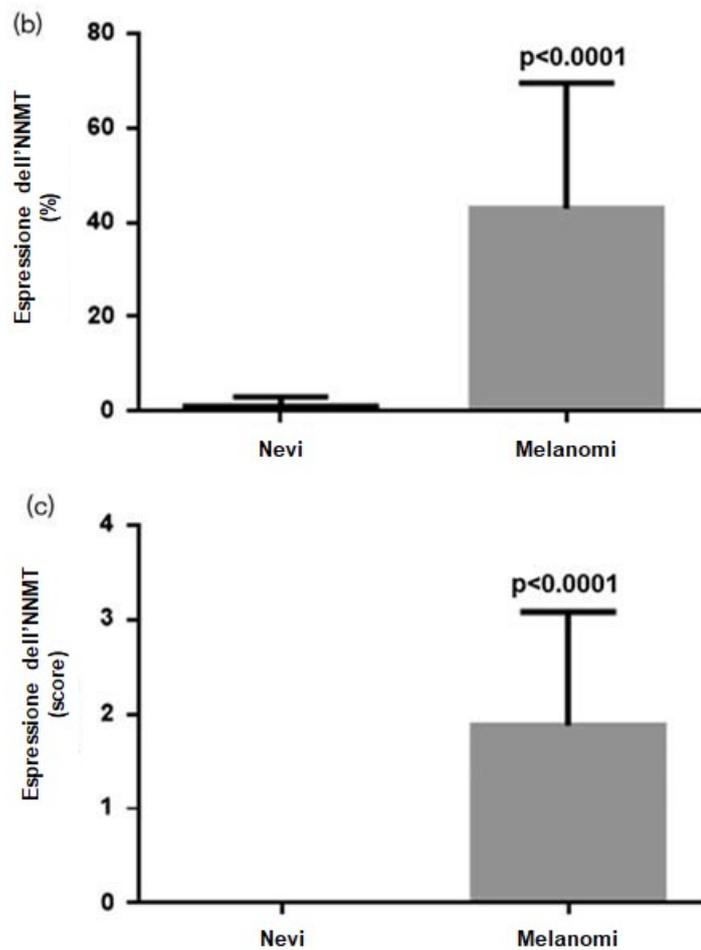
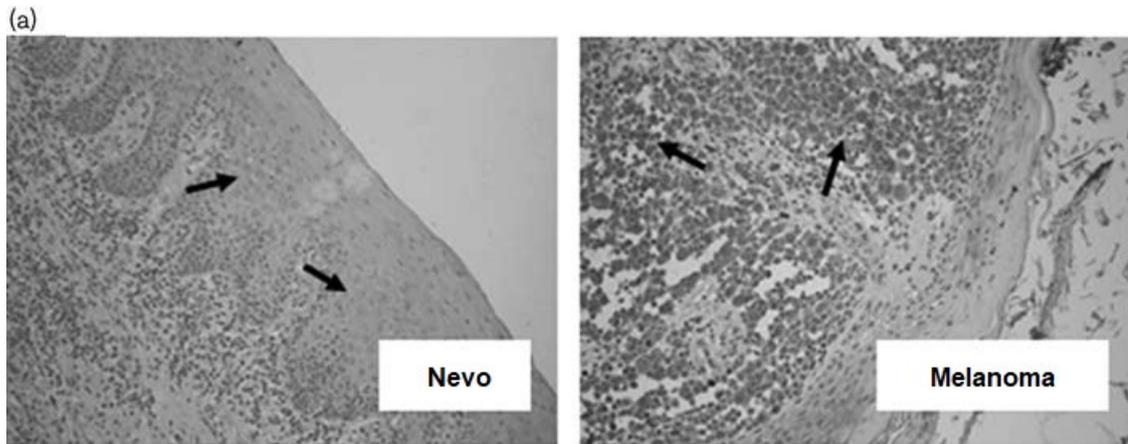


Figura 8. Espressione dell'NNMT nei campioni di melanoma e nei nevi. a) Immagini relative all'analisi immunohistochimica (ingrandimento x20). b) e c) Livello di espressione dell'NNMT nei melanomi e nei nevi espressa in termini di percentuale di cellule positive e di score.

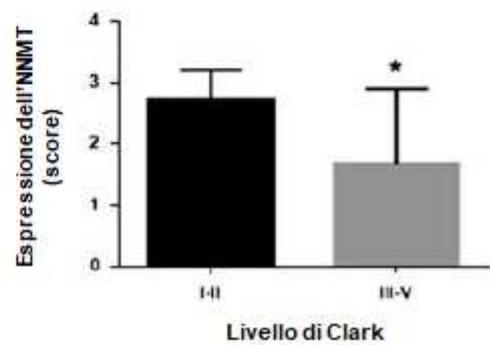
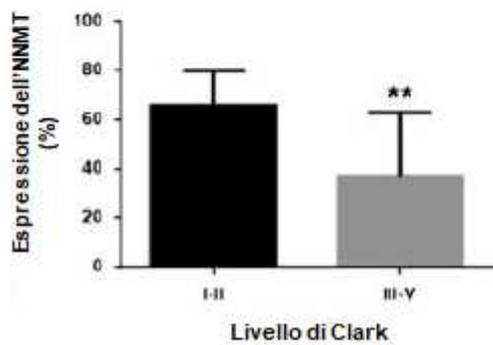
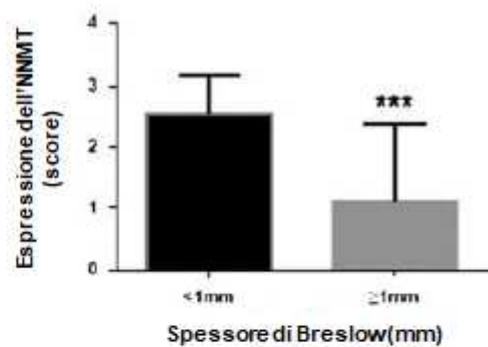
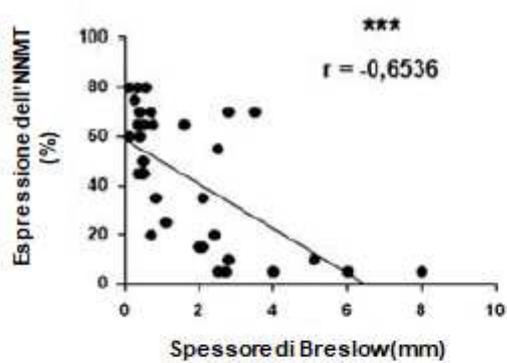


Figura 9. Correlazione tra i livelli di espressione dell'NNMT (valutata sia come percentuale di cellule positive sia come score) e parametri clinico-patologici, quali lo spessore di Breslow e il livello di Clark (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

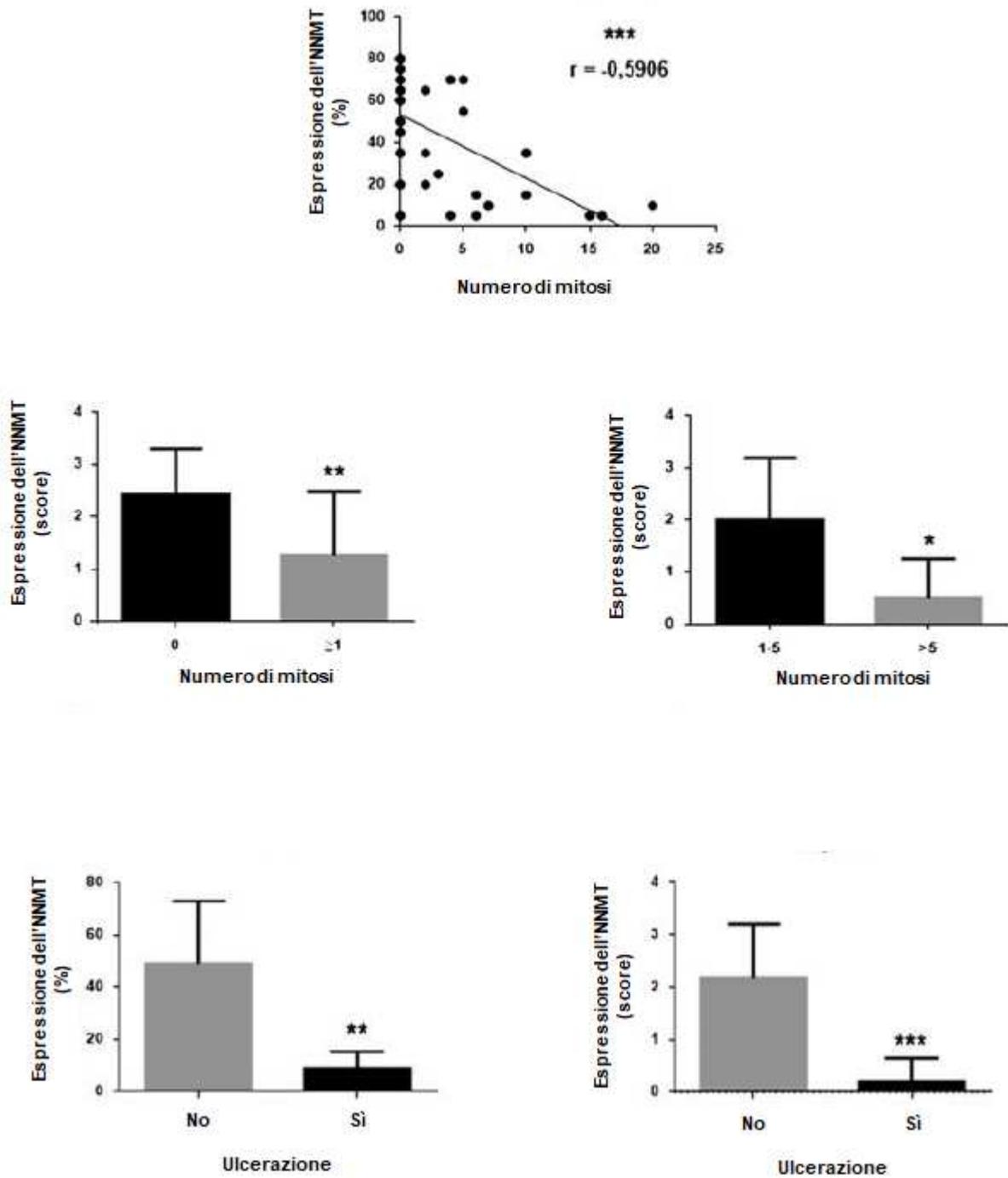


Figura 10. Correlazione tra i livelli di espressione dell'NNMT (valutata sia come percentuale di cellule positive sia come score) e parametri clinico-patologici, quali la presenza e il numero di mitosi, e lo stato di ulcerazione (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.2 ANALISI CELLULARI

L'efficienza del silenziamento dell'NNMT è stata valutata sia a livello dell'RNA messaggero sia a livello proteico, mediante Real-Time PCR e Western blot, rispettivamente.

3.2.1 Real-Time PCR

La verifica del silenziamento dell'NNMT a livello di mRNA è stata effettuata mediante Real-Time PCR, utilizzando come template il cDNA ottenuto in seguito alla retrotrascrizione dell'RNA totale isolato dai campioni cellulari analizzati. I risultati ottenuti evidenziano una significativa ($p < 0,05$) diminuzione dell'espressione dell'enzima nelle cellule trasfettate con i plasmidi che ospitano gli inserti relativi agli shRNAs e in quelle trattate con la miscela contenente i tre differenti vettori rispetto ai controlli (pLKO.1-puro e mock). In particolare, il trattamento con il plasmide pLKO.1-711 è associato alla maggior percentuale di downregolazione (63%) dell'enzima rispetto ai controlli. Tuttavia, anche per quanto concerne i campioni cellulari trattati con gli altri plasmidi (o mix di plasmidi) si assiste ad un livello soddisfacente di silenziamento dell'NNMT, con percentuali di riduzione dell'espressione dell'enzima che si aggirano attorno al 50%. I risultati ottenuti evidenziano inoltre che il trattamento con il plasmide vuoto non determina nessuna variazione significativa nei livelli di espressione dell'NNMT a livello di RNA messaggero (Figura 11).

