



Αθήνα, 12 Απριλίου 2019

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΘΕΜΑ: Διερεύνηση της συνέκφρασης των πρωτεϊνών p53 και MDM2 στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου με ψηφιακή ανάλυση εικόνας.

ΥΠΟΨΗΦΙΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑΣ:

Νιώτης Αθανάσιος, Γενικός Χειρουργός

Τριμελής Επιστημονική Επιτροπή

1. Καθηγητής Κωνσταντινίδης Κωνσταντίνος
2. Καθηγητής Καβαντζάς Νικόλαος
3. Αν Καθηγητής Δημητρούλης Δημήτριος (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Σκοπός μελέτης

Το προς κρίση ερευνητικό πρωτόκολλο σχεδιάστηκε με γνώμονα τη διερεύνηση της συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών p53 και mdm2 στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου.

Υπάρχουσα γνώση-Περιγραφή σημασίας και αναμενόμενη συμβολή της ερευνητικής πρότασης

Η απορρύθμιση γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτείνες κομβικές στη διαδικασία καρκινογένεσης απαντάται σε επιθήλια ενός ευρέως φάσματος οργάνων. Η νεοπλασματική εκτροπή και η καρκινική μεταμόρφωση επιθηλιακών κυττάρων αποτελεί μια προοδευτική διαδικασία στην οποία ενσωματώνονται χρωμοσωμιακές και ειδικές γονιδιακές δομικού και αριθμητικού τύπου αστάθειες. Ιδιαίτερα στη σύγχρονη μοριακή ιατρική, η ανίχνευση συγκεκριμένων τύπων γενετικών συμβάντων (σημειακές μεταλλάξεις, ενισχύσεις ή διαγραφές γονιδίων, πολυσωμία ή ανευπλοειδία χρωμοσωμάτων) οδηγεί σε στοχευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη p53 (TP53) εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 (gene locus: 17p13.1). Λόγω της πολυδιάστατης ρυθμιστικής και επιτελικής δράσης που ασκεί στον πυρήνα κυρίως έχει χαρακτηριστεί ως επόπτης του γονιδιώματος και του κυτταρικού κύκλου (cell cycle-genome gatekeeper). Η πρωτεΐνη δρα ογκοκατασταλτικά αποσβένοντας τη διαδικασία ενός παθολογικού κυττάρου να προχωρήσει στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου και ειδικά στη φάση διαίρεσης και συγκρατώντας το ακόμη και στη φάση G0 (growth arrest) ή ευοδώνοντας τον αποπτωτικό του θάνατο. Δρα ακόμη ως μεταγραφικός παράγοντας στη διαδικασία

παραγωγής και συντήρησης ενδογονιδιακών μη κωδικοποιούμενων περιοχών (intergenic non-coding RNA p21 (lincRNA-p21) και lincRNA-Mkl1. Επιπρόσθετα εμπλέκεται σε σηματοδοτικά μοριακά μονοπάτια μεταγωγής σήματος προς τον πυρήνα όπως τα PI3K-Akt signaling pathway, MAPK signaling pathway Notch signaling pathway. Παράλληλα, μαζί με άλλες πρωτείνες ρυθμίζει αρνητικά μηχανισμούς παραγωγής ενδοκυττάριου οξειδωτικού στρες που περιλαμβάνουν υποξικές καταστάσεις και δομικές αστάθειες της έλικας του μορίου του DNA και της χρωμοσωματικής ατράκτου.

Ο μεταβολισμός της p53 ελέγχεται μερικώς από την πρωτεΐνη MDM2 (MDM2, πρωτο-ογκογονίδιο (12q14.3) με την οποία οργανώνει λειτουργικά σύμπλοκο. Στο αδενοκαρκίνωμα μαστού η p53 πρωτεΐνη εμφανίζει υπερέκφραση ως μεταλλαγμένη μέσω σημειακών μεταλλάξεων του γονιδίου της σε διαφορετικά ποσοστά ανα μελέτη.

Δεδομένα για τη συνδυασμένη απορρύθμιση της έκφρασης των εν λόγω μορίων είναι εξαιρετικά περιορισμένα στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου.

-Εργαστηριακή Ανάλυση

Η έρευνα διεξάγεται στην **Β' Χειρουργική Κλινική** της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στο οποίο πραγματοποιείται διάγνωση, ταξινόμηση, ανάλυση των εξεταζόμενων περιστατικών

-Μεθοδολογία

Η μελέτη θα περιλαμβάνει τριάντα (**n=30**) ιστικά παρασκευάσματα εγκλεισμένα σε κύβους παραφίνης αδενοκαρκινωμάτων παχέος εντέρου. Σε αυτά θα επακολουθεί σε αντίστοιχα 2 πλακίδια ανά περιστατικό ανοσοιστοχημική ανάλυση των μορίων **p53** και **mdm2**.

