

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**FEDERICO II**

**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN MORFOLOGIA CLINICA E PATOLOGICA**

**XXII CICLO**



**TESI DI DOTTORATO**

**RELAZIONE TRA STAMINALITÀ, DEREGOLAZIONE DELLA  
COMPATTAZIONE CROMATINICA NUCLEARE E POTENZIALITÀ DI  
AGGRESSIVITÀ BIOLOGICA DEL MELANOMA CUTANEO**

**RELATORE**

**PROF.SSA STEFANIA STAIBANO**

**CANDIDATO**

**DOTT.SSA MARIALUISA ALESSANDRA  
VECCHIONE**

**ANNO ACCADEMICO 2009-2010**

## Indice

Abstract	pagg. 3-4
1. Background	pagg. 5-18
2. Materiali e Metodi	pagg. 19-23
3. Risultati	pagg. 24-27
4. Discussione	pagg. 28-32
Iconografia e Tabelle	pagg. 33-42
Bibliografia	pagg. 43-52

## **Abstract**

Nonostante il progressivo incremento dei casi di melanoma maligno cutaneo diagnosticati precocemente, registrato negli ultimi vent'anni in seguito alla introduzione della dermoscopia, gli indici di mortalità per questa neoplasia mostrano un andamento sostanzialmente invariato, a causa della sua frequente estrema aggressività, spesso indipendente dai tradizionali fattori prognostici, ed a causa della persistente assenza di cure realmente efficaci per il trattamento della malattia metastatica. Il tentativo di una accurata valutazione prognostica si scontra con la frequente imprevedibilità del comportamento biologico del melanoma, soprattutto in quelle lesioni (“area grigia”) con spessore intermedio ( $>1$  mm,  $<2$ mm). La “stem cell theory” suggerisce che la derivazione dal compartimento staminale possa costituire un fattore determinante nell'induzione del fenotipo aggressivo di almeno un sottogruppo di melanomi cutanei. Il nostro studio si propone di indagare l'eventuale rapporto tra l'espressione di un marcatore di staminalità (nestina) ed i principali parametri clinico-patologici di valutazione prognostica di una serie di 129 pazienti, selezionata in base alla disponibilità dei dati completi di follow-up. I risultati dello studio verranno inoltre rapportati a quelli relativi

all'espressione della proteina CAF-1/p60, direttamente coinvolta nella regolazione epigenetica della compattazione cromatinica, che in un nostro recente studio è risultata direttamente correlata con un comportamento aggressivo dei melanomi maligni cutanei. Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare l'eventuale ruolo di queste molecole come markers predittivi di prognosi e possibili targets per terapia molecolare.

## 1. Background

### Epidemiologia

Negli ultimi quarant'anni il melanoma cutaneo ha mostrato una crescente incidenza in tutto il mondo (1). Le statistiche USA hanno registrato una progressione continua dall'inizio degli anni '70, con 6 nuovi casi su 100,000/anno, fino a 18 su 100,000/anno nel 2000; in Europa si è passati dai 3-4 casi su 100,000 ai 10-15 casi su 100,000/anno, mostrando in entrambi i casi un'incidenza pressappoco triplicata (2, Figura 1); è da sottolineare che l'incremento registrato riguarda in percentuale maggiore soprattutto giovani adulti (3). Negli Stati Uniti, le stime dell'American Cancer Society prevedono per il 2009 68,720 nuovi casi e 8,650 decessi per melanoma cutaneo (1, Figura 2). Secondo le statistiche del 2001 dell'American Joint Committee on Cancer, la sopravvivenza a 10 anni per i pazienti con melanoma non metastatico variava dall'88% nei casi di melanomi cutanei "sottili", con invasione dermica  $\leq 1.0$  mm e senza ulcerazione, al 32% per i tumori di spessore  $> 4.0$  mm, con ulcerazione (4). Leiter (2004) calcola che nel 50% circa dei casi, le metastasi si verificano ai linfonodi loco-regionali; il 20% circa dei pazienti sviluppa metastasi "satelliti" o "in transit"; il restante 30% presenta direttamente metastasi a

distanza (5). In quest'ultimo caso, la mediana di sopravvivenza è compresa tra i 6 ed i 10 mesi, con sopravvivenza a 5 anni inferiore al 5% (6). Si ritiene attualmente che l'aggressività del melanoma sia influenzata dalla concorrenza variabile di fattori intrinseci alle cellule neoplastiche, condizionanti il bilanciamento tra la proliferazione cellulare ed i diversi pathways apoptotici, e da fattori legati al microambiente (neoangiogenesi, espressione di molecole di adesione facilitanti la migrazione delle cellule neoplastiche) (7), e dalla possibile derivazione dal compartimento staminale.

### **La teoria dell'origine staminale**

Secondo le teorie più accreditate sulla patogenesi delle lesioni melanocitarie, il melanocita epidermico sarebbe all'origine sia delle neoplasie melanocitiche benigne che di quelle maligne (8,9). Pareri divergenti esistono invece sul meccanismo di acquisizione del fenotipo maligno da parte dei melanociti. Secondo alcuni, il processo di sviluppo del melanoma si baserebbe su un meccanismo di graduale "dedifferenziazione", in cui il melanocita mutato attraversa gli stadi di nevo benigno, nevo displastico, melanoma a crescita radiale, melanoma a crescita verticale ed infine melanoma metastatico (10,11). Una teoria alternativa (12,13) sostiene invece che le neoplasie melanocitiche derivino

da cellule melanocitarie immature, ovvero precursori staminali. Le cellule staminali proliferano con ritmi lenti, ma sono in grado, attraverso la cosiddetta “divisione asimmetrica”, di generare una progenie di cellule rapidamente proliferanti (cellule TA: Transiently Amplifying) che all’occorrenza si differenziano in elementi cellulari maturi (14, Figura 3). I melanociti sono cellule di origine neuroectodermica. Durante l’embriogenesi dei mammiferi, le cellule della cresta neurale emergono dalla parte dorsale del tubo neurale. Mentre il tubo neurale contiene i precursori delle cellule gliali e dei neuroni del sistema nervoso centrale, la cresta neurale dà origine sia ai neuroni periferici, le cellule di Schwann e le cellule secretorie del sistema neuroendocrino periferico, sia a cellule non neuronali, come i melanociti, i condrociti ed i miociti del muscolo liscio (15). Cellule staminali melanocitarie sono state trovate nell’epidermide normale (16); recentemente, Amoh et al. hanno identificato un’ulteriore sorgente di melanociti nelle cellule staminali del bulbo dei follicoli piliferi, che sono in grado di differenziarsi in melanociti (17). D’altronde, nonostante i meccanismi di turnover melanocitario siano ancora in parte da chiarire, è verosimile assumere che i melanociti nella cute umana siano normalmente sostituiti da un reservoir di cellule immature (14). Questa ipotesi è in accordo con alcuni processi patologici come la vitiligine, in cui

i melanociti differenziati vengono distrutti, ma quando la malattia è sotto controllo si vedono apparire nuovi melanociti (18); in esperimenti sul ciclo dei peli, i melanociti del bulbo pilifero vanno in apoptosi, ma vengono sostituiti da cellule melanocitiche presenti nella guaina esterna della radice, con conseguente ricrescita del pelo (19-21). Dal momento, quindi, che cellule con capacità di proliferare e differenziarsi in melanociti sono normalmente presenti nella cute, è ragionevole pensare ad un loro ruolo nella patogenesi del melanoma (14). D'altronde, l'aggressività del tumore spesso è associata con un fenotipo "dedifferenziato", una proprietà che è in grado di conferire alle cellule tumorali alcune delle caratteristiche dei loro precursori (22). Teoricamente, se alla base di una neoplasia vi sono eventi mutazionali che avvengono a livello delle cellule staminali, si può verosimilmente pensare che queste cellule mutate tendano a seguire i normali pathways di differenziamento finchè non accumulino un danno genetico sufficiente tale che questo differenziamento non risulti più possibile. Se invece assumiamo che la neoplasia si origini da mutazioni nel genoma di melanociti maturi, allora dobbiamo aspettarci che la progenie così originatasi sia più aggressiva della cellula iniziale e che si espanda in maniera omogenea finchè mutazioni aggiuntive non portino alla formazione di nuove popolazioni in grado di ripetere il processo di



selezione clonale (14). Grichnik et al. dimostrano che ci sono dei melanomi che possiedono caratteristiche compatibili con un processo tumorigenico basato su una cellula staminale mutante (14). Ad oggi, il parametro predittivo più rilevante per la valutazione prognostica del melanoma cutaneo rimane la profondità di infiltrazione dermica (spessore di Breslow), la presenza di ulcerazione e, infine, l'indice di proliferazione tumorale (23, Tabella 1). Il melanoma cutaneo, tuttavia, mostra un comportamento spesso imprevedibile rispetto ai classici parametri prognostici: infatti si riscontrano melanomi sottili ( $< 1$  mm di spessore) che metastatizzano precocemente, e tumori spessi ( $> 2$  mm) che danno luogo a metastasi solo tardivamente (melanomi cosiddetti "dormienti") (24). Di fatto, i parametri di previsione prognostica attualmente in uso non sempre risultano efficaci, soprattutto in quel sottogruppo di melanomi ("area grigia") con spessore intermedio ( $>1$  mm,  $<2$ mm). Attualmente, inoltre, eccetto che per le terapie adiuvanti a base di alte dosi di IFN utilizzate per i pazienti al II stadio, non ci sono cure efficaci per il trattamento del melanoma metastatico. Perciò, al momento, la comunità scientifica internazionale è impegnata nel tentativo di trasferire in campo clinico le ormai numerose informazioni ottenute dagli studi di base sulla biologia del melanoma, traducendole nella formulazione di nuovi parametri di previsione prognostica e

nell'identificazione di agenti terapeutici diretti verso target molecolari sempre più specifici (25). La “stem cell theory” (12,13,26-37) suggerisce un ruolo cruciale della componente staminale dei melanomi nella determinazione dell'aggressività delle cellule neoplastiche. Recentemente, Klein et al. hanno dimostrato il progressivo incremento, a partire dal nevo benigno fino al melanoma metastatico, dell'espressione dei tre marcatori di staminalità: CD133, CD166 e nestina (38).

