

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Factori de prognostic și răspuns la tratament în cancerul colorectal

---

Doctorand **Ovidiu Vasile Bochiș**

---

Conducător de doctorat Prof.dr. **Alexandru Irimie**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Epidemiologia și factorii de prognostic în cancerul colorectal</b>	17
1.1. Epidemiologia cancerului colorectal	17
1.2. Importanța factorilor de prognostic în cancerul colorectal	18
<b>2. Reglarea ciclului celular- o cascadă enzimatică guvernată de sistemul ubiquitin proteasomic</b>	21
2.1. Funcționarea sistemului ubiquitin proteasomic	23
2.2. Importanța în cancerogeneză a ubiquitin-ligazelor E3	24
2.2.1. Ubiquitin ligaza Skp1- Cullin1-F-box	25
2.2.1.1. Skp2	26
2.2.1.2. FBW7	27
2.2.1.3. β-TrCP	27
2.2.2. Ubiquitin ligaza APC/C	27
2.3. Rolul proteasomului 26S în facilitarea cancerogenezei	29
<b>3. Rolul căii SCF<sup>Skp2/Cks1</sup>-p27 în cancerul colorectal</b>	31
3.1. Importanța pierderii nucleare a expresiei p27 pentru promovarea cancerogenezei	31
3.2. Rolul oncogenetic al proteinei Skp2	33
3.3. Rolul proteinei Cks1 în interacțiunea Skp2-p27	34
3.4. Mecanismele reglatoare ale expresiei Skp2 identificate în cancerul colorectal	35
3.4.1. Implicarea ubiquitin-ligazei APC/C în controlul expresiei Skp2 în cancerul colorectal	36
3.4.2. Calea PI3K/Akt induce supraexpresia Skp2 în cancerul colorectal	37
3.4.3. PTEN inhibă indirect expresia Skp2 în cancerul colorectal	38
3.4.4. RECK inhibă expresia Skp2 în cancerul colorectal	39
3.5. Supraexpresia Skp2 ar putea fi o țintă terapeutică la pacienții cu cancer colorectal	39
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	43
<b>2. Metodologie generală</b>	47

<b>3. Studiul 1 - Importanța factorilor de prognostic și a abordării multidisciplinare în cancerul rectal</b>	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteza de lucru	50
3.3. Material și metodă	51
3.4. Rezultate	53
3.5. Discuții	66
3.6. Concluzii	70
<b>4. Studiul 2 - Importanța prognostică a oncoproteinei Skp2 și a proteinei supresoare tumorale p27 în cancerul colorectal</b>	71
4.1. Introducere	71
4.2. Ipoteza de lucru	73
4.3. Material și metodă	74
4.4. Rezultate	78
4.5. Discuții	91
4.6. Concluzii	96
<b>5. Studiul 3 - Importanța prognostică a expresiei imunohistochimice a markerului de proliferare celulară Ki67 în cancerul colorectal</b>	99
5.1. Introducere	99
5.2. Ipoteza de lucru	100
5.3. Material și metodă	100
5.4. Rezultate	102
5.5. Discuții	107
5.6. Concluzii	108
<b>6. Concluzii generale</b>	109
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	111
<b>REFERINȚE</b>	113

**Cuvinte cheie:** cancerul colorectal, factori de prognostic, abordare terapeutică multimodală, reglarea ciclului celular, Skp2, p27, Ki67

# INTRODUCERE

Cancerul colorectal este unul dintre cele mai frecvente cancere la nivel global, fiind al treilea ca frecvență la bărbați și al doilea la femei. În România, la bărbați este al doilea atât ca incidență cât și ca mortalitate, după cancerul bronhopulmonar, iar la femei este al treilea, după cancerul de sân și cancerul de col uterin.

Institutul Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță” Cluj-Napoca este un centru de referință pentru tratamentul cancerului colorectal. În perioada 2005-2010 numărul de cazuri noi tratate în institut a crescut constant, la sfârșitul acestei perioade raportându-se peste 500 de cazuri noi pe an.

Datele raportate de SRROM în cadrul Congresului SRROM din octombrie 2015 de la Sibiu, au demonstrat că în România există un deficit atât în ceea ce privește existența unui personal calificat, medici specialiști radioterapeuți, tehnicieni și fizicieni, precum și în ceea ce privește numărul aparatelor de radioterapie. Prin urmare, aceste deficite determină apariția unor întârzieri în administrarea radioterapiei, precum și apariția unor devieri de la secvențialitatea tratamentelor. În studiul 1 din această teză, am dorit să identificăm dacă aceste inconveniente se răsfrâng și asupra supraviețuirii pacienților cu cancer rectal.

Abordarea terapeutică din cancerul colorectal este direct dependentă de prognosticul pacienților. Până în prezent au fost descriși mai mulți factori de prognostic clinici, histopatologici, moleculari și genetici.