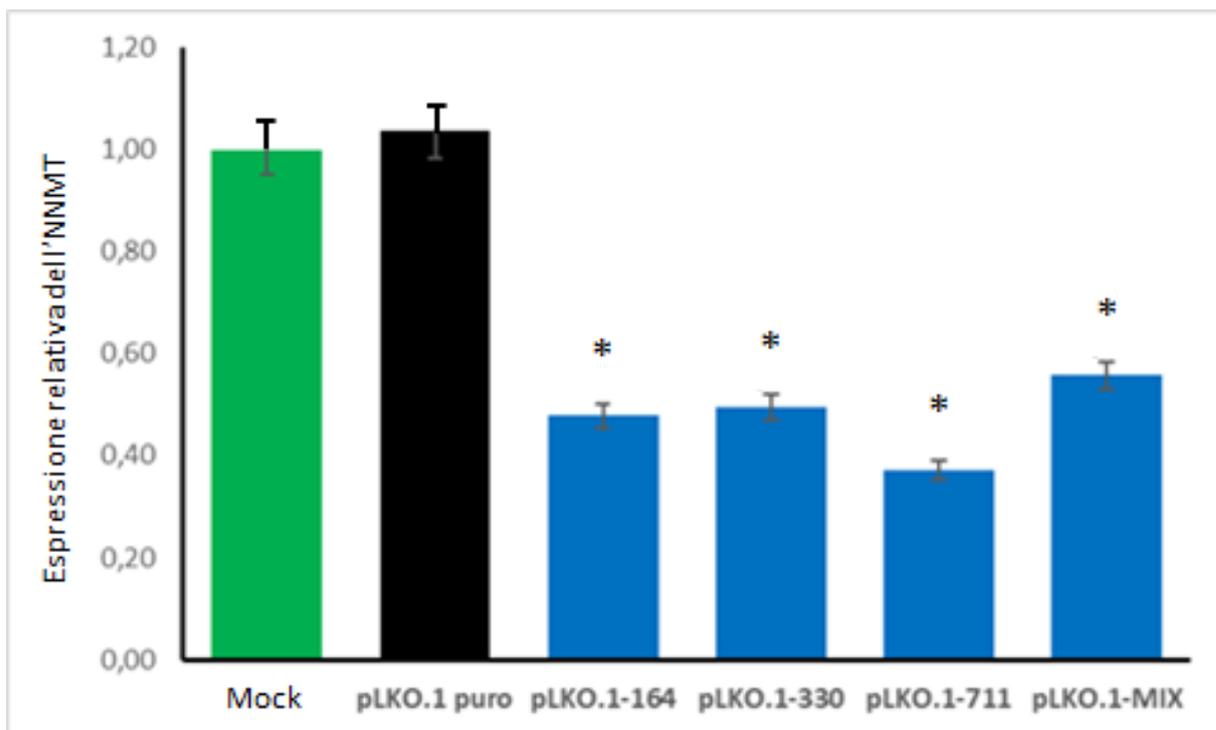


Figura 11. Analisi dei livelli di espressione dell'NNMT (mRNA) mediante Real-Time PCR a carico delle cellule trasfettate con i plasmidi per il silenziamento dell'enzima, con il plasmide vuoto (pLKO.1-puro) e trattate con il solo reagente di trasfezione (mock) (*p <0,05).

3.2.2 Western blot

La conferma dei risultati ottenuti in seguito alle analisi compiute a carico dell'RNA messaggero è stata effettuata mediante la valutazione dell'espressione dell'NNMT a livello proteico, utilizzando il saggio Western blot. I risultati ottenuti in seguito all'analisi effettuata sugli estratti proteici relativi ai campioni cellulari hanno evidenziato evidenza la presenza di una singola banda di circa 30 KDa, corrispondente alla massa molecolare dell'NNMT. A parità di quantitativo di estratto proteico analizzato, le intensità delle bande corrispondenti alle

cellule trasfettate con i diversi plasmidi ospitanti gli inserti relativi agli shRNAs risultano essere significativamente inferiori rispetto a quelle riscontrate a carico delle cellule di controllo (mock) e alle cellule trasfettate con il plasmide vuoto. Inoltre, in analogia a quanto precedentemente osservato a livello di RNA messaggero, l'intensità della banda nel mock e di quella delle cellule trattate con pLKO.1-puro sono equiparabili, confermando il fatto che il plasmide vuoto non altera significativamente l'espressione dell'NNMT (Figura 12).

Alla luce di tali dati, è risultato plausibile effettuare le successive analisi cellulari utilizzando come controllo solamente il mock, trascurando le cellule trasfettate con il plasmide vuoto.

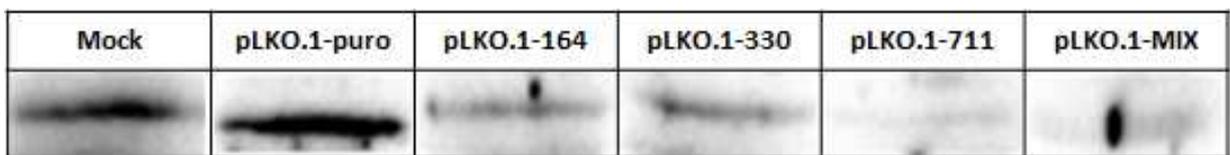


Figura 12. Analisi mediante Western Blot dell'espressione dell'NNMT a carico delle cellule di controllo (mock e pLKO.1-puro) e delle cellule trasfettate con i plasmidi per il silenziamento dell'enzima.

3.2.3 Saggio MTT

L'effetto del silenziamento dell'enzima sulla proliferazione della cellula tumorale di melanoma umano è stato valutato mediante saggio MTT. Le cellule sono state seminate in 96-well e a 24 ore dalla semina è stata effettuata la prima determinazione, corrispondente al tempo zero. Le analisi sono state ripetute a 24h, 48h e 72h dal primo test. I risultati del saggio

colorimetrico sono stati espressi in termini di percentuale di vitalità cellulare rispetto al tempo zero (100%), relativamente a ciascun campione analizzato. I risultati ottenuti mostrano che le cellule in cui l'NNMT è downregolata esibiscono un tasso di proliferazione cellulare significativamente ($p < 0,05$) inferiore rispetto ai controlli. Tale evidenza emerge chiaramente 48h dopo l'inizio del saggio e diventa ancora più marcata a 72h (Figura 13).

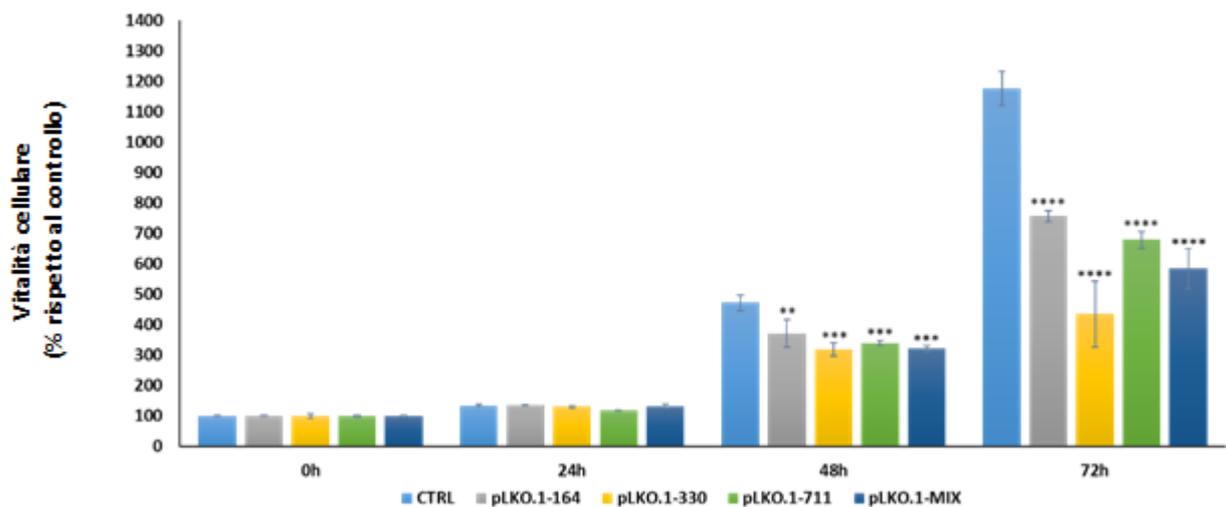


Figura 13. Saggio MTT per la valutazione dell'effetto del silenziamento dell'NNMT sulla proliferazione delle cellule di controllo (mock e pLKO.1-puro) e delle cellule trasfettate con i plasmidi per il silenziamento dell'enzima (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

3.2.4 Wound healing assay

Per valutare il coinvolgimento dell'NNMT nella migrazione cellulare, le cellule trasfettate con i plasmidi per il silenziamento dell'NNMT e quelle di controllo sono state sottoposte a wound healing assay. Come spiegato in precedenza, tale saggio valuta la capacità di migrazione cellulare volta a colmare una lacuna generata sul fondo del pozzetto di coltura in seguito ad un taglio inferto con un puntale. Tale fenomeno mima il processo di rimarginazione (healing) conseguente a ferite (wound). Sulle cellule seminate in 6-well, coltivate fino al raggiungimento del 100% di confluenza, è stato effettuato uno scratch e l'immagine relativa (tempo 0 o 0h) è stata acquisita mediante l'utilizzo di una fotocamera digitale collegata al microscopio. L'acquisizione delle immagini è stata quindi ripetuta dopo 4h, 8h, 24h e 28h, in modo tale da poter monitorare nel tempo il processo di migrazione cellulare. I risultati ottenuti sono stati espressi per ciascun campione come percentuale di chiusura del taglio rispetto al tempo zero. Il tasso di migrazione delle cellule in cui l'NNMT è downregolata risulta significativamente ($p < 0,05$) inferiore a quello relativo alle cellule di controllo. La diminuzione della capacità migratoria, associata ad una diminuzione dell'espressione dell'enzima, è visibile a tutti i time points (Figure 14 e 15).

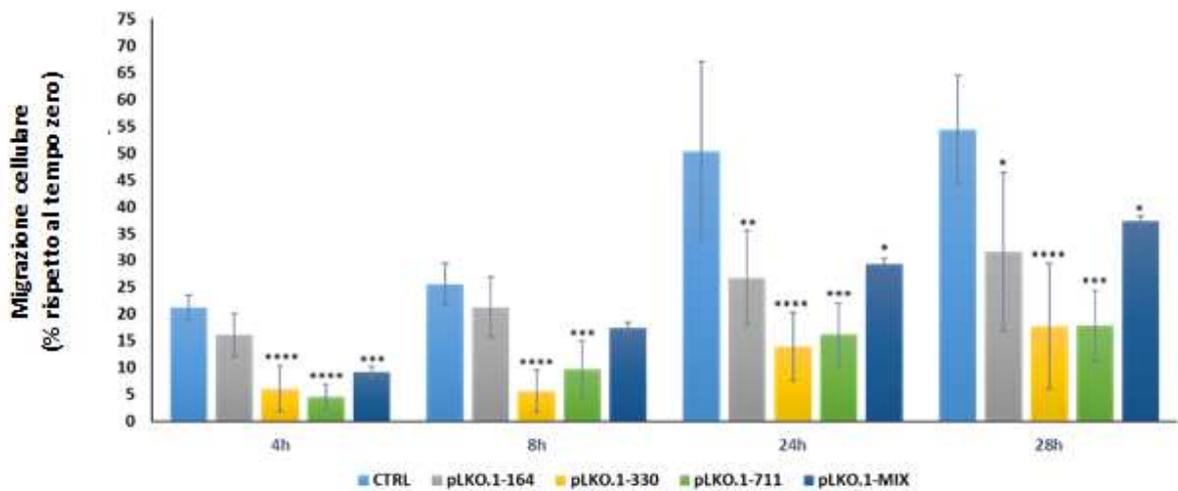


Figura 14. Valutazione dell'effetto del silenziamento dell'NNMT sulla migrazione cellulare mediante Wound healing assay (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

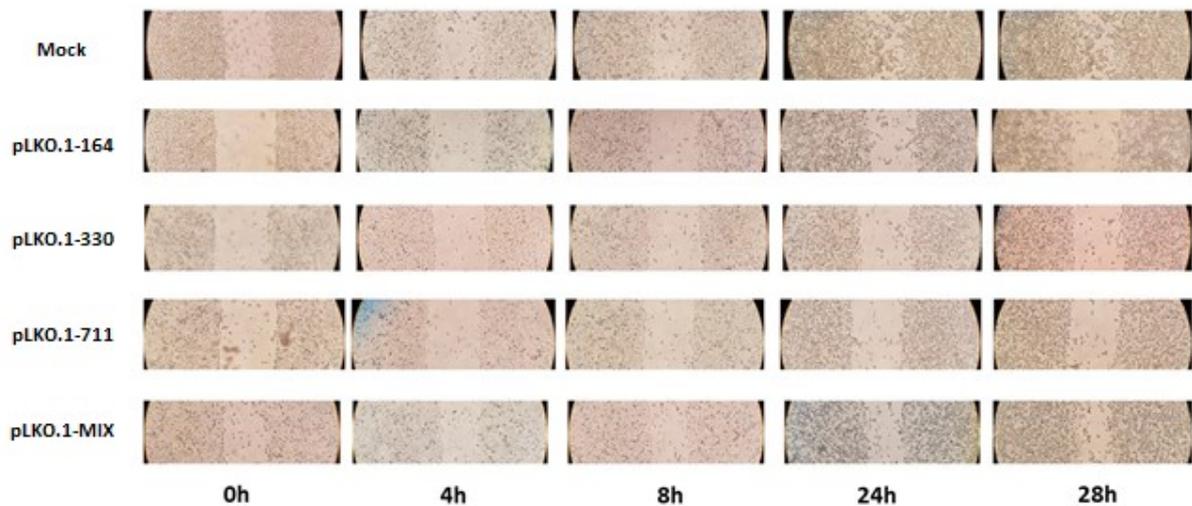


Figura 15. Migrazione cellulare valutata mediante Wound healing assay in cellule A375 di controllo (mock) e trasfettate con i plasmidi per il silenziamento dell'NNMT.

