

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU"
CLUJ-NAPOCA

Rolul metaloproteazelor matriceale și al IGF-1R în melanom

Doctorand: ELISABETA CANDREA

Conducător de doctorat: Prof. Dr. RODICA COSGAREA



UMF

UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Etiologia și patogeneza melanomului	18
1.1. Melanomul	18
1.2. Gene și căi de control la nivel celular în melanom	19
1.2.1. CDKN2A/INK4a/ARF	19
1.2.2. CDK4/p16INK4A	20
1.2.3. p14ARF	22
1.2.4. Calea Ras/Raf/MEK/ERK	23
1.2.5. Calea PI3K/PTEN/AKT	25
1.2.6. Protein tirozin kinazele	25
1.2.7. MC1R- gena cu risc redus	26
1.2.8. Proteina p53	27
1.2.9. Proteina MDM2	29
1.2.10. Insulin growth factor receptor 1	30
1.2.11. Metaloproteinazele matriceale	33
Contribuția personală	
1. Ipoteza de lucru/obiective	46
2. Metodologie generală	47
3. Efectul terapiei cu Nutlin asupra expresiei p53, Mdm2, IGF-1R	48
3.1. Introducere	48
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	48
3.3. Material și metodă	49
3.4. Rezultate	54
3.4.1. Studiul axei p53-Mdm2-IGF-1R în melanom	
3.4.2. Efectul Nutlin-ului asupra proliferării celulare	54
3.4.3. Efectul Nutlin-ului asupra IGF-1R în funcție de doză și interval de timp	58
3.4.4. Degradarea receptorului IGF1 în urma terapiei cu Nutlin	62
3.4.5. Efectul Nutlin-ului asupra semnalizării intracelulare	64
3.4.6. Efectul Nutlin-ului asupra migrării celulare	66
3.4.7. Efectul Nutlin-ului asupra metaloproteazelor matriceale	71
3.6. Concluzii	76
4. Rolul metaloproteazelor matriceale 2 și 9 în melanom	79
4.1. Introducere	79
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	80

4.3. Material și metodă	80
4.4. Rezultate	82
4.5. Discuții	109
4.6. Concluzii	113
5. Concluzii generale	115
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	117
REFERINȚE	119

Cuvinte cheie: melanom, metaloproteaze matriceale, IGF-1R

INTRODUCERE

Melanomul este cea mai gravă neoplazie cutanată, având implicații serioase asupra mortalității și morbidității. În ultimii ani, au fost evaluați o serie de markeri biologici, clinici și histologici, pentru ca terapeutul să beneficieze de o viziune mai clară asupra evoluției melanomului și pentru a oferi un prognostic acurat pacienților cu melanom. S-a demonstrat faptul că grosimea tumorii, ulcerarea, invazia vasculară și invazia ganglionară sunt factori predictivi pentru prognosticul melanomului. De asemenea, au fost studiate căile de semnalizare implicate în patogeneza tumorală, receptori ai adeziunii celulare, gene și produși ai acestora, pentru a înțelege evoluția pe termen lung a acestui tip de neoplazie. Cu toate acestea, în afară de terapia chirurgicală a melanomului primar, terapia adjuvantă este încă în curs de optimizare. Este posibil ca, prin luarea în considerare a unor markeri suplimentari, să se poată oferi o terapie individualizată în funcție de caracterul agresiv al neoplaziei.