Cu toate îmbunătățirile managementului terapeutic, prin apariția terapiilor moleculare țintite și a imunoterapiei, prognosticul pacienților metastatici este încă rezervat. De aceea, în ultimii ani, numeroase cercetări translaționale au încercat să identifice noi factori moleculari și genetici implicați în oncogeneza cancerului colorectal. Aceste studii au dus la identificarea proteinei p27, un reglator negativ al complexelor ciclinE/Cdk2 și ciclinA/Cdk2, care promovează intrarea celulelor în faza S a ciclului celular, ca fiind implicată în supresia tumorală, promovând diferențierea celulară, apoptoza și inhibiția creșterii celulare. Cel mai important reglator post-transcripțional al proteinei supresoare tumorale p27 este complexul ubiquitin-ligazic SCF<sup>Skp2</sup>. În celulele tumorale de carcinom colorectal, frecvent, este întâlnită supraexpresia proteinei F-box Skp2, ceea ce induce ubiquitilarea și degradarea excesivă a proteinei p27, promovând dezvoltarea tumorală. Skp2 se comportă ca o proto-oncoproteină. Pentru o legare eficientă între Skp2 și proteina p27 este nevoie de un ligand, proteina Cks1. În al doilea studiu din această teză am analizat rolul expresiei imunohistochemice a Skp2, p27 și a cofactorului Cks1 în aprecierea prognosticului a 130 de pacienți cu cancer colorectal din România.

Cu toate că în cancerule de sân, în tumorilor neuroendocrine și în gliome s-a dovedit rolul prognostic al imunoexpresiei markerului de proliferare celulară Ki67, în cancerul colorectal studiile care au cercetat acest aspect au prezentat rezultate contradictorii. Prin urmare, în studiul 3 din această teză am analizat rolul prognostic al expresiei Ki67 la pacienți cu cancer colorectal.

# CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

## 1. Ipoteza de lucru/obiective

Cancerul colorectal (CRC) este unul dintre cele mai frecvente cancere la nivel global, fiind al treilea ca frecvență la bărbați și al doilea la femei.

La nivel global, mortalitatea cancerului colorectal a înregistrat un declin în ultimii ani, consecință atât a progreselor terapeutice, cât și a implementării programelor de screening, care au dus la creșterea numărului de cazuri diagnosticate în stadii incipiente, frecvent curabile.

Conform ghidurilor internaționale (NCCN și ESMO) abordarea terapeutică a cazurilor de cancer colorectal este direct influențată de prognosticul pacienților. Este foarte important să se cunoască cât mai mulți factori de prognostic, atât pozitivi cât și negativi pentru a putea încadra pacienții în grupe de risc și a le oferi cele mai bune opțiuni terapeutice disponibile.

Descoperirile din ultimii ani care au dus la identificarea unor factori moleculari implicați în cancerogeneza CRC și dezvoltarea de terapii moleculare țintite au reușit să aducă îmbunătățiri în supraviețuirea pacienților din stadiul metastatic. Descoperirea mecanismelor moleculare de control ale ciclului celular, de activare a oncogenelor și inactivare a genelor supresoare tumorale, poate crea premisa pentru dezvoltarea unor noi abordări terapeutice țintite, care pot fi mult mai eficiente și mai puțin toxice decât moleculele anti-tumorale disponibile la ora actuală.

În cele trei studii care stau la baza acestei teze de doctorat am cercetat implicarea factorilor de prognostic clasici, atât în supraviețuirea generală cât și în supraviețuirea fără recidivă, precum și importanța prognostică a reglatorilor ciclului celular, proteina p27 și proto-oncogenă Skp2 în cancerul colorectal. De asemenea, un punct important al cercetărilor din cadrul acestei teze de doctorat a fost identificarea impactului asupra supraviețuirii generale al intervalului de timp pentru debutul radioterapiei postoperatorii în cancerul rectal, precum și identificarea rolului prognostic al expresiei imunohistochimice a markerului de proliferare celulară Ki67 în cancerul colorectal, având în vedere informațiile contradictorii din acest domeniu.

În plus, în urma rezultatelor obținute am dorit să implementăm folosirea în practica de zi cu zi a determinării expresiei p27 și Skp2 ca markeri de prognostic pentru pacienții cu cancer colorectal.

## 2. Metodologie generală

Cele trei studii s-au desfășurat doar după obținerea aprobării Comisiei de Etică a Institutului Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță” Cluj-Napoca și a Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca. Întreaga activitate din aceste studii s-a desfășurat cu respectarea condițiilor de etică și deontologie medicală și a cercetării științifice.

Pentru analiza statistică s-a folosit programul statistic R, versiunea 3.2.1.. Curbele Kaplan-Meier au fost folosite pentru a estima ratele de supraviețuire generală și supraviețuire fără recidivă. Variabilele categoriale au fost analizate prin intermediul testului Hi pătrat și testul exact Fisher. Pentru datele continue s-a folosit testul t și testul Mann-Whitney U. Testul log-rank a fost folosit pentru efectuarea analizei univariate. Pentru analiza multivariată s-a folosit regresia Cox. Pentru toate analizele, hazard ratios și intervalul de confidență au fost obținute la 95% semnificație și o valoare a  $p < 0.05$  a fost considerată semnificativă statistic.