Όλα τα περιστατικά θα τεθούν υπό διαχείριση με βάση τους κανόνες της βιοηθικής δεοντολογίας

Συνοπτικά ο Εργαστηριακός Αλγόριθμος σχηματίζεται ως εξής:



Ποικνομετρική Ανάλυση ψηφιακής εικόνας



Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων

Έχει διερευνηθεί η διεθνής αρθρογραφία όπως ενδεικτικά παρατίθεται

References

1. Kondo I, Iida S, Takagi Y, Sugihara K. MDM2 mRNA expression in the p53 pathway may predict the potential of invasion and liver metastasis in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2008 Sep;51(9):1395-402
2. Das P, Jain D, Vaiphei K, Wig JD. Abberant crypt foci -- importance in colorectal carcinogenesis and expression of p53 and mdm2: a changing concept. *Dig Dis Sci*. 2008 Aug;53(8):2183-8
3. Halaschek-Wiener J, Wacheck V, Kloog Y, Jansen B. Ras inhibition leads to transcriptional activation of p53 and down-regulation of Mdm2: two mechanisms that cooperatively increase p53 function in colon cancer cells. *Cell Signal*. 2004 Nov;16(11):1319-27
4. Schumacher U, Adam E, Feldhaus S, Katoh M, Lane DP. Cell differentiation and chemotherapy influence p53 and Mdm2 immunoreactivity in human HT29 colon cancer cells grown in scid mice. *Cancer Lett*. 2001 May 26;166(2):215-21
5. Broude EV, Demidenko ZN, Vivo C, Swift ME, Davis BM, Blagosklonny MV, Roninson IB. p21 (CDKN1A) is a negative regulator of p53 stability. *Cell Cycle*. 2007 Jun 15;6(12):1468-71

Experimental Study Summary

Impact of p53-MDM2 auto-regulatory pathway co-expression in colon adenocarcinoma based on digital image analysis

Provided by Athanasios Niotis, General Surgeon, MSc

Among genes that critically modify pathological and molecular characteristics in patients with breast adenocarcinoma, p53 and MDM2 are of high significance. p53 is a key regulator of the genome stability and function. The gene is located on the short (p) arm of chromosome 17 at position 13.1 (17p13.1) encoding a nuclear phosphoprotein with a molecular mass of 53 kDa acting as a transcription factor that negatively regulates cell proliferation. It is also involved in a significant number of cell-signaling pathways; including cell cycle, programmed cell death, and DNA repair. The protein is expressed at a low level in and malignant epithelia. p53 over expression due to point mutations is frequently detected by immuno-histo-cytochemistry assays in about 60% of malignancies of different histogenetic origin, including also breast and colon adenocarcinoma.

Additionally, MDM2, a proto-oncogene (12q14.3) encoding a nuclear-localized E3 ubiquitin ligase, acts as a major negative regulator in p53-MDM2 auto-regulatory pathway. MDM2 directly binds to p53 and represses its transcriptional activity and promotes p53 proteasomal degradation. Gene amplification is the major mechanism of MDM2 deregulation and over expression in breast carcinoma correlated with aggressive phenotype.

In the current study we will co-analyze p53/MDM2 at the protein level in colon adenocarcinoma cases for determining their expression significance in the corresponding lesions. There are very limited data regarding their co-expression in colon adenocarcinoma.

Materials and Methods

Study group

For the purposes of our study, thirty (n=30) archival, formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens of histologically confirmed primary CAs will be used derived from the Department of Pathology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece for research purposes, according to World Medical Association Declaration of Helsinki guidelines. The tissue samples are fixed in 10% neutral-buffered formalin. Hematoxylin and eosin (H&E)-stained slides of the corresponding samples were reviewed for confirmation of

histopathological diagnoses. All lesions were classified according to the histological typing criteria of World Health Organization (WHO).

