

Heterogenost melanoma kože i njegovi molekularni aspekti

Skin melanoma heterogeneity and its molecular aspects

Miljenko Katunarić*, Andrea Dekanić, Gordana Zamolo

Zavod za patologiju i patološku anatomiju,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,
Rijeka

Sažetak. U Hrvatskoj je zabilježen 2,7 postotni godišnji porast mortaliteta od melanoma kože. U više studija otkriveno je da osobe koje razviju melanom na abdomenu imaju znatno veći broj madeža od osoba koje razviju melanom na glavi ili vratu. Suprotno tome, melanomi na glavi i vratu povezani su sa solarnom keratozom, ali vrlo slabo s brojem madeža. Otkrivena je povezanost podtipa lentigo maligna melanoma sa značajnim izlaganjem suncu, ali nikakve konstantne korelacije nisu pronađene kod drugih histoloških podtipova. Nova molekularno genetska istraživanja snažno podržavaju koncept da su melanomi nastali na centralnim dijelovima tijela kod mlađih osoba s velikim brojem melanocitnih madeža biološki različiti od melanoma nastalih kumulativnim djelovanjem na suncem oštećenoj koži starijih ljudi i da su madeži i melanomi istog puta nastanka vođeni istim genetskim promjenama. Epidemiološke stručne analize brzo su utvrdile da visok stupanj izloženosti suncu znači veći broj madeža u ranom djetinjstvu. Višestruka istraživanja pokazala su da BRAF-mutirajući melanomi najčešće spadaju u superficijalno-šireći podtip i pojavljuju se na koži koja je povremeno bila izložena suncu kao i da češće metastasiziraju u regionalne limfne čvorove nego melanomi bez BRAF mutacija. KIT-mutiranimelanomi se pojavljuju u koži, na noktima, na mukozi ili na koži koja je oštećena suncem te najčešće isključuju BRAF mutaciju. Melanomi s ovom mutacijom vrlo često imaju *in situ* komponente koje su slabo ograničene, što je rezultat pojačane lateralne mobilnosti neoplastičnih melanocita nakon aktivacije SCF KIT puta.

Glavne riječi: BRAF; KIT; madež; melanom; patohistologija; RAS

Abstract. Croatia has recorded a 2.7 percent annual increase in melanoma of the skin mortality. Several studies have found that people who develop melanoma on the abdomen carry a significantly higher number of nevi than people who develop melanoma on the head or neck. In contrast, melanoma on the head and neck is associated with solar keratosis, but not with the number of nevi. The correlation was found between lentigo maligna melanoma incidence and exposure to the sun. No similar correlation was found in other histological subtypes of melanoma. New molecular genetic studies support the concept that melanomas arising in the central parts of the body of young people carrying multiple nevi are biologically different from melanoma caused by cumulative action of the sun-damaged skin in older patients. Epidemiological expert analysis quickly determined that a high degree of exposure to the sun means a larger number of moles in early childhood. Multiple studies have shown that BRAF-mutant melanoma most often fall into the superficial-spreading subtype and appear on skin that has occasionally been exposed to the sun and that they more often metastasize to regional lymph nodes than melanomas without the BRAF mutation. KIT-mutated melanoma appear in the skin, the nails, the mucosa or the skin, which is damaged by the sun and usually exclude BRAF mutations. Melanomas with this mutation often carry a poorly delimited *in situ* components as a result of enhanced lateral mobility of neoplastic melanocytes after the SCF KIT pathway activation.

Key words: BRAF; KIT; melanoma; nevus; pathohistology; RAS

*Dopisni autor:

Dr. sc. Miljenko Katunarić
Zavod za patologiju i patološku anatomiju,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka
e-mail: miljenko23@gmail.com

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Iako nije najčešći, maligni melanom kože (MMK) je najsmrtonosniji zloćudni tumor kože. U usporedbi s drugim europskim državama Hrvatska ima umjerenu incidenciju melanoma, ali s mortalitetom od 3,5/100.000 za muškarce te 1,8/100.000 za žene Hrvatska ima treći, odnosno četvrti najviši mortalitet u Europi. U periodu od 1988. do 2008. god. u Hrvatskoj je zabilježen 2891 smrtni slučaj povezan s MMK-om uz godišnji porast mortaliteta od 2,7 %. Razlog za to se mora tražiti u kasnom dijagnosticiranju i nedostupnosti skupljih lijekova. Ipak, postoji mogućnost daljnjeg poboljšanja liječenja pacijenata u nama dostupnim okvirima^{1,2}.