### **Nestina**

La nestina è stata identificata nel 1985 da Hockfield e McKay (39); la sua denominazione, in inglese “nestin”, è l'acronimo di NeuroEpithelial STem cell INtermediate filament (40). L'analisi del gene della nestina nel ratto ha dimostrato infatti che questo codifica per una proteina dei filamenti intermedi classificata in una nuova, sesta classe (41). L'espressione della nestina è stata utilizzata da diversi gruppi di ricerca per l'identificazione di cellule staminali del SNC in roditori in varie aree del sistema nervoso in via di sviluppo (Figura 4) ed in linee cellulari murine di precursori del SNC immortalizzate (42-46). Nei mammiferi, le cellule che sono destinate a differenziarsi in componenti del SNC esprimono le differenti classi di filamenti intermedi citoplasmatici in uno stretto ordine temporale e spaziale, iniziando dalle citocheratine (classi I e II: espresse dalle cellule

embrionali precoci), passando attraverso la nestina e la vimentina (classi VI e III: nel neuroepitelio mitotico), fino ai neurofilamenti e GFAP (classi IV e III: neuroni differenziati ed astrociti). In questo pathway d'espressione strettamente regolato, la nestina contraddistingue le cellule staminali multipotenti neuroectodermiche, mentre i neurofilamenti identificano i neuroni completamente differenziati (47). Dahlstrand et al. hanno analizzato l'espressione, la struttura e l'organizzazione genomica del gene della nestina umana. Dai loro studi deriva l'osservazione che la nestina appartiene alla stesso "*phylum*" evolutivo dei neurofilamenti, anche se la percentuale di similarità con i geni codificanti per i neurofilamenti e le inusuali sequenze N- e C-terminali hanno confermato l'inserimento della nestina all'interno di una nuova classe di filamenti intermedi, la VI (47). Recentemente, Bakos et al. hanno dimostrato la coespressione di nestina con i geni SOX9 e SOX10, che sembrerebbero avere un ruolo regolatorio sulla sua espressione (48). La nestina è presente prevalentemente nelle cellule del SNC, a livello del tubo neurale (42). Sejersen et al. ne hanno mostrato altresì l'espressione durante lo sviluppo del muscolo scheletrico (49). Normalmente, l'espressione della nestina risulterebbe down-regolata sia nel muscolo che nel SNC, dopo la differenziazione cellulare. Tuttavia essa è risultata riespressa in epoca post-natale nel tessuto cerebrale, a

livello della zona subventricolare e nelle cellule endoteliali (50), nel sistema nervoso periferico, a livello delle cellule di Schwann (51), ed in tessuti sottoposti a rigenerazione, come il SNC, il fegato, il pancreas ed il tratto gastrointestinale (52). Recentemente, la nestina è stata identificata anche nelle cellule progenitrici dei follicoli piliferi di individui adulti (53) e nelle cellule staminali epiteliali che sono in grado di differenziarsi in neuroni, fibroblasti ed adipociti (50). La nestina si trova espressa inoltre in una varietà di tumori del SNC come il glioma ed il glioblastoma (29,54-56), dove i suoi livelli di espressione si correlano con il grado istologico della lesione (57), ed in altri stati caratterizzati da un'incrementata proliferazione delle cellule gliali, come traumi ed infiammazione (58). Nel 2005, Ehrmann et al. hanno mostrato la riespressione della nestina in differenti tumori, compresi i tumori melanocitici benigni e maligni (59). Lobo et al. hanno identificato la riespressione della nestina in età adulta anche in una popolazione di cellule normali ed iperplastiche del Leydig e nelle cellule del Sertoli in casi di tumore testicolare (30). Shimada et al. rilevano l'espressione della nestina nel 100% dei rhabdomyosarcomi e dei melanomi desmoplastici analizzati (60). Questi dati stanno ad indicare che la nestina si presenta come un marker molecolare utile ad identificare cellule staminali progenitrici e cellule tumorali originatesi non solo dalle

linee neuroectodermiche, ma anche da quelle mesenchimali (44). Si direbbe che i geni della nestina vengano riattivati, sotto determinati stimoli, in quelle popolazioni cellulari che li esprimono normalmente durante l'embriogenesi. Tuttavia la ripresa dell'espressione non sembrerebbe interamente e direttamente associata con la dedifferenziazione dei tessuti, in quanto la nestina è stata trovata espressa anche nei melanociti benigni, differenziati, all'interno dei nevi (61). Il primo studio di riferimento riguardo l'espressione della nestina in tumori melanocitari risale al 1994 (Flørenes et al.,71). Visto che i melanociti derivano dalla cresta neurale ed è noto che i melanomi esprimono diversi markers neuroectodermici (62-70), i ricercatori ipotizzarono che anche la nestina potesse essere tra questi, perciò attraverso esperimenti di Northern blot ed immunohistochimica indagarono l'espressione della nestina in melanomi maligni e metastasi di melanoma, in confronto con nevi benigni e melanociti normali. La nestina risultava espressa nei tumori melanocitari, ma non nei melanociti non neoplastici (71); tuttavia non emergeva alcuna correlazione statisticamente significativa dell'espressione della nestina né con lo spessore, né con la quantità di melanina, né con la progressione del melanoma, anche se era evidente la presenza di una proporzione più elevata di cellule immunopositive alla nestina nei melanomi maligni, rispetto ai nevi, ed i

livelli di espressione della nestina apparivano più elevati nelle metastasi da melanoma rispetto al melanoma primario e nella fase di crescita verticale rispetto a quella radiale (71). Più recentemente (2007) anche Brychtova et al. (61) hanno analizzato l'espressione della nestina nei melanomi e nei nevi melanocitici: i loro studi evidenziano la presenza di melanociti nestina-positivi all'interno dei melanomi analizzati, anche in aree profonde delle lesioni, nonostante le cellule nestina-positive risultassero, nel loro studio, predominanti a livello della zona giunzionale. Purtroppo, anche alcuni melanociti all'interno dei nevi risultavano positivi per l'espressione della nestina, nonostante il segnale si mantenesse sempre di bassa intensità e confinato a cellule isolate. Per questi motivi, la nestina non si configurava come marker adatto a distinguere le lesioni benigne da quelle maligne. Una più intensa espressione veniva rilevata nei melanomi nodulari, in particolare in quelli con spessore > di 1mm, rispetto ai melanomi a crescita superficiale, ed il segnale era più frequentemente confinato nelle aree periferiche della lesione. Inoltre una percentuale più elevata di melanomi nodulari, di stadio avanzato e/o metastatici, risultava positiva per la nestina, rispetto ai tumori in stadio più precoce, anche se l'intensità di espressione non sembrava variare tra le metastasi e le lesioni primarie. Nonostante il trend incoraggiante, tuttavia, neppure questo studio

ha fatto emergere alcuna correlazione tra i livelli di espressione della nestina e lo stato del linfonodo sentinella, escludendo, per il momento, un suo possibile ruolo nella valutazione prognostica della malattia. Certamente lo studio di Brychtova ha contribuito ad ampliare le conoscenze sui possibili meccanismi d'azione della nestina: ha posto infatti l'attenzione sull'espressione della nestina nell'endotelio dei capillari adiacenti all'area tumorale, confermando i dati di Sugawara et al. (57), che avevano già considerato la nestina come un marker di proliferazione endoteliale, ed ipotizzando un suo ruolo nella conversione di un flusso ematico irregolare in un flusso laminare, attraverso capillari neoformati, sotto stimolazione dello stroma tumorale. Non è ancora noto, tuttavia, se l'incremento di espressione della nestina comporti solo un aumento della proliferazione endoteliale oppure possa stimolare anche modificazioni nella funzione dell'endotelio (61). Allo stato, comunque, restano ancora aperte le ipotesi sul reale significato di questo marcatore di staminalità nell'induzione di un fenotipo aggressivo dei melanomi maligni cutanei.

### **CAF-1/p60**

Diversi studi genomici e proteomici hanno rivelato l'alterazione dell'espressione, nel melanoma cutaneo, di diversi oncogeni e oncosoppressori, responsabili sia del controllo del ciclo cellulare, che dei

processi di riparazione dei danni al DNA (72-76). In particolare, un ruolo fondamentale nel controllo di entrambi questi processi è emerso per molecole normalmente coinvolte nella regolazione epigenetica della texture cromatinica nucleare (allo stesso tempo responsabili della condensazione e della despiralizzazione del genoma in risposta a stimoli del microambiente) (77-80) (Figura 5). È noto che, nonostante la sua localizzazione all'interno del microambiente cromatinico, il DNA è soggetto a ripetuti danni da parte di agenti esogeni (come le radiazioni ultraviolette/UV, strettamente correlate alla patogenesi “ambientale” del melanoma maligno cutaneo), che possono compromettere la corretta replicazione e/o trascrizione e necessitano di meccanismi correttivi, allo scopo di prevenire l'insorgenza di mutazioni (81). Le dinamiche cromatiniche governano strettamente l'attivazione e la funzione dei geni, modulando l'accesso di fattori regolatori al DNA, ed influenzano in modo determinante il comportamento sia delle cellule normali che di quelle neoplastiche (78). La stretta organizzazione ed il coordinamento dei fattori che regolano l'apertura e la chiusura della cromatina sono cruciali per assicurare che il codice genetico si mantenga intatto (81). Gli chaperoni degli istoni giocano un ruolo fondamentale in questo processo: infatti guidano l'accesso degli istoni alle molecole di DNA nei siti in cui la cromatina nucleare dev'essere riparata o



rimodellata (82). In questo contesto, il Chromatin Assembly Factor-1 (CAF-1) risulta essere specifico per le dinamiche degli istoni H3 ed H4 ed agisce sia nella fase S del processo mitotico, sia nella riparazione del DNA (83-86) (Figura 6). CAF-1 è un complesso proteico trimerico, costituito dalle subunità p48, p60 e p150; queste tre subunità sono in grado di assicurare che nel corso della fase finale della riparazione del DNA siano ripristinati diversi aspetti fondamentali dell'organizzazione cromatinica, inclusi la posizione del nucleosoma e le "impronte epigenetiche", prima della replicazione cellulare (41-43). CAF-1 rimuove le lesioni puntiformi del DNA, inclusi i dimeri di pirimidina correlati con il danno da UV ed i fotoprodotto 6-4 durante il NER (Riparo da Escissione di Nucleotidi), attraverso l'interazione con PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (84-86). Esperimenti di delezione delle subunità di CAF-1 in *S. cerevisiae* conferivano infatti sensibilità alle radiazioni UV (81). In particolare, il silenziamento della subunità p60 tramite iRNA portava all'accumulo di interruzioni nel doppio filamento di DNA ed all'induzione di morte cellulare programmata in cellule umane proliferanti, ma non in cellule quiescenti (87). CAF-1/p60 è stato proposto come nuovo marker di proliferazione e di valutazione prognostica, in quanto è risultato overespresso in una serie di neoplasie umane (cancro della mammella, della

