

Biomarcadores moleculares y genómica en melanoma

Alfonso Berrocal

RUTINARIO 

RECOMENDABLE 

INVESTIGACIÓN 

<ul style="list-style-type: none">• BRAF	<ul style="list-style-type: none">• KIT• NRAS• PD-L1	<ul style="list-style-type: none">• GNAQ /GNA11• PTEN• MITF• p16INK4
--------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------

INTRODUCCIÓN:

Desde el punto de vista terapéutico, el melanoma maligno supone un reto. Los métodos utilizados para establecer el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad precoz, se basan en criterios morfológicos y son muy imprecisos a la hora de evaluar el riesgo de progresión de la enfermedad. Hasta hace muy poco, tampoco existían marcadores predictivos para individualizar la selección de tratamiento de manera racional. Los avances en las técnicas genómicas producidos durante la última década han incrementado sustancialmente el conocimiento de los fenómenos moleculares que ocurren durante la génesis y desarrollo del melanoma. A pesar de su solidez basada en la evidencia, la clasificación TNM se ha visto superada en los últimos años por la inclusión en la rutina diagnóstica de marcadores moleculares con importantes implicaciones carcinogénicas, pronósticas y terapéuticas.

El hallazgo molecular más importante en la patogénesis del melanoma ha sido el descubrimiento del papel clave que juega la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) en el desarrollo de este tumor, esto ha permitido desarrollar terapias dirigidas. La vía de MAPK está activada en casi todos los melanomas lo que facilita su crecimiento y supervivencia. Los miembros de la familia de los genes RAS integrantes de esta vía, promueven proteínas que actúan como mediadores críticos en la transducción de señales (1).

Las mutaciones o aberraciones genómicas están presentes en la mayoría de los melanomas, lo que puede conducir a la activación de la vía MAPK, creando una adicción oncogénica a la proteína hiperactivada. Las mutaciones de BRAF y NRAS son más frecuentes en melanomas que se desarrollan en piel intermitentemente expuesta al sol pero sin daño solar crónico (2)(3). En el melanoma uveal, la vía MAPK está sobreactivada

por la mutación activadora en GNAQ o en GNA11, que se observan en el 80% de los casos. Sin embargo, las mutaciones de BRAF, NRAS y KIT son infrecuentes en dichos melanomas. Por último, en los melanomas acrales y mucosos la mutación más frecuente es la del gen KIT (entre el 15 y el 40%), mientras que las mutaciones de BRAF y NRAS ocurren en menos del 10% de los casos. (4)(5)

Además de las terapias dirigidas en el abordaje terapéutico del melanoma la inmunoterapia juega un papel muy relevante, posicionándose en primera línea en los pacientes que no presentan mutaciones. En los pacientes con mutaciones tratables aún estamos pendientes de los ensayos de secuenciación que nos permitirán decidir cuál es la secuencia óptima de tratamiento, terapia dirigida seguida de inmunoterapia a la progresión o la inversa. Una de las limitaciones de la inmunoterapia es la ausencia de marcadores predictivos de su eficacia. Si bien la expresión del ligando de PD-1 ha demostrado capacidad predictiva en otras neoplasias, hasta el momento no ha sido así en el melanoma.

BIOMARCADORES RUTINARIOS

MUTACIÓN BRAF

La activación de RAF, en su forma de homo o heterodímero, inicia la fosforilación de la MAPK cinasa (MEK), que induce a su vez la fosforilación de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la activación de ERK promueve el crecimiento y la transformación de señales a través de su interacción con un número de moléculas críticas en la patogénesis tumoral. (6)(7)

La mutación de BRAF parece ser un evento adquirido, que ocurre inicialmente en los melanomas invasivos e induce la expansión clonal y la progresión tumoral. Sin embargo, la mutación de BRAF no es un evento decisivo en el desarrollo del cáncer, sino que facilita la transformación maligna mediante la adquisición de estímulos oncogénicos sucesivos. Esto explica por qué las mutaciones de BRAF son tan frecuentes en nevus melanocíticos (70-80%), en melanomas en fase de crecimiento vertical o metastásicos (40-50%) Y sin embargo son infrecuentes en melanomas en fase de crecimiento radial o in situ (6-10%). (8)(9)(10)