În ultimii ani, s-au realizat progrese remarcabile în scopul elucidării patogenezei melanomului. Cu toate acestea, înțelegerea mecanismelor tumorale este departe de a fi clarificată. Factorii genetici și de mediu au efect complementar în apariția melanomului. Astfel, un stimul ambiental precum radiația ultravioletă induce modificări genetice/epigenetice la nivelul cromozomilor din melanocit, cu consecință asupra semnalizării celulare. Din această perspectivă, progresia melanomului se asociază în primul rând cu alterări genetice, respectiv modificări în secvențele ADN, cum ar fi mutații, deleții, amplificări sau translocații, și în al doilea rând, cu modificări epigenetice, precum alterări la nivelul activității transcripționale. În dezvoltarea neoplazică, semnalizarea intracelulară este fie amplificată, fie se constată un deficit în cadrul semnalizării proapoptotice. Aceste modificări ireversibile permit celulelor melanomatoase să prolifereze necontrolat și să dezvolte un caracter invaziv. Este recunoscut rolul metaloproteinazelor matriceale și al insulin growth factor receptor în creșterea, invazia și metastazarea tumorală. Din aceste considerente, ne-am propus elucidarea relației dintre IGF-1R și semnalizarea intracelulară, precum și clarificarea legăturii dintre metaloproteazele matriceale (MMP) și parametrii clinici, histopatologici relevanți pentru melanom.

Am dorit ca prin studiile efectuate să aducem o contribuție la înțelegerea mecanismelor etiopatogenetice în melanom, mecanisme incomplet înțelese la ora actuală, la nivel mondial. Rezultatele obținute de către echipa noastră sunt elocvente și clarifică aspecte importante legate de semnalizarea celulară tumorală, de caracterul metastatic tumoral, oferind totodată un marker prognostic pentru evoluția melanomului.

Contribuția personală

1. Efectul terapiei cu Nutlin asupra expresiei p53, Mdm2, IGF-1R

1.1 Studiul axei p53-Mdm2-IGF-1R în melanom

Prima etapă a cercetării a constat în determinarea proteinelor p53, Mdm2, IGF-1R și GAPDH în liniile celulare studiate pentru a obține o caracterizare a liniilor celulare melanomatoase folosite. În acest scop, determinările au fost efectuate prin tehnica Western Blot și s-a obținut expresia bazală, neinfluențată prin terapie, a IGF-1R, p53, Mdm2 în liniile celulare BE, Mel 28, DFB și Mel Juso. Proteina p53 este mai puternic exprimată în cazul liniilor BE și Mel 28, linii celulare cu mutație la nivelul p53. Prin comparație, celelate două linii celulare DFB și Mel Juso, "wild type", au p53 mai puțin exprimat. Mdm2 prezintă o exprimare mai pronunțată în liniile DFB și Mel Juso.

1.2 Efectul tratamentului cu Nutlin asupra proliferării celulare

În continuare ne-am propus să observăm efectele biologice în celulele melanomatoase după terapia cu Nutlin, focalizându-ne pe capacitatea de proliferare celulară. În acest scop cele 4 linii celulare melanomatoase au fost tratate cu diferite concentrații de Nutlin. Ca și loturi de control au fost considerate celule netratate și celule tratate cu DMSO. Viabilitatea celulară a fost evaluată la 24 și 48 ore prin utilizarea indicatorului redox Alamar Blue® și al aparatului de citire al fluorescenței și absorbției Tecan® Infinite® M1000. Remarcăm faptul că în urma terapiei cu Nutlin proliferarea celulară este puțin afectată atât la cele 2 linii celulare cu mutație la nivelul p53, BE și Mel 28, precum și la liniile celulare cu p53 funcțional, DFB și Mel Juso. Demonstrăm astfel faptul că Nutlin în concentrație de sub 1μM nu afectează semnificativ proliferarea celulară, nu induce apoptoză celulară directă și permite evidențierea mecanismelor intracelulare caracteristice celulelor tumorale melanomatoase.

1.3 Efectul Nutlin-ului asupra IGF-1R în funcție de doză și interval de timp

Scopul nostru a fost evaluarea efectelor tratamentului cu Nutlin la diferite doze și intervale de timp, urmărind expresia p53, Mdm2 și IGF-1R. În acest scop, celulele BE și DFB au fost tratate cu DMSO și cu concentrații variate de Nutlin (sub 1μM) timp de 24 ore. Observăm faptul că multiplele concentrații de Nutlin nu modifică expresia p53, IGF-1R, Mdm2 la linia celulară BE. În cazul liniei DFB se constată afectarea receptorului IGF1 în funcție de doza de Nutlin folosită: cu cât doza de Nutlin este mai mare, cu atât receptorul este mai slab exprimat. De asemenea, se obiectivează o creștere a p53 și Mdm2 în funcție de doză. Acumularea Mdm2 și p53 reflectă ruperea inhibiției care există în mod obișnuit între cele două proteine, disrupție care este consecința directă a terapiei efectuate cu Nutlin.