lingua e della prostata), in stretta associazione con la loro aggressività biologica (88-91). Il nostro gruppo di ricerca ha inoltre recentemente confermato questo dato su una casistica selezionata di melanomi cutanei, dimostrando l'esistenza di una correlazione statisticamente significativa tra l'overespressione di p60 e la prognosi infausta dei pazienti, indipendentemente dallo spessore di Breslow, dalla presenza di ulcerazione e dalle principali variabili clinico-patologiche al momento della diagnosi (25). Sulla base di tali presupposti, questo studio si è proposto di indagare l'espressione di un marker di staminalità (nestina) in una serie di 129 casi di melanoma maligno cutaneo, selezionati in base alla disponibilità dei dati completi di follow-up. I risultati sono stati correlati quindi con i principali parametri clinico-patologici di prognosi e con l'espressione di CAF-1/p60, allo scopo di valutare la relazione tra staminalità e deregolazione epigenetica della compattazione cromatinica ed aggressività biologica dei melanomi maligni cutanei.

## **1. Materiali e Metodi**

### **Popolazione-studio**

Lo studio retrospettivo, progettato secondo le direttive del Comitato Etico Istituzionale, è stato realizzato su una casistica selezionata di melanomi cutanei primitivi, fissati in formalina ed inclusi in blocchi di paraffina, conservati negli archivi del Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali –Sezione di Anatomia Patologica dell’Università degli Studi di Napoli “Federico II”. La casistica è stata selezionata fra tutti i melanomi cutanei escissi chirurgicamente presso la sezione di Dermatologia del Dipartimento di Patologia Sistemica e presso la Divisione di Chirurgia Plastica dello stesso ateneo tra gennaio 1985 e dicembre 2008. I criteri di inclusione sono stati i seguenti:

- melanomi primari insorti in aree cutanee fotoesposte;
- assenza di lesioni multiple, di storia ereditaria di cancro cutaneo, e/o di esposizione ad agenti chimici e/o fisici predisponenti;
- follow-up clinico post-operatorio, esteso da un minimo di 3 mesi ad un massimo di 16 anni.

In base alla rispondenza con i suddetti criteri, sono stati selezionati 129 casi. Per ciascun paziente, si è provveduto a registrare in maniera

standardizzata i dati anagrafici (età, sesso), clinici e di follow-up, e le caratteristiche istopatologiche dei tumori, come lo spessore (classi di spessore di Breslow, secondo l'American Joint Committee on Cancer, AJCC 2009) (23, Tabella 2).

### **Immunoistochimica**

Per ciascun caso, sono state tagliate sezioni sottili (4  $\mu\text{m}$ ) seriate, e fatte aderire a vetrini polilisinati. Come controllo sono state utilizzate sezioni paraffinate di cute umana normale ottenute da 10 pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia ricostruttiva per patologie non neoplastiche, e sezioni corrispondenti a 15 nevi melanocitici benigni (5 giunzionali, 5 composti e 5 intradermici). Tutti i casi selezionati sono stati colorati con doppia colorazione per CAF-1/p60 e nestina. Le sezioni sono state deparaffinate in Xilolo e reidratate in una scala decrescente di alcoli. Per la colorazione con l'anticorpo anti-CAF-1/p60 i campioni sono stati sottoposti ad una prima fase di smascheramento termindotto, a 500Watt per 10 minuti, in tampone citrato  $10^{-3}$  M (pH 6.0), poi immersi per 15 minuti in pepsina allo 0.4%. L'inibizione degli enzimi endogeni che avrebbero potuto interferire con la colorazione è stata ottenuta mediante l'incubazione con gli appositi reagenti bloccanti forniti insieme al kit per la doppia colorazione (Dako, EnVision G|2 Doublestain System Rabbit/Mouse). Prima dell'incubazione

con l'anticorpo primario, si è proceduto alla saturazione dei siti di legame aspecifici mediante l'incubazione con siero normale di cavallo (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) al 2%. Per l'evidenziazione di CAF-1/p60 è stato utilizzato il clone SS53, Abcam, Cambridge, MA, USA, ad una diluizione di 1:300 (25,89,90), mentre per la nestina è stato utilizzato il clone 10C2, Santa Cruz Biotechnology, alla concentrazione di 1:300. Entrambi gli anticorpi primari sono stati incubati in camera umida per un'ora, a temperatura ambiente. Il segnale è stato evidenziato utilizzando il kit per la doppia colorazione (Dako, EnVision G|2 Doublestain System Rabbit/Mouse). Il segnale corrispondente a CAF-1/p60 è stato visualizzato con il sistema perossidasi/diaminobenzidina (segnale nucleare marrone), mentre il segnale della nestina, essendo citoplasmatico, è stato evidenziato tramite il sistema fosfatasi alcalina/Fast Red (segnale rosa/fucsia), allo scopo di evitare sovrapposizioni cromatiche con la melanina. Dopo il contrasto dei nuclei con ematossilina di Mayer, le sezioni sono state nuovamente disidratate e coperte con un vetrino coprioggetto, usando un agente montante sintetico (Entellan, Merk, Germany). Come controlli positivi per CAF-1/p60 sono state utilizzate sezioni di cancro della mammella e di carcinoma del cavo orale a cellule squamose (25,89,90), e per la nestina, sezioni di cute normale e di gliomi (29,56). L'espressione

dei due antigeni è stata valutata sottoforma di percentuale di cellule tumorali positive sul totale delle cellule neoplastiche presenti in almeno 10 campi osservati ad alto ingrandimento. L'espressione è stata poi valutata in base ad una scala arbitraria, così strutturata: 0 (<5% di cellule positive); + (da 5% a <15%); ++ (da 15% a <30%); +++ ( $\geq$ 30%) (25,73,75). Le sezioni colorate sono state valutate separatamente da due patologi, ed in caso di discordanza, la valutazione è stata discussa e risolta mediante consenso.

### **Analisi statistica**

Per valutare la significatività dei parametri esaminati, è stata effettuata l'analisi univariata delle variabili non parametriche mediante il test di correlazione non parametrico di Spearman. La sopravvivenza libera da malattia è stata calcolata dalla data dell'intervento di escissione del melanoma alla data di registrazione della prima metastasi loco-regionale (dermica, ipodermica o linfonodale) e/o a distanza. Le curve di sopravvivenza libera da malattia sono state disegnate utilizzando le stime di Kaplan-Meier e sono state comparate usando il "log-rank test". La regressione logistica multinomiale è stata utilizzata per valutare il ruolo del sesso, dell'età dei pazienti, dello spessore di Breslow, dell'ulcerazione e dell'espressione di CAF-1/p60 e della nestina come variabili predittive di una prognosi sfavorevole del tumore. I dati sono stati analizzati tramite il

PRISM 4 package (versione 4) per Windows. Il valore di  $P < 0.05$  è stato scelto come livello di significatività.

## 2. Risultati

La popolazione-studio comprendeva 51 pazienti di sesso maschile e 78 di sesso femminile, con un'età media di 51.34 anni (da 14 a 88 anni); la durata media del follow-up era di 10.4 anni (da 3 mesi a 16 anni) (Tabella 2). La profondità d'invasione (spessore di Breslow) del melanoma era inferiore o uguale a 1.00 mm in 67 pazienti (51.94%), compresa tra 1.01 e 2.00 mm in 25 (19.38%), tra 2.01 e 4.00 mm in 26 (20.15%) ed oltre 4.00 mm in 10 casi (7.75%) (Tabella 2). In tutti i casi, i tessuti sono stati ottenuti da campioni routinari di melanoma escissi con margini di sicurezza. L'ulcerazione è stata rilevata nel 18.6% dei pazienti (24 casi, 1 con uno spessore di Breslow inferiore ad 1.00 mm, 2 con uno spessore tra 1.1 e 2.00 mm, 15 compresi tra 2.01 e 4.00 mm e 6 oltre i 4.00 mm) (Tabella 2). 5 pazienti (3.87%) hanno sviluppato metastasi cutanee (dermiche/ipodermiche) nel corso del periodo di follow-up; 15 pazienti (11.63%) hanno sviluppato metastasi linfonodali, e 8 pazienti (6.20%) metastasi a distanza; tra questi, 4 pazienti (3.1%) hanno sviluppato sia metastasi linfonodali che a distanza, 2 pazienti (1.55%) hanno registrato contemporaneamente metastasi cutanee, linfonodali e a distanza ed 1 solo paziente (0.77%) ha registrato unicamente metastasi a distanza. (Tabella 2).



Come atteso, la curva di sopravvivenza libera da malattia è influenzata dallo spessore del tumore. Alla conclusione del follow-up, tra i 21 casi di melanoma con follow-up sfavorevole, lo spessore di Breslow era  $\leq 1.00$  mm in 2 casi (9.5%), compreso tra 1.01 e 2.00 mm in 3 casi (14.3%), compreso tra 2.01 e 4.00 mm in 10 casi (47.6%) e  $>4.00$  mm in 6 casi (28.6%). Di questi pazienti, 5 (23.8%) sono deceduti (1 con sole metastasi cutanee, 1 con sole metastasi linfonodali e 1 con sole metastasi a distanza, 2 con metastasi cutanee, linfonodali e a distanza) (Tabella 2). La percentuale di casi con fenotipo metastatico in ogni gruppo di Breslow variava secondo questi valori: il 60% (6/10 pazienti) per il gruppo di pazienti con melanoma di profondità superiore ai 4.00 mm, il 38.5% (10/26) per il gruppo con spessore da 2.01 a 4.00 mm; il 12% (3/25) per i melanomi con spessore compreso tra 1.01 e 2.00 mm, ed il 3.0% (2/67) per quelli con profondità  $\leq 1.00$  mm (Tabella 2).