4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il melanoma deriva dalla trasformazione neoplastica dei melanociti e può insorgere in tutti i distretti in cui tali cellule sono presenti. In particolar modo, si tratta di una neoplasia che interessa la cute, con predilezione per le zone maggiormente fotoesposte, ma può anche svilupparsi a livello di mucose, meningi e uvea (2). Il melanoma rappresenta il 5% dei tumori cutanei ma è la causa dell'80% dei decessi dovuti ad essi (40). L'incidenza di tale neoplasia è in aumento e l'età di insorgenza è in continua diminuzione (41-44). Si tratta infatti di uno dei tumori più frequenti tra gli adolescenti ed i giovani adulti di tutto il mondo (41,68). Se diagnosticato precocemente può essere rimosso chirurgicamente con una buona prognosi (113), mentre la diagnosi tardiva si associa a scarso successo nel trattamento e ad una prognosi infausta (114). Alla luce di tali considerazioni, è di notevole importanza l'individuazione di nuovi biomarker prognostici e target molecolari che consentano un trattamento tempestivo ed efficace di tale neoplasia.

Sebbene in letteratura venga evidenziato un ruolo dell'NNMT in numerose neoplasie, al momento non sono disponibili dati sul melanoma cutaneo. Per questo motivo lo scopo del presente lavoro di ricerca è stato quello di valutare il ruolo dell'enzima nella suddetta lesione neoplastica. L'NNMT è un enzima citosolico che catalizza la reazione di N-metilazione della nicotinamide, dei composti piridinici e di altri analoghi strutturali, svolgendo un ruolo chiave sia nei processi di biotrasformazione sia nella detossificazione dei composti xenobiotici (172).

Nonostante l'enzima sia principalmente espresso a livello epatico, dati presenti in letteratura riportano che la sua espressione è rilevabile anche nel polmone, nel muscolo scheletrico, nella vescica e in altri tessuti (174). Numerosi studi evidenziano un'overespressione dell'NNMT in molte patologie neoplastiche come il glioblastoma multiforme (236, 237), l'adenocarcinoma gastrico (244, 245), il tumore del colon-retto (246), il carcinoma tiroideo di tipo papillare

(241), il carcinoma renale (260, 261), il tumore del pancreas (242), il carcinoma della vescica (258) e il carcinoma squamoso del cavo orale (227, 231).

Nel presente lavoro di ricerca, la valutazione dei livelli di espressione dell'enzima è stata effettuata mediante immunohistochimica su 34 campioni di melanoma cutaneo e su 34 nevi, costituenti il gruppo di controllo. I risultati ottenuti hanno evidenziato che il livello di espressione dell'enzima è significativamente aumentato nei campioni di melanoma rispetto a quello riscontrato nei nevi. Inoltre, è stata identificata una correlazione inversa statisticamente significativa tra l'espressione dell'NNMT e parametri clinico-patologici, quali il livello di Clark, lo spessore di Breslow, la presenza e il numero di mitosi e l'ulcerazione. Tali risultati candidano l'enzima a potenziale marker diagnostico e prognostico del melanoma cutaneo.

Successivamente, è stato indagato il ruolo svolto dall'NNMT nel metabolismo della cellula tumorale di melanoma. In particolare, è stato effettuato il silenziamento genico dell'enzima, mediante l'utilizzo di plasmidi codificanti shRNAs, nella linea cellulare di melanoma cutaneo metastatico umano A375. L'avvenuto silenziamento è stato verificato a livello di mRNA e di proteina, rispettivamente tramite Real-Time PCR e Western blot. In seguito, è stata valutata la capacità proliferativa e migratoria delle cellule, mediante l'utilizzo del saggio MTT e del wound healing assay. I dati ottenuti mostrano che la riduzione dell'espressione dell'NNMT si associa ad una diminuzione sia della proliferazione cellulare sia della capacità migratoria delle cellule, suggerendo un potenziale coinvolgimento dell'enzima nel processo di proliferazione cellulare e nei meccanismi di tumorigenicità della cellula neoplastica.

Tali risultati nel loro complesso sono in accordo con quelli ottenuti a carico di linee cellulari relative ad altre tipologie di tumore. In una linea cellulare di OSCC è stata osservata, una notevole riduzione della capacità proliferativa, sia *in vitro* sia *in vivo*, in seguito al silenziamento dell'NNMT (231). Studi condotti su linee cellulari umane di carcinoma della

vescica (257) e di carcinoma renale a cellule chiare (ccRCC) (264) hanno mostrato come alla downregolazione dell'enzima si associa una riduzione nella capacità di migrazione e di invasività cellulare. Inoltre, le cellule di carcinoma ccRCC assoggettate al silenziamento della nicotinamide N-metiltrasferasi hanno evidenziato una marcata riduzione della capacità tumorigenica e metastatizzante *in vivo*. Altri studi sono stati invece intrapresi per indagare le modalità con cui l'enzima è coinvolto nel mantenimento della vitalità cellulare. Esperimenti condotti sulla linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y hanno infatti rivelato come l'induzione dell'espressione dell'NNMT ed il trattamento con MNA portano alla riduzione della morte cellulare (223, 225).

I risultati ottenuti e riportati nel presente lavoro di ricerca dimostrano per la prima volta un coinvolgimento dell'NNMT nel melanoma cutaneo, evidenziando le notevoli potenzialità dell'enzima in qualità di marcatore sia diagnostico, sia prognostico di tale neoplasia. Tuttavia, successive analisi a carico dell'enzima, effettuate su una corte più ampia di pazienti, saranno necessarie al fine di esplorare più a fondo la capacità informativa derivante dallo studio della sua espressione in relazione all'outcome di tale neoplasia. Inoltre, con lo scopo di confermare il ruolo dell'NNMT quale potenziale target terapeutico per il melanoma cutaneo, sarà interessante valutare l'effetto del silenziamento dell'enzima sulla risposta al trattamento chemioterapico.

5 BIBLIOGRAFIA

1. Ciarletta P, Foret L, Ben Amar M. The radial growth phase of malignant melanoma: multi-phase modelling, numerical simulations and linear stability analysis. *J R Soc Interface*. 2011 Mar 6;8(56):345-68.
2. Matthews NH, Li WQ, Qureshi AA, Weinstock MA, Cho E. Epidemiology of Melanoma. In: Ward WH, Farma JM, editors. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Dec 21. Chapter 1.
3. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):843-50.
4. Speeckaert R, van Geel N, Vermaelen KV, Lambert J, Van Gele M, Speeckaert MM, Brochez L. Immune reactions in benign and malignant melanocytic lesions: lessons for immunotherapy. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011 Apr;24(2):334-44. Epub 2010 Nov 19. Review.
5. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos DA, Mccubrey JA, Candido S, Libra M. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol*. 2018 Apr;52(4):1071-1080. Epub 2018 Feb 27.
6. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos AH, Lawrence MS, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio RC, Winckler W, Ardlie K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton DL, Stenke-Hale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury JE, Davies MA, Gershenwald JE, Wagner SN, Hoon DS, Schadendorf D, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Garraway LA, Chin L. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012 Jul 20;150(2):251-63.

7. Krauthammer M1, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, Cheng E, Davis MJ, Goh G, Choi M, Ariyan S, Narayan D, Dutton-Regester K, Capatana A, Holman EC, Bosenberg M, Sznol M, Kluger HM, Brash DE, Stern DF, Materin MA, Lo RS, Mane S, Ma S, Kidd KK, Hayward NK, Lifton RP, Schlessinger J, Boggon TJ, Halaban R. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet.* 2012 Sep;44(9):1006-14. Epub 2012 Jul 29.
8. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, Bäsecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Nicoletti F, Libra M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Montalto G, Cervello M, Laidler P, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Evangelisti C, Cocco L, Martelli AM, McCubrey JA. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget.* 2011 Mar;2(3):135-64. Review.
9. Carlino MS, Long GV, Kefford RF, Rizos H. Targeting oncogenic BRAF and aberrant MAPK activation in the treatment of cutaneous melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015 Dec;96(3):385-98. Epub 2015 Aug 28. Review.
10. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Nov;5(11):875-85. Review.
11. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 2007 May 14;26(22):3100-12. Review.
12. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 2007 Feb 22;445(7130):851-7. Review.
13. Lovly CM, Dahlman KB, Fohn LE, Su Z, Dias-Santagata D, Hicks DJ, Hucks D, Berry E, Terry C, Duke M, Su Y, Sobolik-Delmaire T, Richmond A, Kelley MC, Vnencak-Jones CL, Iafrate AJ, Sosman J, Pao W. Routine multiplex mutational

- profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PLoS One*. 2012;7(4):e35309. Epub 2012 Apr 20.
14. Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, Ariyan S, Cheng E, Bacchiocchi A, Kluger HM, Narayan D, Halaban R. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med*. 2010 Jul 14;8:67.
 15. Mandalà M, Imberti GL, Piazzalunga D, Belfiglio M, Labianca R, Barberis M, Marchesi L, Poletti P, Bonomi L, Novellino L, Di Biagio K, Milesi A, Guerra U, Tondini C. Clinical and histopathological risk factors to predict sentinel lymph node positivity, disease-free and overall survival in clinical stages I-II AJCC skin melanoma: outcome analysis from a single-institution prospectively collected database. *Eur J Cancer*. 2009 Sep;45(14):2537-45. Epub 2009 Jun 22.
 16. Aung PP, Nagarajan P, Prieto VG. Regression in primary cutaneous melanoma: etiopathogenesis and clinical significance. *Lab Invest*. 2017 Feb 27.
 17. Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem*. 2005 Mar;386(3):193-205. Review.
 18. Fedorenko IV, Gibney GT, Smalley KS. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene*. 2013 Jun 20;32(25):3009-18. Epub 2012 Oct 15. Review.
 19. Bartlett EK, Gupta M, Datta J, Gimotty PA, Guerry D, Xu X, Elder DE, Czerniecki BJ, Fraker DL, Karakousis GC. Prognosis of patients with melanoma and microsatellitosis undergoing sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg Oncol*. 2014 Mar;21(3):1016-23. Epub 2013 Nov 21.

20. Stucky CC, Gray RJ, Dueck AC, Wasif N, Laman SD, Sekulic A, Pockaj BA. Risk factors associated with local and in-transit recurrence of cutaneous melanoma. *Am J Surg*. 2010 Dec;200(6):770-4; discussion 774-5.
21. Menzies AM, Haydu LE, Visintin L, Carlino MS, Howle JR, Thompson JF, Kefford RF, Scolyer RA, Long GV. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2012 Jun 15;18(12):3242-9. Epub 2012 Apr 24.
22. Gonzalez D, Fearfield L, Nathan P, Tanière P, Wallace A, Brown E, Harwood C, Marsden J, Whittaker S. BRAF mutation testing algorithm for vemurafenib treatment in melanoma: recommendations from an expert panel. *Br J Dermatol*. 2013 Apr;168(4):700-7. Review.
23. Mosko MJ, Nakorchevsky AA, Flores E, Metzler H, Ehrich M, van den Boom DJ, Sherwood JL, Nygren AO. Ultrasensitive Detection of Multiplexed Somatic Mutations Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J Mol Diagn*. 2016 Jan;18(1):23-31. Epub 2015 Nov 18.
24. Candido S, Rapisarda V, Marconi A, Malaponte G, Bevelacqua V, Gangemi P, Scalisi A, McCubrey JA, Maestro R, Spandidos DA, Fenga C, Libra M. Analysis of the B-RafV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure. *Oncol Rep*. 2014 Mar;31(3):1079-82. Epub 2014 Jan 14.
25. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005 Nov 17;353(20):2135-47.
26. Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:239-71. Review.

27. Boniol M, Autier P, Boyle P, Gandini S. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2012; 345
28. Schneider S, Krämer H. Who uses sunbeds? A systematic literature review of risk groups in developed countries. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 Jun;24(6):639-48. Epub 2009 Dec 8.
29. Paul CL, Stacey F, Girgis A, Brozek I, Baird H, Hughes J. Solaria compliance in an unregulated environment: the Australian experience. *Eur J Cancer*. 2005 May;41(8):1178-84. Epub 2005 Apr 14.
30. Lim HW, James WD, Rigel DS, Maloney ME, Spencer JM, Bhushan R. Adverse effects of ultraviolet radiation from the use of indoor tanning equipment: time to ban the tan. *J Am Acad Dermatol*. 2011 May;64(5):893-902.
31. El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Cogliano V; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens--part D: radiation. *Lancet Oncol*. 2009 Aug;10(8):751-2.
32. Leachman SA, Carucci J, Kohlmann W, Banks KC, Asgari MM, Bergman W, Bianchi-Scarrà G, Brentnall T, Bressac-de Paillerets B, Bruno W, Curiel-Lewandrowski C, de Snoo FA, Debniak T, Demierre MF, Elder D, Goldstein AM, Grant-Kels J, Halpern AC, Ingvar C, Kefford RF, Lang J, MacKie RM, Mann GJ, Mueller K, Newton-Bishop J, Olsson H, Petersen GM, Puig S, Rigel D, Swetter SM, Tucker MA, Yakobson E, Zitelli JA, Tsao H. Selection criteria for genetic assessment of patients with familial melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2009 Oct;61(4):677.e1-14. Review.