Cuando se desarrollan mutaciones de BRAF en melanomas invasivos, estas inducen la activación de MEK, y subsecuentemente la de ERK, dando lugar a la oncogénesis a través de la promoción del crecimiento celular y la inactivación de la apoptosis. Las mutaciones más frecuentemente observadas en el gen BRAF son la V600E (40-60%) y la V600K (20%), y son mucho más raras las V600D, V600E2, V600R, V600A, V600G y K601E. Las mutaciones o aberraciones genómicas están presentes en la mayoría de los melanomas, lo que puede conducir a la activación de la vía MAPK (11).

Teniendo en cuenta que aproximadamente la mitad de los melanomas presentan una mutación activadora en BRAF y que esta mutación parece un evento precoz en el desarrollo del tumor y ha permitido el desarrollo de fármacos que inhiben específicamente esta proteína mutada, podemos explicar la necesidad de su determinación en la práctica clínica diaria.

Los fármacos inhibidores de BRAF son más eficaces que la quimioterapia convencional en el tratamiento del melanoma diseminado. El primero de los nuevos inhibidores de BRAF es vemurafenib. Cuando vemurafenib fue comparado con dacarbacina, mostró una clara superioridad, con una tasa de respuestas del 48% frente al 5%, una mediana de supervivencia libre de enfermedad de 5,3 meses frente a 1,6 meses y una SG de 12,5 meses frente a 9,5 meses, respectivamente (12). Más recientemente se han comunicado los resultados obtenidos con otro inhibidor de BRAF denominado dabrafenib, al comparar dabrafenib con dacarbacina, la mediana de supervivencia libre de progresión fue de 6,7 meses frente a 2,9 meses respectivamente (13).

Además de respuestas objetivas, los inhibidores de BRAF son capaces de inducir respuestas menores, de manera que el 90% de los pacientes experimenta algún grado de reducción en el tamaño del tumor. Considerando el beneficio clínico y la prolongación de la supervivencia obtenidos en estos pacientes, los inhibidores de BRAF se han convertido en el tratamiento de elección para el melanoma avanzado con mutación en BRAF. Pero, a pesar de la elevada actividad de los nuevos inhibidores de BRAF, la mayoría de los pacientes acaban sufriendo una progresión del tumor. Se están estudiando los mecanismos relacionados con la resistencia a estos fármacos. De esta forma, se ha observado que, aunque suele mantenerse la mutación en BRAF, aparecen o se seleccionan nuevas mutaciones que llevan a reactivar la vía MAPK (14).

En la actualidad, los métodos moleculares que se utilizan para determinar las mutaciones de BRAF son los mismos que se emplean para otros estudios de patología molecular. Básicamente se pueden clasificar en métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación, y métodos basados en PCR en tiempo real (RT-qPCR). Además de los estudios moleculares, recientemente se ha descrito la detección de la mutación BRAF V600E por inmunohistoquímica (VE1); no obstante, son necesarios nuevos estudios confirmatorios para su implantación en la práctica clínica habitual.

Entre los métodos de secuenciación se encuentra la secuenciación directa por el método Sanger, que consiste en el análisis directo de la secuencia de ADN previamente amplificada por PCR. Este es un método de alta especificidad con el que se pueden detectar todas las mutaciones posibles. Sin embargo, es una técnica con una sensibilidad subóptima (25%), que puede dar lugar a falsos negativos. Otro método de secuenciación es la pirosecuenciación, que se basa en una reacción de PCR en la que, por cada nueva base que se añade a la cadena de ADN, se libera un pirofosfato que se traduce en la emisión de luz ultravioleta. Puede identificar todas las mutaciones posibles dentro de una región de interés. (15)(16)