## **3. Studiul 1. Importanța factorilor de prognostic și a abordării multidisciplinare în cancerul rectal**

### **3.1. Introducere**

În fiecare an, aproape o treime din cancerul colorectal diagnosticat la nivel global, este reprezentat de cancerul rectal. Prognosticul și calitatea vieții pacienților cu cancer rectal au fost îmbunătățite în ultimele decenii datorită implementării programelor de screening naționale cât și prin îmbunătățirea tehnicilor chirurgicale de anastomoză și ale tratamentelor neoadjuvante și adjuvante. Abordarea multidisciplinară a cancerului rectal a adus rezultate remarcabile în ceea ce privește prognosticul acestor cazuri

Scopul acestui studiu a fost să analizeze relația dintre anumiți factori de prognostic și supraviețuirea generală, precum și să analizeze impactul intervalului de timp dintre chirurgie și debutul tratamentelor adjuvante asupra supraviețuirii pacienților cu cancer rectal tratați prin rezecție chirurgicală urmată de radiochimioterapie concomitentă.

### **3.2. Material și metodă**

Am desfășurat un studiu retrospectiv pe pacienți cu cancer rectal tratați în Institutul Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță” Cluj-Napoca, pe o perioadă de 5 ani, între ianuarie 2006 și decembrie 2010. Din numărul total de pacienți cu cancer rectal, un număr de 161 de pacienți au fost tratați prin chirurgie în prim timp, urmat de radiochimioterapie postoperatorie și cu sau fără chimioterapie pentru un total de 6 luni.

### **3.3. Rezultate și Concluzii**

Stadiul TNM rămâne unul dintre cei mai importanți factori de prognostic pentru aprecierea supraviețuirii generale a pacienților cu cancer rectal.

Abordarea multimodală oferă posibilitatea administrării tuturor resurselor terapeutice disponibile pentru fiecare caz în parte și este asigurată de colaborarea în managementul terapeutic a unei echipe multidisciplinare specializată în cancerul rectal.

Administrarea radiochimioterapiei concomitente în secvența adjuvantă în cazurile de cancer rectal avansat locoregional, nu influențează negativ datele de supraviețuire generală dar crește frecvența recidivelor locale.

La pacienții din acest studiu, respectarea anumitor intervale de timp între secvențele terapeutice din cancerul rectal, nu a fost atât de importantă pentru supraviețuirea generală precum folosirea până la urmă a tuturor resurselor terapeutice: rezecția chirurgicală, radioterapia și chimioterapia. În cazul tratamentului adjuvant, este recomandat ca acesta să fie început cât de repede permite starea pacientului și infrastructura locală.

## **4. Studiul 2. Importanța prognostică a oncoproteinei Skp2 și a proteinei supresoare tumorale p27 în cancerul colorectal**

### **4.1. Introducere**

În ultimii ani, odată cu dezvoltarea tehnicilor de biologie moleculară și genetică s-au putut caracteriza tot mai multe căi de control și de semnalizare celulară și astfel s-a asigurat cadrul științific pentru descoperirea multor factori de prognostic moleculari și genetici, implicați în oncogeneza CRC.

Scopul acestui studiu a fost să analizeze rolul prognostic al expresiei imunohistochimice a Skp2, p27 și Cks1 la pacienții cu cancer colorectal din România și să aprecieze utilitatea implementării acestor determinări imunohistochimice în practica de zi cu zi.

### **4.2. Material și metodă**

Am desfășurat un studiu retrospectiv pe pacienți cu cancer colorectal tratați prin rezecție chirurgicală, urmat de chimioterapie adjuvantă, sau radiochimioterapie, în cazul cancerului rectal, sau doar de chimioterapie paliativă, pentru cazurile metastatice. Pentru acest studiu am analizat pacienții la care s-a inițiat tratament oncologic în Institutul Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță” Cluj-Napoca într-o perioadă de 5 ani, între ianuarie 2006 și decembrie 2010.

Din punct de vedere al testelor imunohistochimice, patru grupe de expresie variabilă, de la 1 la 4, au fost definite în funcție de procentul de celule tumorale cu reactivitate nucleară, respectiv 0-24%, 25-49%, 50-74% și 75-100%.

### **4.3. Rezultate și Concluzii**

Factorii de prognostic clasici din cancerul colorectal, precum statusul de performanță scăzut, stadiul TNM avansat, valoarea preterapeutică crescută a markerului tumoral CEA, invazia limfatică, vasculară și perineurală, precum și efracția

capsulară oferă informații prognostice majore în ceea ce privește supraviețuirea pacienților cu cancer colorectal. Supraexpresia Skp2 este, de asemenea, un factor de prognostic important în cancerul colorectal, având impact atât asupra OS cât și asupra RFS. Mai mult, prezența expresiei moderată sau crescută a Skp2 a avut o relație direct proporțională cu prezența celorlalți factori de prognostic bine cunoscuți din cancerul colorectal. Prin urmare, testarea sa de rutină în practica clinică, ar aduce informații prognostice importante pentru pacienții cu cancer colorectal, putând fi folosit ca un marker de prognostic imunohistochimic. Mai mult, continuarea studiilor din acest domeniu și identificarea unor terapii moleculare țintite anti-Skp2 ar putea oferi rezultate promițătoare în terapia anti-tumorală.

