

A vastagbélrák progressziójának vizsgálata kísérletes állatmodell segítségével

Doktori értekezés

Dr. Bánky Balázs

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola
Onkológia Program



Témavezető: Dr. Rásó Erzsébet, laboratóriumvezető, Ph.D

Hivatalos bírálók: Prof. Dr. Méhes Gábor, egyetemi tanár, Ph.D
Dr. Lászik András, egyetemi adjunctus, Ph.D

Szigorlati bizottság elnöke:
Prof. Dr. Lakatos Péter, egyetemi tanár, DSc

Szigorlati bizottság tagjai:
Prof. Dr. Szentirmay Zoltán, egyetemi tanár, DSc
Dr. Patócs Attila, laboratóriumvezető, Ph.D

Budapest
2013

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	7
1. Bevezetés	10
1.1. A vastagbélrák genetikai háttere	10
1.2. Az alternatív splicing jelensége	16
1.2.1. Alternatív splicing és a colorectalis carcinoma	18
1.3. A CD44 gén és protein	18
1.3.1 A CD44 alternatív splice variánsainak szerepe a daganatok progressziójában	18
1.3.2. Eredeti ismeretek a CD44-ről - hematológiai vonatkozások	21
1.3.3. A CD44 normál szöveti előfordulása	22
1.3.4. A CD44 daganatokban	22
1.3.5. A CD44 különféle variánsainak ismert funkciói	24
1.3.6. CD44 és a Wnt-szignálút	29
1.3.7 CD44 – őssejt elmélet – colorectalis carcinoma őssejt, metasztatikus őssejt	31
1.3.8. A CD44 feltételezett szerepe a metasztatikus folyamatban	32
1.4. A Wilms tumor 1 (WT1) gén	34
1.4.1. A WT1 szerkezete	34
1.4.2. A WT1 funkciója	35
1.4.2.1. A WT1, mint transzkripciófaktor	35
1.4.2.2. A WT1, mint tumorszupresszor gén	36
1.4.2.3 A WT1, mint onkogén	36

1.4.3. A WT1 szolid daganatokban	38
1.5. A KRAS gén és protein	39
1.5.1. A KRAS, mint onkogén	40
1.5.2. A KRAS mutáció jelentősége a vastagbélrák terápiájában	41
1.6. Keringő tumorsejtek jelentősége a vastagbélrák áttétképzésében	43
2. Célkitűzések	46
3. Módszerek	47
3.1. Állatkísérleti modellrendszer	47
3.1.1. Graft-rendszerek	47
3.1.2. Implantálandó egysejt-szuszpenzió preparálása	47
3.1.3. Állatok műtéti kezelése	47
3.1.4. Modellrendszerek	48
3.1.4.1. Májmetasztázis modellek	48
3.1.4.2. A „host” szerepének vizsgálata az áttétképzésben – felnőtt/újszülött modell	50
3.1.4.3. Keringő tumorsejtek vizsgálata (CTC)	51
3.2. Sejttenyésztés	52
3.2.1. Sejtvonalak és tenyésztési körülmények	52
3.2.2. Tenyészetek indítása <i>in vivo</i> modellből	53
3.2.3. Tenyésztés különböző mátrixokon	55
3.2.4. Tenyésztett humán colorectalis sejtek terápiás érzékenységének vizsgálata	55
3.3. MTT-proliferációs teszt	56

3.4. Génexpressziós vizsgálatok	57
3.4.1. RNS-izolálás és RT-PCR	57
3.4.2. Kvalitatív PCR	58
3.4.2.1. A CD44 ujjlenyomat PCR alapú detektálása	58
3.4.2.2. WT1 alternatív splicing mintázat azonosítása – nested PCR	58
3.4.3. CD44 variábilis exon specifikus primerekkel végzett qPCR	59
3.4.4. KRAS mutációs státus detektálás – RFMD	60
3.4.5. Szekvenálás	61
3.4.5.1. Direkt szekvenálás	61
3.4.5.2. Újgenerációs szekvenálás	61
3.5. Statisztikai kiértékelés	63
4. Eredmények	64
4.1. Az állatkísérletek áttétképzési mutatói	64
4.2. Kísérletes colorectalis carcinoma primer és áttéti tumora kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata MTT teszt segítségével	65
4.3. A CD44 expresszió vizsgálata colorectalis carcinoma vonalakon és tumormintákon	74
4.3.1. A CD44 alternatív splicing mintázat humán CRC vonalakon	75
4.3.2. A CD44 ASM „megfejtése”, az expresszálandó CD44 izoformák azonosítása	75
4.3.3. A CD44 ASM colorectalis carcinoma specificitása	77
4.3.4. A CD44 ujjlenyomat jellemzése a tumorprogresszió során	78