La técnica basada en la RT-qPCR es actualmente el método más empleado en los servicios de anatomía patológica para la identificación de biomarcadores moleculares en tumores, destaca la alta sensibilidad, su mayor inconveniente es que solo detecta mutaciones conocidas. Sin embargo, teniendo en cuenta que en el momento actual las mutaciones de BRAF más frecuentes son la V600E (40-60%) y la V600K (20%) y que ambas son subsidiarias de tratamientos con inhibidores de BRAF, esta técnica es óptima para identificar este tipo de mutaciones. Existen 2 tipos de sondas para la determinación de mutaciones de BRAF, denominadas TaqMan® y Scorpions®. El prototipo de sonda TaqMan® para la determinación de mutaciones BRAF utiliza la prueba diagnóstica cobas®4800BRAF/V600. A pesar de ser una prueba inicialmente diseñada para determinar mutaciones en V600E, también es capaz de detectar el 70% de las mutaciones en V600K89, así como las mutaciones de V600D y V600E2. Para la técnica RT-qPCR con sondas Scorpions®, en la actualidad se utiliza la prueba BRAF gen rotor Q (RGQ) PCR de Qiagen®. Se trata de un equipo diseñado para determinar la mutación somática V600E de BRAF, que además detecta las mutaciones V600K, V600E compleja (GAA) y V600D. (17)(18)

RECOMENDACIÓN

La determinación de mutaciones en el gen BRAF de pacientes con melanoma avanzado se debe realizar de modo prioritario, ya que su resultado va a condicionar el tratamiento farmacológico. Por tanto, el tiempo de realización de la determinación no debería retrasarse. Para conseguirlo, en estos casos es de vital importancia el trabajo multidisciplinar conjunto a través de comités de tumores específicos.

BIOMARCADORES RECOMENDABLES

MUTACIONES KIT

Un subconjunto pequeño de melanomas muestra alteraciones en KIT. Los melanomas que se originan en las mucosas, en las regiones acrales y en la piel crónicamente expuesta al sol presentan de manera infrecuente mutaciones en BRAF. Sin embargo, pueden albergar mutaciones (10%) y/o amplificaciones (25%) del gen KIT. Las alteraciones en KIT ocurren selectivamente en el 17% de los melanomas con daño solar crónico. (19)

KIT es un receptor transmembrana con actividad tirosinacinasasa 50. La unión con su ligando, induce la dimerización y la autofosforilación del receptor, que da lugar a la activación de las vías de señalización de MAPK y PI3K-proteína cinasa B (AKT) que median la supervivencia y la proliferación celular. Las mutaciones en KIT se detectan con distintas frecuencias en los siguientes exones: exón 9 (2%), exón 11 (60-70%), exón 13(15-20%) y exones 17 o 18 (10-15%). (20)(21)

Los estudios que han evaluado el papel pronóstico de las mutaciones de KIT en melanoma difieren. Así, Kong et al estudiaron 502 pacientes con melanoma entre los que había

un 38,4 y un 33,3% de pacientes con melanomas acrales y de mucosas, respectivamente. En este estudio se observó que la presencia de una mutación en KIT se asociaba con una supervivencia global más corta comparada con la observada en pacientes con melanoma no mutado (22). Sin embargo, en un estudio sueco que incluyó 71 pacientes con melanomas de mucosas con mutaciones en KIT (35%), NRAS (10%) y BRAF (6%), el estado mutacional de KIT no se asoció con la supervivencia (23).

Dos estudios prospectivos fase II han evaluado la actividad clínica de imatinib en pacientes con melanoma y alteraciones genéticas en KIT. Las tasas de respuesta observadas fueron aproximadamente un 22%. Ambos estudios sugieren una mayor actividad de imatinib en tumores con mutaciones en los exones 11 o 13, mientras que su actividad era más variable en pacientes con otras alteraciones. Estos datos indican que algunos pacientes con melanomas con el gen KIT mutado pueden responder a inhibidores de KIT (24)(25). Si bien en el melanoma no está clara la importancia clínica de las mutaciones en KIT, el 20% de los casos con estas mutaciones son sensibles a imatinib y a otros inhibidores de KIT.