HETEROGENOST MELANOMA PREMA ANATOMSKOM POLOŽAJU

Umjesto pretpostavke da mnogi kožni melanomi nastaju u povezanosti s istim rizičnim faktorima, mnogi znanstvenici istraživali su mogućnost različitih rizičnih faktora s obzirom na anatomske pozicije primarnog tumora. Iako ta prva istraživanja nisu bila specifično dizajnirana niti statički potpomognuta za otkrivanje različitosti u rizicima za razvitak melanoma s obzirom na lokalizaciju, otkriveno je da osobe koje imaju velik broj madeža imaju i veću sklonost nastanku melanoma na koži abdomena, glavi ili vratu³⁻⁵.

Dvije australske studije potkrijepile su i proširile ove spoznaje promatrajući da je opseg i smjer povezanosti između solarne keratoze (biljezi kumulativnog solarnog oštećenja kože) i madeža reguliran anatomske pozicijom melanoma. No, uočena je obrnuta korelacija solarnih keratoza i melanocitnih nevasa^{6,7}. Dakle, melanom na abdomenu je povezan s velikim brojem madeža, ali je obrnuto proporcionalno povezan sa solarnom keratozom. Suprotno tome, melanomi na glavi i vratu su povezani sa solarnom keratozom, ali vrlo slabo s brojem madeža.

Odražavaju li ove položajne specifičnosti na razliku u izlaganju suncu, melanocitnu osjetljivost ili konstitucijske faktore nije jasno iz ovih studija, ali upućuju na moguću kompleksnost na kojoj počiva razvoj kožnih melanoma.

HETEROGENOST MELANOMA PREMA PATOHISTOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA

Koncept etiološke heterogenosti kožnih melanoma nastavio se istraživati u raznim smjerovima, na primjer izvođenjem odvojenih analiza za svaki od najčešće prepoznatljivih podtipova melanoma⁸. Otkrivena je povezanost podtipa lentigo maligna melanoma sa značajnim izlaganjem suncu (kao što je bilo pretpostavljeno iz kliničkog iskustva), ali nikakve konstantne razlike nisu pronađene

BRAF-mutirajući melanomi najčešće spadaju u superficialno-šireći podtip te češće metastasiziraju u regionalne limfne čvorove nego melanomi bez BRAF mutacija.

ne kod drugih histoloških podtipova. Do sredine 1980-ih Ackerman i David predložili su ujedinjeni koncept za melanom i ustvrdili da različiti podtipovi melanoma ne postoje^{9,10}. Istražujući sličan put Green je predložio da bi anatomska raspodjela melanoma mogla biti objašnjena različitim sklonostima malignoj promjeni melanocita na različitim mjestima na tijelu¹¹. Točnije, predloženo je da madeži na glavi i vratu imaju manje šanse progrediranja u melanom za razliku od madeža na abdomenu i stoga će izazvati manje melanoma povezanih s madežima. Kako bi potvrdio svoju teoriju, Green je ustanovio da se melanomi povezani s madežima pojavljuju puno više u području abdomena nego na glavi i vratu. Studije u drugim populacijama potvrdile su nejedinstvenu distribuciju melanoma povezanih s madežima po cijeloj površini kože¹². Nadalje, utvrđeno je da pacijenti s melanomima povezanim s madežima imaju puno veći broj madeža, dok *de novo* melanomi (bez dokaza o prethodnom postojanju madeža) imaju veću mogućnost nastanka kod starijih pacijenata na glavi i vratu i povezani su sa solarnom elastozaom¹³. Kao što je objašnjeno u nastavku, nova molekularno genetska istraživanja snažno podržavaju koncept da su melanomi nastali na centralnim dijelovima tijela kod mlađih osoba s velikim brojem melanocitnih madeža biološki različiti od melanoma nastalih kumulativnim djelovanjem na suncem oštećenoj koži starijih ljudi i da su madeži i melanomi istog puta nastanka vođeni istim genetskim promjenama (BRAF mutacije).