Pentru a evalua expresia proteinelor în funcție de durata tratamentului, ambele linii celulare au fost tratate timp de 6 ore, 12 ore respectiv 24 ore cu o doză de Nutlin de 0.5μM. La încheierea intervalului de timp propus, celulele au fost prelucrate conform procedurii Western Blot. În cazul liniei celulare BE, nu se observă modificări în expresia p53, IGF-1R sau Mdm2, cel din urmă fiind foarte slab exprimat. În cazul liniei DFB, constatăm faptul că proteina p53 este mult mai puternic exprimată în urma tratamentului cu Nutlin. Acumularea de p53 și Mdm2 atinge un platou de la 6 ore de tratament, modificările apărute la 12, 24 ore de terapie fiind minime.

Am luat în considerare două linii celulare suplimentare, Mel28 cu mutație la nivelul p53 și Mel Juso - linie celulară melanomatoasă fără mutație la nivelul p53. Mel28 și Mel Juso au

fost tratate timp de 24 ore cu Nutlin 500nM. Datele obținute confirmă rezultatele anterior enunțate.

1.4 Degradarea IGF-1R în urma terapiei cu Nutlin

În continuare, ne-am propus observarea modului în care receptorul IGF1 este afectat în urma tratamentului cu Nutlin, în funcție de prezența IGF1, la celule melanomatoase cu și fără mutație la nivelul p53. În acest scop, celulele BE, DFB și Mel Juso au fost tratate cu doze crescătoare de Nutlin; lotul de control constă din celule netratate și celule tratate cu DMSO. O parte din celule a fost stimulată cu IGF1, experimentul fiind încheiat la 24h de la efectuarea terapiei. Comparând lotul de celule melanomatoase stimulate cu IGF1 și cele nestimulate cu IGF1, se observă faptul că celulele stimulate cu IGF1 prezintă o degradare mult mai accentuată a receptorului IGF-1R, indiferent de caracterul lui p53.

1.5 Efectul Nutlin-ului asupra semnalizării intracelulare

Obiectivul nostru a fost identificarea modului în care este afectată semnalizarea intracelulară în urma terapiei cu Nutlin.

Scopul experimentului a fost determinarea activării tirozin kinazei IGF-1R și activarea celor două căi importante de semnalizare al IGF-1R: calea IRS/PI3K/AKT și calea Ras/Raf/MEK/ERK. În acest sens, s-au obiectivat fosfo-IGF-1R, fosfo-AKT și fosfo-ERK. Pentru experimentele de semnalizare intracelulară, celulele melanomatoase au fost tratate cu Nutlin în concentrație de 0,5 μ M și au fost stimulate IGF1. Celulele au fost recoltate și pregătite pentru procedeul Western Blot.

Observăm faptul că în cazul liniilor celulare studiate, pAKT se activează atât în prezența cât și în absența tratamentului cu Nutlin. Fosforilarea lui ERK este mai crescută în cazul lotului tratat, observându-se activarea lui ERK chiar și fără stimulare cu IGF1, doar în urma tratamentului cu Nutlin. Datele obținute indică faptul că în urma terapiei cu Nutlin rezultă activarea ERK în absența activării AKT.

1.6 Efectul Nutlin-ului asupra migrării celulare

Având în vedere faptul că activarea ERK determină stimulare și proliferare celulară, ne-am propus să observăm efectul terapiei cu Nutlin asupra migrării celulare. Celulele DFB au fost puse în plăci de culturi celulare, după ce s-au atașat, s-a efectuat o "rană", o zonă de unde celulele au fost înlăturate. Condițiile de tratament au fost următoarele: IGF1 și Nutlin, Nutlin, IGF1, mediu fără ser. Am constatat că migrarea cea mai intensă a fost indusă de IGF1; celulele care au beneficiat de o terapie combinată, Nutlin și IGF1, precum și celulele tratate doar cu Nutlin, au prezentat o reducere semnificativă a migrării celulare, demonstrând că Nutlin inhibă migrarea celulară indusă de IGF1.