Las mutaciones ocurren con más frecuencia en el exón 11 y con menos frecuencia en los exones 9, 13, 17 y 1851. En el exón 11, la mayoría de las mutaciones (34%) causan la sustitución de una leucina por una prolina en el codón 576. En cualquier caso, se debe realizar el estudio mutacional de los 5 exones del gen. En los casos en que la cantidad o calidad del ADN sea un factor limitante, se evaluarán de forma preferente los exones 9 y 11 (21)(25).

Los dos métodos más utilizados para la determinación de las mutaciones de KIT son la secuenciación directa y la RT-qPCR. El límite de detección de la técnica, definido como el porcentaje mínimo de células tumorales requerido dentro de una muestra, varía en función del método empleado y el laboratorio. En cualquier caso, independientemente de la técnica realizada, es importante seleccionar la muestra con un porcentaje adecuado de células tumorales. Es importante destacar que la detección por inmunohistoquímica de la proteína KIT (CD117) no es fiable para predecir mutaciones, lo que conlleva la necesidad de hacer pruebas moleculares (26).

ALTERACIONES GENÉTICAS DE NRAS:

La familia de proteínas RAS incluye a NRAS, KRAS y HRAS. Las proteínas RAS pueden activar las vías de señalización de MAPK y PI3K por la interacción de factores de crecimiento extracelulares con receptores transmembrana o por la adquisición de mutaciones activadoras. Entre los genes RAS, las mutaciones más frecuentes en el melanoma son en NRAS (10-20%), mientras que las mutaciones en HRAS y KRAS se detectan aproximadamente en el 1 y el 2% de los melanomas, respectivamente (27) (28.)

La mayoría de las mutaciones de NRAS se detectan en el codón 60 o 61 del exón 2 (80%), y en el codón 12 o 13 del exón 1 (20%). Además, la presencia de mutaciones en NRAS y BRAF parece ser mutuamente excluyente, observándose juntas en menos del 1% de los pacientes (29).

La inhibición farmacológica selectiva de NRAS ha tenido poco éxito hasta la fecha, debido a la dificultad de diseñar antagonistas de NRAS que inhiban su actividad guanosina trifosfatasa. Tipifarnib es un inhibidor de la enzima farnesil-transferasa, implicada en la modificación postraslacional de RAS. Tipifarnib se ha evaluado como monoterapia en un estudio fase II en pacientes con melanoma metastásico, sin objetivarse respuestas en los pacientes incluidos, por lo que el estudio se cerró prematuramente (30).

Dada la falta de disponibilidad de inhibidores de RAS específicos, se ha empezado a investigar el bloqueo de otras moléculas efectoras de la vía de RAS, como el beneficio que pueden obtener los pacientes con melanoma que albergan una mutación en NRAS mediante el tratamiento con inhibidores de la cinasa MEK (31). Recientemente un inhibidor de MEK el binimetinib ha demostrado eficacia superior a la quimioterapia en un ensayo randomizado fase III llamado NEMO (32). En este ensayo se comparó dacarbacina con binimetinib y este último fue superior en tasa de respuestas, control de la enfermedad y supervivencia libre de progresión. Los datos de supervivencia global aún no están maduros ya que no hay suficientes eventos. Con estos resultados la FDA ha autorizado binimetinib en el tratamiento de melanomas con mutación de NAS.

EXPRESION DE LIGANDO DE PD-1

El ligando de PD-1 está demostrando cada vez más valor en la predicción de la respuesta a fármacos anti PD-1, en diferentes tumores tratados con inmunoterapia. En el caso del melanoma su valor es controvertido ya que en el melanoma se demuestra una gran heterogeneidad de los resultados e incluso falta concordancia entre el primario y las metástasis (33). A pesar de esta heterogeneidad es posible que este marcador acabe implantándose en melanoma dada la importancia que ha adquirido en otros tumores sólidos, y a que en algunos estudios se apunta a que el mayor beneficio de tratamientos de inmunoterapia combinada se observan en la población que demuestra una ausencia de expresión de este ligando (34).