BROJ MADEŽA ODREĐEN JE GENIMA I SUNČEVOM SVJETLOŠĆU

Iako je zaključak više studija kako samo manja proporcija melanoma kože nastaje direktno iz madeža velik se napor uložio kako bi se identificirali čimbenici koji pridonose razvoju madeža u ljudi. Epidemiološke studije brzo su utvrdile da visok stupanj izloženosti suncu znači veći broj madeža u ranom djetinjstvu. Broj madeža ovisi o izlaganju suncu u prve tri godine života^{14,15}. Naknadne studije su dale uvjerljive dokaze da je broj madeža na koži pod velikom genskom kontrolom, a to su dokazali uspoređujući broj madeža između dvanaestogodišnjih blizanaca. Dok jednojajčani (monozigotni ili identični (MZ)) blizanci dijele sve svoje gene i imaju jako približan broj madeža (blizanac 1 protiv blizanca 2, $r = 0,94$), dvojajčani (dizigotni, ili dvojajčani (DZ)) parovi blizanaca dijele u prosjeku samo pola svojih gena, i broj madeža kod njih je prilično različit¹⁶. Par jednojajčanih blizanaca koji su odrastali zajedno imaju gotovo identičan broj madeža. Taj se broj uvelike razlikuje u dvojajčanih blizanaca, iako su se vjerojatno jednako izlagali suncu.

Podaci o madežima objavljeni u istraživanju su informativni i izvan hereditarnosti. Raspon izbrojenih madeža kod tog uzorka, dvanaestogodišnjih blizanaca iz Queenslanda u Australiji, bio je jako velik (1 do 350+ madeža¹⁶). Paralelna studija koja je koristila istu metodologiju, ali je provedena u Velikoj Britaniji (okoliš koji ima znatno manje sunčevih zraka) dala je skoro identične podatke o korelaciji za MZ ($r = 0,94$) i DZ ($r = 0,61$) blizance, ali je zabilježen bitno manji broj madeža¹⁷. Ove uspoređene stručne analize nasljednosti madeža provedene u okruženju s bitno različitim izlaganjem sunca pokazuju da kod svjetloputih ljudi postoje i neki ljudi s visokom sklonošću da razviju melanocitne madeže, dok ostali imaju nisku sklonost, bez obzira na okoliš i sunčevo isijavanje u kojem su odrasli. Tako izgleda da geni određuju osobni potencijal za razvoj madeža, i konačni izražaj ovog potencijala je određen donekle stupnjem izloženosti osobe sunčevoj svjetlosti. Napori da se otkriju geni koji utječu na broj madeža se intenziviraju, većinom sekvenciranjem čitavog genoma¹⁸. Štoviše, postoje dokazi koji upozoravaju da najmanje jedan od ovih istraživanih lokusa

(npr. MTAP; engl. *methylthiadenosine phosphorylase*) može biti povezan s rizikom pojave melanoma¹⁹.

MOLEKULARNI ASPEKTI

Tijekom posljednjeg desetljeća napravljen je značajan napredak u otkrivanju kritičnih somatskih alteracija, otkrića koja su početak revolucije u liječenju melanoma. Također je postalo jasno da su specifične genske alteracije povezane s određenim kliničkim i histopatološkim značajkama bolesti, sugerirajući da će biti korisne u popravljaju shematskih klasifikacija postojećih bolesti.