## **5. Studiul 3. Importanța prognostică a expresiei imunohistochimice a markerului de proliferare celulară Ki67 în cancerul colorectal**

### **5.1. Introducere**

Aprecierea gradului de proliferare celulară, un factor de prognostic descris în multe patologii maligne umane, se poate realiza prin determinarea expresiei imunohistochimice a markerului de proliferare celulară Ki67. Multe studii au demonstrat importanța prognostică a expresiei Ki67 în mai multe cancere umane, printre care cancerul de sân, tumorile gastrointestinale stromale, tumorile gastrointestinale neuroendocrine, gliome. Cu toate acestea, în ceea ce privește cancerul colorectal, sunt puține studii care să analizeze importanța prognostică a expresiei Ki67, iar rezultatele lor sunt contradictorii.

Scopul acestui studiu a fost să analizeze rolul prognostic al expresiei imunohistochimice a Ki67 la pacienții cu cancer colorectal din România și să aprecieze utilitatea determinării sale în practica de zi cu zi.

### **5.2. Material și metodă**

Am desfășurat un studiu retrospectiv pe pacienți cu cancer colorectal tratați în Institutul Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj-Napoca, pe o perioadă de 5 ani, între ianuarie 2006 și decembrie 2010. După aplicarea criteriilor de includere și excludere, din numărul total de pacienți cu cancer colorectal tratați în IOCN în această perioadă, 130 de pacienți au fost incluși în acest studiu.

Cazurile cu imunoreactivitate de 1 au fost definite ca având expresie-scăzută, cele cu 2 au fost definite ca având expresie-moderată și cele cu 3 și 4 ca având expresie-crescută.

### **5.3. Rezultate și Concluzii**

În acest studiu, realizat pe 130 de pacienți, imunoexpresia Ki67 nu s-a corelat semnificativ statistic cu ratele de supraviețuire generală și nici cu ceilalți factori de



prognostic din cancerul colorectal. Pentru moment, nu putem dovedi că aprecierea expresiei Ki67 în cancerul colorectal aduce informații prognostice și nu susținem determinarea expresiei Ki67 în practica clinică de rutină. Având în vedere că rezultatele referitoare la rolul prognostic al expresiei imunohistochimice în cancerul colorectal sunt contradictorii, efectuarea unor studii mai ample și pe populații diverse sunt necesare pentru a clarifica acest subiect.

## 6. Concluzii generale

1) Am confirmat și pe lotul nostru de pacienți că factorii de prognostic clasici (stadiul TNM, statusul de performanță, valoarea markerului CEA, invazia limfo-vasculară, invazia perineurală, efracția capsulară) din cancerul colorectal au un rol important în aprecierea prognosticului pacienților cu cancer colorectal.

2) În studiul nostru, atât supraviețuirea generală cât și supraviețuirea fără recidivă nu au fost influențate negativ dacă intervalul de timp pentru debutul radioterapiei postoperatorii în cancerul rectal s-a încadrat în primele 6 sau 12 săptămâni postoperator, subliniind importanța folosirii tuturor resurselor terapeutice disponibile, mai mult decât respectarea cu strictețe a anumitor intervale de timp între secvențele terapeutice.

3) Și pe cazuistica noastră, expresia crescută a Skp2 a determinat scăderea expresiei celulare a p27, Skp2 fiind și singura proteină studiată care a avut o relație direct proporțională cu prezența majorității celorlalți factori de prognostic negativ din cancerul colorectal.

4) În acest studiu, prezența imunoexpresiei Skp2 la cel puțin 25% dintre celulele tumorale a reprezentat un factor de prognostic important în cancerul colorectal, având un impact negativ atât asupra supraviețuirii generale cât și asupra supraviețuirii fără recidivă.

5) Pe lotul nostru de pacienți, nu am identificat o diferență semnificativă statistic între expresia proteinelor reglatoare ale ciclului celular Skp2, Cks1 și p27 și localizarea tumorală, pe colonul drept sau pe colonul stâng.

6) În studiul nostru, expresia markerului de proliferare celulară Ki67 nu s-a corelat semnificativ statistic cu ratele de supraviețuire generală și nici cu ceilalți factori de prognostic din cancerul colorectal.

## 7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea acestei teze constă în abordarea unor subiecte care nu au mai fost analizate pe populația din România, sau nu au mai fost analizate pe o cazuistică asemănătoare. Prin urmare, în studiul 1 am analizat impactului prognostic al întârzierilor în administrarea radioterapiei pacienților cu cancer rectal din România, din cauza deficitului de aparate de radioterapie și de personal medical calificat în acest domeniu. De asemenea, în cadrul studiului 2 din această teză, a fost pentru prima dată

când s-a testat pe pacienți cu cancer colorectal din România, rolul prognostic al reglatorilor ciclului celular Skp2, p27 și Cks1. În studiul 3 am analizat rolul prognostic al determinării expresiei Ki67 în cancerul colorectal.