RECOMENDACIÓN

El análisis de alteraciones genéticas de KIT puede ser razonable en pacientes con tumores primarios de localización acral, en mucosas o en piel crónicamente expuesta al sol, en situación avanzada, pero no en pacientes con otro tipo de melanomas. El análisis mutacional de NRAS, esta indicado en pacientes con melanoma b-raf wild type, metastásico ya que el tratamiento con binimetinib, se ha demostrado superior a la quimioterapia en términos de SLP y respuesta. El análisis de expresión de PD-L1 es razonable en pacientes con melanoma sin mutación tratable en que se plantee el uso de una inmunoterapia de combinación.

BIOMARCADORES EN INVESTIGACIÓN

ALTERACIONES GENÉTICAS DE GNAQ/GNA11:

Los genes GNAQ y GNA11 codifican una parte de la proteína de unión a GTP que permite la señalización de la superficie celular a la vía de proteínas cinasas, siendo por tanto un importante regulador de la señalización. Hasta el 83% de los melanomas uveales tienen mutaciones en uno de estos 2 genes, que ocurren en los codones 209 y 18319. Las mutaciones de GNAQ aparecen en el 45% de los melanomas uveales primarios y en el 22% de sus metástasis. Por otra parte, las mutaciones de GNA11 aparecen en el 32% de los tumores primarios y en el 57% de sus metástasis. (35)(36)

No parece que la presencia de estas mutaciones se asocie con el pronóstico de la enfermedad, aunque su valor puede venir dado por la posibilidad de desarrollar nuevas terapias dirigidas, como la de los inhibidores de MEK. Sin embargo, en la actualidad, dada la ausencia de implicaciones terapéuticas o pronósticas relacionadas con estos genes, no se considera necesaria su determinación asistencial. (37)(38)

ALTERACIONES GENÉTICAS DE PTEN:

El sistema PI3K/AKT/fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN) desempeña un papel crítico en la modulación de funciones celulares, como la proliferación, el crecimiento, la supervivencia y el metabolismo, en respuesta a estímulos extracelulares mediados por los receptores de membrana citoplasmática y las proteínas G. (39)

La inactivación de PTEN se asocia con varios tipos de cáncer. En el 20-40% de los melanomas se puede determinar, mediante inmunohistoquímica, una pérdida o reducción significativa de la expresión de PTEN en muestras tumorales. Tanto las mutaciones somáticas puntuales del gen PTEN como las deleciones homocigóticas son raras. Como consecuencia de su función, el 82% de los melanomas con pérdida de PTEN tienen incrementos en la expresión de la proteína cinasa B fosforilada (pAKT). (40) (41)

Más del 70% de los melanomas primarios y metastásicos presentan un incremento de la actividad de AKT detectada mediante inmunohistoquímica. Puede existir una falta de regulación de AKT en los pacientes con melanoma asociada a una mutación de BRAF (42).

Se ha descrito una mayor expresión de PI3K en los melanomas, en comparación con los nevus azules, así como una asociación con peor pronóstico. Sin embargo, las mutaciones puntuales activadoras de PI3K son muy raras (1% de los melanomas primarios) y los estudios de hibridación genómica comparada no han mostrado amplificación génica. (43)

Tanto la pérdida de función de PTEN como la activación de AKT se han asociado con la mutación de BRAF. En modelos murinos con mutación de BRAF en sus melanocitos se requiere el silenciamiento génico de PTEN para la transformación maligna. Asimismo, hay modelos preclínicos que implican la activación de este sistema en la adquisición de resistencia a la inhibición de BRAF. Por todo lo anterior, y dado que la vía PI3K/AKT/PTEN

puede modularse farmacológicamente, es previsible que sus integrantes principales se conviertan, en un futuro próximo, en biomarcadores con potencial predictivo. (44)(45)(46)

ALTERACIONES GENÉTICAS MITF:

MITF regula el desarrollo, la diferenciación y el mantenimiento de los melanocitos. MITF se activa por el sistema de MAPK o por la vía del adenosín monofosfato cíclico y conduce a la transcripción de genes asociados a la pigmentación, a la progresión del ciclo celular y a la supervivencia. Además, puede contribuir al aumento de la actividad de Bcl-273 y a la transcripción de la cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2). Se ha detectado que el locus de MITF está frecuentemente amplificado en el melanoma. La amplificación de MITF se correlaciona con una menor supervivencia y con un incremento de la resistencia a la quimioterapia. (47)

ALTERACIÓN GENÉTICA p16INK4:

La delección de p16INK4 está descrita en aproximadamente el 50% de los melanomas y su mutación puntual en un 10% de ellos. Además, este gen puede estar silenciado por metilación de su promotor. La reducción de los niveles de p16INK4 se correlaciona con peor pronóstico (48)(49).

RECOMENDACIÓN

No es recomendable fuera del campo de la investigación el estudio de otras alteraciones genéticas, como pueden ser el estado mutacional de NRAS en pacientes no portadores de mutaciones de BRAF, el análisis mutacional de GNAQ/GNA11 o las alteraciones genéticas de PTEN, ya que hoy por hoy sus resultados no influyen en la planificación del tratamiento de estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2003;9:6483 – 8
- 2) Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 2005;353:2135-47.
- 3) Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE. From genes to drugs: Targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:349-61.
- 4) Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature.* 2009;457:599-602.
- 5) Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363:2191-9

- 6) Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK. *Raf: A strategic target for therapeutic development against cancer. J Clin Oncol.*2005;23:6771-90.
- 7) Garnett MJ, Rana S, Paterson H, Barford D, Marais R. *Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. Mol Cell.* 2005;20:963-9.
- 8) Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. *Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature.*2002;417:949-54.
- 9) Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. *High frequency of BRAF mutations in nevi. Nat Genet.*2003;33:19-20.
- 10) Poynter JN, Elder JT, Fullen DR, Nair RP, Soengas MS, Johnson TM, et al. *BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. Melanoma Res.* 2006;16:267-73.
- 11) Sharma A, Trivedi NR, Zimmerman MA, Tuveson DA, Smith CD, Robertson GP. *Mutant V599E-Braf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. Cancer Res.*2005;65:2412-21.
- 12) Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. N Engl J Med.* 2011;364:2507-16.
- 13) Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. *Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. Lancet.* 2012;380:358-65.
- 14) Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, et al. *Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. Cancer Cell.*2010;18:683—95.35.
- 15) Kirschner M, Helmke B, Starz H, Benner A, Thome M, Deichmann M. *Preponderance of the oncogenic V599E and V599K mutations in the B-raf kinase domain is enhanced in melanoma lymph node metastases. Melanoma Res.* 2005;15:427-34.
- 16) Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. *Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. J Clin Oncol.*2011;29:1239-46
- 17) Thomas NE, Edmiston SN, Alexander A, Millikan RC, Groben PA, Hao H, et al. *Number of nevi and early-life ambient UV exposure are associated with BRAF-mutant melanoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16:991-7.
- 18) Anderson S, Bloom KJ, Vallera DU, Rueschoff J, Meldrum C, Schilling R, et al. *Multisite analytic performance studies of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of BRAF V600E mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens of malignant melanoma. Arch Pathol Lab Med.*2012;136:1385-91.
- 19) Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. *Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. J Clin Oncol.* 2006;24:4340-6.
- 20) Arden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, et al. *Human proto-oncogene c-kit: A new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. EMBO J.* 1987;6:3341-51.
- 21) Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Paterson J, et al. *KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. Clin Cancer Res.* 2008;14:6821-8.