RAS i melanom

Prvi melanomski onkogen koji je identificiran bio je RAS (engl. *rat sarcoma*), s NRAS (engl. *neuroblastoma RAS*) koji je najčešće pogođen iz RAS obitelji²⁰. Učestalost NRAS mutacija je oko 15 % u većini melanomnih tipova, dok HRAS (engl. *Harvey RAS*) ili KRAS (engl. *Kirsten RAS*) rijetko mutiraju. Ova raspodjela razlikuje se od ukupne učestalosti RAS mutacija u karcinomima, u kojih je KRAS do skoro (85 %) najčešće mutiran RAS alel²¹. Van Elsas i suradnici (1996.) otkrili su da jedan od 68 analiziranih melanoma ima jednu HRAS mutaciju i nijedan nije imao KRAS mutaciju, a Curtin i suradnici (2005.) otkrili su jednu HRAS mutaciju i nijednu KRAS mutaciju u 126 primarnih melanoma različitih tipova. Nije u potpunosti riješeno imaju li određeni tipovi melanoma višu frekvenciju NRAS mutacija^{22,23}. Ranija istraživanja Van't Veera i suradnika (1989.) pokazala su veću učestalost mutacija NRAS u melanomima koji su izloženi suncu²⁴. U naknadnoj većoj studiji od 175 primarnih uzoraka tumora, 63 metastaze i 32 linija stanica, van Elsas i suradnici (1996.) također su otkrili najvišu incidenciju mutanta NRAS u tumorima koji proizlaze iz dijelova tijela kao što su lice ili glava (22 %), uspoređena s ekstremitetima (15 %) ili trupa (11 %)²². Usporedbom, druga istraživanja nisu našla značajnu povezanost NRAS mutacija s anatomskim mjestom od kuda potječe melanom ili sa stupnjem izloženosti suncu, što se primarno procjenjuje stupnjem sunčeve elastoze obližnje kože^{23,25}.

Neke studije slično su izvjestile da su NRAS mutacije povezane s određenim histopatološkim

podtipovima, dok druge nisu otkrile takvu povezanost^{23,26}. Konačno, NRAS mutacije su na početku povezivane s debljinom tumora i stupnjem invazije, ali takva povezanost nije bila dosljedno promatrana kroz studije²⁷⁻²⁹.

BRAF i melanom

Za razliku od nalaza za NRAS, BRAF mutacije, prvotno otkrivene u staničnim linijama melanoma³⁰, bile su povezivane sa specifičnim kliničkim i histopatološkim karakteristikama melanoma.

Višestruke studije pokazale su da su pacijenti s BRAF-mutiranim melanomima značajno mlađi od pacijenata koji imaju melanome bez BRAF-mutacija^{29,31,32}. Nadalje, BRAF-mutirajući melanomi najčešće su superficijalno-šireći tip (nešto rjeđe su nodularnog tipa) te imaju distinktivne fenotipske karakteristike. Melanociti su raspršeni unutar epidermisa, radijalna faza rasta je veća, pokazuju nagliji prijelaz u normalnu kožu te imaju izraženiju epidermalnu konturu (engl. *epidermal contour*)^{23,25,31}. Također, češće se javljaju na koži koja je povremeno bila izložena suncu, iako koža koja okružuje tumor ima niži nivo solarne elastoze od kože koja okružuje melanome bez BRAF mutacija^{23,25,30}. Nekoliko studija pokazalo je da su BRAF-mutirajući melanomi jače pigmentirani nego oni bez BRAF mutacija, što je uočeno pomoću histopatološke i kliničke inspekcije³¹. BRAF mutacije možemo često naći u nevusima koji se obično pojavljuju u prva dva desetljeća života i zato je vrlo vjerojatno da su BRAF-mutirajući melanomi i nevusi dio istog spektra melanocitne neoplazije³³. U prilog ovoj tvrdnji nekoliko studija otkrilo je da su BRAF-mutirajući melanomi u većoj mjeri povezani s prisutnošću višestrukih melanocitnih tkivnih oštećenja na koži pacijenata, nego melanomi bez BRAF mutacija^{32,34}. Ova spoznaja govori nam da je BRAF mutacija rana pojava koja sama za sebe nije dovoljna da bi uzrokovala pojavu melanoma. Mora se dogoditi naknadne genetičke promjene uzrokovane BRAF-mutirajućim melanocitima unutar oštećenog tkiva da bi došlo do formacije melanoma, procesa koji iziskuje dodatno vrijeme i može objasniti razliku u latentnom periodu između pojave oštećenog tkiva u prva dva desetljeća života i pojave oštećenog tkiva u kasnijem periodu života (treće desetljeće i kasnije). Zapažanje da se frekvencija BRAF mutacija smanjuje kod starijih

ljudi pokazuje opasnost od razvijanja tih mutacija u ranoj fazi života²³, dosljedno epidemološkim nalascima objašnjenim u poglavljima ranije. Detaljna morfološka analiza primarnih melanoma otkrila je da je kombinacija fenotipskih značajki radijalne faze rasta primarnog tumora imala veću prediktivnu vrijednost u prisutnosti BRAF mutacije, nego histološkog podtipa melanoma ili bilo kojih značajki prikazanih iznad²⁵. Poveznica između kliničkih i histopatoloških značajki su potvrđene u odvojenoj kohorti u neovisnom istraživanju³⁵. U obje studije