### **Espressione di CAF-1/p60**

Nei melanociti normali dell'epidermide e nei nevi melanocitici ordinari l'espressione di CAF-1/p60 è risultata bassa (compresa tra 0 e +). Tutti i casi di melanoma cutaneo esaminati hanno mostrato un'espressione nucleare di CAF-1/p60 da moderata (++) ad alta (+++), prevalente nelle cellule della fase di crescita verticale (invasiva). In dettaglio,

l'overespressione di CAF-1/p60 (+++) nella componente verticale è stata rilevata in 38 casi (il 29.46%), mentre livelli moderati (++) sono stati rilevati in 57 casi (il 44.19%); nei restanti 34 casi (il 26.36%) l'espressione era scarsa (+) (Figura 7, Tabella 2). È stato registrato un trend positivo per l'espressione di CAF-1/p60 dalle lesioni sottili a quelle spesse, ma questo risultato non ha raggiunto la significatività statistica ( $P>0.05$ ). Non è stata trovata una significativa correlazione statistica neppure tra i livelli di espressione di CAF-1/p60 e il sesso o l'età dei pazienti ( $P>0.05$ ). Una correlazione statistica significativa è stata trovata, invece, tra l'overespressione massima di CAF-1/p60 (+++) nei melanomi cutanei e la comparsa di metastasi loco-regionali o a distanza e/o morte per malattia dei pazienti ( $P<0.05$ ). Tale correlazione risultava indipendente dallo spessore di Breslow e/o la presenza di ulcerazione nel tumore primario ( $P<0.05$ ), dall'indice mitotico, dal sesso e dall'età dei pazienti al momento della diagnosi ( $P<0.05$ ).

### **Espressione della nestina**

La nestina è risultata positiva in tutti i gliomi di controllo (++) e nei nevi valutati, sia pure con segnale compreso tra 0 (poche cellule, spesso isolate, nel contesto della lesione), + e, solo in 3 casi, ++. Tutti i casi di melanoma cutaneo esaminati mostrano un'espressione citoplasmatica della nestina da

moderata (++) ad alta (+++) , sia nelle cellule della fase di crescita verticale (invasiva), sia di quella radiale (intraepiteliale). In dettaglio, l'overespressione della nestina (+++) nella fase radiale è stata registrata in 52 casi (40.31%), mentre nei restanti 77 l'espressione era comunque moderata (++); nella componente verticale, l'iperespressione della nestina (+++) è stata rilevata in 112 casi (86.82%), mentre livelli moderati (++) si sono registrati nei restanti 17 casi (13.18%) (Figura 7, Tabella 2).

### **Colocalizzazione di CAF-1/p60 e nestina**

In tutti i melanomi valutati, la presenza di segnale per CAF-1/p60 è risultata sempre associata a positività per nestina ( $P < 0.01$ ). Dei 38 casi con componente verticale fortemente positiva (+++) per CAF-1/p60, infatti, 37 (il 97.37%) mostravano la contemporanea iperespressione (+++) di nestina. Al contrario, quest'ultima risultava frequentemente espressa anche nella fase di crescita radiale dei tumori, spesso negativa per CAF-1/p60. Infatti dei 52 tumori con componente radiale fortemente positiva alla nestina (+++), solo 27 (il 51.92%) presentavano un'altrettanto marcata positività (+++) per CAF-1/p60 (Figura 7, Tabella2)

### 3. Discussione

Diverse motivazioni rendono attraente l'ipotesi dell'origine staminale delle neoplasie melanocitarie. Innanzitutto, i nevi melanocitici ed il melanoma potrebbero avere un'origine comune, derivando da una cellula staminale che ha acquisito delle anomalie genetiche. La severità dell'anomalia nella regolazione della crescita darebbe la spiegazione del grado di iperproliferazione; i difetti autolimitanti tramite i normali meccanismi cellulari di "rescue" darebbero origine alle lesioni benigne, quelli non autolimitanti alle neoplasie maligne (14). L'insorgenza di una mutazione nel corso dell'evoluzione di un processo neoplastico benigno darebbe spiegazione della nascita di un subclone maligno. Il concetto di "dedifferenziazione" sarebbe quindi abolito. Piuttosto che la "dedifferenziazione" del melanoma a partire da un melanocita normale, il fenotipo "dedifferenziato" potrebbe essere semplicemente spiegato con la slatentizzazione di una cellula staminale/precursore con ridotta abilità a produrre cellule figlie competenti in grado di differenziarsi (14). Ancora, si potrebbero considerare le metastasi come direttamente derivanti dalle più primitive cellule staminali, ipotesi che spiegherebbe le frequenti dimensioni ridotte e le differenti capacità di aderenza cellulare delle cellule

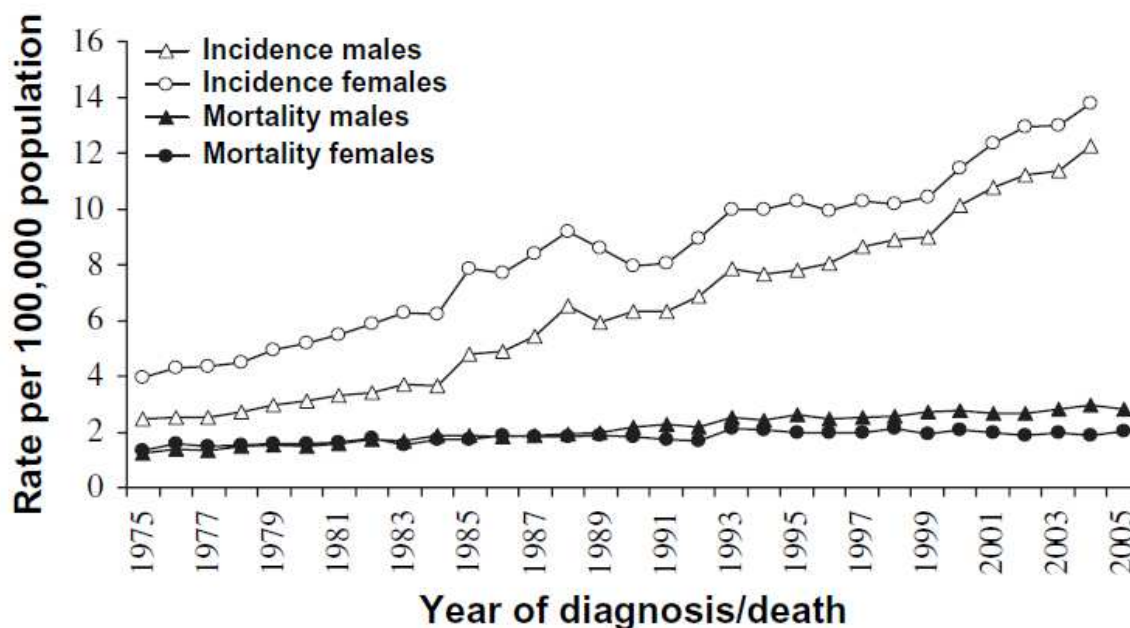
metastatiche rispetto a quelle neoplastiche della lesione primaria (14). Ancora, il ritardo nel manifestarsi della malattia o la sua quiescenza potrebbero essere spiegati molto più facilmente: le cellule staminali mutate potrebbero esistere per lunghi periodi nell'organismo senza essere stimulate, e poi, in presenza di condizioni ambientali appropriate, potrebbero di nuovo dare origine ad una progenie di cellule TA responsabili della "evidenziazione" della presenza del tumore. Accettando l'ipotesi dell'origine staminale, si potrebbe spiegare più semplicemente la sussistenza della mortalità per melanoma, sostanzialmente invariata anche in presenza di una forte risposta immunologica agli antigeni melanocitari. Mentre le cellule figlie differenziate possono essere facilmente distrutte dal sistema immunitario, infatti, le cellule staminali maligne riuscirebbero a passare inosservate (14). Sembra evidente che una serie di caratteristiche biologiche dei melanomi sono compatibili con la teoria che questi possano originarsi da una cellula staminale mutata. È ovvio che tale modello di patogenesi del melanoma basato sulla "stem cell theory" risulti in contrasto con il modello della "dedifferenziazione", mentre è pienamente consistente con la nostra conoscenza clinica del melanoma. Ciò implica rilevanti implicazioni diagnostiche, prognostiche e terapeutiche (14). Pensare ad un coinvolgimento del comparto staminale nella patogenesi del melanoma non

significa necessariamente immaginare che le cellule neoplastiche si originino tutte direttamente da un unico clone meno differenziato, immaturo. Secondo Ackermann et al., infatti, i melanomi comprenderebbero una mistura di precursori primitivi esprimenti nestina ed allo stesso tempo cellule differenziate, che si presume abbiano differenti caratteristiche (92). Nei casi più aggressivi della malattia, l'espansione e l'overespressione dei filamenti citoplasmatici potrebbe influenzare il potenziale metastatico delle lesioni maligne andando ad incentivarne la proliferazione, la trasformazione e la migrazione delle cellule (49,92). Questa ipotesi viene confermata dai nostri risultati, che evidenziano una popolazione di melanociti che nella prima fase di sviluppo della neoplasia (crescita radiale) esibiscono dapprima un fenotipo "staminale" (espressione di nestina), probabilmente riproducendosi direttamente da un precursore staminale. In un secondo momento, tali cellule, evidentemente facilitate dai meccanismi cellulari correlati con la loro dedifferenziazione, acquisirebbero un netto vantaggio proliferativo (espressione di CAF-1/p60) ed un maggiore potenziale invasivo, almeno in parte correlato all'incrementata produzione di nestina. Come precedentemente accennato, la nestina risulta coinvolta nei processi di migrazione e proliferazione cellulare. Questa proteina è espressa nelle cellule progenitrici in



proliferazione del SNC, del SNP e del muscolo e la sua espressione precede l'espressione di altri tipi di filamenti intermedi, come i neurofilamenti, GFAP e desmina nel SNC e nel muscolo (49). Questo potrebbe essere spiegato dall'ipotesi che il network citoplasmatico formato dalla nestina sia più compatibile con le dinamiche strutturali di una cellula in divisione (71), oppure che esso serva come "stampo" per altri filamenti intermedi espressi più tardi nello sviluppo (49,71). Ad ogni modo, dal momento che l'espressione della nestina risulta vantaggiosa per le cellule mitotiche in migrazione, i suoi livelli più elevati nella quota infiltrante (verticale) dei melanomi cutanei suggerisce un suo ruolo cruciale nel processo di invasione tumorale (71). La presenza significativa della coespressione di CAF-1/p60 quasi esclusivamente nella quota verticale (invasiva) nestina-positiva delle lesioni, suggerisce una sequenza temporale di comparsa, nei melanomi maligni cutanei, che vede prima l'espressione della sola nestina nella fase radiale, ed in seguito, nella fase verticale, la contemporanea iperespressione di CAF-1/p60, prevalente nella fase verticale. Ciò suggerisce un ruolo precoce del fenotipo staminale nell'induzione e progressione neoplastica del melanoma maligno cutaneo, comprendente l'acquisizione della invasività stromale e, successivamente, l'acquisizione di un netto vantaggio selettivo di crescita della popolazione della fase

verticale di crescita, segnalato dalla overespressione di CAF-1/p60. Questi risultati indicano l'esistenza dei presupposti teorici per poter ipotizzare, per nestina e CAF-1/p60, un ruolo di nuovi, sensibili marcatori di aggressività nel melanoma maligno cutaneo, nonché potenziali target per terapie molecolari specifiche.