4.3.5. A CD44 v3 és v6 exonjainak expressziója – szemikvantitatív expressziós vizsgálatok	79
4.3.5.1. Izograft rendszer: májmetasztázis modellek	79
4.3.5.2. Humán CRC vonalak v3 és v6 expressziós aktivitása (<i>in vitro</i>)	81
4.3.5.3. Humán CRC májmetasztázis modell xenograft rendszerben	81
4.3.5.4. A CD44 v3 és v6 expressziós aktivitás vizsgálata permisszív és nem-permisszív hostban fejlődő CRC mintákon heterotop implantációs rendszeren	84
4.3.5.5. Szolid tumorok intratumorális heterogenitásának vizsgálata a CD44 v3 és v6 expresszió vonatkozásában	86
4.3.5.6. A CD44 v3 és v6 expressziós szintek vizsgálata humán CRC vonalak különféle ECM proteineken történő proliferációja során	88
4.4. MTT teszt különféle extracelluláris mátrix protein alapon tenyésztő colorectalis carcinoma vonalakon	90
4.5. A WT1 génexpresszió kvalitatív jellemzése a humán CRC progressziója során	91
4.6. KRAS mutációs státus vizsgálata a C26–Balb/C metasztatikus izograft rendszereken	94
4.6.1. A KRAS státus szinkron vizsgálata primer colon tumoron, keringő tumorsejten (CTC) és áttétekben	94
4.6.2. A lép-máj modellrendszer (máj kolonizációs rendszer) értékelése a máj szekunder tumorai KRAS mutációs státusának függvényében	96
5. Megbeszélés	97
5.1. Az állatkísérleti rendszer értékelése	97
5.2. A CD44 génexpresszió jellemzése a colorectalis carcinoma progressziója folyamatában	100

5.3. Az expresszáldó CD44 variáns izoformák listája	102
5.4. Colorectalis carcinoma specifikus CD44 alternatív splice mintázat (ASM)	103
5.5. A CD44 v3 és v6 tartalmú variánsainak expressziós intenzitásbeli változása a tumorprogresszió folyamán	104
5.6. A primer tumor mikrokörnyezetének hatása	107
5.7. A keringő tumorsejtek vizsgálata: modellrendszer és kemorezisztencia vizsgálat	110
5.8. A WT1 gén alternatív splicing vizsgálata a colorectalis carcinoma áttétképzése során	112
5.9. KRAS mutáció vizsgálata az áttétképzés különböző fázisaiban	113
6. Következtetések	116
7. Összefoglalás / Summary	119
8. Irodalomjegyzék	121
9. Saját publikációk jegyzéke	144
9.1. A dolgozattal szorosan összefüggő cikkek	144
9.2. A dolgozattal szorosan összefüggésbe nem hozható cikkek	144
10. Köszönetnyilvánítás	145

Rövidítések jegyzéke

APC – adenomatous polyposis coli (gén)

ASA – acetyl-szalicilsav

ASM – alternatív splice mintázat

bp - bázispár

CD44s – standard CD44

CD44v – variáns CD44

CIMP – CpG island methylator phenotype (CpG sziget metilátor fenotípus)

CIN – kromoszomális instabilitás

CML – chronic myeloid leukaemia (krónikus mieloid leukaemia)

CRC – colorectal cancer (colorectalis carcinoma)

CT – computer tomography (komputer tomográfia)

CTC – circulating tumour cell (keringő tumorsejt)