Numeroase studii internaționale au validat implicarea în oncogeneza cancerului colorectal a proto-oncogenei Skp2, prin scăderea expresiei proteinei supresoare tumorale p27. Această teză este prima lucrare din țara noastră care a demonstrat rolul prognostic al acestor factori moleculari la pacienții cu cancer colorectal din România.

În primul studiu am arătat că, cu toate că în România administrarea radioterapiei uneori cunoaște anumite întârzieri față de recomandările internaționale, supraviețuirea generală a pacienților cu cancer rectal nu este influențată negativ de acest inconvenient. Mai important pentru supraviețuirea generală a acestor pacienți este abordarea multimodală, decât respectarea cu strictețe a anumitor intervale de timp între secvențele terapeutice.

În al doilea studiu, am demonstrat că la pacienții cu cancer colorectal din România, prezența imunoexpresiei Skp2 la cel puțin 25% dintre celulele tumorale a reprezentat un factor de prognostic negativ atât în ceea ce privește OS cât și a RFS. De asemenea, același prag al imunoexpresiei a fost identificat și în ceea ce privește imunoexpresia Cks1. Referitor la expresia imunohistochimică a proteinei p27, pragul pentru semnificație prognostică s-a situat între valorile de 25-50%.

Cu toate că multe studii au demonstrat existența unor diferențe moleculare și genetice între tumorile localizate pe colonul drept și cele localizate la nivelul colonului stâng, în această lucrare nu am identificat o diferență semnificativă statistic între expresia proteinelor reglatoare ale ciclului celular Skp2, Cks1 și p27 și localizarea tumorală, pe colonul drept sau pe colonul stâng, fiind prima lucrare la nivel mondial care testează această asocieră.

Aprecierea rolului prognostic al expresiei markerului de proliferare celulară Ki67 la pacienții cu cancer colorectal din România, nu s-a mai analizat atât de amplu precum în studiul 3 din această lucrare. Din datele obținute, putem afirma că pentru moment, în ceea ce privește cancerul colorectal, determinarea expresiei Ki67 nu oferă nici o informație prognostică.

Dintre factorii moleculari studiați, cel mai important rol prognostic l-a avut expresia Skp2, fiind proteina studiată care s-a corelat semnificativ statistic, într-o manieră direct proporțională și cu prezența majorității celorlați factori de prognostic negativ din cancerul colorectal.

Utilitatea rezultatelor studiului 2 în practica clinică reiese din identificarea unui factor de prognostic care poate fi apreciat prin imunohistochimie, cu un real impact asupra supraviețuirii pacienților cu cancer colorectal.

---

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

# Prognostic factors and treatment response in colorectal cancer

---

Ph.D. student **Ovidiu Vasile Bochiş**

---

Ph.D. coordinator Prof.dr. **Alexandru Irimie**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Epidemiology and prognostic factors in colorectal cancer</b>	17
1.1. Colorectal Cancer Epidemiology	17
1.2. The Importance of Prognostic Factors in Colorectal Cancer	18
<b>2. Cell cycle regulation - an enzymatic cascade governed by the proteasome ubiquitin system</b>	21
2.1. Functioning of the proteasome ubiquitin system	23
2.2. Importance in cancerogenesis of ubiquitin-ligases E3	24
2.2.1. Ubiquitin ligase Skp1-Cullin1-F-box	25
2.2.1.1. Skp2	26
2.2.1.2. FBW7	27
2.2.1.3. $\beta$ -TrCP	27
2.2.2. APC/C ubiquitin ligase	27
2.3. The role of 26S proteasome in facilitating carcinogenesis	29
<b>3. The role of the SCF<sup>Skp2/Cks1</sup>-p27 pathway in colorectal cancer</b>	31
3.1. The importance of nuclear loss of P27 to promote cancerogenesis	31
3.2. The oncogenetic role of Skp2 protein	33
3.3. The role of Cks1 protein in the Skp2-p27 interaction	34
3.4. Regulatory mechanisms of Skp2 expression identified in colorectal cancer	35
3.4.1. Involvement of APC / C ubiquitin-ligase in the control of Skp2 expression in colorectal	36
3.4.2. The PI3K / Akt pathway induces Skp2 overexpression in colorectal cancer	37
3.4.3. PTEN indirectly inhibits Skp2 expression in colorectal cancer	38
3.4.4. RECK inhibits Skp2 expression in colorectal cancer	39
3.5. Skp2 overexpression could be a therapeutic target in patients with colorectal cancer	39
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Working hypothesis/objectives</b>	43
<b>2. General Methodology</b>	47