33. Gumaste PV, Penn LA, Cymerman RM, Kirchoff T, Polsky D, McLellan B. Skin cancer risk in BRCA1/2 mutation carriers. *Br J Dermatol*. 2015 Jun;172(6):1498-1506. Epub 2015 Apr 29. Review.
34. Psaty EL, Scope A, Halpern AC, Marghoob AA. Defining the patient at high risk for melanoma. *Int J Dermatol*. 2010 Apr;49(4):362-76. Review.
35. Aitken JF, Elwood M, Baade PD, Youl P, English D. Clinical whole-body skin examination reduces the incidence of thick melanomas. *Int J Cancer*. 2010 Jan 15;126(2):450-8.
36. Titus-Ernstoff L, Perry AE, Spencer SK, Gibson JJ, Cole BF, Ernstoff MS. Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *Int J Cancer*. 2005 Aug 10;116(1):144-9.
37. Coit DG, Andtbacka R, Anker CJ, Bichakjian CK, Carson WE 3rd, Daud A, Dimaio D, Fleming MD, Guild V, Halpern AC, Hodi FS Jr, Kelley MC, Khushalani NI, Kudchadkar RR, Lange JR, Lind A, Martini MC, Olszanski AJ, Pruitt SK, Ross MI, Swetter SM, Tanabe KK, Thompson JA, Trisal V, Urist MM, McMillian N, Ho M; National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Melanoma, version 2.2013: featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013 Apr 1;11(4):395-407.
38. Kauffmann RM, Chen SL. Workup and staging of malignant melanoma. *Surg Clin North Am*. 2014 Oct;94(5):963-72, vii. Epub 2014 Aug 6. Review.
39. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988 Jun;124(6):869-71.
40. Bertolotto C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:635203. Epub 2013 Dec 12. Review.

41. Edited by Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 v1.0. IARC CancerBase No. 11
42. Kosary CL, Altekruse SF, Ruhl J, Lee R, Dickie L. Clinical and prognostic factors for melanoma of the skin using SEER registries: collaborative stage data collection system, version 1 and version 2. *Cancer*. 2014 Dec 1;120 Suppl 23:3807-14.
43. Guy GP Jr, Thomas CC, Thompson T, Watson M, Massetti GM, Richardson LC; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: melanoma incidence and mortality trends and projections - United States, 1982-2030. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015 Jun 5;64(21):591-6.
44. Whiteman DC, Green AC, Olsen CM. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. *J Invest Dermatol*. 2016 Jun;136(6):1161-1171. Epub 2016 Feb 20.
45. Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol*. 2014 Jan;170(1):11-9. Review.
46. Coory M, Baade P, Aitken J, Smithers M, McLeod GR, Ring I. Trends for in situ and invasive melanoma in Queensland, Australia, 1982-2002. *Cancer Causes Control*. 2006 Feb;17(1):21-7.
47. Jemal A, Saraiya M, Patel P, Cherala SS, Barnholtz-Sloan J, Kim J, Wiggins CL, Wingo PA. Recent trends in cutaneous melanoma incidence and death rates in the United States, 1992-2006. *J Am Acad Dermatol*. 2011 Nov;65(5 Suppl 1):S17-25.e1-3.
48. Lasithiotakis KG, Leiter U, Gorkiewicz R, Eigentler T, Breuninger H, Metzler G, Strobel W, Garbe C. The incidence and mortality of cutaneous melanoma in Southern

- Germany: trends by anatomic site and pathologic characteristics, 1976 to 2003. *Cancer*. 2006 Sep 15;107(6):1331-9.
49. de Vries E, Bray FI, Coebergh JW, Parkin DM. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer*. 2003 Oct 20;107(1):119-26.
50. Shen W, Sakamoto N, Yang L. Melanoma-specific mortality and competing mortality in patients with non-metastatic malignant melanoma: a population-based analysis. *BMC Cancer*. 2016 Jul 7;16:413.
51. National Cancer Institute. Previous Version: SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013. Updated September 12, 2016. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/.
52. Erdei E, Torres SM. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010 Nov;10(11):1811-23. Review.
53. Olsen CM, Neale RE, Green AC, Webb PM, The QSkin Study, The Epigene Study, Whiteman DC. Independent validation of six melanoma risk prediction models. *J Invest Dermatol*. 2015 May;135(5):1377-1384. Epub 2014 Dec 30.
54. Apalla Z, Nashan D, Weller RB, Castellsagué X. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2017 Jan;7(Suppl 1):5-19. Epub 2017 Feb 1. Review.
55. Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*. 2008 May-Jun;84(3):539-49. Review.
56. Everett MA, Yeagers E, Sayre RM, Olson RL. Penetration of epidermis by ultraviolet rays. *Photochem Photobiol*. 1966 Jul;5(7):533-42.

57. Grigalavicius M, Moan J, Dahlback A, Juzeniene A. Daily, seasonal, and latitudinal variations in solar ultraviolet A and B radiation in relation to vitamin D production and risk for skin cancer. *Int J Dermatol*. 2016 Jan;55(1):e23-8. Epub 2015 Nov 6.
58. Baade P, Meng X, Youlden D, Aitken J, Youl P. Time trends and latitudinal differences in melanoma thickness distribution in Australia, 1990-2006. *Int J Cancer*. 2012 Jan 1;130(1):170-8. Epub 2011 Apr 20.
59. Marrett LD, Nguyen HL, Armstrong BK. Trends in the incidence of cutaneous malignant melanoma in New South Wales, 1983-1996. *Int J Cancer*. 2001 May 1;92(3):457-62.
60. Iannacone MR, Youlden DR, Baade PD, Aitken JF, Green AC. Melanoma incidence trends and survival in adolescents and young adults in Queensland, Australia. *Int J Cancer*. 2015 Feb 1;136(3):603-9. Epub 2014 May 17.
61. Armstrong BK. Epidemiology of malignant melanoma: intermittent or total accumulated exposure to the sun? *J Dermatol Surg Oncol*. 1988 Aug;14(8):835-49.
62. Aceituno-Madera P, Buendia-Eisman A, Olmo FJ, Jimenez-Moleon JJ, Serrano-Ortega S. Melanoma, altitude, and UV-B radiation. *Actas Dermosifiliogr*. 2011 Apr;102(3):199-205. Epub 2011 Feb 22.
63. Haluza D, Simic S, Moshhammer H. Temporal and spatial melanoma trends in Austria: an ecological study. *Int J Environ Res Public Health*. 2014 Jan 6;11(1):734-48.
64. Coory M, Baade P, Aitken J, Smithers M, McLeod GR, Ring I. Trends for in situ and invasive melanoma in Queensland, Australia, 1982-2002. *Cancer Causes Control*. 2006 Feb;17(1):21-7.
65. Sneyd MJ, Cox B. 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*. 2013 Aug 6;13:372.

66. MacKie RM, Bray CA, Hole DJ, Morris A, Nicolson M, Evans A, Doherty V, Vestey J; Scottish Melanoma Group. Incidence of and survival from malignant melanoma in Scotland: an epidemiological study. *Lancet*. 2002 Aug 24;360(9333):587-91.
67. Stang A, Pukkala E, Sankila R, Söderman B, Hakulinen T. Time trend analysis of the skin melanoma incidence of Finland from 1953 through 2003 including 16,414 cases. *Int J Cancer*. 2006 Jul 15;119(2):380-4.
68. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol*. 2009 Jan-Feb;27(1):3-9.
69. Watson M, Geller AC, Tucker MA, Guy GP Jr, Weinstock MA. Melanoma burden and recent trends among non-Hispanic whites aged 15-49years, United States. *Prev Med*. 2016 Oct;91:294-298. Epub 2016 Aug 24.
70. Weir HK, Marrett LD, Cokkinides V, Barnholtz-Sloan J, Patel P, Tai E, Jemal A, Li J, Kim J, Ekwueme DU. Melanoma in adolescents and young adults (ages 15-39 years): United States, 1999-2006. *J Am Acad Dermatol*. 2011 Nov;65(5 Suppl 1):S38-49.
71. Guy GP Jr, Zhang Y, Ekwueme DU, Rim SH, Watson M. The potential impact of reducing indoor tanning on melanoma prevention and treatment costs in the United States: An economic analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Feb;76(2):226-233. Epub 2016 Dec 6.
72. Colantonio S, Bracken MB, Beecker J. The association of indoor tanning and melanoma in adults: systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2014 May;70(5):847-57.e1-18. Epub 2014 Mar 12. Review.
73. Zhang M, Qureshi AA, Geller AC, Frazier L, Hunter DJ, Han J. Use of tanning beds and incidence of skin cancer. *J Clin Oncol*. 2012 May 10;30(14):1588-93. Epub 2012 Feb 27.

74. Li WQ, Cho E, Weinstock MA, Mashfiq H, Qureshi AA. Epidemiological Assessments of Skin Outcomes in the Nurses' Health Studies. *Am J Public Health*. 2016 Sep;106(9):1677-83. Epub 2016 Jul 26. Review.
75. Li WQ, Qureshi AA, Ma J, Goldstein AM, Giovannucci EL, Stampfer MJ, Han J. Personal history of prostate cancer and increased risk of incident melanoma in the United States. *J Clin Oncol*. 2013 Dec 10;31(35):4394-9. Epub 2013 Nov 4.
76. I numeri del Cancro in Italia. Rapporto AIOM-AIRT 2017. www-AIRTUM.it
77. Osterlind A, Hou-Jensen K, Møller Jensen O. Incidence of cutaneous malignant melanoma in Denmark 1978-1982. Anatomic site distribution, histologic types, and comparison with non-melanoma skin cancer. *Br J Cancer*. 1988 Sep;58(3):385-91.
78. Magnus K. Habits of sun exposure and risk of malignant melanoma: an analysis of incidence rates in Norway 1955-1977 by cohort, sex, age, and primary tumor site. *Cancer*. 1981 Nov 15;48(10):2329-35.
79. Popescu NA, Beard CM, Treacy PJ, Winkelmann RK, O'Brien PC, Kurland LT. Cutaneous malignant melanoma in Rochester, Minnesota: trends in incidence and survivorship, 1950 through 1985. *Mayo Clin Proc*. 1990 Oct;65(10):1293-302.
80. Måsbäck A, Westerdahl J, Ingvar C, Olsson H, Jonsson N. Cutaneous malignant melanoma in south Sweden 1965, 1975, and 1985. A histopathologic review. *Cancer*. 1994 Mar 15;73(6):1625-30.
81. Cho E, Rosner BA, Colditz GA. Risk factors for melanoma by body site. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 May;14(5):1241-4.
82. Elder DE. Human melanocytic neoplasms and their etiologic relationship with sunlight. *J Invest Dermatol*. 1989 May;92(5 Suppl):297S-303S. Review.

83. Stierner U, Augustsson A, Rosdahl I, Suurkula M. Regional distribution of common and dysplastic naevi in relation to melanoma site and sun exposure. A case-control study. *Melanoma Res.* 1992 Jan-Feb;1(5-6):367-75.
84. Green A, MacLennan R, Youl P, Martin N. Site distribution of cutaneous melanoma in Queensland. *Int J Cancer.* 1993 Jan 21;53(2):232-6.
85. Green A. A theory of site distribution of melanomas: Queensland, Australia. *Cancer Causes Control.* 1992 Nov;3(6):513-6.
86. Chen YT, Zheng T, Holford TR, Berwick M, Dubrow R. Malignant melanoma incidence in Connecticut (United States): time trends and age-period-cohort modeling by anatomic site. *Cancer Causes Control.* 1994 Jul;5(4):341-50.
87. Bulliard JL, Cox B. Cutaneous malignant melanoma in New Zealand: trends by anatomical site, 1969-1993. *Int J Epidemiol.* 2000 Jun;29(3):416-23.
88. Lachiewicz AM, Berwick M, Wiggins CL, Thomas NE. Epidemiologic support for melanoma heterogeneity using the surveillance, epidemiology, and end results program. *J Invest Dermatol.* 2008 May;128(5):1340-2.
89. Stang A, Stabenow R, Eisinger B, Jöckel KH. Site- and gender-specific time trend analyses of the incidence of skin melanomas in the former German Democratic Republic (GDR) including 19351 cases. *Eur J Cancer.* 2003 Jul;39(11):1610-8.
90. Elwood JM, Gallagher RP. Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun exposure. *Int J Cancer.* 1998 Oct 29;78(3):276-80.
91. Pérez-Gómez B, Aragonés N, Gustavsson P, Lope V, López-Abente G, Pollán M. Do sex and site matter? Different age distribution in melanoma of the trunk among Swedish men and women. *Br J Dermatol.* 2008 Apr;158(4):766-72. Epub 2008 Jan 30.
92. Ward-Peterson M, Acuña JM, Alkhalifah MK, Nasiri AM, Al-Akeel ES, Alkhaldi TM, Dawari SA, Aldaham SA. Association Between Race/Ethnicity and Survival of

- Melanoma Patients in the United States Over 3 Decades: A Secondary Analysis of SEER Data. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Apr;95(17):e3315.
93. Khosrotehrani K, Dasgupta P, Byrom L, Youlden DR, Baade PD, Green AC. Melanoma survival is superior in females across all tumour stages but is influenced by age. *Arch Dermatol Res*. 2015 Oct;307(8):731-40. Epub 2015 Jun 24.
94. Linos E, Swetter SM, Cockburn MG, Colditz GA, Clarke CA. Increasing burden of melanoma in the United States. *J Invest Dermatol*. 2009 Jul;129(7):1666-74. Epub 2009 Jan 8.
95. Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schüz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart EW, Bray F. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer*. 2013 Jan 15;132(2):385-400. Epub 2012 May 21.
96. Dennis LK. Analysis of the melanoma epidemic, both apparent and real: data from the 1973 through 1994 surveillance, epidemiology, and end results program registry. *Arch Dermatol*. 1999 Mar;135(3):275-80.
97. Seité S, Del Marmol V, Moyal D, Friedman AJ. Public primary and secondary skin cancer prevention, perceptions and knowledge: an international cross-sectional survey. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017 May;31(5):815-820. Epub 2017 Feb 8.
98. Lazovich D, Choi K, Vogel RI. Time to get serious about skin cancer prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Nov;21(11):1893-901. Epub 2012 Sep 7.
99. Brunssen A, Waldmann A, Eisemann N, Katalinic A. Impact of skin cancer screening and secondary prevention campaigns on skin cancer incidence and mortality: A systematic review. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Jan;76(1):129-139.e10. Epub 2016 Oct 1.