1.7 Efectul Nutlin-ului asupra metaloproteinazelor matriceale

În etapa următoare am urmărit studiul relației dintre axa p53-Mdm2-IGF-1R și MMP în melanom. În acest scop, în studiul pilot, celulele melanomatoase au fost tratate cu Nutlin și stimulate cu IGF1 pentru a evalua expresia Mdm2, MMP2 și MMP14.

În urma terapiei cu Nutlin pentru un interval de 6 ore, constatăm faptul că perioada a fost prea scurtă pentru a obiectiva modificări la nivelul transcripției, astfel încât Mdm2 nu s-a legat de IGF-1R. Având în vedere faptul că IGF-1R este cel care poate activa MMP 2 și MMP 14, modificările la nivelul expresiei MMP sunt minime.

În urma terapiei cu Nutlin pentru un interval de 15 ore, constatăm diferența care apare la nivelul MMP în funcție de caracterul p53: dacă în cazul celulelor cu mutație este sugerată o scădere la nivelul MMP2 și MMP14, pentru linia celulară fără mutație constatăm creșterea MMP2 și MMP14, în ciuda terapiei cu Nutlin. Rezultatele noastre preliminare sugerează un comportament diferit din punct de vedere al migrării celulelor tumorale în funcție de statusul proteinei p53.

2. Rolul metaloproteazelor matriceale 2 și 9 în melanom

Scopul studiului a fost:

- Determinarea formelor active și latente a MMP 2 și MMP 9 la melanom comparativ cu nevi melanocitari;
- Obiectivarea diferențelor din punct de vedere al valorilor MMP între lotul de tumori cutanate benigne și lotul de tumori cutanate maligne;
- Observarea unei relații între expresia MMP-2, MMP-9 și între indici clinicopatologici în cazul pacienților diagnosticați cu melanom: sex, vârstă, nev preexistent, ulcerație tumorală, indice Breslow, scor Clark, stadiul bolii, ganglion sentinelă, LDH, S100.

Material și metodă:

Expresia formelor active și latente de MMP 2 și MMP 9 a fost evaluată prin metoda zimografică pe un lot de 21 tumori melanomatoase și 19 nevi melanocitari. Datele obținute au fost prelucrate statistic utilizând programele Microsoft Excel și Med Calc versiunea 12. Valorile au fost considerate ca având semnificație statistică la o valoare a parametrului P mai mică de 0,05.

Rezultate:

Din totalul de 21 biopsii de melanom, 100% au exprimat MMP 2 inactiv. În cazul lotului martor de nevi melanocitari, 16 din 19 probe au exprimat MMP 2 inactiv, respectiv 78.94%. MMP 2 activ a fost exprimat la 95% din biopsiile de melanom, respectiv la 20 din 21 de cazuri, și la 5,26% din nevi melanocitari (1 caz). MMP 9 inactiv s-a obiectivat la 18 din 21 biopsii (85%) de melanom și în 4 probe de nevi melanocitari (21%). MMP 9 activ s-a observat la 8 cazuri cu melanom (38%) și nu s-a evidențiat la nici un nev melanocitar (0%). În cadrul lotului de melanom, media MMP 9 este mai mare la bărbați față de femei.

Valoarea medie a MMP 2 inactiv, MMP 2 activ, MMP 9 inactiv și MMP 9 activ a fost mai mare în cazul lotului de melanom în comparație cu lotul de nevi melanocitari benigni. MMP 2 inactiv, MMP 2 activ, MMP 9 inactiv și MMP 9 activ s-au corelat cu caracterul de malignitate al tumorii. MMP 9 activ s-a corelat cu indicele Breslow. Expresia formelor activ și latent a MMP 2 și MMP 9 nu s-a corelat cu stadiul tumorii, nivelul Clark, forma clinică de melanom, ulcerația tumorală, LDH, S100 și vârstă. Media MMP 9 inactiv și MMP 9 activ a fost mai elevată la lotul de pacienți cu indice Breslow peste 2mm față de lotul de pacienți cu indice Breslow sub 2mm. MMP 9 activ și inactiv s-a corelat cu invazia ganglionară neoplazică. MMP 2 activ și inactiv nu s-a corelat cu invazia limfatică.