KIT-mutirani melanomi vrlo često imaju slabo ograničene *in situ* komponente, što je rezultat pojačane lateralne mobilnosti neoplastičnih melanocita nakon aktivacije SCFKIT puta.

dokazano je da BRAF-mutirajući melanomi češće metastasiziraju u regionalne limfne čvorove nego melanomi bez BRAF mutacija. Povezanost melanoma s mlađom populacijom, kliničke i histopatološke značajke i obrazac metastaza upućuju na to da su melanomi s BRAF mutacijom dio biološkog subtipa melanoma. Vjerojatno ovaj subtip nije kompletno definiran samo BRAF mutacijom, iako su sve aktivne mutacije uzete u obzir. (Većina studija analizirala je samo ekson 15 ili samo kodon 600.) Onkogene alteracije slične BRAF ili NRAS mutaciji nisu poznate u temeljnoj proporciji melanoma i očekivano je da postoje i druge mutacije ili kombinacije koje su funkcionalno ekvivalentne BRAF mutacijama i stoga rezultiraju ili su povezane sa sličnim fenotipskim osobinama. Ovo je predloženo u nedavnoj studiji u kojoj melanomi koji su bili predviđeni da su BRAF mutanti (bazirano na tri značajke zajedničkog fenotipa koje su navedene iznad) nisu imali BRAF niti NRAS mutacije, ali su bili slični u drugim značajkama povezanim s BRAF mutacijama³⁵. Ostaje na današnjim znanstvenicima da dokažu imaju li ovi "BRAF-slični" melanomi duge genetičke ili biološke sličnosti s melanomima koji posjeduju BRAF mutaciju.

KIT i melanom

Kit mutacije nalaze se u melanomima koji se pojavljuju u koži, na noktima, na mukozi ili na koži koja je oštećena suncem, a relativno su odsutne

u melanomima koji se pojavljuju na koži koja nije oštećena suncem. U tipovima melanoma u kojima nalazimo KIT mutacije rijetko nalazimo BRAF mutacije, stoga možemo govoriti o zrcalnoj slici tih dviju mutacija. Akralni melanomi, melanomi na sluznicama te melanomi koji su nastali zbog kroničnog oštećenja kože suncem imaju nekoliko zajedničkih karakteristika. Njihova pojavnost raste s godinama pacijenta, za razliku od melanoma s BRAF mutacijom čiji je vrh pojavnosti oko pedesete godine te pokazuju karakterističan način rasta u kojem se intraepidermalni melanociti poslože tako da formiraju solidne nakupine, a ne skupine melanocita s bazalnim slojem epidermisa. Melanomi ovih kategorija vrlo često imaju *in situ* komponente koje su slabo ograničene, a prema periferiji se broj melanocita smanjuje, što dodatno otežava patologu određivanje granica melanoma. Za akralne melanome karakteristično je da melanociti koji su genetski abnormalni, a histopatološki neinvazivni, prodiru do nekoliko centimetara u normalno tkivo koje okružuje melanom. Ove karakteristike su različite od onih u melanomu s BRAF mutacijom koji su karakteristični po tome da su oštro ograničeni od okoline. Slabo ograničenje je rezultat pojačane lateralne mobilnosti neoplastičnih melanocita koji se mogu funkcionalno povezati s aktivacijom KIT puta mutacija. SCF (engl. *stem cell factor*) KIT signalni put ključan je tijekom migracije melanocita iz neuralnog grebena prema koži putem dorzolateralnog puta. Reaktivacija tog puta mogla bi biti uzrok histopatološkog načina rasta za koji je karakteristična pokretljivost stanica. Sklonost lateralnoj migraciji u ovim tipovima melanoma je zaslužna za njihovo lokalno održavanje, npr. nakon obavljenog kirurškog postupka vađenja tumora, on se ponovno nalazi tamo. Melanomi koji sadrže KIT mutaciju, za razliku od melanoma koji sadrže BRAF mutaciju, ne nastaju iz pigmentiranog nevusa. Umjesto toga oni su karakterizirani periodom odgođenog intraepidermalnog rasta koji može trajati mnogo godina prije nego se razvije invazivna komponenta.