100. Miles A, Waller J, Hiom S, Swanston D. SunSmart? Skin cancer knowledge and preventive behaviour in a British population representative sample. *Health Educ Res.* 2005 Oct;20(5):579-85. Epub 2005 Jan 11.
101. Nilsen LT, Aalerud TN, Hannevik M, Veierød MB. UVB and UVA irradiances from indoor tanning devices. *Photochem Photobiol Sci.* 2011 Jul;10(7):1129-36. Epub 2011 Mar 28.
102. Nilsen LT, Hannevik M, Aalerud TN, Johnsen B, Friberg EG, Veierød MB. Trends in UV irradiance of tanning devices in Norway: 1983-2005. *Photochem Photobiol.* 2008 Sep-Oct;84(5):1100-8. Epub 2008 Apr 9.
103. Sinclair C, Foley P. Skin cancer prevention in Australia. *Br J Dermatol.* 2009 Nov;161 Suppl 3:116-23.
104. Breitbart EW, Waldmann A, Nolte S, Capellaro M, Greinert R, Volkmer B, Katalinic A. Systematic skin cancer screening in Northern Germany. *J Am Acad Dermatol.* 2012 Feb;66(2):201-11. Epub 2011 Nov 8.
105. Brunssen A, Waldmann A, Eisemann N, Katalinic A. Impact of skin cancer screening and secondary prevention campaigns on skin cancer incidence and mortality: A systematic review. *J Am Acad Dermatol.* 2017 Jan;76(1):129-139.e10. Epub 2016 Oct 1.
106. Aitken JF, Elwood M, Baade PD, Youl P, English D. Clinical whole-body skin examination reduces the incidence of thick melanomas. *Int J Cancer.* 2010 Jan 15;126(2):450-8.
107. Psaty EL, Scope A, Halpern AC, Marghoob AA. Defining the patient at high risk for melanoma. *Int J Dermatol.* 2010 Apr;49(4):362-76. Review.

108. Ward WH, Lambreton F, Goel N, Yu JQ, Farma JM. Clinical Presentation and Staging of Melanoma. In: Ward WH, Farma JM, editors. Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Dec 21. Chapter 6.
109. Zager JS, Hochwald SN, Marzban SS, Francois R, Law KM, Davis AH, Messina JL, Vincek V, Mitchell C, Church A, Copeland EM, Sondak VK, Grobmyer SR. Shave biopsy is a safe and accurate method for the initial evaluation of melanoma. *J Am Coll Surg*. 2011 Apr;212(4):454-60; discussion 460-2.
110. Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, Laman SD, Kottschade LA, Maples WJ, Pittelkow MR, Pulido JS, Cameron JD, Creagan ET; Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc*. 2007 Mar;82(3):364-80. Review.
111. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):6199-206. Epub 2009 Nov 16.
112. Editors: Amin, M.B., Edge, S., Greene, F., Byrd, D.R., Brookland, R.K., Washington, M.K., Gershenwald, J.E., Compton, C.C., Hess, K.R., Sullivan, D.C., Jessup, J.M., Brierley, J.D., Gaspar, L.E., Schilsky, R.L., Balch, C.M., Winchester, D.P., Asare, E.A., Madera, M., Gress, D.M., Meyer, L.R. (Eds.). *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York: Springer; 2017
113. Maverakis E, Cornelius LA, Bowen GM, Phan T, Patel FB, Fitzmaurice S, He Y, Burrall B, Duong C, Kloxin AM, Sultani H, Wilken R, Martinez SR, Patel F.

- Metastatic melanoma - a review of current and future treatment options. *Acta Derm Venereol.* 2015 May;95(5):516-24. Review.
114. Younes R, Abrao FC, Gross J. Pulmonary metastasectomy for malignant melanoma: prognostic factors for long-term survival. *Melanoma Res.* 2013 Aug;23(4):307-11.
115. Brys AK, Gowda R, Loriaux DB, Robertson GP, Mosca PJ. Nanotechnology-based strategies for combating toxicity and resistance in melanoma therapy. *Biotechnol Adv.* 2016 Sep-Oct;34(5):565-577. Epub 2016 Jan 28. Review.
116. Kunishige JH, Brodland DG, Zitelli JA. Margins for standard excision of melanoma in situ. *J Am Acad Dermatol.* 2013 Jul;69(1):164.
117. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg.* 1992 Apr;127(4):392-9.
118. Joyce KM, McInerney NM, Joyce CW, Jones DM, Hussey AJ, Donnellan P, Kerin MJ, Kelly JL, Regan PJ. A review of sentinel lymph node biopsy for thin melanoma. *Ir J Med Sci.* 2015 Mar;184(1):119-23. Epub 2014 Nov 1. Review.
119. Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, Andtbacka RH, Mozzillo N, Zager JS, Jahkola T, Bowles TL, Testori A, Beitsch PD, Hoekstra HJ, Moncrieff M, Ingvar C, Wouters MWJM, Sabel MS, Levine EA, Agnese D, Henderson M, Dummer R, Rossi CR, Neves RI, Trocha SD, Wright F, Byrd DR, Matter M, Hsueh E, MacKenzie-Ross A, Johnson DB, Terheyden P, Berger AC, Huston TL, Wayne JD, Smithers BM, Neuman HB, Schneebaum S, Gershenwald JE, Ariyan CE, Desai DC, Jacobs L, McMasters KM, Gesierich A, Hersey P, Bines SD, Kane JM, Barth RJ, McKinnon G, Farma JM, Schultz E, Vidal-Sicart S, Hoefler RA, Lewis JM, Scheri R, Kelley MC, Nieweg OE, Noyes RD, Hoon DSB, Wang HJ, Elashoff DA, Elashoff RM. Completion Dissection

- or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med*. 2017 Jun 8;376(23):2211-2222.
120. Leiter U, Stadler R, Mauch C, Hohenberger W, Brockmeyer N, Berking C, Sunderkötter C, Kaatz M, Schulte KW, Lehmann P, Vogt T, Ulrich J, Herbst R, Gehring W, Simon JC, Keim U, Martus P, Garbe C; German Dermatologic Cooperative Oncology Group (DeCOG). Complete lymph node dissection versus no dissection in patients with sentinel lymph node biopsy positive melanoma (DeCOG-SLT): a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jun;17(6):757-767. Epub 2016 May 5.
121. Lens MB, Dawes M, Goodacre T, Newton-Bishop JA. Elective lymph node dissection in patients with melanoma: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Surg*. 2002 Apr;137(4):458-61. Review.
122. Klop WM, Veenstra HJ, Vermeeren L, Nieweg OE, Balm AJ, Lohuis PJ. Assessment of lymphatic drainage patterns and implications for the extent of neck dissection in head and neck melanoma patients. *J Surg Oncol*. 2011 Jun;103(8):756-60. Epub 2011 Jan 31.
123. Delman KA, Kooby DA, Ogan K, Hsiao W, Master V. Feasibility of a novel approach to inguinal lymphadenectomy: minimally invasive groin dissection for melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2010 Mar;17(3):731-7.
124. Sloot S, Rashid OM, Zager JS. Intralesional therapy for metastatic melanoma. *Expert Opin Pharmacother*. 2014 Dec;15(18):2629-39. Epub 2014 Nov 7. Review.
125. Sondak VK, Wong SL, Gershenwald JE, Thompson JF. Evidence-based clinical practice guidelines on the use of sentinel lymph node biopsy in melanoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2013.

126. Kim T, Amaria RN, Spencer C, Reuben A, Cooper ZA, Wargo JA. Combining targeted therapy and immune checkpoint inhibitors in the treatment of metastatic melanoma. *Cancer Biol Med*. 2014 Dec;11(4):237-46.
127. Schindler K, Postow MA. Current options and future directions in the systemic treatment of metastatic melanoma. *J Community Support Oncol*. 2014 Jan;12(1):20-6.
128. Noda SE, Lautenschlaeger T, Siedow MR, Patel DR, El-Jawahri A, Suzuki Y, Loeffler JS, Bussiere MR, Chakravarti A. Technological advances in radiation oncology for central nervous system tumors. *Semin Radiat Oncol*. 2009 Jul;19(3):179-86.
129. Weedon D. Melanoma and other melanocytic skin lesions. *Curr Top Pathol*. 1985;74:1-55. Review.
130. Fogarty GB, Hong A, Scolyer RA, Lin E, Haydu L, Guitera P, Thompson J. Radiotherapy for lentigo maligna: a literature review and recommendations for treatment. *Br J Dermatol*. 2014 Jan;170(1):52-8. Review.
131. Ballo MT, Zagars GK, Gershenwald JE, Lee JE, Mansfield PF, Kim KB, Camacho LH, Hwu P, Ross MI. A critical assessment of adjuvant radiotherapy for inguinal lymph node metastases from melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2004 Dec;11(12):1079-84.
132. Fogarty GB, Hong A. Radiation therapy for advanced and metastatic melanoma. *J Surg Oncol*. 2014 Mar;109(4):370-5. Epub 2013 Nov 27. Review.
133. Dhomen N, Marais R. BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Jun;23(3):529-45, ix. Review.
134. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri

- G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54. Epub 2002 Jun 9.
135. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA; BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011 Jun 30;364(26):2507-16. Epub 2011 Jun 5.
136. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 26;363(9):809-19.
137. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, Rutkowski P, Blank CU, Miller WH Jr, Kaempgen E, Martín-Algarra S, Karaszewska B, Mauch C, Chiarion-Sileni V, Martin AM, Swann S, Haney P, Mirakhur B, Guckert ME, Goodman V, Chapman PB. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2012 Jul 28;380(9839):358-65. Epub 2012 Jun 25.
138. Sambade MJ, Peters EC, Thomas NE, Kaufmann WK, Kimple RJ, Shields JM. Melanoma cells show a heterogeneous range of sensitivity to ionizing radiation and are radiosensitized by inhibition of B-RAF with PLX-4032. *Radiother Oncol*. 2011 Mar;98(3):394-9. Epub 2011 Feb 4.
139. Hecht M, Zimmer L, Loquai C, Weishaupt C, Gutzmer R, Schuster B, Gleisner S, Schulze B, Goldinger SM, Berking C, Forschner A, Clemens P, Grabenbauer G,

- Müller-Brenne T, Bauch J, Eich HT, Grabbe S, Schadendorf D, Schuler G, Keikavoussi P, Semrau S, Fietkau R, Distel LV, Heinzerling L. Radiosensitization by BRAF inhibitor therapy-mechanism and frequency of toxicity in melanoma patients. *Ann Oncol.* 2015 Jun;26(6):1238-44. Epub 2015 Mar 11.
140. Huang V, Hepper D, Anadkat M, Cornelius L. Cutaneous toxic effects associated with vemurafenib and inhibition of the BRAF pathway. *Arch Dermatol.* 2012 May;148(5):628-33.
141. Merten R, Hecht M, Haderlein M, Distel L, Fietkau R, Heinzerling L, Semrau S. Increased skin and mucosal toxicity in the combination of vemurafenib with radiation therapy. *Strahlenther Onkol.* 2014 Nov;190(12):1169-72. Epub 2014 Jun 26.
142. Peuvrel L, Ruellan AL, Thillays F, Quereux G, Brocard A, Saint-Jean M, Aumont M, Drouet F, Dreno B. Severe radiotherapy-induced extracutaneous toxicity under vemurafenib. *Eur J Dermatol.* 2013 Nov-Dec;23(6):879-81.
143. Ly D, Bagshaw HP, Anker CJ, Tward JD, Grossmann KF, Jensen RL, Shrieve DC. Local control after stereotactic radiosurgery for brain metastases in patients with melanoma with and without BRAF mutation and treatment. *J Neurosurg.* 2015 Aug;123(2):395-401. Epub 2015 Mar 13.
144. Patel KR, Chowdhary M, Switchenko JM, Kudchadkar R, Lawson DH, Cassidy RJ, Prabhu RS, Khan MK. BRAF inhibitor and stereotactic radiosurgery is associated with an increased risk of radiation necrosis. *Melanoma Res.* 2016 Aug;26(4):387-94.
145. Xu Z, Lee CC, Ramesh A, Mueller AC, Schlesinger D, Cohen-Inbar O, Shih HH, Sheehan JP. BRAF V600E mutation and BRAF kinase inhibitors in conjunction with stereotactic radiosurgery for intracranial melanoma metastases. *J Neurosurg.* 2017 Mar;126(3):726-734. Epub 2016 May 20.