DMSO – dimetil-szulfoxid

DNS – dezoxi-ribonukleinsav

ECM – extracelluláris mátrix

EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav

ELFO – elektroforézis / elektroforetogram

EMT – epithelial-mesenchymal transition (epithelialis-mesenchymalis átalakulás)

FACS – fluorescence-activated cell sorting (flow cytometry, flow-citometria)

FBS – fetal bovine serum (magzati borjú szérum)

FCS – fetal calf serum (magzati borjú szérum)

FFPE – formalin-fixed paraffin-embedded (formalinfixált, paraffinba ágyazott szövetminta)

GIST – gasztrointesztinális stromális tumor

GP – glikoprotein

HA - hyaluronsav

HBGF – heparin-binding growth factor (heparinkötő növekedési faktor)

HE – hematoxin–eozin

HGF – hepatocyte growth factor (májsejt növekedési faktor)

HNPCC – hereditær nem-polipózisos colorectalis carcinoma

HSPG – heparán-szulfát proteoglikán

mCRC – metasztatikus colorectalis carcinoma

MET – mesenchymal-epithelial transition

MMR – mismatch repair (gén)

MRI – magnetic resonance imaging

mRNS – messenger RNS

MSI – mikroszatellita instabilitás

MSS – mikroszatellita stabil (tumor)

MTT – metil-tiazol tetrazolium teszt

NGS – next generation sequencing (újgenerációs szekvenálás)

PCR – polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

PET – positron emission tomography

qPCR – quantitative polymerase chain reaction , real-time PCR (kvantitatív polimeráz láncreakció, valós idejű PCR)

RFLP – restriction fragment length polymorphism

RFMBD – Restriction Fragment Microfluid Based Detection

RNS - ribonukleinsav

RT-PCR – reverse transcriptase PCR

sCD44 – szolubilis CD44

scid – Severe Combined Immunodeficiency

SD – standard deviáció

SDS – Na-dodecil-szulfát

siRNS – small interfering RNA (kis interferáló RNS) vagy silencing RNS

TIL – tumorfiltráló limfocita

TKI – tyrozin-kináz inhibitor

TMA – tissue microarray (szöveti mikrochip)

TME – total mesorectal/mesocolic excision (teljes mesorekum/mesocolon eltávolítás)

TNM – daganat stádium beosztása (tumor, nyirokcsomó, távoli metasztázis)

Wnt – Wiggless (jelátviteli út és fehérjék egy csoportjának megnevezése)

wt – vad típus (nem mutáns)

WT1 – Wilms-tumor 1 (gén)

1. Bevezetés

1.1. A vastagbélrák genetikai háttere

Az utóbbi évtizedben a műtéti technológia elveinek letisztulásával („no touch”, „central ligation”, „medial-to-lateral dissection”, „TME” stb.) a primer vastagbélrák prognózisa jelentősen javult. Klinikai szempontból a lokálisan invazív (T4), valamint a távoli áttétet képző (M1) elváltozások azonban a mai napig megoldatlan problémát jelentenek, ami gyakorlatilag azt jelenti, hogy az e daganattípus következtében létrejött halálozás jelentős részéért az áttétképzés tehető felelőssé (1). Ezért a colorectalis tumorok áttétképzési mechanizmusának a tanulmányozása - szinte valamennyi más tumorhoz hasonlóan - központi jelentőséggel bír. A daganat karcinogenezisének egyes mozzanatait, a normál vastagbél nyálkahártyától a jóindulatú, polipoid elváltozásokon át a vastagbélrák *kialakulásáig* tartó morfológiai lépéssor jól meghatározott genetikai elváltozásokkal korreláltatható (adenoma-carcinoma szekvencia), ugyanez azonban nem mondható el a colorectalis carcinoma *áttétképzéséről*. A metasztatikus kaszkád hibátlan végrehajtásának vannak mikrokörnyezet és tumor eredetű előfeltételei. Már a colorectalis tumorok karcinogenezisének folyamatáról birtokunkban levő információk is jól jelzik azonban, hogy az egységes elnevezés ellenére genetikailag milyen heterogén háttér jellemzi azokat a sejteket, amelyekből az áttétképzésre alkalmas tumorsejtek szelektálódnak.