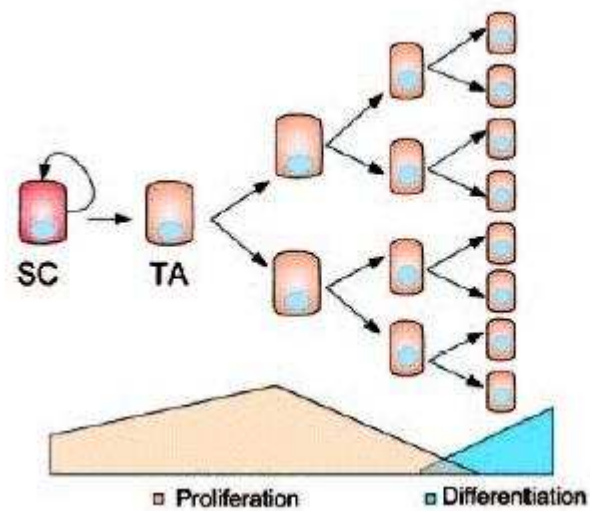




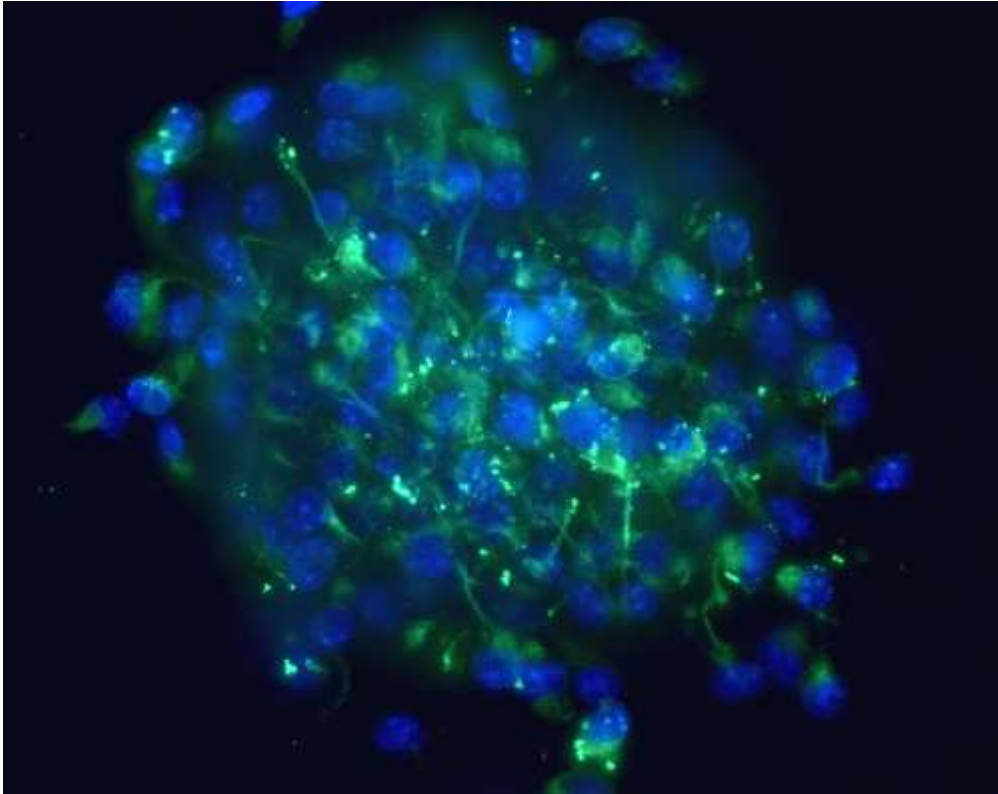
**Figura 1** – Il grafico rappresenta l’andamento degli indici di incidenza e mortalità per melanoma cutaneo nel Regno Unito relativo al trentennio 1975-2005, per una popolazione di 55 milioni di individui. Da: MacKiel RM, Hauschild A, Eggermont AMM. *Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. Annals of Oncology*, 20:vi1-vi7, 2009.

Estimated New Cases*							
			Males	Females			
Prostate	192,280	25%			Breast	192,370	27%
Lung & bronchus	116,090	15%			Lung & bronchus	103,350	14%
Colon & rectum	75,590	10%			Colon & rectum	71,380	10%
Urinary bladder	52,810	7%			Uterine corpus	42,160	6%
<u>Melanoma of the skin</u>	<u>39,080</u>	<u>5%</u>			Non-Hodgkin lymphoma	29,990	4%
Non-Hodgkin lymphoma	35,990	5%			<u>Melanoma of the skin</u>	<u>29,640</u>	<u>4%</u>
Kidney & renal pelvis	35,430	5%			Thyroid	27,200	4%
Leukemia	25,630	3%			Kidney & renal pelvis	22,330	3%
Oral cavity & pharynx	25,240	3%			Ovary	21,550	3%
Pancreas	21,050	3%			Pancreas	21,420	3%
<b>All Sites</b>	<b>766,130</b>	<b>100%</b>			<b>All Sites</b>	<b>713,220</b>	<b>100%</b>

**Figura 2** – Nella tabella sono indicate le stime relative alle previsioni sull’incidenza del cancro nel 2009, suddivise in base ai diversi tipi di neoplasia, per uomini e donne. In rosso vengono sottolineati i valori relativi al melanoma cutaneo. Da: Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. *Cancer Statistics, 2009. CA Cancer J Clin*, 59:225-249; 2009.



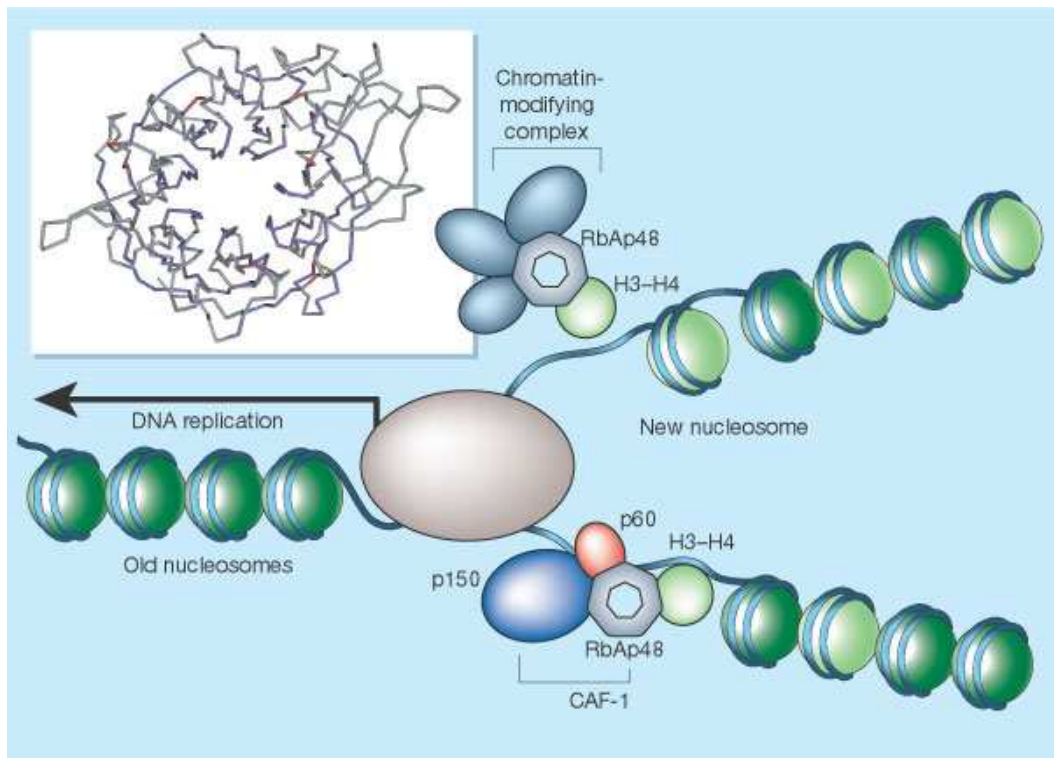
**Figura 3** – L'immagine illustra schematicamente l'attività proliferativa ed il differenziamento delle cellule staminali e delle cellule Transiently Amplifying. Le cellule staminali si dividono lentamente, hanno la capacità di auto rinnovarsi e di produrre una progenie di cellule che si dividono più rapidamente (TA). Dopo alcuni cicli di divisione, le cellule TA normalmente escono dal ciclo cellulare ed iniziano a differenziarsi. Da: Fritz Aberger and Anna Maria Frischauf. GLI genes and their targets in epidermal development and disease. NCBI, Bookshelf.