146. Keler T, Halk E, Vitale L, O'Neill T, Blanset D, Lee S, Srinivasan M, Graziano RF, Davis T, Lonberg N, Korman A. Activity and safety of CTLA-4 blockade combined with vaccines in cynomolgus macaques. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):6251-9.
147. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 19;363(8):711-23. Epub 2010 Jun 5. Erratum in: *N Engl J Med*. 2010 Sep 23;363(13):1290.
148. Margolin K, Ernstoff MS, Hamid O, Lawrence D, McDermott D, Puzanov I, Wolchok JD, Clark JI, Sznol M, Logan TF, Richards J, Michener T, Balogh A, Heller KN, Hodi FS. Ipilimumab in patients with melanoma and brain metastases: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2012 May;13(5):459-65. Epub 2012 Mar 27.
149. Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, Hamid O, Robert C, Ascierto PA, Richards JM, Lebbé C, Ferraresi V, Smylie M, Weber JS, Maio M, Bastholt L, Mortier L, Thomas L, Tahir S, Hauschild A, Hassel JC, Hodi FS, Taitt C, de Pril V, de Schaetzen G, Suciú S, Testori A. Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1845-1855. Epub 2016 Oct 7.
150. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000 Oct 2;192(7):1027-34.

151. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*. 1999 Dec;5(12):1365-9.
152. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Bousiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001 Mar;2(3):261-8.
153. Larkin J, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015 Sep 24;373(13):1270-1.
154. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1565-70. Review.
155. Sucker A, Zhao F, Real B, Heeke C, Bielefeld N, Maßen S, Horn S, Moll I, Maltaner R, Horn PA, Schilling B, Sabbatino F, Lennerz V, Kloor M, Ferrone S, Schadendorf D, Falk CS, Griewank K, Paschen A. Genetic evolution of T-cell resistance in the course of melanoma progression. *Clin Cancer Res*. 2014 Dec 15;20(24):6593-604. Epub 2014 Oct 7.
156. Liu C, Peng W, Xu C, Lou Y, Zhang M, Wargo JA, Chen JQ, Li HS, Watowich SS, Yang Y, Tompers Frederick D, Cooper ZA, Mbofung RM, Whittington M, Flaherty KT, Woodman SE, Davies MA, Radvanyi LG, Overwijk WW, Lizée G, Hwu P. BRAF inhibition increases tumor infiltration by T cells and enhances the antitumor activity of adoptive immunotherapy in mice. *Clin Cancer Res*. 2013 Jan 15;19(2):393-403. Epub 2012 Nov 30.

157. Peng W, Chen JQ, Liu C, Malu S, Creasy C, Tetzlaff MT, Xu C, McKenzie JA, Zhang C, Liang X, Williams LJ, Deng W, Chen G, Mbofung R, Lazar AJ, Torres-Cabala CA, Cooper ZA, Chen PL, Tieu TN, Spranger S, Yu X, Bernatchez C, Forget MA, Haymaker C, Amaria R, McQuade JL, Glitza IC, Cascone T, Li HS, Kwong LN, Heffernan TP, Hu J, Bassett RL Jr, Bosenberg MW, Woodman SE, Overwijk WW, Lizée G, Roszik J, Gajewski TF, Wargo JA, Gershenwald JE, Radvanyi L, Davies MA, Hwu P. Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy. *Cancer Discov.* 2016 Feb;6(2):202-16. Epub 2015 Dec 8.
158. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell.* 2015 Apr 13;27(4):450-61. Epub 2015 Apr 6. Review.
159. Boni A, Cogdill AP, Dang P, Udayakumar D, Njauw CN, Sloss CM, Ferrone CR, Flaherty KT, Lawrence DP, Fisher DE, Tsao H, Wargo JA. Selective BRAFV600E inhibition enhances T-cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte function. *Cancer Res.* 2010 Jul 1;70(13):5213-9. Epub 2010 Jun 15.
160. Bradley SD, Chen Z, Melendez B, Talukder A, Khalili JS, Rodriguez-Cruz T, Liu S, Whittington M, Deng W, Li F, Bernatchez C, Radvanyi LG, Davies MA, Hwu P, Lizée G. BRAFV600E Co-opts a Conserved MHC Class I Internalization Pathway to Diminish Antigen Presentation and CD8+ T-cell Recognition of Melanoma. *Cancer Immunol Res.* 2015 Jun;3(6):602-9. Epub 2015 Mar 20.
161. Frederick DT, Piris A, Cogdill AP, Cooper ZA, Lezcano C, Ferrone CR, Mitra D, Boni A, Newton LP, Liu C, Peng W, Sullivan RJ, Lawrence DP, Hodi FS, Overwijk WW, Lizée G, Murphy GF, Hwu P, Flaherty KT, Fisher DE, Wargo JA. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more

- favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2013 Mar 1;19(5):1225-31. Epub 2013 Jan 10.
162. Wilmott JS, Long GV, Howle JR, Haydu LE, Sharma RN, Thompson JF, Kefford RF, Hersey P, Scolyer RA. Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012 Mar 1;18(5):1386-94. Epub 2011 Dec 12.
163. Sapkota B, Hill CE, Pollack BP. Vemurafenib enhances MHC induction in BRAFV600E homozygous melanoma cells. *Oncoimmunology.* 2013 Jan 1;2(1):e22890.
164. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell.* 2017 Feb 9;168(4):707-723.
165. Koo T, Kim IA. Radiotherapy and immune checkpoint blockades: a snapshot in 2016. *Radiat Oncol J.* 2016 Dec; 34(4): 250–259.
166. Mole RH. Whole body irradiation; radiobiology or medicine? *Br J Radiol.* 1953 May;26(305):234-41.
167. Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, Formenti SC. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Mar 1;58(3):862-70.
168. Postow MA, Callahan MK, Barker CA, Yamada Y, Yuan J, Kitano S, Mu Z, Rasalan T, Adamow M, Ritter E, Sedrak C, Jungbluth AA, Chua R, Yang AS, Roman RA, Rosner S, Benson B, Allison JP, Lesokhin AM, Gnjatic S, Wolchok JD. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *N Engl J Med.* 2012 Mar 8;366(10):925-31.
169. Grimaldi AM, Simeone E, Giannarelli D, Muto P, Falivene S, Borzillo V, Giugliano FM, Sandomenico F, Petrillo A, Curvietto M, Esposito A, Paone M, Palla M, Palmieri

- G, Caracò C, Ciliberto G, Mozzillo N, Ascierto PA. Abscopal effects of radiotherapy on advanced melanoma patients who progressed after ipilimumab immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2014 May 14;3:e28780. eCollection 2014.
170. Stamell EF, Wolchok JD, Gnjatic S, Lee NY, Brownell I. The abscopal effect associated with a systemic anti-melanoma immune response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013 Feb 1;85(2):293-5. Epub 2012 May 5.
171. Koller KM, Mackley HB, Liu J, Wagner H, Talamo G, Schell TD, Pameijer C, Neves RI, Anderson B, Kokolus KM, Mallon CA, Drabick JJ. Improved survival and complete response rates in patients with advanced melanoma treated with concurrent ipilimumab and radiotherapy versus ipilimumab alone. *Cancer Biol Ther*. 2017 Jan 2;18(1):36-42. Epub 2016 Dec 1.
172. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010 Jun;154(2):103-16.
173. Weinshilboum R. Methyltransferase pharmacogenetics. *Pharmacol Ther*. 1989;43(1):77-90. Review.
174. Pissios P. Nicotinamide N-Methyltransferase: More Than a Vitamin B3 Clearance Enzyme. *Trends Endocrinol Metab*. 2017 May;28(5):340-353. Epub 2017 Mar 11. Review.
175. Cantó C, Menzies KJ, Auwerx J. NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab*. 2015 Jul 7;22(1):31-53. Epub 2015 Jun 25.
176. Kumar JS, Subramanian VS, Kapadia R, Kashyap ML, Said HM. Mammalian colonocytes possess a carrier-mediated mechanism for uptake of vitamin B3 (niacin): studies utilizing human and mouse colonic preparations. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013 Aug 1;305(3):G207-13. Epub 2013 Jun 6.

177. Booth ES, Basran J, Lee M, Handa S, Raven EL. Substrate Oxidation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase: EVIDENCE FOR A COMMON REACTION MECHANISM. *J Biol Chem*. 2015 Dec 25;290(52):30924-30. Epub 2015 Oct 28.
178. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM. L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *Int J Tryptophan Res*. 2009 Mar 23;2:45-60.
179. Nikiforov A, Dölle C, Niere M, Ziegler M. Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *J Biol Chem*. 2011 Jun 17;286(24):21767-78. Epub 2011 Apr 19.
180. Hiratsuka C, Sano M, Fukuwatari T, Shibata K. Time-dependent effects of L-tryptophan administration on urinary excretion of L-tryptophan metabolites. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2014;60(4):255-60.
181. Rini J, Szumlanski C, Guerciolini R, Weinshilboum RM. Human liver nicotinamide N-methyltransferase: ion-pairing radiochemical assay, biochemical properties and individual variation. *Clin Chim Acta*. 1990 Jan 31;186(3):359-74.
182. Okamoto H, Ishikawa A, Yoshitake Y, Kodama N, Nishimuta M, Fukuwatari T, Shibata K. Diurnal variations in human urinary excretion of nicotinamide catabolites: effects of stress on the metabolism of nicotinamide. *Am J Clin Nutr*. 2003 Feb;77(2):406-10.
183. Aksoy S, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization. *J Biol Chem*. 1994 May 20;269(20):14835-40.

184. Aksoy S, Brandriff BF, Ward A, Little PF, Weinshilboum RM. Human nicotinamide N-methyltransferase gene: molecular cloning, structural characterization and chromosomal localization. *Genomics*. 1995 Oct 10;29(3):555-61.
185. Yan L, Otterness DM, Weinshilboum RM. Human nicotinamide N-methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence analysis and promoter characterization. *Pharmacogenetics*. 1999 Jun;9(3):307-16.
186. Tomida M, Ohtake H, Yokota T, Kobayashi Y, Kurosumi M. Stat3 up-regulates expression of nicotinamide N-methyltransferase in human cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 May;134(5):551-9. Epub 2007 Oct 6.
187. Xu J, Capezzone M, Xu X, Hershman JM. Activation of nicotinamide N-methyltransferase gene promoter by hepatocyte nuclear factor-1beta in human papillary thyroid cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2005 Feb;19(2):527-39. Epub 2004 Oct 14.
188. Nabokikh A, Ilhan A, Bilban M, Gartner W, Vila G, Niederle B, Nielsen JH, Wagner O, Base W, Luger A, Wagner L. Reduced TGF-beta1 expression and its target genes in human insulinomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007 Nov;115(10):674-82.
189. Peng Y, Sartini D, Pozzi V, Wilk D, Emanuelli M, Yee VC. Structural basis of substrate recognition in human nicotinamide N-methyltransferase. *Biochemistry*. 2011 Sep 13;50(36):7800-8. Epub 2011 Aug 17.
190. Alston TA, Abeles RH. Substrate specificity of nicotinamide methyltransferase isolated from porcine liver. *Arch Biochem Biophys*. 1988 Feb 1;260(2):601-8
191. Thomas MG, Sartini D, Emanuelli M, van Haren MJ, Martin NI, Mountford DM, Barlow DJ, Klamt F, Ramsden DB, Reza M, Parsons RB. Nicotinamide N-methyltransferase catalyses the N-methylation of the endogenous β -carboline

- norharman: evidence for a novel detoxification pathway. *Biochem J.* 2016 Oct 1;473(19):3253-67. Epub 2016 Jul 7.
192. van Haren MJ, Thomas MG, Sartini D, Barlow DJ, Ramsden DB, Emanuelli M, Klamt F, Martin NI, Parsons RB. The kinetic analysis of the N-methylation of 4-phenylpyridine by nicotinamide N-methyltransferase: Evidence for a novel mechanism of substrate inhibition. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018 May;98:127-136. Epub 2018 Mar 13.
193. van Haren MJ, Sastre Toraño J, Sartini D, Emanuelli M, Parsons RB, Martin NI. A Rapid and Efficient Assay for the Characterization of Substrates and Inhibitors of Nicotinamide N-Methyltransferase. *Biochemistry.* 2016 Sep 20;55(37):5307-15. Epub 2016 Sep 9.
194. van Haren MJ, Taig R, Kuppens J, Sastre Toraño J, Moret EE, Parsons RB, Sartini D, Emanuelli M, Martin NI. Inhibitors of nicotinamide N-methyltransferase designed to mimic the methylation reaction transition state. *Org Biomol Chem.* 2017 Aug 9;15(31):6656-6667.
195. Pumpo R, Sarnelli G, Spinella A, Budillon G, Cuomo R. The metabolism of nicotinamide in human liver cirrhosis: a study on N-methylnicotinamide and 2-pyridone-5-carboxamide production. *Am J Gastroenterol.* 2001 Apr;96(4):1183-7.
196. Bryniarski K, Biedron R, Jakubowski A, Chlopicki S, Marcinkiewicz J. Anti-inflammatory effect of 1-methylnicotinamide in contact hypersensitivity to oxazolone in mice; involvement of prostacyclin. *Eur J Pharmacol.* 2008 Jan 14;578(2-3):332-8. Epub 2007 Sep 26.
197. Biedroń R, Ciszek M, Tokarczyk M, Bobek M, Kurnyta M, Słominska EM, Smoleński RT, Marcinkiewicz J. 1-Methylnicotinamide and nicotinamide: two related anti-