Iako postoje mnoge sličnosti između akralnog melanoma te melanoma sluznica ili melanoma zbog oštećenja suncem, postoje i bitne razlike. Akralni melanomi i melanomi sluznica imaju izraženu gensku nestabilnost koja rezultira brojnim genskim mutacijama po genomu. Fluorescentna *in*

situ hibridizacija akralnog melanoma pokazuje da se izražavanje određenih gena javlja već vrlo rano tijekom progresije samog melanoma te se također mogu naći već u *in situ* komponentama melanoma. Mehanizam koji dovodi do te genske nestabilnosti nije poznat. Komparacije procesa aberacije između različitih ostataka tumora istog pacijenta pokazale su relativno stabilne uzorke aberacija koje se javljaju kao genska nestabilnost vrlo rano u procesu nastanka ovih melanoma. To bi moglo biti povezano s ciklusima pucanja fuzijskih mostova tijekom telomerskih promjena ili s fenomenom kromotripsize. Tijekom oba procesa dolazi do brzog pucanja kromosoma te zatim njihovog rearanžiranja i reformiranja. Ako se radi o telomernim promjenama, smatra se da se te promjene provlače kroz nekoliko generacija stanica kćeri, a ako se radi o kromotripsizi dolazi do jednog dramatičnog događaja koji razbije dijelove kromosoma koji se kasnije spoje nazad pomoću DNK popravilačkih komponenti. Amplifikacija regije genoma koja nosi katalitičku podjedinicu telomeraze ističe se u akralnom melanomu te je dokazano da ima bitnu ulogu u fazi vertikalnog rasta nekih melanoma. Iako se amplifikacije mogu pronaći u nekim melanomima nastalim izvan akralnog ili mukoznog područja, takvi melanomi tipično nastaju kasno tijekom progresije, nisu temeljeni na multiplitetu unutar genoma i ne može ih se otkriti u početnim fazama progresije. Unatoč relativnom nedostatku BRAF mutacija i prisutnosti KIT mutacija (što je zajedničko akralnom, mukoznom i CSD melanomu (engl. *chronic sun damage*)), posljednju kategoriju razlikuje nedostatak brojnih „high-level” amplifikacija koje nalazimo kod akralnih i mukoznih melanoma. Nadalje, regije genoma zahvaćene amplifikacijom ili nekim drugim oblikom promjene broja gena razlikuju se između ovih dvaju tipova, što govori u prilog biološkoj razlici između akralnog i mukoznog melanoma. Na primjer, amplifikacija gena u akralnom melanomu najčešće se javlja na kromosomu 11q13, centrirajući se na ciklin D1 lokus, kao i hTERT (engl. *telomerase reverse transcriptase*) na kromosomu 5p. Obrnuto, ciklin D1 je nejednako amplificiran u mukoznim melanomima, gdje amplifikacije redovito uključuju CDK4 (engl. *cyclin-dependent kinase 4*) i MDM2 lokus na kromosomu 12q²³.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