<b>3. Study 1- The importance of prognostic factors and of a multidisciplinary approach in rectal cancer</b>	49
3.1. Introduction	49
3.2. Working hypothesis	50
3.3. Material and method	51
3.4. Results	53
3.5. Discussions	66
3.6. Conclusions	70
<b>4. Study 2 - The Prognostic Importance of Skop2 Oncoprotein and of the p27 tumor suppressor protein in colorectal cancer</b>	71
4.1. Introduction	71
4.2. Working hypothesis	73
4.3. Material and method	74
4.4. Results	78
4.5. Discussions	91
4.6. Conclusions	96
<b>5. Study 3 – The Prognostic Importance of Immunohistochemical Expression of the Ki67 Cell Proliferation Marker in Colorectal Cancer</b>	99
5.1. Introduction	99
5.2. Working hypothesis	100
5.3. Material and method	100
5.4. Results	102
5.5. Discussions	107
5.6. Conclusions	108
<b>6. General Conclusions</b>	109
<b>7. Originality and Innovative Contributions of the Thesis</b>	111
<b>REFERENCES</b>	113

**Key words:** colorectal cancer, prognostic factors, multimodal therapeutic approach, cell cycle regulation, Skp2, p27, Ki67

# INTRODUCTION

Colorectal cancer is one of the most common cancers worldwide, being the third most common in men and the second in women. In Romania, it is the second in both incidence and mortality among men, after the bronchopulmonary cancer, and the third, after breast cancer and cervical cancer among women.

The Oncological Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuța" Cluj-Napoca is a reference center for the treatment of colorectal cancer. During 2005-2010, the number of new cases treated at the institute has steadily increased, at the end of this period, accounting for over 500 new cases per year.

The data reported by SRROM at the October 2015 SRROM Congress in Sibiu demonstrated that there is a deficiency in Romania in terms of the existence of qualified staff, radiotherapeutic specialists, technicians and physicians, as well as the number of the radiotherapy devices. These deficits, therefore, lead to delays in the administration of radiotherapy and the occurrence of deviations from the sequencing of the treatments. In the first study of this thesis, I wanted to find out if these inconveniences also affect the survival of patients with rectal cancer.

The therapeutic approach to colorectal cancer is directly dependent on patient prognosis. So far, several clinical, histopathological, molecular and genetic prognostic factors have been described.

Despite all the improvements in therapeutic management, through the emergence of targeted molecular therapies and immunotherapy, the prognosis of metastatic patients is still reserved. Therefore, in recent years, many translational research has attempted to identify new molecular and genetic factors involved in the oncogenesis of colorectal cancer. These studies have led to the identification of the p27 protein, a negative regulator of the cyclinE / Cdk2 and cyclinA / Cdk2 complexes, which promotes the entry of cells into the S phase of the cell cycle, as involved in tumor suppression, promoting cell differentiation, apoptosis and inhibition of cell growth. The most important post-transcriptional regulator of p27 tumor suppressor protein is the ubiquitin-ligase SCFSkp2 complex. In tumor cells of colorectal carcinoma, overexpression of the Skp2 F-box protein is frequently encountered, which induces ubiquitinating and excessive degradation of the p27 protein, promoting tumor growth. Skp2 behaves as a proto-oncoprotein. For efficient binding between Skp2 and p27 protein, a ligand, the Cks1 protein, is needed. In the second study of this thesis I analyzed the role of the immunohistochemical expression of Skp2, p27 and cofactor Cks1 in assessing the prognosis of 130 patients with colorectal cancer in Romania.

Although in breast cancer, neuroendocrine tumors and gliomas the prognostic role of Ki67 cell proliferation marker immunoassay has been proven, in colorectal cancer studies have shown contradictory results. Therefore, in the third study of this thesis we analyzed the prognostic role of Ki67 expression in patients with colorectal cancer.

# PERSONAL CONTRIBUTION

## 1. Working hypothesis / objectives

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers worldwide, being the third most common in men and the second in women. Globally, colorectal cancer mortality has declined in recent years, as a result of both the therapeutic advances and the implementation of screening programs, which have led to an increase in the number of cases diagnosed at an early stage, often curable.

According to international guidelines (NCCN and ESMO), the therapeutic approach of colorectal cancers is directly influenced by patient prognosis. It is very important to know as many prognostic factors, both positive and negative, in order to place patients in risk groups and provide them with the best available therapeutic options. The findings in recent years that have led to the identification of molecular factors involved in CRC cancerogenesis and the development of targeted molecular therapies have succeeded in making improvements in the survival of patients in the metastatic stage. The discovery of molecular mechanisms of cell cycle control, oncogen activation and inactivation of tumor suppressor genes may create the premise for the development of new targeted therapeutic approaches that may be more effective and less toxic than currently available anti-tumor molecules.

In the three studies underlying this thesis I investigated the implication of classical prognostic factors in both general survival and non-relapse survival as well as the prognostic importance of cell cycle regulators, p27 protein and Skop2 proto-oncogene in colorectal cancer. Also, an important point of research in this PhD thesis was to identify the impact on the overall survival of the post-operative radiotherapy overnight on rectal cancer as well as to identify the prognostic role of immunohistochemical expression of the Ki67 cell proliferation marker in colorectal cancer, taking into account contradictory information in this area.

In addition, following my results, I wanted to implement the daily practice of determining p27 and Skp2 as prognostic markers for colorectal cancer patients.

## 2. General Methodology

The three studies were carried out only after receiving approval from the Ethics Committee of the Oncological Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuța" Cluj-Napoca, and the Ethics Commission of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca. All activity in these studies was conducted in accordance with medical ethics and deontology, and scientific research.