**Figura 4** - L'immagine mostra una neurosfera indifferenziata, in vitro, proveniente dalla zona sub-ventricolare di un topo adulto (40X). La maggioranza delle cellule nella sfera sono immunoreattive per nestina (verde). I nuclei (blu) sono stati marcati con DAPI. Da: Gianvito Martino - Dip. di Neuroscienze - Fondazione San Raffaele del Monte Tabor - Milano. [www.sanraffaele.org](http://www.sanraffaele.org).



**Figura 5** – L'illustrazione rappresenta i diversi livelli di organizzazione e quindi di compattazione cromatinica nucleare. Da: N. Bouvier for G. Almouzni UMR 218 CNRS/Institut Curie.



**Figura 6** – L'illustrazione rappresenta il ruolo del complesso CAF-1 nella regolazione del riparo e della compattazione cromatinica nucleare. Da: Steven Henikoff. Gene regulation: Versatile assembler. Nature, 423:814-817, 2003.

**Table 1. TNM Staging Categories for Cutaneous Melanoma**

Classification	Thickness (mm)	Ulceration Status/Mitoses
<b>T</b>		
Tis	NA	NA
T1	≤ 1.00	a: Without ulceration and mitosis < 1/mm <sup>2</sup> b: With ulceration or mitoses ≥ 1/mm <sup>2</sup>
T2	1.01-2.00	a: Without ulceration b: With ulceration
T3	2.01-4.00	a: Without ulceration b: With ulceration
T4	> 4.00	a: Without ulceration b: With ulceration
<b>N</b>		
	No. of Metastatic Nodes	Nodal Metastatic Burden
N0	0	NA
N1	1	a: Micrometastasis* b: Macrometastasis†
N2	2-3	a: Micrometastasis* b: Macrometastasis† c: In transit metastases/satellites without metastatic nodes
N3	4+ metastatic nodes, or matted nodes, or in transit metastases/satellites with metastatic nodes	
<b>M</b>		
	Site	Serum LDH
M0	No distant metastases	NA
M1a	Distant skin, subcutaneous, or nodal metastases	Normal
M1b	Lung metastases	Normal
M1c	All other visceral metastases	Normal
	Any distant metastasis	Elevated

Abbreviations: NA, not applicable; LDH, lactate dehydrogenase.  
 \*Micrometastases are diagnosed after sentinel lymph node biopsy.  
 †Macrometastases are defined as clinically detectable nodal metastases confirmed pathologically.

**Tabella 1** – La tabella riporta i criteri di stadi azione del melanoma cutaneo, così come stabiliti dall'AJCC. Da: Balch CM, Gershenwald JE, Soong S, Thompson JF, Atkins MB et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J Clin Oncol, 2009. In press.

CASO	ETA' (anni)	SESSO	FOLLOW-UP	SPESSORE DI BRESLOW AJCC system (2009)	LIVELLO (Clark)	ULCERAZIONE	CAF-1/p60		NESTINA		S-N-M-D (mesi)
							R	V	R	V	
1	62	M	139	0,30	ND	No	0	++	++	+++	
2	40	F	126	0,30	II	No	0	+	++	++	
3	63	M	142	0,35	II	No	0	+	++	++	
4	60	M	122	0,35	II	No	+	++	++	+++	
5	42	M	165	0,37	II	No	0	+	++	++	
6	42	F	146	0,40	II-III	No	0	+	++	++	
7	53	F	150	0,40	II	No	0	+	++	++	
8	30	M	122	0,40	II	No	0	+	++	++	
9	55	M	140	0,45	II-III	No	0	+	++	++	
10	61	F	110	0,45	III	No	0	+	++	++	
11	30	M	113	0,45	II	No	+	++	++	+++	
12	71	F	130	0,50	II	No	+	+	++	+++	
13	24	M	123	0,50	III-IV	No	0	+	++	++	
14	59	M	117	0,50	II	No	0	+	++	++	
15	71	M	110	0,54	II	No	+	+	++	+++	
16	37	M	130	0,55	III	No	0	+	++	++	
17	68	F	136	0,55	ND	No	0	+	++	++	
18	32	F	129	0,55	IV	No	0	+	++	++	
19	37	F	110	0,55	II	No	0	+	++	++	
20	39	M	136	0,60	III	No	+	++	++	+++	
21	45	M	129	0,60	II	No	+	+	++	+++	
22	21	M	128	0,60	III	No	0	+	++	+++	
23	55	M	125	0,60	III	No	0	+	++	+++	
24	29	F	122	0,60	II	No	0	+	++	+++	
25	39	F	119	0,60	II	No	0	+	++	+++	
26	52	M	115	0,60	III	No	0	+	++	+++	
27	54	M	126	0,62	II	No	0	+++	++	+++	18N
28	60	M	119	0,65	IV	No	0	+	++	+++	
29	78	F	130	0,70	III	No	+	++	++	+++	
30	60	F	126	0,70	III	No	0	+	++	+++	
31	62	F	138	0,70	II-III	No	0	+	++	+++	
32	46	M	137	0,70	II	No	0	+	++	+++	
33	67	M	164	0,70	II	No	+	++	++	+++	
34	39	F	147	0,70	II	No	0	+	++	+++	
35	48	F	138	0,70	II	No	0	+	++	+++	
36	32	F	137	0,70	II	No	0	+	++	+++	
37	68	F	115	0,70	II	No	0	+	++	+++	
38	65	F	113	0,70	II	No	0	+	++	+++	
39	61	F	113	0,70	II	No	+	+	++	+++	
40	52	F	174	0,75	III	No	+	+	++	+++	
41	53	M	138	0,75	III	No	0	+	++	+++	
42	65	F	134	0,75	III	No	0	+++	++	+++	70S
43	39	F	120	0,75	II	No	+	++	++	+++	

CASO	ETA' (anni)	SESSO	FOLLOW-UP	SPESSORE DI BRESLOW AJCC system (2009)	LIVELLO (Clark)	ULCERAZIONE	CAF-1/p60		NESTINA		S-N-M-D (mesi)
							R	V	R	V	
44	46	F	136	0,75	II-III	No	+	++	+++	+++	
45	69	F	122	0,75	III	No	++	++	++	+++	
46	74	F	110	0,75	III	No	+	++	++	+++	
47	ND	M	ND	0,76	III	No	+	+++	+++	+++	
48	44	F	128	0,78	III	No	++	+++	+++	+++	
49	88	M	110	0,80	III	No	++	++	++	+++	
50	56	M	18	0,80	II-III	No	+	++	++	+++	
51	43	F	122	0,82	III	No	+	++	++	+++	
52	39	M	109	0,84	III	No	+	++	++	+++	
53	35	F	136	0,85	III	No	++	++	++	+++	
54	40	M	109	0,85	III	No	+	++	++	+++	
55	30	F	140	0,90	III	No	+	++	++	++	
56	57	M	127	0,90	IV	No	+	++	++	+++	
57	35	M	71	0,90	II-III	Sì	++	++	++	+++	
58	51	F	122	0,95	IV	No	+	++	++	+++	
59	32	F	54	0,95	III	No	+	+++	+++	+++	
60	57	M	129	1,00	III	No	+	+++	+++	+++	
61	57	M	126	1,00	IV	No	+	++	++	++	
62	35	F	126	1,00	IV	No	+	++	++	+++	
63	67	F	126	1,00	III-IV	No	+	+++	+++	+++	
64	63	F	125	1,00	IV	No	++	++	++	+++	
65	75	F	116	1,00	IV	No	+	+++	+++	+++	
66	14	F	115	1,00	III-IV	No	+	++	++	+++	
67	17	F	114	1,00	IV	No	+	+++	+++	+++	
68	43	M	84	1,05	III	No	++	+++	+++	+++	
69	63	M	161	1,10	III	No	+	+++	+++	+++	
70	34	F	162	1,10	III	No	+	+++	++	++	
71	41	F	122	1,10	IV	No	+	+++	++	+++	
72	37	F	174	1,20	III	No	++	+++	++	+++	
73	24	M	110	1,20	III-IV	No	+	+++	++	+++	
74	39	F	125	1,25	II-III	No	+	+++	+++	+++	
75	66	F	176	1,30	III	No	++	++	++	+++	
76	60	M	160	1,30	III	Sì	+	+++	++	+++	
77	48	F	173	1,40	III-IV	No	+	++	++	+++	
78	53	F	150	1,40	IV	No	+	+++	+++	+++	24N
79	64	F	139	1,45	III	No	+	++	++	+++	
80	54	F	150	1,45	III	No	+	+++	++	+++	
81	28	M	21	1,45	ND	No	+	++	++	+++	
82	53	F	173	1,50	III	No	+	++	++	+++	
83	63	F	138	1,50	III	No	+	+++	+++	+++	
84	51	M	134	1,50	III	No	+	++	++	+++	
85	46	F	127	1,50	III	No	+	++	++	+++	115N;132N
86	38	F	138	1,50	III	No	++	+++	+++	+++	