- Barbarić J, Znaor A. Incidence and mortality trends of melanoma in Croatia. *Croat Med J* 2012;53:135-40.
- deVries, Bray F, Coebergh JW, Parkin M. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1969-1997: rising trends in incidence and mortality, but recent stabilisations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer* 2003;107:119-26.
- Chen YT, Dubrow R, Holford TR, Zheng T, Barnhill RL, Fine J et al. Malignant melanoma risk factors by anatomic site: a case-control study and polychotomous logistic regression analysis. *Int J Cancer* 1996;67:636-43.
- Rieger E, Soyer HP, Garbe C, Büttner P, Kofler R, Weiss J et al. Overall and site-specific risk of malignant melanoma associated with nevus counts at different body sites: a multicenter case-control study of the German Central Malignant-Melanoma Registry. *Int J Cancer* 1995;62:393-7.
- Weinstock MA, Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Bronstein BR, Mihm MC et al. Moles and site-specific cutaneous malignant melanoma in women. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:948-52.
- Bataille V, Sasieni P, Grulich A, Swerdlow A, McCarthy W, Hersey P et al. Solar keratoses: a risk factor for melanoma but negative association with melanocytic naevi. *Int J Cancer* 1998;78:8-12.
- Whiteman DC, Bray CA, Siskind V, Hole D, MacKie RM, Green AC. A comparison of the anatomic distribution of cutaneous melanoma in two populations with different levels of sunlight: the west of Scotland and Queensland, Australia 1982-2001. *Cancer Causes Control* 2007;18:485-91.
- Holman CD, Armstrong BK. Cutaneous malignant melanoma and indicators of total accumulated exposure to the sun: an analysis separating histogenetic types. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:75-82.
- Ackerman AB. Malignant melanoma: a unifying concept. *HumPathol* 1980;11:591-5.
- Ackerman AB, David KM. A unifying concept of malignant melanoma: biologic aspects. *HumPathol* 1986;17:438-40.
- Green A. A theory of site distribution of melanomas: Queensland, Australia. *Cancer Causes Control* 1992;3:513-6.
- Skender-Kalnenas TM, English DR, Heenan PJ. Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? *J. Am AcadDermatol* 1995;33:1000-7.
- Purdue MP, From L, Armstrong BK, Krickler A, Gallagher RP, McLaughlin JR et al. Etiologic and other factors predicting nevus-associated cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2015-22.
- Harrison SL, MacKie RM, MacLennan R. Development of melanocytic nevi in the first three years of life. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1436-8.
- Whiteman DC, Brown RM, Purdie DM, Hughes MC. Melanocytic nevi in very young children: The role of phenotype, sun exposure and sun protection. *J Am AcadDermatol* 2005;52:40-7.
- Zhu G, Duffy DL, Eldridge A, Grace M, Mayne C, O'Gorman L et al. A major quantitative-trait locus for mole density is linked to the familial melanoma gene CDKN2A: a maximum-likelihood combined linkage and association analysis in twins and their sibs. *Am J Hum Genet* 1999;65:483-92.
- Wachsmuth RC, Turner F, Barrett JH, Gaut R, Rander-son-Moor JA, Bishop DT et al. The effect of sun exposure in determining nevus density in UK adolescent twins. *J Invest Dermatol* 2005;124:56-62.
- Falchi M, Bataille V, Hayward NK, Duffy DL, Newton Bishop JA, Pastinen T et al. Genome-wide association study identifies variants at 9p21 and 22q13 associated with development of cutaneous nevi. *Nat Genet* 2009;41:915-9.
- Bishop DT, Demenais F, Iles MM. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nat Genet* 2009;41:920-5.
- Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, Cordon-Cardo C, McNutt NS, Bressler J et al. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene* 1989;4:1363-74.
- Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:11-22.
- vanElsas A, Zerp SF, van der Flier S, Krüse KM, Aarnoudse C, Hayward NK et al. Relevance of ultraviolet-induced N-ras oncogene point mutations in development of primary human cutaneous melanoma. *Am J Pathol* 1996;149:883-93.
- 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.
- van 't Veer LJ, Burgering BM, Versteeg R, Boot AJ, Ruiters DJ, Osanto S. N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *Mol Cell Biol* 1989;9:3114-6.
- Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med* 2008;5:e120.
- Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histologic types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol* 2010;164:776-7.
- Ball NJ, Yohn JJ, Morelli JG, Norris DA, Golitz LE, Hoeffler JP. Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *J Invest Dermatol* 1994;102:285-90.
- Demunter A, Ahmadian MR, Libbrecht L, Stas M, Baens M, Scheffzek K et al. A novel N-ras mutation in malignant melanoma is associated with excellent prognosis. *Cancer Res* 2001;61:4916-22.
- Edlundh-Rose E, Egyházi S, Omholt K, Månsson-Brahme E, Platz A, Hansson J et al. NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res* 2006;16:471-8.
- 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.
- Liu W, Kelly JW, Trivett M, Murray WK, Dowling JP, Wolfe R et al. Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF(T1799A(V600E)) mutation in primary melanoma. *J Invest Dermatol* 2007;127:900-5.

32. 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.
33. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2002;25:25.
34. 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.
35. Broekaert SM, Roy R, Okamoto I, van den Oord J, Bauer J, Garbe C et al. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23:763-70.