For statistical analysis, statistical program R, version 3.2.1, was used. The Kaplan-Meier curves were used to estimate overall survival and survival rates without recurrence. The class variables were analyzed using the Hi square test and the Fisher exact test. For continuous data, the t test and the Mann-Whitney U test were used. The log-rank test was used to perform univariate analysis. For multivariate analysis the

Cox regression was used. For all analyzes, hazard ratios and confidence interval were obtained at 95% significance and a  $p < 0.05$  value was considered statistically significant.

### **3. Study 1. The importance of prognostic factors and the multidisciplinary approach in rectal cancer**

#### **3.1. Introduction**

Every year, nearly a third of colorectal cancer diagnosed globally is rectal cancer. The prognosis and quality of patients' lives with rectal cancer have improved over the past decades due to the implementation of national screening programs and by improving surgical techniques of anastomosis and neoadjuvant and adjuvant treatments. The multidisciplinary approach to rectal cancer has yielded remarkable results in the prognosis of these cases.

The purpose of this study is to analyze the relationship between certain prognostic factors and overall survival and to analyze the impact of the time interval between surgery and the onset of adjuvant treatments on the survival of rectal cancer patients treated by surgical resection followed by concomitant radiochemotherapy.

#### **3.2. Material and method**

I conducted a retrospective study on rectal cancer patients treated at the Oncology Institute. "Prof Dr. Ion Chiricuță" Cluj-Napoca, for a period of 5 years, between January 2006 and December 2010. Of the total number of patients with rectal cancer, 161 patients were first treated by surgery, followed by postoperative radiochemotherapy and with or without chemotherapy for a total of 6 months.

#### **3.3. Results and Conclusions**

The stage of TNM remains one of the most important prognostic factors for assessing the overall survival of patients with rectal cancer.

The multimodal approach offers the opportunity to administer all the therapeutic resources available on a case-by-case basis and is assured by the collaboration in the therapeutic management of a multidisciplinary team specializing in rectal cancer.

Administration of concomitant radiochemotherapy in the adjuvant sequence in locally advanced rectal cancers does not adversely affect overall survival data, but increases the frequency of local recurrences.

For patients included in this study, observing certain time intervals between the rectal cancer therapies was not as important for overall survival as the ultimate use of all therapeutic resources: surgical resection, radiotherapy and chemotherapy. For adjuvant treatment, it is recommended to be started as soon as possible considering the condition of the patient and the local infrastructure.



## **4. Study 2. Prognostic importance of Skp2 oncoprotein and the p27 tumor suppressor protein in colorectal cancer**

### **4.1. Introduction**

In recent years, with the development of molecular and genetic biology techniques, we have been able to characterize more and more control and cellular signaling pathways and thus have provided the scientific framework for the discovery of many molecular and genetic prognostic factors involved in CRC oncogenesis.

The purpose of this study was to analyze the prognostic role of the immunohistochemical expression of Skp2, p27 and Cks1 in patients with colorectal cancer in Romania and to appreciate the usefulness of the implementation of these immunohistochemical determinations in daily practice.

### **4.2. Material and method**

I performed a retrospective study in patients with colorectal cancer treated by surgical resection followed by adjuvant chemotherapy or radiochemotherapy for rectal cancer, or palliative chemotherapy alone for metastatic cases. For this study, we analyzed the patients on whom oncological treatment was initiated at the Oncology Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuța" Cluj-Napoca during a period of 5 years, between January 2006 and December 2010.

From the point of view of the immunohistochemic tests, four variable expression groups, from 1 to 4, were defined according to the percentage of nuclear reactive tumor cells, namely 0-24%, 25-49%, 50-74% and 75-100%.

### **4.3. Results and Conclusions**

Classic prognostic factors of colorectal cancer, as well as decreased performance status, advanced TNM stage, increased pre-therapeutic value of the tumor marker CEA, lymphatic vascular and perineural invasion, and capsular intrusion, all provide major prognostic information in terms of survival of patients with colorectal cancer. Skp2 overexpression is also an important prognostic factor in colorectal cancer, affecting both OS and RFS. Moreover, the presence of moderate or increased expression of Skp2 had a relationship directly proportional to the presence of other well-known prognostic factors in colorectal cancer. Therefore, its routine testing in clinical practice would provide important prognostic information for patients with colorectal cancer and could be used as an immunohistochemical prognostic marker. Furthermore, continuing studies in this area and identifying targeted anti-Skp2 molecular therapies could provide promising results in anti-tumor therapy.

# **5. Study 3. Prognostic importance of immunohistochemical expression of the Ki67 cell proliferation marker in colorectal cancer**

## **5.1. Introduction**

The assessment of the degree of cell proliferation, a prognostic factor described in many human malignancies, can be achieved by determining the immunohistochemical expression of the Ki67 cell proliferation marker. Many studies have demonstrated the prominent importance of Ki67 expression in several human cancers, including breast cancer, stromal gastrointestinal tumors, neuroendocrine gastrointestinal tumors, gliomas. However, with regard to colorectal cancer, there are few studies that analyze the prognostic significance of Ki67 expression, and their results are contradictory.