Concluzii generale

1.

- În urma terapiei cu Nutlin a celulelor melanomatoase are loc o disociere a legăturii p52-Mdm2, motiv pentru care se constată diminuarea expresiei receptorului IGF1 și accentuarea expresiei p53, Mdm2.
- Prin tratarea celulelor melanomatoase cu doze crescătoare de Nutlin se constată degradarea IGF-1R la celulele fără mutație la nivelul p53 și nu se obiectivează modificări ale IGF-1R la celulele cu mutație la acest nivel.
- Terapia cu Nutlin pentru intervale progresiv crescute de timp are ca și efect diminuarea expresiei IGF-1R la celulele fără mutație p53, dar nu afectează expresia IGF-1R la celulele cu mutație p53.
- În urma tratamentului cu Nutlin și a stimulării cu IGF1, se constată următoarele:
 - la celule cu mutație p53 se obține degradarea IGF-1R și creșterea expresiei Mdm2;
 - la celule melanomatoase fără mutație p53 se obiectivează degradarea IGF-1R și expresia crescută la nivelul p53 și Mdm2;
- Interesant de subliniat este faptul că în urma terapiei cu Nutlin, fosforilarea ERK este mai crescută și apare mai repede, indiferent de caracterul lui p53, context în care calea PI3K/PTEN/AKT este neinfluențată.
- Terapia cu Nutlin inhibă migrarea celulară tumorală indusă de IGF1.
- Rezultate preliminare obținute în urma tratamentului cu Nutlin demonstrează:
 - La liniile celulare fără mutație p53 există o creștere a MMP2, la liniile celulare cu mutație la nivelul p53 o scădere a MMP2;
 - La celulele fără mutație p53 există o creștere marcată a MMP14, în timp ce la celulele melanomatoase cu mutație la nivelul p53 se constată o scădere a MMP14.

2.

- În urma determinării MMP la un lot de melanoame și un lot de nevi melanocitari benigni, se observă faptul că valorile MMP 9 inactiv, MMP 9 activ, MMP 2 inactiv și MMP 2 activ se corelează cu caracterul malign al tumorii cutanate.
- În cadrul lotului de melanom, media MMP 9 este mai mare la bărbați față de femei.
- Media MMP 9 activ și MMP 9 inactiv este mai mare la pacienții cu indice Breslow peste 2mm;
- Din punct de vedere al legăturii dintre MMP și metastazarea limfatică, am obiectivat faptul că media MMP 9 activ a fost semnificativ mai mare la pacienții cu ganglion santinelă pozitiv față de cei cu ganglion santinelă negativ, MMP 9 activ corelându-se statistic cu ganglionul santinelă pozitiv.
- Media MMP 9 inactiv a fost mai ridicată la pacienții cu ganglion santinelă pozitiv în comparație cu cei fără invazie limfatică neoplazică. Există corelație înalt semnificativă statistic între prezența ganglionului santinelă pozitiv și valoarea MMP 9 inactiv.
- În urma cercetării efectuate, nu am constatat o diferență semnificativă statistic între valorile MMP 9 activ, MMP 9 inactiv, MMP 2 activ, MMP 2 inactiv și stadiul bolii.