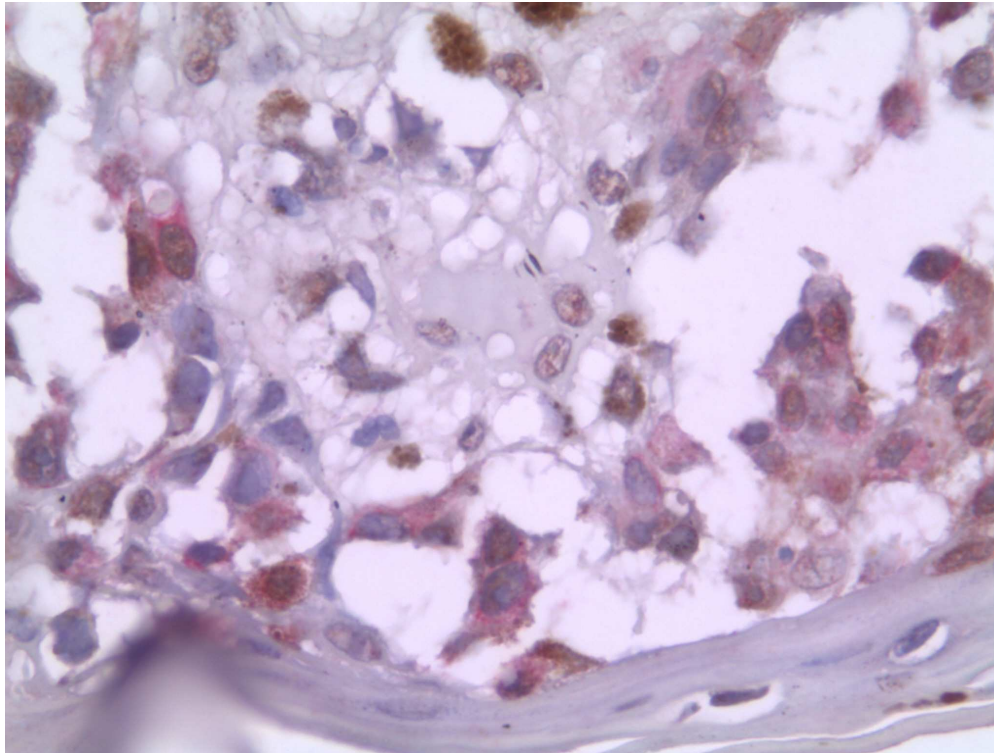


CASO	ETA' (anni)	SESSO	FOLLOW-UP	SPESSORE DI BRESLOW AJCC system (2009)	LIVELLO (Clark)	ULCERAZIONE	CAF-1/p60		NESTINA		S-N-M-D (mesi)
							R	V	R	V	
87	58	F	54	1,60	III	Sì	+	+++	++	+++	
88	32	F	171	1,70	III	No	++	+++	+++	+++	
89	67	M	114	1,70	III-IV	No	+	++	++	+++	
90	84	F	162	1,85	IV	No	+	++	++	+++	
91	48	F	161	1,90	III	No	+	+++	+++	+++	7N
92	37	F	117	1,90	III	No	+	++	+++	+++	
93	27	F	141	2,10	III	No	+	++	+++	+++	
94	36	M	138	2,10	III	Sì	+	++	+++	+++	
95	73	M	137	2,10	III	Sì	+	++	+++	+++	
96	81	F	14	2,10	III	No	+	+++	+++	+++	2M
97	77	M	109	2,20	IV	Sì	+	++	+++	+++	
98	53	F	149	2,30	III	Sì	+	++	+++	+++	
99	56	F	161	2,50	IV	No	++	++	+++	+++	
100	21	M	166	2,55	III	Sì	+	++	+++	+++	
101	ND	F	137	2,70	IV	Sì	+	++	+++	+++	
102	51	F	110	2,70	III	Sì	+	+++	+++	+++	9S; 18D
103	60	F	6	2,70	ND	No	+	++	+++	+++	1N
104	33	F	14	2,90	III	Sì	+	++	+++	+++	14M; 22M
105	71	M	182	3,00	IV	No	+	+++	++	+++	114N; 114D
106	37	F	166	3,00	III	No	+	++	+++	+++	
107	66	M	125	3,00	IV	Sì	+	+++	+++	+++	12D
108	62	F	131	3,00	III	No	+	++	+++	+++	
109	39	F	120	3,00	IV	No	+	++	+++	+++	
110	38	F	150	3,00	IV	Sì	+	++	+++	+++	
111	83	F	146	3,00	IV	Sì	+	++	+++	+++	
112	43	M	130	3,00	IV	No	+	++	+++	+++	
113	60	M	160	3,10	IV	No	+	++	+++	+++	
114	75	M	117	3,10	V	Sì	++	+++	+++	+++	6S; 7N; 7M; 8D
115	54	F	182	3,20	IV	No	+	++	+++	+++	
116	73	F	149	3,30	IV	Sì	+	+++	+++	+++	12N
117	70	M	37	3,50	III	No	+	+++	+++	+++	22N; 26M
118	42	M	54	3,70	IV	Sì	+	++	+++	+++	
119	45	M	62	4,00	ND	Sì	+	+++	+++	+++	2N; 29N; 26M; 28M
120	68	M	122	4,30	IV	No	+	+++	+++	+++	5N
121	38	F	3	4,80	IV-V	Sì	+	+++	+++	+++	2N
122	52	F	185	4,90	III	No	++	+++	++	+++	11S; 12N; 11M; 12D
123	55	F	166	5,10	V	Sì	+	++	+++	+++	
124	44	F	190	5,20	V	No	+	++	+++	+++	
125	31	F	189	6,00	IV	Sì	+	++	+++	+++	
126	74	F	25	6,40	IV	Sì	+	+++	+++	+++	1N; 20M; 28M
127	74	M	162	7,00	IV	No	+	++	+++	+++	
128	56	F	117	9,00	V	Sì	+	+++	+++	+++	24S
129	81	F	24	13,00	V	Sì	+	+++	+++	+++	1N;0M

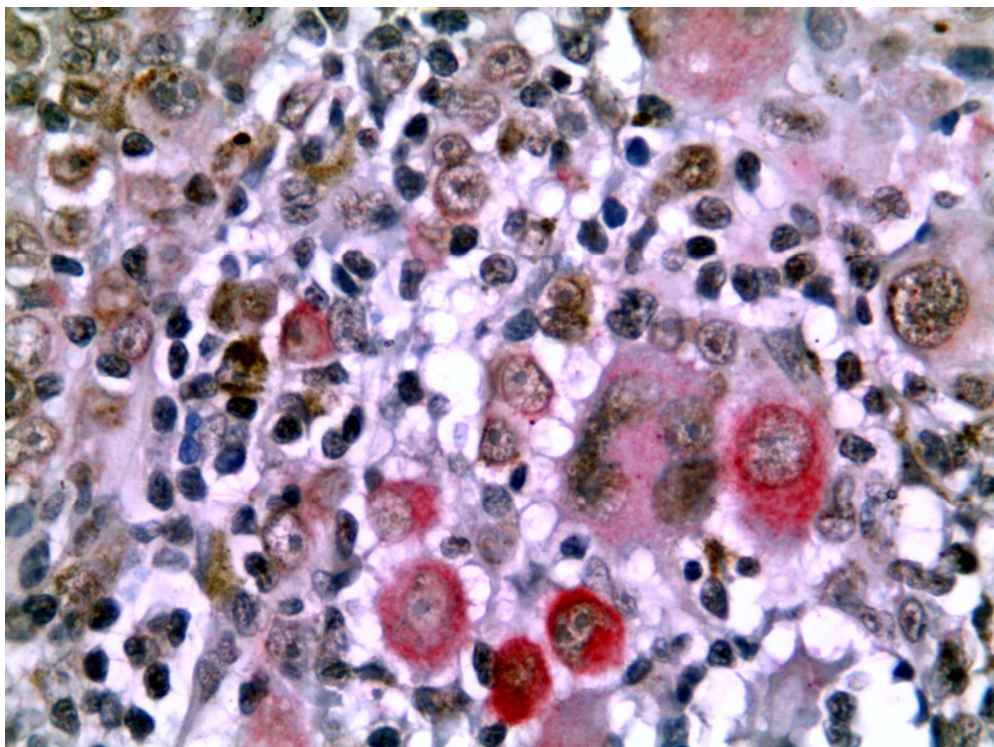
**Tabella 2** - Colonne “CAF-1/p60” e “NESTINA”: la colonna “R” contiene i valori corrispondenti all’espressione nella componente radiale della lesione; la colonna “V” contiene i valori corrispondenti all’espressione nella componente verticale.

S: Metastasi cutanee locali, intraepiteliali/intradermiche; N: Metastasi linfonodali; M: Metastasi a distanza. D: Decesso del paziente. I valori sono espressi in mesi trascorsi dalla diagnosi al momento del rilievo delle metastasi. L’espressione dei due marcatori è stata valutata in base ad una scala arbitraria, così strutturata: 0 (<5% di cellule positive); + (da 5% a <15%); ++ (da 15% a <30%); +++ (≥30%).

**A**



**B**



**Figura 7** – A: Componente radiale di melanoma cutaneo. B: Componente verticale di melanoma cutaneo. In rosa (citoplasma) si evidenzia l'espressione di nestina, in marrone (nuclei), quella di CAF-1/p60.

## **Bibliografia**

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 59;225-249; 2009.
2. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol*, 27:3-9, 2009.
3. MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AMM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Annals of Oncology*, 20:vi1-vi7, 2009.
4. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*, 19:3635-48, 2001.
5. Leiter U, Meier F, Schitteck B, Garbe C. The natural course of cutaneous melanoma. *J Surg Oncol*, 86:172-8, 2004.
6. Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med*, 351:998-1012, 2004.
7. Ruitter D, Bogenrieder T, Elder D, Herlyn M. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol*, 3:35-43, 2002.
8. Bennett DC. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene*, 22:3063-9, 2003.
9. Hussein MR. Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. *J Clin Pathol*, 57:797-801, 2004.
10. Clark Jr WH, Elder DE, Guerry DT, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol*, 15:1147-65, 1984.

11. Herlyn M, Thurin J, Balaban G, Bannicelli JL, Herlyn D, Elder DE et al. Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression. *Cancer Res*, 45:5670–6, 1985.
12. Cramer SF. The histogenesis of acquired melanocytic nevi. Based on a new concept of melanocytic differentiation. *Am J Dermatopathol*, 6:289–98, 1984.
13. Cramer SF. The neoplastic development of malignant melanoma. A biological rationale. *Am J Dermatopathol*, 6:299–308, 1984.
14. Grichnik JM, Burch JA, Schulteis RD, Shan S, Liu J, Darrow TL, Vervaert CE, Seigler HF. Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? *J Invest Dermatol*, 126:142-153, 2006.
15. Stemple DL, Anderson DJ. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*, 71: 973-985, 1992.
16. Grichnik JM, Ali WN, Burch JA, Byers JD, Garcia CA, Clark RE et al. Kit expression reveals a population of precursor melanocytes in human skin. *J Invest Dermatol*, 106:967–71, 1996.
17. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:5530, 2005.
18. Yu HS. Melanocyte destruction and repigmentation in vitiligo: a model for nerve cell damage and regrowth. *J Biomed Sci*, 9:564–73, 2002.
19. Tobin DJ, Hagen E, Botchkarev VA, Paus R. Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen)? *J Invest Dermatol*, 111:941–7, 1998.
20. Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature*, 416:854–60, 2002.