- inflammatory agents that differentially affect the functions of activated macrophages. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008 Mar-Apr;56(2):127-34. Epub 2008 Mar 31.
198. Chłopicki S, Swies J, Mogielnicki A, Buczko W, Bartus M, Łomnicka M, Adamus J, Gebicki J. 1-Methylnicotinamide (MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts anti-thrombotic activity mediated by a cyclooxygenase-2/prostacyclin pathway. *Br J Pharmacol*. 2007 Sep;152(2):230-9. Epub 2007 Jul 16.
199. Mateuszuk Ł, Khomich TI, Słomińska E, Gajda M, Wójcik L, Łomnicka M, Gwóźdź P, Chłopicki S. Activation of nicotinamide N-methyltransferase and increased formation of 1-methylnicotinamide (MNA) in atherosclerosis. *Pharmacol Rep*. 2009 Jan-Feb;61(1):76-85.
200. Sternak M, Khomich TI, Jakubowski A, Szafarz M, Szczepański W, Białas M, Stojak M, Szymura-Oleksiak J, Chłopicki S. Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) and 1-methylnicotinamide (MNA) in experimental hepatitis induced by concanavalin A in the mouse. *Pharmacol Rep*. 2010 May-Jun;62(3):483-93.
201. Chłopicki S, Kurdziel M, Sternak M, Szafarz M, Szymura-Oleksiak J, Kamiński K, Żołądź JA. Single bout of endurance exercise increases NNMT activity in the liver and MNA concentration in plasma; the role of IL-6. *Pharmacol Rep*. 2012;64(2):369-76.
202. Sternak M, Jakubowski A, Czarnowska E, Słominska EM, Smolenski RT, Szafarz M, Walczak M, Sitek B, Wojcik T, Jaształ A, Kaminski K, Chłopicki S. Differential involvement of IL-6 in the early and late phase of 1-methylnicotinamide (MNA) release in Concanavalin A-induced hepatitis. *Int Immunopharmacol*. 2015 Sep;28(1):105-14. Epub 2015 May 11

203. Dou J, Liu P, Wang J, Zhang X. Effect of hepatitis C virus core shadow protein expressed in human hepatoma cell line on human gene expression profiles. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Dec;21(12):1794-800.
204. Guldiken N, Zhou Q, Kucukoglu O, Rehm M, Levada K, Gross A, Kwan R, James LP, Trautwein C, Omary MB, Strnad P. Human keratin 8 variants promote mouse acetaminophen hepatotoxicity coupled with c-jun amino-terminal kinase activation and protein adduct formation. *Hepatology*. 2015 Sep;62(3):876-86. Epub 2015 Jul 3.
205. Fedorowicz A, Mateuszuk Ł, Kopec G, Skórka T, Kutryb-Zajac B, Zakrzewska A, Walczak M, Jakubowski A, Łomnicka M, Słomińska E, Chlopicki S. Activation of the nicotinamide N-methyltransferase (NNMT)-1-methylnicotinamide (MNA) pathway in pulmonary hypertension. *Respir Res*. 2016 Aug 31;17(1):108.
206. Rabinovich RA, Drost E, Manning JR, Dunbar DR, Díaz-Ramos M, Lakhdar R, Bastos R, MacNee W. Genome-wide mRNA expression profiling in vastus lateralis of COPD patients with low and normal fat free mass index and healthy controls. *Respir Res*. 2015 Jan 8;16:1.
207. Savarimuthu Francis SM, Larsen JE, Pavey SJ, Duhig EE, Clarke BE, Bowman RV, Hayward NK, Fong KM, Yang IA. Genes and gene ontologies common to airflow obstruction and emphysema in the lungs of patients with COPD. *PLoS One*. 2011 Mar 15;6(3):e17442.
208. Kim HC, Mofarrahi M, Vassilakopoulos T, Maltais F, Sigala I, Debigare R, Bellenis I, Hussain SN. Expression and functional significance of nicotinamide N-methyltransferase in skeletal muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Apr 15;181(8):797-805. Epub 2010 Jan 28.
209. Tanaka Y, Kume S, Araki H, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki S, Nakagawa F, Koya D, Haneda M, Maegawa H, Uzu T. 1-Methylnicotinamide ameliorates

- lipotoxicity-induced oxidative stress and cell death in kidney proximal tubular cells. *Free Radic Biol Med*. 2015 Dec;89:831-41. Epub 2015 Oct 19.
210. Dostalek M, Hardy KD, Milne GL, Morrow JD, Chen C, Gonzalez FJ, Gu J, Ding X, Johnson DA, Johnson JA, Martin MV, Guengerich FP. Development of oxidative stress by cytochrome P450 induction in rodents is selective for barbiturates and related to loss of pyridine nucleotide-dependent protective systems. *J Biol Chem*. 2008 Jun 20;283(25):17147-57. Epub 2008 Apr 28.
211. Riederer M, Erwa W, Zimmermann R, Frank S, Zechner R. Adipose tissue as a source of nicotinamide N-methyltransferase and homocysteine. *Atherosclerosis*. 2009 Jun;204(2):412-7. Epub 2008 Sep 27.
212. Giuliante R, Sartini D, Bacchetti T, Rocchetti R, Klötting I, Polidori C, Ferretti G, Emanuelli M. Potential involvement of nicotinamide N-methyltransferase in the pathogenesis of metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord*. 2015 May;13(4):165-70. Epub 2015 Feb 26.
213. Kraus D, Yang Q, Kong D, Banks AS, Zhang L, Rodgers JT, Pirinen E, Pulinilkunnit TC, Gong F, Wang YC, Cen Y, Sauve AA, Asara JM, Peroni OD, Monia BP, Bhanot S, Alhonen L, Puigserver P, Kahn BB. Nicotinamide N-methyltransferase knockdown protects against diet-induced obesity. *Nature*. 2014 Apr 10;508(7495):258-62.
214. Kannt A, Pfenninger A, Teichert L, Tönjes A, Dietrich A, Schön MR, Klötting N, Blüher M. Association of nicotinamide-N-methyltransferase mRNA expression in human adipose tissue and the plasma concentration of its product, 1-methylnicotinamide, with insulin resistance. *Diabetologia*. 2015 Apr;58(4):799-808. Epub 2015 Jan 18.
215. Bubenek S, Nastase A, Niculescu AM, Baila S, Herlea V, Lazar V, Paslaru L, Botezatu A, Tomescu D, Popescu I, Dima S. Assessment of gene expression profiles

- in peripheral occlusive arterial disease. *Can J Cardiol.* 2012 Nov-Dec;28(6):712-20. Epub 2012 Jun 19.
216. Hong S, Moreno-Navarrete JM, Wei X, Kikukawa Y, Tzamelis I, Prasad D, Lee Y, Asara JM, Fernandez-Real JM, Maratos-Flier E, Pissios P. Nicotinamide N-methyltransferase regulates hepatic nutrient metabolism through Sirt1 protein stabilization. *Nat Med.* 2015 Aug;21(8):887-94. Epub 2015 Jul 13.
217. Fricker RA, Green EL, Jenkins SI, Griffin SM. The Influence of Nicotinamide on Health and Disease in the Central Nervous System. *Int J Tryptophan Res.* 2018 May 21;11:1178646918776658. eCollection 2018.
218. Parsons RB, Smith SW, Waring RH, Williams AC, Ramsden DB. High expression of nicotinamide N-methyltransferase in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2003 May 15;342(1-2):13-6.
219. Williams AC, Cartwright LS, Ramsden DB. Parkinson's disease: the first common neurological disease due to auto-intoxication? *QJM.* 2005 Mar;98(3):215-26. Review.
220. Fukushima T, Tawara T, Isobe A, Hojo N, Shiwaku K, Yamane Y. Radical formation site of cerebral complex I and Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 1995 Oct 15;42(3):385-90.
221. Fukushima T, Kaetsu A, Lim H, Moriyama M. Possible role of 1-methylnicotinamide in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Toxicol Pathol.* 2002 Feb;53(6):469-73.
222. Fukushima T., Ohta M., Tanaka K., Kaneko S. Y., Maeda T., Sasaki A. Niacin metabolism and Parkinson's disease. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2004; 13(suppl): 176.
223. Parsons RB, Aravindan S, Kadampeswaran A, Evans EA, Sandhu KK, Levy ER, Thomas MG, Austen BM, Ramsden DB. The expression of nicotinamide N-

- methyltransferase increases ATP synthesis and protects SH-SY5Y neuroblastoma cells against the toxicity of Complex I inhibitors. *Biochem J.* 2011 May 15;436(1):145-55.
224. Thomas MG, Saldanha M, Mistry RJ, Dexter DT, Ramsden DB, Parsons RB. Nicotinamide N-methyltransferase expression in SH-SY5Y neuroblastoma and N27 mesencephalic neurones induces changes in cell morphology via ephrin-B2 and Akt signalling. *Cell Death Dis.* 2013 Jun 13;4:e669.
225. Milani ZH, Ramsden DB, Parsons RB. Neuroprotective effects of nicotinamide N-methyltransferase and its metabolite 1-methylnicotinamide. *J Biochem Mol Toxicol.* 2013 Sep;27(9):451-6. Epub 2013 Jul 18
226. Liu KY, Mistry RJ, Aguirre CA, Fasouli ES, Thomas MG, Klamt F, Ramsden DB, Parsons RB. Nicotinamide N-methyltransferase increases complex I activity in SH-SY5Y cells via sirtuin 3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Nov 20;467(3):491-6. Epub 2015 Oct 8
227. Sartini D, Santarelli A, Rossi V, Goteri G, Rubini C, Ciavarella D, Lo Muzio L, Emanuelli M. Nicotinamide N-methyltransferase upregulation inversely correlates with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Mol Med.* 2007 Jul-Aug;13(7-8):415-21.
228. Emanuelli M, Santarelli A, Sartini D, Ciavarella D, Rossi V, Pozzi V, Rubini C, Lo Muzio L. Nicotinamide N-Methyltransferase upregulation correlates with tumour differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol.* 2010 Jan;25(1):15-20.
229. Sartini D, Pozzi V, Renzi E, Morganti S, Rocchetti R, Rubini C, Santarelli A, Lo Muzio L, Emanuelli M. Analysis of tissue and salivary nicotinamide N-methyltransferase in oral squamous cell carcinoma: basis for the development of a

- noninvasive diagnostic test for early-stage disease. *Biol Chem*. 2012 May;393(6):505-11.
230. Pozzi V, Mazzotta M, Lo Muzio L, Sartini D, Santarelli A, Renzi E, Rocchetti R, Tomasetti M, Ciavarella D, Emanuelli M. Inhibiting proliferation in KB cancer cells by RNA interference-mediated knockdown of nicotinamide N-methyltransferase expression. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011 Jan-Mar;24(1):69-77.
231. Pozzi V, Sartini D, Morganti S, Giuliantè R, Di Ruscio G, Santarelli A, Rocchetti R, Rubini C, Tomasetti M, Giannatempo G, Orlando F, Provinciali M, Lo Muzio L, Emanuelli M. RNA-mediated gene silencing of nicotinamide N-methyltransferase is associated with decreased tumorigenicity in human oral carcinoma cells. *PLoS One*. 2013 Aug 21;8(8):e71272. eCollection 2013.
232. Seta R, Mascitti M, Campagna R, Sartini D, Fumarola S, Santarelli A, Giuliani M, Cecati M, Muzio LL, Emanuelli M. Overexpression of nicotinamide N-methyltransferase in HSC-2 OSCC cell line: effect on apoptosis and cell proliferation. *Clin Oral Investig*. 2019 Feb;23(2):829-838. Epub 2018 Jun 7.
233. Pozzi V, Sartini D, Rocchetti R, Santarelli A, Rubini C, Morganti S, Giuliantè R, Calabrese S, Di Ruscio G, Orlando F, Provinciali M, Saccucci F, Lo Muzio L, Emanuelli M. Identification and characterization of cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(2):784-98. Epub 2015 May 22.
234. Ulanovskaya OA, Zuhl AM, Cravatt BF. NNMT promotes epigenetic remodeling in cancer by creating a metabolic methylation sink. *Nat Chem Biol*. 2013 May;9(5):300-6. Epub 2013 Mar 3.
235. Shlomi T, Rabinowitz JD. Metabolism: Cancer mistunes methylation. *Nat Chem Biol*. 2013 May;9(5):293-4.