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY "IULIU HATIEGANU" CLUJ
NAPOCA**

**Matrix metalloproteinases and IGF-1R expression in
melanoma**

PhD student: ELISABETA CANDREA

PhD coordinator: PROF. DR. RODICA COSGAREA



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Melanoma etiology and pathogenesis	18
1.1. Melanoma	18
1.2 Genes and cellular control pathways	19
1.2.1. CDKN2A/INK4a/ARF	19
1.2.2. CDK4/p16INK4A	20
1.2.3. p14ARF	22
1.2.4. Ras/Raf/MEK/ERK pathway	23
1.2.5. PI3K/PTEN/AKT pathway	25
1.2.6. Protein tyrosin kinases	25
1.2.7. MC1R- low risk gene	26
1.2.8. P53 protein	27
1.2.9. MDM2 protein	29
1.2.10. Insulin growth factor receptor 1	30
1.2.11. Matrix metalloproteinases	33
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. General hypothesis	46
2. General methodology	47
3. Effects of Nutlin therapy on p53, Mdm2, IGF1R expression	48
3.1. Introduction	48
3.2. Work hypothesis	48
3.3. Material and methods	49
3.4. Results	54
3.4.1 Study of p53-Mdm2-IGF1R axis in melanoma	56
3.4.2 Effects of Nutlin therapy on cellular proliferation	
3.4.3 Dose response and time response	58
3.4.4 Effects of Nutlin therapy on IGF1R degradation	62
3.4.5 Effects of Nutlin therapy on intracellular signaling	64
3.4.6 Effects of Nutlin therapy on cellular migration	66
3.4.7 Effects of Nutlin therapy on matrix metalloproteinases	71
3.6. Conclusions	76
4. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in melanoma	79
4.1. Introduction	79
4.2. Work hypothesis	80
4.3. Materials and methods	80
4.4. Results	82
4.5. Discussions	109
4.6. Conclusions	113
5. General conclusions	116

KEYWORDS: melanoma, matrix metalloproteinases, IGF1R

INTRODUCTION

Cutaneous melanoma is the most serious type of skin cancer, with high implications on the morbidity and mortality of patients. Several clinical, biological and histological markers have been evaluated in order to better understand the evolution of melanoma. Common clinical factors predicting the outcome of melanoma include tumor stage, localization, sex and the age of the patient. Although several receptors, genes, gene products have been linked to melanoma progression, still no adjuvant therapy measures up to the benefits of surgical operation. Additional molecular information regarding the tumor aggressiveness may lead to an improved targeted therapy.

Significant progress has been made in the understanding of melanoma pathogenesis. Still, the understanding of tumor mechanisms is far from being complete. Both genetic and environmental factors contribute to the development of melanoma. An environmental stimulus, ultraviolet radiation for example, induces genetic/epigenetic alterations at the chromosome level within the melanocyte, having important consequences on the cellular signaling. From this point of view, melanoma progression is associated with oncogenic change, genetic alterations like DNA sequence alterations, mutations, deletions, translocations or amplifications and epigenetic changes like alterations in the transcriptional activity. In malignant tumor progression, intracellular signaling may be hyperactivated or proapoptotic signaling may be decreased. These irreversible changes allow melanoma cells to proliferate and to acquire an invasive phenotype. Matrix metalloproteinases and IGF1R are widely recognized for their involvement in tumor growth, invasion and metastasis. This is the reason why we have decided to study the connection between IGF1R and intracellular signaling, as well as to understand the link between matrix metalloproteinases (MMP) and clinical, histological parameters characteristic for melanoma.

Our intention was to bring a contribution to the understanding of the etiopathogenetic mechanisms of melanoma, which have not been entirely elucidated worldwide. The results obtained by our team are eloquent and clarify important aspects regarding tumor cellular signaling and the metastatic nature of tumors, while offering a prognosis marker for the evolution of melanoma.

Personal Contribution

1. The effect of Nutlin therapy over the expression p53, Mdm2, IGF1R

1.1 The study of the p53-Mdm2-IGFR axis in melanoma

During the first stage of our research we focused upon the analysis of the p53, Mdm2, IGF1R and GAPDH proteins in order to understand the characteristics of the melanoma cell lines included in our study. Consequently, for the BE, Mel 28, DFB and Mel Juso cell lines, we used the Western Blot technique to obtain normal IGF1R, p53 and Mdm2 expressions, unaffected by therapy. The p53 registers a stronger expression in BE and Mel 28 cell lines, which include a p53 mutation. By contrast, in the case of the DFB and Mel Juso “wild type”

cell lines, p53 registers a weaker expression. Mdm2 registers a stronger expression in the case of the DFB and Mel Juso cell lines.