- 22) Kong Y, Si L, Zhu Y, Xu X, Corless CL, Flaherty KT, et al. Large scale analysis of KIT aberrations in Chinese patients with melanoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17:1684-91.
- 23) Omholt K, Grafstrom E, Kanter-Lewensohn L, Hansson J, Ragnarsson-Olding BK. KIT pathway alterations in mucosal melanomas of the vulva and other sites. *Clin Cancer Res.* 2011;17:393-42.
- 24) Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA.* 2011;305:2327-34.
- 25) Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty KT, Xu X, Zhu Y, et al. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol.* 2011;29:2904-9.
- 26) Abu-Abed S, Pennell N, Petrella T, Wright F, Seth A, Hanna W. KIT gene mutations and patterns of protein expression in mucosal and acral melanoma. *J Cutan Med Surg.* 2012;16:135-42.
- 27) Mishra PJ, Ha L, Rieker J, Sviderskaya EV, Bennett DC, Oberst MD, et al. Dissection of RAS downstream pathways in melanomagenesis: A role for Ral in transformation. *Oncogene.* 2010;29:2449-56.
- 28) Swick JM, Maize Sr JC. Molecular biology of melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67:1049-54.
- 29) Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006;126:154-60.
- 30) Gajewski TF, Niedzwiecki D, Johnson J, Linette G, Bucher C, Blaskovich M, et al. Phase II study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in advanced melanoma: CALGB 500104. *ASCO Meeting Abstracts.* 2006;24:8014.
- 31) Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, Agarwala SS, van Herpen CM, Queirolo P, et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: A non-randomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2013;14:249-56.
- 32) Dummer R, Schadendorf D, Ascierto PA, Arance Fernández AM, Dutriaux C, Maio M, et al. Results of NEMO: A phase III trial of binimetinib vs dacarbazine in NRAS mutant cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2016; 34: Abst 9500.
- 33) Madore J, Vilain RE, Menzies AM, Kakavand H, Wilmott JS, Hyman J, et al. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015;28:245-53.
- 34) Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey L, Lao CD, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015;373:23-34.
- 35) Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature.* 2009;457:599-602.
- 36) Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363:2191-9.

- 37) Bauer J, Kilic E, Vaarwater J, Bastian BC, Garbe C, de Klein A. Oncogenic GNAQ mutations are not correlated with disease-free survival in uveal melanoma. *Br J Cancer*. 2009;101:813-5
- 38) Sisley K, Doherty R, Cross NA. What hope for the future? GNAQ and uveal melanoma. *Br J Ophthalmol*. 2011;95:62-3.
- 39) Carnero A. The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des*. 2010;16:34-44.
- 40) Slipicevic A, Holm R, Nguyen MT, Bohler PJ, Davidson B, Florenes VA. Expression of activated Akt and PTEN in malignant melanomas: Relationship with clinical outcome. *Am J Clin Pathol*. 2005;124:528-36.
- 41) Hocker TL, Singh MK, Tsao H. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: Moving from the benchside to the bedside. *J Invest Dermatol*. 2008;128:2575-95
- 42) Meier F, Schitteck B, Busch S, Garbe C, Smalley K, Satyamoorthy K, et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Front Biosci*. 2005;10:2986-3001.
- 43) Aziz SA, Pick-Golan E, McCarthy MM, Flaherty KT, Camp RL, Rimm DL, et al. Assessment of PI3 kinase as a druggable target in melanoma. *ASCO Meeting Abstracts*. 2007;25:8521.69.
- 44) Smalley KS, Haass NK, Brafford PA, Lioni M, Flaherty KT, Herlyn M. Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:1136-44
- 45) Lasithiotakis KG, Sinnberg TW, Schitteck B, Flaherty KT, Kulms D, Maczey E, et al. Combined inhibition of MAPK and mTOR signaling inhibits growth, induces cell death, and abrogates invasive growth of melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 2008;128:2013-23
- 46) Meier F, Busch S, Lasithiotakis K, Kulms D, Garbe C, Maczey E, et al. Combined targeting of MAPK and AKT signalling pathways is a promising strategy for melanoma treatment. *Br J Dermatol*. 2007;156:1204-13.
- 47) Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*. 2005;436:117-22.
- 48) Bennett DC. How to make a melanoma: What do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008;21:27-38.
- 49) Marini A, Mirmohammadsadegh A, Nambiar S, Gustrau A, Ruzicka T, Hengge UR. Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*. 2006;126:422-31.