21. Botchkareva NV, Botchkarev VA, Gilchrest BA. Fate of melanocytes during development of the hair follicle pigmentary unit. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 8:76–9, 2003.
22. Houghton AN, Real FX, Davis LJ, Cordon-Cardo C, Old LJ. Phenotypic heterogeneity of melanoma. Relation to the differentiation program of melanoma cells. *J Exp Med*, 164:812-829, 1987.
23. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S, Thompson JF, Atkins MB et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 2009. In press.
24. De Giorgi V, Massi D, Gerlini G, Mannone F, Quercioli E, Carli P. Immediate local and regional recurrence after the excision of a polypoid melanoma: tumor dormancy or tumor activation? *Dermatol Surg*, 29:664-7, 2003.
25. Mascolo M, Vecchione ML, Ilardi G, Scalvenzi M, Molea G, Di Benedetto M, Nugnes L, Siano M, De Rosa G, Staibano S. Metastasizing human skin melanoma overexpress Chromatin Assembly Factor-1/p60. *BMC Cancer*, sottomesso per pubblicazione, August 2009.
26. Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK et al. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood*, 98:1166-73, 2001.
27. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:3983-8, 2003.
28. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63:5821-8, 2003.

29. Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the c6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:781-6, 2004.
30. Lobo MV, Arenas MI, Alonso FJ et al. Nestin, a neuroectodermal stem cell marker molecule, is expressed in Leydig cells of human testis and in some specific cell types from human testicular tumors. *Cell Tissue Res*, 316:369, 2004.
31. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23:675–699, 2007.
32. Fong MY, Kakar SS. The role of cancer stem cells and the side population in epithelial ovarian cancer. *Histol Histopathol*, 25(1):113-20, 2010.
33. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells - perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 66:9339–9344, 2006.
34. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414:105–11, 2001.
35. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*, 65:9328–9337, 2005.
36. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Sayegh MH, Frank MH. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 451:345–349, 2008.
37. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea - a paradigm shift. *Cancer Res*, 66:1883–1890, 2006.

38. Klein WM, Wu BP, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJP, Tahan SR. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol*, 20;102-107, 2007.
39. Hockfield S and McKay R. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci*, 5:3310-3328, 1985.
40. Yang XH, Wu QL, Yu XB, Xu CX, Ma BF, Zhang XM, Li SN, Lahn BT, Xiang AP. Nestin expression in different tumors and its relevance to malignant grade. *J Clin Pathol*, 61:467-473, 2008.
41. Lendahl U, Zimmerman LB and McKay RDG. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60:585-595, 1990.
42. Frederiksen K and McKay R. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci*, 8:1144-1151, 1988.
43. Cattaneo C and McKay R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature*, 347:762-765, 1990.
44. Redies C, Lendahl U and McKay RDG. Differentiation and heterogeneity in T-antigen immortalized precursor cell lines from mouse cerebellum. *J Neurosci Res*, 30:601-615, 1991.
45. Renfranz PJ, Cunningham MG and McKay RDG. Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell*, 66:713-729, 1991.
46. Valtz NLM, Hayes TE, Norregaard T, Liu S and McKay RDG. An embryonic organ for medulloblastoma. *The New Biol*, 3:364-371, 1991.
47. Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RDG, Lendahl U. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci*, 103:589-597, 1992.

48. Bakos RM, Maier T, Besch R, Mestel DS, Ruzicka T, Sturm RA, Berking C. Nestin and SOX9 and SOX10 transcription factors are coexpressed in melanoma. *Exp Dermatol*. 2009.
49. Sejersen T, Lendhal U. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci*, 106:1291-1300, 1993.
50. Yang LY, Zheng JK, Liu XM, Hui GZ, Guo LH. Culture of skin-derived precursors and their differentiation into neurons. *Chin Traumatol*, 7:91, 2004.
51. Friedman B, Zarembo S, Hockfield S. Monoclonal antibody rat 401 recognizes Schwann cells in mature and developing peripheral nerve. *J Comp Neurol*, 295:43-51, 1990.
52. Wiese C, Rolletschek A, Kania G, et al. Nestin expression – a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci*, 61:2510, 2004.
53. Li L, Mignone J, Yang M, et al. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:9958, 2003.
54. Dahlstrand J, Collins VP, Lendhal U. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res*, 52:5334-5341, 1992.
55. Tohyama T, Lee V M-Y, Borke LB, Marvin M, McKay RDG, Trojanowski JQ. Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab Invest*, 66:303-313, 1992.
56. Kurihara H, Zama A, Tamura M, Takeda J, Sasaki T, Takeuchi T. Glioma/glioblastoma-specific adenoviral gene expression using the nestin gene regulator. *Gene Ther*, 7:686, 2000.
57. Sugawara K, Kurihara H, Negishi M et al. Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas. *Lab Invest*, 82:345, 2002.



58. Jin JK, Jeong BH, Na YJ, et al. Increased expression of the embryonic intermediate filament, nestin, in the brains of scrapie-infected mice. *Neurosci Lett*, 367:254, 2004.
59. Ehrmann J, Kolar Z, Mokry J. Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumors. *J Clin Pathol*, 58:222, 2005.
60. Shimada S, Tsuzuki T, Kuroda M, Nagasaka T, Hara K, Takahashi E, Hayakawa S, Ono K, Maeda N, Mori N, Illei PB. Nestin expression as a new marker in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Pathology International*, 57:60-67, 2007.
61. Brychtova S, Fiuraskova M, Hlobilková A, Brychta T, Hirnak J. Nestin expression in cutaneous melanomas and melanocytic nevi. *J Cutan Pathol*, 34:370-375, 2007.
62. Gould VE, Fodstad O, Memoli VA, Warren WH, Dardi LE, Johannessen JV. Neuroendocrine cells and associated neoplasms of the skin. In: S. Falkmer, R. Hakanson, R. Sundler (eds.), *Evolution and Tumor Pathology of the Neuroendocrine System*, pp. 545-580. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1984.
63. Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol*, 35(5):433-44, 2008.
64. Wilkerson AE, Glasgow MA, Hiatt KM. Immunoreactivity of CD99 in invasive malignant melanoma. *J Cutan Pathol*, 33(10):663-6, 2006.
65. Radfar A, Stefanato CM, Ghosn S, Bhawan J. NGFR-positive desmoplastic melanomas with focal or absent S-100 staining: Further evidence supporting the use of both NGFR and S-100 as a primary immunohistochemical panel for the diagnosis of desmoplastic melanomas. *Am J Dermatopathol*, 28(2):162-7, 2006.

66. Zubovits J, Buzney E, Yu L, Duncan LM. HMB-45, S-100, NK1/C3, and MART-1 in metastatic melanoma. *Hum Pathol*, 35: 217, 2004.
67. Orchard GE. Comparison of immunohistochemical labeling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB45 with NK1C3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J*, 32: 475, 2000.
68. Banerjee SS, Harris M. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. *Histopathology*, 36: 387, 2000.
69. Fetsch PA, Marincola FM, Abati A. The new melanoma markers: MART-1 and Melan-A (the NIH experience). *Am J Surg Pathol*, 23:607, 1999.
70. Granter SR, Weilbaecher KN, Quigley C, Fisher DE. Role for microphthalmia transcription factor in the diagnosis of metastatic malignant melanoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 10: 47, 2002.
71. Flørenes VA, Holm R, Myklebost O, Lendhal U, Fodstad Ø. Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas. *Cancer Res*, 54:354-356, 1994.
72. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 368:753-6, 1994.
73. Staibano S, Lo Muzio L, Pannone G, et al. P53 and hMSH2 expression in basal cell carcinomas and malignant melanomas from photoexposed areas of head and neck region. *Int J Oncol*, 19:551-9, 2001.
74. Lo Muzio L, Nocini P, Mignogna MD, et al. Immunocytochemical detection of hMSH2 and hMLH1 expression in oral melanoma. *Anticancer Res*, 20:741-8, 2000.

75. Staibano S, Pepe S, Lo Muzio L, et al. PARP-1 expression in malignant melanomas from photoexposed areas of the head and neck region. *Hum Pathol*, 36:724-31, 2005.
76. Boisvert-Adamo K, Longmate W, Abel EV, Aplin AE. Mcl-1 is required for melanoma cell resistance to anoikis. *Mol Cancer Res*, 7:549-56, 2009.
77. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*, 128:683-92, 2007.
78. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128:693-705, 2007.
79. Ozanne SE, Constância M. Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 3:539-46, 2007.
80. Liu S, Ren S, Howell P, Fodstad O, Riker AI. Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. *Pigment Cell Melanoma Res*, 21:545-58, 2008.
81. Ehrenhofer-Murray AE. Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur J Biochem*, 271:2335-49, 2004.
82. Ramirez-Parra E, Gutierrez C. The many faces of chromatin assembly factor 1. *Trends Plant Sci*, 12:570-6, 2007.
83. Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*, 116:51-61, 2004.
84. Linger JG, Tyler JK. Chromatin disassembly and reassembly during DNA repair. *Mutat Res*, 618:52-64, 2007.
85. Gaillard PH, Martini EM, Kaufman PD, Stillman B, Moustacchi E, Almouzni G. Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. *Cell*, 86:887-96, 1996.

86. Verger A, Crossley M. Chromatin modifiers in transcription and DNA repair. *Cell Mol Life Sci*, 61:2154-62, 2004.
87. Nabatiyan A, Krude T. Silencing of chromatin assembly factor 1 in human cells leads to cell death and loss of chromatin assembly during DNA synthesis. *Mol Cell Biol*, 24:2853-62, 2004.
88. Polo SE, Yheocharis SE, Klijaieko J, Savignoni A, Asselain B, Almouzni G. CAF-1, a marker of clinical value to distinguish quiescent from proliferative cells. *Cancer Res*, 64:2371-81, 2004.
89. Staibano S, Mignogna C, Lo Muzio L, et al. Chromatin Assembly Factor-1 (CAF-1)-mediated regulation of cell proliferation repair: a link with the biological behaviour of squamous cell carcinoma of the tongue. *Histopathology*, 50:911-9, 2007.
90. Staibano S, Mascolo M, Mancini FP, et al. Overexpression of chromatin assembly factor-1 (CAF-1) p60 is predictive of adverse behaviour of prostatic cancer. *Histopathology*, 54:580-9, 2009.
91. ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, 447:799-816, 2007.
92. Ackermann J, Fruttschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on a INK4a-deficient background. *Cancer Res*, 65:4005, 2005.