1.2 Effects of Nutlin-3 therapy on cell proliferation

Next, we set out to investigate the effects of Nutlin-3 therapy on cell proliferation. 4 melanoma cell lines were treated with low-dose of Nutlin-3 in various concentrations; untreated and DMSO treated cells, in which Nutlin-3 is dissolved, represented the negative control. Cell viability assay was performed after 24 and 48 hours. Viability of both mutant and wild type p53 cells was not significantly affected after low-dose Nutlin-3 treatment (<1 μ M).

1.3 Dose response/ time response

To investigate the effects of low dose Nutlin-3 therapy on p53, Mdm2 and IGF-1R, BE and DFB melanoma cell lines were treated with various Nutlin-3 concentrations and DMSO for 24 hours. No considerable change was noticed in the expression of p53, IGF-1R and Mdm2 in the p53 mutant, BE cell line. In DFB cells, accumulation of p53 and Mdm2 was noticed, while IGF-1R levels showed a Nutlin-3 dose dependent decrease.

Various time-frames of Nutlin-3 treatment have no effects on p53, Mdm2 and IGF-1R expression in the p53 mutant BE cell line. P53 and Mdm2 expression are modified after treatment with Nutlin-3 in the p53 wild type, DFB, melanoma cell line, reaching a peak after 6 hours of treatment. No further increase was noticed at 12 and 24 hours of treatment.

Treatment of Mel 28 (mutant p53) and Mel Juso (wild type p53) with Nutlin-3 for 24 hours confirmed the p53 status dependent protein expression.

1.4 Effect of Nutlin-3 on IGF-1R Degradation

We investigated the effects of Nutlin-3 and IGF1 treatment on IGF-1R degradation, using p53 wild type and mutant melanoma cell lines. This was performed on BE, DFB and Mel Juso cell lines by using increasing Nutlin concentrations; non-treated and DMSO treated cells represented the negative control. The degradation occurred only in the presence of IGF-1 and only in cells expressing wild type p53 indicating that the Nutlin-3 dependent degradation requires signaling through the IGF-1R to occur.

1.5 Effect of Nutlin-3 on cell signaling

Next we wanted to assess whether Nutlin-3 could affect IGF-1 mediated signaling through the IGF-1R therefore, we analyzed IGF-1R phosphorylation and the activation of two important signaling pathways IRS/PI3K/AKT and Ras/Raf/MEK/ERK. Melanoma cells were treated with and without Nutlin-3, stimulated with IGF-1 then prepared for Western Blot analysis. In our study, pAKT was activated regardless of whether the cells had been treated without or with Nutlin-3. pERK is increased in the unstimulated cells that were treated with Nutlin-3. Our data suggests activation of ERK in the absence of AKT activation following Nutlin-3 therapy.

1.6 Effects of Nutlin-3 treatment on cell migration

Having in mind the fact that ERK activation enhances cell stimulation and proliferation, we next investigated the effects of Nutlin-3 therapy on cell migration. A "wound" was performed with a sterile tip after the DFB cells attached to the cell culture plates. Cells were treated with

Nutlin-3& IGF1, Nutlin-3, IGF1 and serum free medium. Most cell migration was measured after IGF1 stimulation; in comparison, cells receiving a combined treatment consisting of Nutlin-3& IGF1 and cells treated with Nutlin-3 migrated significantly less, indicating that Nutlin-3 inhibits cell migration induced by IGF1.

1.7 Effects of Nutlin-3 on matrix metalloproteinases

We set out to investigate the relationship between p53-Mdm2-IGF-1R and MMP in melanoma. Therefore, in our pilot study, wild type and mutant p53 melanoma cell lines were treated with Nutlin and IGF1 in order to evaluate Mdm2, MMP 2 and MMP 14 expression.