Mai ismereteink szerint a normál mucosától a jóindulatú daganaton át a malignus elváltozásokig számos ismert és még fel nem tárt, egymást követő, egymásra épülő genetikai elváltozás vezet (2). Ezen elváltozások sorában néhány alternatív lépés mellett bizonyos, a colorectalis carcinomák többségére jellemző, kvázi-obligát genetikai elváltozás, mutáció határozható meg.

A normál colon mucosára ható számos mutagén faktor, valamint a korral szaporodó számú, a gének promoter régióját érintő (A-típusú) hipermetiláció hiperplasztikus, hiperproliferatív elváltozásokat indukál. Ezáltal a vastagbél nyálkahártyájában a karcinogenezis megindulására alkalmas feltételek jönnek létre.

A jóindulatú daganatos szövettani kép megjelenése (korai adenoma) általában az APC gén mutációjához kapcsolódik, ennek alapján az APC a colorectalis normál szöveti

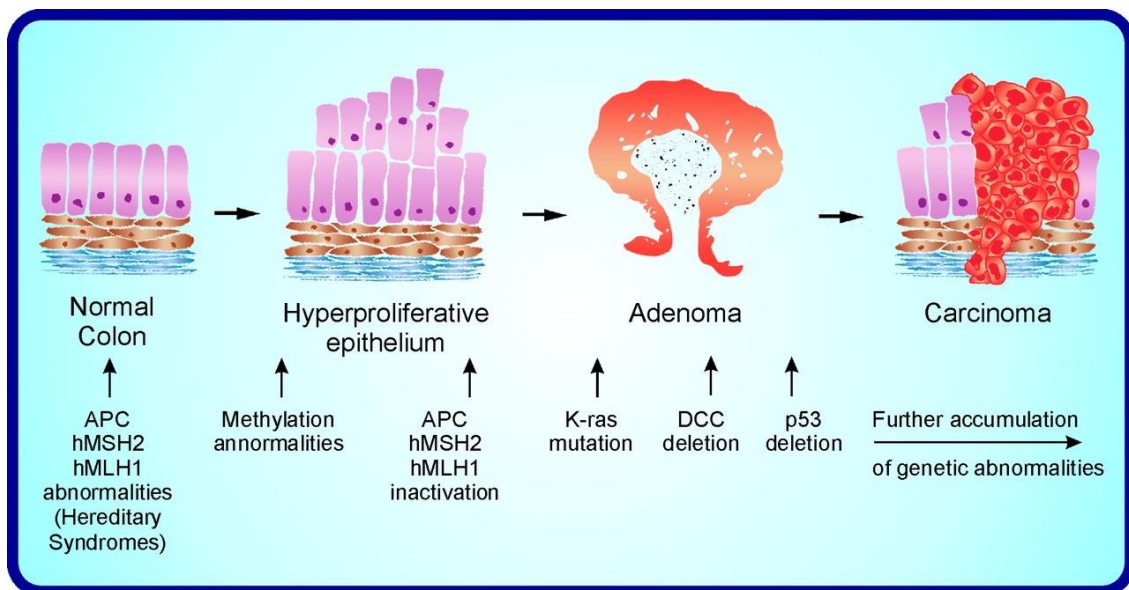
integritás „őreként” ismeretes. Sporadikus colorectalis carcinomák közel 70%-ában a gén szomatikus (szerzett) mutációja, míg familiáris adenomatózus polipózis szindrómában a gén csírasejtes mutációja nyomán vastagbél polipusok jelennek meg (familiáris adenomatózus polipózisban polipusok ezreivel találkozunk, s utóbbi szindróma obligát prekancerózus állapotként ismeretes). Az APC tumorszuppresszor gén mutációja nyomán a Wnt-szignálút kóros aktivációja által számos ősi, embrionális jelátviteli út re-aktivációja következik be, így például TCF/LEF transzkripciós faktor által a c-myc, a cyclin D1, illetve onkogének aktivációja mutatható ki (3,4). A Wnt-szignálút célgénjei közé tartozik a CD44 is (5). Egyes feltevések szerint a CD44-nek az aberráns kripták hiperproliferatív zónájában a „túlélés-apoptózis” egyensúly beállításában lehet szerepe (5).