236. Markert JM, Fuller CM, Gillespie GY, Bubien JK, McLean LA, Hong RL, Lee K, Gullans SR, Mapstone TB, Benos DJ. Differential gene expression profiling in human brain tumors. *Physiol Genomics*. 2001 Feb 7;5(1):21-33.
237. Yamada K, Miyazaki T, Hara N, Tsuchiya M. Interferon-gamma elevates nicotinamide N-methyltransferase activity and nicotinamide level in human glioma cells. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2010;56(2):83-6.
238. Gehrman ML, Fenselau C, Hathout Y. Highly altered protein expression profile in the adriamycin resistant MCF-7 cell line. *J Proteome Res*. 2004 May-Jun;3(3):403-9.
239. Peng H, Yang HW, Song LW, Zhou Z. Screening the differential expression of adriamycin-resistance related genes of breast cancer by cDNA microarray. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009 Jul 7;89(25):1745-8.
240. Zhang J., Wang Y., Li G., Yu H., Xie X. Down-Regulation of Nicotinamide N-methyltransferase Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells via the Mitochondria-Mediated Pathway. *PLoS One*. 2014 Feb 18;9(2):e89202. eCollection 2014.
241. Xu J, Capezzone M, Xu X, Hershman JM. Activation of nicotinamide N-methyltransferase gene promoter by hepatocyte nuclear factor-1beta in human papillary thyroid cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2005 Feb;19(2):527-39. Epub 2004 Oct 14.
242. Rogers CD, Fukushima N, Sato N, Shi C, Prasad N, Hustinx SR, Matsubayashi H, Canto M, Eshleman JR, Hruban RH, Goggins M. Differentiating pancreatic lesions by microarray and QPCR analysis of pancreatic juice RNAs. *Cancer Biol Ther*. 2006 Oct;5(10):1383-9. Epub 2006 Oct 22.

243. Xu Y, Liu P, Zheng DH, Wu N, Zhu L, Xing C, Zhu J. Expression profile and prognostic value of NNMT in patients with pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2016 Apr 12;7(15):19975-81.
244. Yu T, Wang YT, Chen P, Li YH, Chen YX, Zeng H, Yu AM, Huang M, Bi HC. Effects of nicotinamide N-methyltransferase on PANC-1 cells proliferation, metastatic potential and survival under metabolic stress. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(2):710-21. Epub 2015 Jan 28.
245. Bi HC, Pan YZ, Qiu JX, Krausz KW, Li F, Johnson CH, Jiang CT, Gonzalez FJ, Yu AM. N-methylnicotinamide and nicotinamide N-methyltransferase are associated with microRNA-1291-altered pancreatic carcinoma cell metabolome and suppressed tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2014 Oct;35(10):2264-72. Epub 2014 Aug 12.
246. Roessler M, Rollinger W, Palme S, Hagmann ML, Berndt P, Engel AM, Schneidinger B, Pfeffer M, Andres H, Karl J, Bodenmüller H, Rüschoff J, Henkel T, Rohr G, Rossol S, Rösch W, Langen H, Zolg W, Tacke M. Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 15;11(18):6550-7.
247. Xie X, Yu H, Wang Y, Zhou Y, Li G, Ruan Z, Li F, Wang X, Liu H, Zhang J. Nicotinamide N-methyltransferase enhances the capacity of tumorigenesis associated with the promotion of cell cycle progression in human colorectal cancer cells. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Dec 15;564:52-66. Epub 2014 Sep 6.
248. Xie X, Liu H, Wang Y, Zhou Y, Yu H, Li G, Ruan Z, Li F, Wang X, Zhang J. Nicotinamide N-methyltransferase enhances resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cells through inhibition of the ASK1-p38 MAPK pathway. *Oncotarget*. 2016 Jul 19;7(29):45837-45848.

249. Jang JS, Cho HY, Lee YJ, Ha WS, Kim HW. The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates. *Oncol Res.* 2004;14(10):491-9.
250. Chen C, Wang X, Huang X, Yong H, Shen J, Tang Q, Zhu J, Ni J, Feng Z. Nicotinamide N-methyltransferase: a potential biomarker for worse prognosis in gastric carcinoma. *Am J Cancer Res.* 2016 Feb 15;6(3):649-63. eCollection 2016.
251. Tomida M, Mikami I, Takeuchi S, Nishimura H, Akiyama H. Serum levels of nicotinamide N-methyltransferase in patients with lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009 Sep;135(9):1223-9. Epub 2009 Feb 26.
252. Sartini D, Morganti S, Guidi E, Rubini C, Zizzi A, Giuliani R, Pozzi V, Emanuelli M. Nicotinamide N-methyltransferase in non-small cell lung cancer: promising results for targeted anti-cancer therapy. *Cell Biochem Biophys.* 2013;67(3):865-73.
253. Sartini D, Seta R, Pozzi V, Morganti S, Rubini C, Zizzi A, Tomasetti M, Santarelli L, Emanuelli M. Role of nicotinamide N-methyltransferase in non-small cell lung cancer: in vitro effect of shRNA-mediated gene silencing on tumourigenicity. *Biol Chem.* 2015 Mar;396(3):225-34.
254. Kim J, Hong SJ, Lim EK, Yu YS, Kim SW, Roh JH, Do IG, Joh JW, Kim DS. Expression of nicotinamide N-methyltransferase in hepatocellular carcinoma is associated with poor prognosis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009 Feb 16;28:20.
255. Kassem HSh, Sangar V, Cowan R, Clarke N, Margison GP. A potential role of heat shock proteins and nicotinamide N-methyl transferase in predicting response to radiation in bladder cancer. *Int J Cancer.* 2002 Oct 10;101(5):454-60.
256. D'Andrea FP, Safwat A, Kassem M, Gautier L, Overgaard J, Horsman MR. Cancer stem cell overexpression of nicotinamide N-methyltransferase enhances cellular radiation resistance. *Radiother Oncol.* 2011 Jun;99(3):373-8. Epub 2011 Jun 29.

257. Wu Y, Siadaty MS, Berens ME, Hampton GM, Theodorescu D. Overlapping gene expression profiles of cell migration and tumor invasion in human bladder cancer identify metallothionein 1E and nicotinamide N-methyltransferase as novel regulators of cell migration. *Oncogene*. 2008 Nov 6;27(52):6679-89. Epub 2008 Aug 25.
258. Sartini D, Muzzonigro G, Milanese G, Pozzi V, Vici A, Morganti S, Rossi V, Mazzucchelli R, Montironi R, Emanuelli M. Upregulation of tissue and urinary nicotinamide N-methyltransferase in bladder cancer: potential for the development of a urine-based diagnostic test. *Cell Biochem Biophys*. 2013 Apr;65(3):473-83.
259. Pozzi V, Di Ruscio G, Sartini D, Campagna R, Seta R, Fulvi P, Vici A, Milanese G, Brandoni G, Galosi AB, Montironi R, Cecati M, Emanuelli M. Clinical performance and utility of a NNMT-based urine test for bladder cancer. *Int J Biol Markers*. 2018 Jan;33(1):94-101.
260. Sartini D, Muzzonigro G, Milanese G, Pierella F, Rossi V, Emanuelli M. Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel tumor marker for renal clear cell carcinoma. *J Urol*. 2006 Nov;176(5):2248-54.
261. Neely BA, Wilkins CE, Marlow LA, Malyarenko D, Kim Y, Ignatchenko A, Sasinowska H, Sasinowski M, Nyalwidhe JO, Kislinger T, Copland JA, Drake RR. Proteotranscriptomic Analysis Reveals Stage Specific Changes in the Molecular Landscape of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *PLoS One*. 2016 Apr 29;11(4):e0154074. eCollection 2016.
262. Zhang J, Xie XY, Yang SW, Wang J, He C. Nicotinamide N-methyltransferase protein expression in renal cell cancer. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2010 Feb;11(2):136-43.
263. Kim DS, Choi YP, Kang S, Gao MQ, Kim B, Park HR, Choi YD, Lim JB, Na HJ, Kim HK, Nam YP, Moon MH, Yun HR, Lee DH, Park WM, Cho NH. Panel of

- candidate biomarkers for renal cell carcinoma. *J Proteome Res.* 2010 Jul 2;9(7):3710-9.
264. Tang SW, Yang TC, Lin WC, Chang WH, Wang CC, Lai MK, Lin JY. Nicotinamide N-methyltransferase induces cellular invasion through activating matrix metalloproteinase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2011 Feb;32(2):138-45. Epub 2010 Nov 2.
265. Su Kim D, Choi YD, Moon M, Kang S, Lim JB, Kim KM, Park KM, Cho NH. Composite three-marker assay for early detection of kidney cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013 Mar;22(3):390-8.
266. You Z, Liu Y, Liu X. Nicotinamide N-methyltransferase enhances the progression of prostate cancer by stabilizing sirtuin 1. *Oncol Lett.* 2018 Jun;15(6):9195-9201. Epub 2018 Apr 12.
267. Kawasaki H, Taira K, Morris KV. siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Cell Cycle.* 2005 Mar;4(3):442-8. Epub 2005 Mar 7. Review.
268. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1146-50.
269. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000 Oct;25(2):169-93. Review.
270. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
271. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

272. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
273. Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol.* 2005;294:23-9.

6 ABBREVIAZIONI

5-FU	5-Fluorouracile
A375	Linea cellulare di melanoma cutaneo metastatico umano
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AIDS	Sindrome da immunodeficienza acquisita
AIRTUM	Associazione Italiana Registri Tumori
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APAP	Acetaminofene o Paracetamolo
ARTs	Mono-ADP-ribosiltrasferasi
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BBC	Blu Brillante di Comassie
ccRCC	Carcinoma renale a cellule chiare
CDKN2A	Inibitore 2A della chinasi ciclina-dipendente
cDNA	DNA complementare
CEA	Antigene carcino-embrionario
CSD	Chronic sun damage
COMT	Catecol-O-Metiltrasferasi
ConA	Concanavalina A
COPD	Ostruzione Cronica Polmonare
COX-2	Cicloossigenasi 2
CSCs	Cancer stem cells
CTLA-4	Proteina-4 citotossica associata ai linfociti T
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsolfossido

DNA	Acido deossiribonucleico
DNM	Melanoma Neurotropico Desmoplastico
dsRNA	RNA a doppio filamento
DTIC	Dacarbazina
EDTA	Acido etilenamintetracetico
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAMMM	Sindrome familiare con nevi atipici multipli e melanoma
FDA	Food and Drug Administration
GBM	Glioblastoma Multiforme
GOI	Gene of Interest
HCV	Virus dell'epatite C
hESC	Cellule embrionali staminali umane
HKG	Gene housekeeping
HNF-1 β	Hepatocyte nuclear factor beta1
HNMT	Istamina N-metiltrasferasi
HPLC	Cromatografia liquida ad alta prestazione
IARC	Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro
IL-6	Interleuchina -6
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LMM	Melanoma Lentigo Maligna
MC1R	Recettore della melanocortina 1
MCF-7	Linea cellulare di carcinoma mammario
MCF-7/ADR	Linea cellulare di carcinoma mammario adriamicina resistente
MeNH	2- Metilnorharman
MMS	Chirurgia Micrografica di Mohs
MNA	N1-metilnicotinamide

MPP+	1-Metil-4-Fenilpiridinio
MRI	Imaging a risonanza magnetica
MSH	Ormone stimolante i melanociti
MTT	Bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAD	Nicotinamide adenina dinucleotide
NADP	Nicotinamide adenina dinucleotide fosfato
NF1	Neurofibromina1
NH	Norharman
NNMT	Nicotinamide N-metiltraferasi
NSCLC	Carcinoma polmonare non a piccole cellule
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAH	Ipertensione Polmonare Arteriosa
PARPs	Poli (ADP-ribosio) polimerasi
PCR	Reazione a catena della polimerasi
PD	Parkinson's disease
PD-1	Proteina di morte cellulare programmata-1
PET	Tomografia a emissione di positroni
PFS	Progression-Free Survival
PGI2	Prostaciclina
PI3K	Pathway fosfoinositol3chinasi
POMT	Fenol O-Metiltrasferasi
PTEN	Fosfatasi e tensina omologo
PVDF	Polivinildenfluoruro
OS	Overall Survival
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
RNA	Acido ribonucleico

RNAi	RNA interference
RT	Radioterapia
SBRT	Radioterapia stereotassica del corpo
SCREEN	Skin Cancer Research to Provide Evidence for Effectiveness of Screening
SLNM	Biopsia dei linfonodi sentinella
SPF	Sun protection factor
SRS	Radiochirurgia stereotassica
TERT	Trascrittasi inversa della telomerasi
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
TILs	Tumor-infiltrating lymphocytes
TMT	Tiolo metiltrasferasi
TNM	Tumor-Nodes-Metastasis
TPMT	Tiopurina Metiltransferasi
TP53	Proteina tumorale 53
SDS	Sodio dodecilsolfato
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Short interfering RNA
SIRT1	Sirtuina 1-deacilasi NAD dipendente
STAT3	Signal Transducer and Activator of transcription 3
UV	Radiazioni ultraviolette
WBE	Whole-Body skin Examination
XP	Xeroderma pigmentoso