The purpose of this study is to analyze the prognostic role of Ki67 immunohistochemical expression in patients with colorectal cancer in Romania and to appreciate the usefulness of its determination in daily practice.

## **5.2. Material and method**

I conducted a retrospective study on patients with colorectal cancer treated in the Oncologic Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj-Napoca, for a period of 5 years between January 2006 and December 2010. Following the inclusion and exclusion criteria, of the total number of patients with colorectal cancer treated in the IOCN during this period, 130 patients were included in this study.

Cases of immunoreactivity of 1 were defined as having low expression, those with 2 being defined as having moderate expression and those with 3 and 4 as having increased expression.

## **5.3. Results and Conclusions**

In this study, performed on 130 patients, Ki67 immunoexpression did not statistically correlate with overall survival rates or with other prognostic factors in colorectal cancer. For the time being, we cannot prove that the appreciation of Ki67 expression in colorectal cancer provides prognostic information and we do not support the determination of Ki67 expression in routine clinical practice. Since the results on the prognostic role of immunohistochemical expression in colorectal cancer are contradictory, more extensive studies on different populations are needed to clarify this topic.

## 6. General conclusions

1) We also confirmed in our group of patients that the classic prognostic factors (TNM stage, performance status, CEA marker value, lymph-vascular invasion, perineural invasion, capsular invasion) from colorectal cancer play an important role in assessing the prognosis of patients with colorectal cancer.

2) In this thesis, neither overall survival nor non-relapse survival were negatively influenced if the time interval for the onset of postoperative radiotherapy in rectal cancer was within the first 6 or 12 postoperative weeks, thus underlining the importance of using all the available therapeutic resources, more than the strict observance of certain time intervals between the therapeutic sequences.

3) And on our case basis, the increased expression of Skp2 determined the decrease in cellular expression of p27, Skp2 being also the only studied protein that had a relationship directly proportional to the presence of most other negative prognostic factors in colorectal cancer.

4) In this study, the presence of Skp2 immunoexpression in at least 25% of the tumor cells was an important prognostic factor in colorectal cancer, having a negative impact on both general survival and non-relapse survival.

5) In our group of patients, we did not detect a statistically significant difference between the expression of the regulatory proteins of the Skp2, Cks1 and p27 cell cycle, and tumor localization, on the right colon or on the left colon.

6) In our study, the expression of the Ki67 cell proliferation marker did not statistically correlate with general survival rates nor with other prognostic factors in colorectal cancer.

## 7. Originality and innovative contributions of the thesis

The originality of this thesis consists in addressing subjects that have not been analyzed on the Romanian population, or have not been analyzed on a similar case basis. Therefore, in study 1 I analyzed the prognostic impact of delays in the administration of radiotherapy to patients with rectal cancer in Romania due to the lack of radiotherapy devices and qualified medical personnel in this field. Further, in study 2 of this thesis, it was the first time that the prognostic role of the cell cycle regulators Skp2, p27 and Cks1 in colorectal cancer patients in Romania was tested. In study 3 we analyzed the prognostic role of Ki67 expression in colorectal cancer.

Numerous international studies have validated involvement in the oncogenesis of colorectal cancer of the proto-oncogene Skp2 by decreasing expression of the p27 tumor suppressor protein. This thesis is the first paper in our country that demonstrated the prognostic role of these molecular factors in patients with colorectal cancer in Romania.

In the first study I have shown that, although the administration of radiotherapy in Romania sometimes has certain delays to international recommendations, the general survival of patients with rectal cancer is not negatively influenced by this inconvenience. More important for the general survival of these patients is the multimodal approach, rather than strict adherence to certain time intervals between the therapeutic sequences. In the second study, we demonstrated that in patients with colorectal cancer in Romania the presence of Skp2 immunoexpression in at least 25% of the tumor cells was a negative prognostic factor for both OS and RFS. Also, the same threshold of immunoexpression has been identified with respect to Cks1 immunoexpression. Regarding the immunohistochemical expression of p27 protein, the threshold for prognostic significance was between 25-50%.

Although many studies have demonstrated the existence of molecular and genetic differences between tumors located on the right colon and those located on the left colon, in this paper I have not identified a statistically significant difference between the expression of the regulatory proteins of the cell cycle Skp2, Cks1 and p27 and tumor localization on the right colon or left colon, being the first worldwide paper to test this association.

The assessment of the prognostic role of the expression of the Ki67 cell proliferation marker in patients with colorectal cancer in Romania has never before been analyzed as extensively as in study 3 of this paper. From the data obtained, we can say that for the time being, in terms of colorectal cancer, the determination of the Ki67 expression does not provide any prognostic information.

Of the studied molecular factors, the most important prognostic role was expressed by Skp2, the studied protein that correlated statistically significantly in a directly proportionate manner and in the presence of most other negative prognostic factors in colorectal cancer.

The utility of study results 2 in clinical practice results from the identification of a prognostic factor that can be assessed through immunohistochemistry, with a real impact on the survival of patients with colorectal cancer.