A kevésbé differenciált diszplasztikus, majd súlyosan diszplasztikus adenomákban emellett számos további gén, így onkogének (KRAS 40-50%-ban, az ún. „serrated adenomákban” BRAF), illetve más gének (COX2 85%-ban (6–8)), valamint a 18-as kromoszóma rövid karjának deléciójával járó (18qLOH), heterozigótaság vesztésen alapuló mutációja (DCC, Smad2, Smad4/DPC4) követi egymást. A 18qLOH a CIMP-0 fenotípussal pozitív (CIMP = CpG islet metylator phenotype; ld. részletesen később), míg a CIMP-low és CIMP-high fenotípussal negatív korrelációt mutat (9). Az említett, kromoszomális instabilitással járó (CIN+) colon carcinomáktól eltérő, alternatív karcinogenezis utat jelent a kromoszomális instabilitással nem járó (CIN-), mikroszatellita instabilitáson alapuló rendszer (a sporadikus colorectalis rákok mintegy 15%-át érintve). A mikroszatelliták a genomban elszórtan elhelyezkedő, több ezer rövid, egyéenként veleszületett jellegzetességként állandó hosszúságú, bázisisméltódéseket tartalmazó DNS szakaszok. A DNS hibajavító enzim (MMR, mismatch repair) mutációjának (HNPCC), vagy ugyanezen gének promoter régióját érintő hipermetilációnak (sporadikus) egyik érzékeny diagnosztikus jele a mikroszatelliták hosszában bekövetkező változás, azaz a mikroszatellita instabilitás (MSI). Diagnosztikus kritériumként legalább 5 mikroszatellita vizsgálata alapján különíthető el az MSS (mikroszatellita stabil), az MSI-H (mikroszatellita instabil – high, azaz 40%-fölötti instabilitási rátával járó), valamint az MSI-L (azaz alacsony szintű mikroszatellita instabilitást mutató) altípus. Számos MMR gén ismeretes, melyek közül

mutáció tekintetében leggyakrabban az MLH1, MSH2, illetve MSH6, PMS1, PMS2 érintettek (10,11).

Az említett „metilátor-fenotípus” (CIMP magas, illetve alacsony fenotípus) mindkét említett colorectalis karcinogenezis útvonalat alapvetően befolyásolja: mind az MMR gének promoter régiójának hipermetilációján keresztül MSI-H jelleg kialakítása által, mind az APC, illetve egyéb onkogének és tumorszuppresszor gének (p16) promoter régióinak szabályozásán (silencing) (C-típusú hipermetiláción) keresztül (12).

Végül kései, a malignus transzformáció egyik kapuór tumorszuppresszoraként ismert, a sejtciklus szabályozásában kulcsfontosságú, s számos jellemzően malignus szöveti viselkedési mechanizmusban (apoptózis, DNS javítás, angiogenezis, invázió) központi szerepet vivő TP53 inaktivációhoz vezető mutációja (az MSI-H tumorok kivételével) általános genetikai hibaként mutatható ki a colorectalis carcinomákban. 1. ábra.



1. ábra: A Vogelstein-féle adenoma-carcinoma szekvencia és az egyes fázisainak azonosított genetikai háttere. (13)

A CpG sziget metilátor fenotípus (CIMP), valamint a genetikai instabilitás típusa (vagy CIN vagy MSI) alapján jelenleg legalább 6 féle colorectalis carcinoma altípus definiálható. Ezen altípusok mind genotípusbeli és epigenetikai, mind pedig biológiai viselkedésbeli eltéréseket mutatnak. Emellett alkalmat kínál a rendszer a jobb és bal

colonfél, valamint a colon és rectum carcinomák bizonyos szintű differenciálására (12,14). Az elkülöníthető CRC altípusok a következők:

1a. CIMP-0/MSS/CIN+. A CRC-k 57%-a tartozik ebbe az altípusba. Általában a bal colonfél érintett. Időskorú betegekben kialakuló, sporadikus tumorokra jellemző. Jellemző mutációk: APC, TP53, KRAS (de a BRAF mutáció ritka). Rossz prognózisú típus. Klasszikus adenoma-carcinoma szekvencia figyelhető meg.