After a short term Nutlin-3 therapy (6 hours), no significant changes in the expression of MMP 2 and MMP 14 are noticed, due to the fact that the treatment period was too short to obtain transcription modifications. After a 15 hour Nutlin therapy, there is a difference in MMP expression according to p53 status: mutated p53 cells show decreased MMP 2 and MMP 14 expression in comparison to wild type p53 cells that show increased MMP 2 and MMP 14 expression. Our preliminary data suggests different migration behavior according to p53 status.

2. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma

The main objectives of this study were:

- To determine the expression of active and inactive forms of MMP 2 and MMP 9 in melanoma and benign melanocytic nevi;
- To assess the differences in MMP expression between the benign and malignant tumors;
- To evaluate the relationship between MMP 2 and MMP 9 expression and clinicopathological parameters such as sex, age, ulceration, Breslow index, Clark level, tumor stage, lymph node metastasis, LDH and S100.

Materials and methods:

Expression of both active and latent forms of MMP 2 and MMP 9 was evaluated by zymography in 21 melanoma tissue samples and 19 benign melanocytic nevi samples. Statistical analysis was performed in Microsoft Excel XP and MedCalc software, version 12 for Windows. Statistical significance was defined as $p < 0,05$.

Results:

MMP 2 inactive was detected in all patients (100%) with melanoma and in 16 out of 21 (78,98%) patients with benign melanocytic nevi. The expression of active MMP 2 was observed in 20 out of 21 melanoma cases (95%) and in 1 (5,26%) nevus sample. Inactive MMP 9 expression was found in 18 out of 21 (85%) melanoma lesions and in 4 out of 19 (21%) benign tumor samples. The expression of active MMP 9 was assessed in 8 melanoma samples (38%) and in no benign melanocytic tumor sample (0%). In the melanoma group, the average value of inactive MMP 9 is higher in males compared to females. The mean value of inactive, active MMP 2 and inactive, active MMP 9 was higher in the melanoma group compared to the benign melanocytic nevi group. The expression of active MMP 9 correlated with Breslow index. No significant differences were observed between the expression of active and inactive MMP 2, MMP 9 and age, tumor stage, Clark level, clinical subtype, tumor

ulceration, LHD, S100. When comparing melanoma tumors above and below 2mm, both inactive and active MMP 9 expression was statistically higher in tumors >2mm thick. We report a correlation between positive lymph node metastasis and inactive MMP 9 and active MMP 9 expression.

General conclusions:

1.

- Nutlin-3 therapy in melanoma cell lines inhibits p53-Mdm2 interaction and increases p53, Mdm2 accumulation and decreases IGF-1R expression.
- IGF-1R exhibits dose dependent Nutlin-3 decrease in p53 wild type melanoma cells and remains constant in p53 mutant cells.
- IGF-1R shows time-dependent Nutlin-3 decrease in p53 wild type melanoma cells and remains constant in p53 mutant cells.
- Treatment of melanoma cells with IGF1 and Nutlin resulted in IGF-1R degradation and Mdm2 increase irrespective of p53 status and in p53 increase in wild type melanoma cells.
- We report increase in ERK phosphorylation and no significant change in AKT activation after Nutlin-3 treatment, irrespective of p53 status.
- Nutlin-3 inhibits melanoma cell migration induced by IGF1.
- After Nutlin-3 treatment, our preliminary data suggests:
 - mutated p53 cells show decreased MMP 2 and MMP 14 expression.
 - wild type p53 cells that show increased MMP 2 and MMP 14 expression.

2.

- After having detected both active and latent forms of MMP 2 and MMP 9 in melanoma and benign melanocytic nevi, we report that both inactive and active forms of MMP 2 and MMP 9 correlated with melanoma;
- In the melanoma group, the average value of inactive MMP 9 is higher in males compared to females;
- Both inactive and active MMP 9 expression was statistically higher in melanomas >2mm thick;
- The median expression of active and inactive MMP 9 is higher in the patients with positive lymph nodes compared to the patients with negative lymph node analysis. Moreover, we report a correlation between positive lymph node metastasis and active, inactive MMP 9 expression.
- No relationship was found between tumor stage and active, inactive MMP 9 and active, inactive MMP 2.