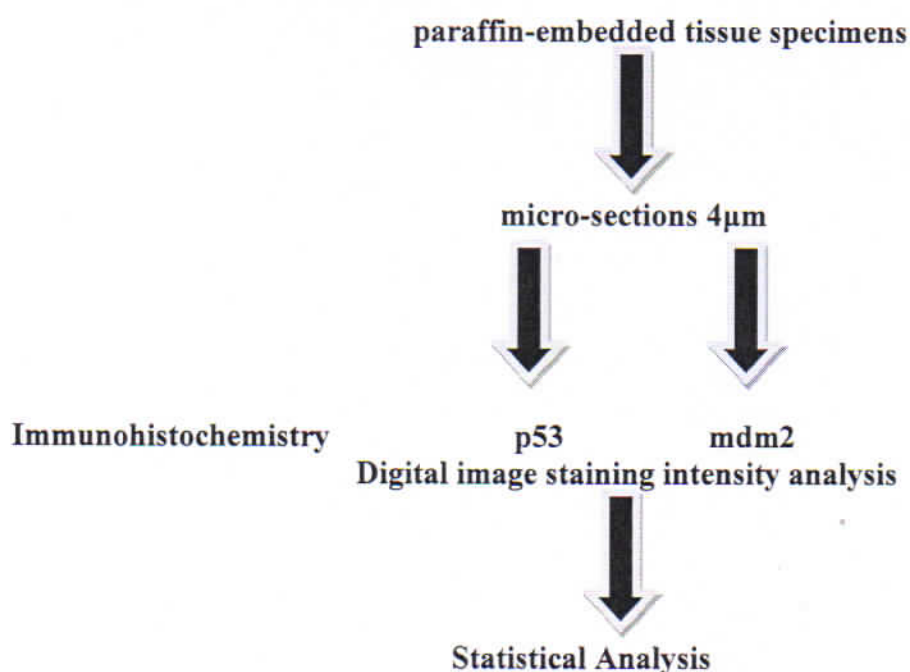
Antibodies and immunohistochemistry assay (IHC)

Ready-to-use anti-p53 (clone DO7-DAKO, UK dilution at 1:40) and also anti- MDM2 (clone IF2, Novocastra, UK dilution at 1:40) mouse monoclonal antibodies will be applied in the corresponding cases. IHC for those antigens will be carried out on 5µm serial tissue sections. The slides will be de-paraffinized and rehydrated. IHC protocol will be performed by the use of an automated staining system. Nuclear predominantly and cytoplasmic staining are considered acceptable for the markers, according to manufacturers' data sheets. Pre-analyzed cancer tissue sections expressing the proteins and normal appearing breast epithelia will be used as control groups, respectively.

Digital image analysis (DIA)

P53 and MDM2 protein expression levels will be evaluated by measuring the corresponding staining intensity levels provided by digital image analysis. We will perform DIA based on a semi-automated system (Windows XP/NIS-Elements Software AR v3.0, Nikon Corp, Tokyo, Japan). Measurements will be performed in 5 optical fields per case and at a magnification of ×40. Using normal epithelia as control group, we will characterize and group the corresponding expression as Low, Moderate and High.

Algorithm of the experimental study



References

1. Silwal-Pandit L, Vollan HK, Chin SF et al. TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. *Clin Cancer Res.* 2014; 20(13):3569-80
2. Purvis J.E., et al. p53 dynamics control cell fate. *Science* 2012; 336(6087): 1440–4
3. Dumay A, Feugeas JP, Wittmer E, Lehmann-Che J, Bertheau P, Espie M et al. Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. *Int J Cancer* 2013; 132: 1227–1231
4. Wade M, Li YC, Wahl GM. MDM2 MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 83–96
5. Santarius T, Shipley J, Brewer D, Stratton MR, Cooper CS. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10: 59-64
6. Kondo I, Iida S, Takagi Y, Sugihara K. MDM2 mRNA expression in the p53 pathway may predict the potential of invasion and liver metastasis in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2008 Sep;51(9):1395-402
7. Das P, Jain D, Vaiphei K, Wig JD. Abberant crypt foci -- importance in colorectal carcinogenesis and expression of p53 and mdm2: a changing concept. *Dig Dis Sci.* 2008 Aug;53(8):2183-8
8. Halaschek-Wiener J, Wacheck V, Kloog Y, Jansen B. Ras inhibition leads to transcriptional activation of p53 and down-regulation of Mdm2: two mechanisms that cooperatively increase p53 function in colon cancer cells. *Cell Signal.* 2004 Nov;16(11):1319-27
9. Schumacher U, Adam E, Feldhaus S, Katoh M, Lane DP. Cell differentiation and chemotherapy influence p53 and Mdm2 immunoreactivity in human HT29 colon cancer cells grown in scid mice. *Cancer Lett.* 2001 May 26;166(2):215-21
10. Broude EV, Demidenko ZN, Vivo C, Swift ME, Davis BM, Blagosklonny MV, Roninson IB. p21 (CDKN1A) is a negative regulator of p53 stability. *Cell Cycle.* 2007 Jun 15;6(12):1468-71