1b. CIMP-0/MSS. Csírasejtes APC mutáció, autoszómális domináns öröklésment jellemző. Familiáris adenomatózis polipózis, 100-nál több adenomatózis polipus alakul ki a colonban, obligát prekancerózis. A CRC-k kevesebb, mint 1%-a sorolható e csoportba.

2a. CIMP-0/MSI-H. Az MMR gének valamelyikének germline mutációjával járó HNPCC (Lynch-szindróma). Az összes CRC 3%-át teszik ki. Jobb colonfél predominancia jellemző. Fiatal korban kialakuló CRC (45 éves átlag életkor). Morfológiailag és szövettanilag a sporadikus MSI-H rákokra hasonlít. Jellemzően: mucinózis, alacsony differenciáltságú tumorok, intenzív limfocita infiltrációval. Gyakori mutációk: KRAS, illetve mikroszatellitát hordozó gének: TGF β R2, TCF4, BAX, IGF2R. (A HNPCC diagnózisa az Amsterdam-II. kritériumok teljesülése esetén adható ki (15).)

2b. CIMP+H/MSI-H. A sporadikus CRC-k 12%-át adja. Elsősorban idős korban (70 év felett) alakul ki, jobb colonfél predominancia, illetve női nemi túlsúly jellemzi. Alacsony differenciáltságú CRC, szövettana mucinózis, gazdag limfocita infiltrációt mutat. Gyakori az APC és KRAS mutáció, ritka a BRAF mutáció, gyakori a hMLH1 hipermetiláció.

3. CIMP+H/MSS/CIN+. Szövettanilag jellemzően „serrated polyp”-okból kialakuló CRC, az összes vastagbélrák 8%-át adják. Jellemző a BRAF mutáció, emellett gyakori a *CDKN2A* és thrombospondin-1 (TBS1), E-cadherin, RB1 hipermetiláció, előfordul a hMLH1 hipermetiláció. Jobb oldalra lokalizálható, mucinózis tumorok intenzív limfocita infiltrációval.

4. CIMP+L/MSI-L/CIN+. Korábban az MSS tumoroktól való elkülönítése vitatott kérdés volt, jelenleg az MSS és MSI-H tumoroktól való elkülönítése racionális, objektív adatokon alapul (16). Jellegzetes az O-6-MGMT MMR gén hipermetilációja (20%). Gyakori a KRAS mutáció (92%), jellemző a MSI mellett a CIN is. Kivételt jelent tehát a megállapított, egymást kizáró MSI és CIN tekintetében. Túlnyomórészt jól differenciált, bal colonfelet érintő tumorok. Nem jellemző a limfocita infiltráció. Prognózisa kifejezetten rossz. Férfi nemi túlsúly jellemző.

(Végül megjegyzendő, hogy az IBD talaján kialakuló vastagbélrákok igen nehezen illeszthetők a fenti hat kategória egyikébe is. Jellemzően kevesebb mutációt lehet ezen tumorokban kimutatni, s a TP53 korai stádiumban megjelenő mutációja is a fenti vastagbélrákoktól elkülönülő entitásra utal. Jelenleg széleskörben elfogadott, önálló karcinogenezis útvonalként az IBD talaján kialakuló CRC még nem említhető.)

A bemutatott, néhány párhuzamosságot is megengedő karcinogenezis-szekvenciára jellemző tehát a konszekutív, egymásra épülő, halmozott genetikai hibák és szabályozási zavarok, szabályozási variánsok sora. Az öröklött (kongenitális) hajlamosító mutációk, valamint a szerzett genetikai és epigenetikai elváltozások halmozódására számos elméleti modell él. Ezzel kapcsolatban két, alapvetően egymással nem teljesen összebékíthetetlen elképzelés körvonalazódott: a malignus viselkedést mutató (proliferatív, majd progreszív potenciállal jellemezhető) klón szelekciójának elmélete és a multipotens tumor-össejt, illetve metasztatikus össejt aktivációjának elmélete (17). A *klónszelekciós modell* értelmében bizonyos sztochasztikus hatások, valamint a tumor környezetének hatására az oligoklonális normál, majd tumoros szövetben bizonyos malignus potenciállal rendelkező sejtek, sejtcsoportok, klónok túlszaporodnak, fokozatosan alakítva ki a sajátos, malignus szöveti képet. Ugyanígy a primer tumoron belül hasonló klónszelekciós mechanizmussal jelenhet meg, illetve szaporodhat fel a helyi invázióra, továbbá áttétképzésre alkalmas klón is. Az *össejt elmélet* értelmében a normál intestinalis proliferatív zóna progenitor sejtjei, az intestinalis össejtek (18) bizonyos genetikai illetve környezeti faktorok hatására (pl. APC mutáció, hipermetiláció, MMR mutáció) szabályozatlan proliferációjú össejteké alakulnak. A normál szöveti össejtek tehát a hiperproliferatív tulajdonságukat megőrző, mind önmaguk megújítására, mind egy

bizonyos sajátos differenciált sejtállomány, szöveti struktúra képzésére alkalmas progenitor sejtekké képesek alakulni. (19). Ugyanígy teoretikusan léteznek az előbbi proliferatív „őssejtektől” eltérő „metasztatikus őssejtek” is, amely kifejezés távoli szöveti környezetet (pl. máj) is akceptálni képes, azaz progresszióra alkalmas sejteket jelent. Kimutatásuk és esetleges karakterizálásuk irányában jelenleg is intenzív kutatómunka folyik világszerte (20,21). Mindkét fenti elméleti modell bizonyos, a tumoros szövet képzésére alkalmas sejt-jellemzők felkutatását célozza. Tekintettel a bonyolult összefüggéseket, sok esetben párhuzamos, illetve redundáns viselkedést mutató jelentős számú intracelluláris szignálútra (22), azok vizsgálatára több száz/több ezer expresszált gén és protein párhuzamos vizsgálatára alkalmas microarray technológiákat dolgoztak ki. Ezen expressziós és szöveti chip (TMA) vizsgálatok számos, mRNS szinten (PCR vizsgálatokkal) és protein szinten (immunhisztokémiai, áramlásos citometriai eljárással) igazolt gént, illetve génterméket emeltek ki, mint potenciális őssejt markert, illetve a klónszelekció szempontjából központi jelentőségű markereket. Vastagbélrákok vonatkozásában ezek közé tartozik pl. a CD44, CD166, CD133, valamint az ALDH-1 (20).

A metastatikus potenciállal összefüggésbe hozható sejtmarkerek közül elsőként (mint metasztázis szuppresszort) az nm23-at írták le. (23–26). Ugyancsak az elsők között szerepelt (mint a metasztázist segítő gén) a legtöbb tanulmányban őssejt-markerként említett CD44, illetve az utóbbi években annak is a v6-os domént tartalmazó variánsai (27,28). Bár az expressziós chipek adatainak értelmezése számos (kvalitatív és kvantitatív) problémát vet fel, elvitathatatlan haszna azonban e vizsgálatoknak, hogy a figyelmet számos, korábban nem vizsgált molekulára irányította, kiszélesítve ezáltal a karcinogenezis, tumoros viselkedés, illetve a progresszió horizontját (29). Példaként említhető e tekintetben a CB1 (30) és a LYVE1 (31) gén.

Másrésről azonban e vizsgálatok nem adnak direkt felvilágosítást az expressziós szabályozási rendszerek összefüggései, a szabályozó rendszerek szabályozása, valamint az epigenetikai, poszttranszkripciós változások tekintetében. Azaz sejtípustól függően ugyanazon változás akár alapvetően eltérő információt hordozhat (pl. TGF β). A leglényegesebb kritika a génexpressziós chip tekintetében azonban az a tény, hogy az általuk használt próbák legjobb esetben is egy adott gén konszenzus régiójára vannak

tervezve, jóllehet ma már közismert tény, hogy az általunk ismert gének 80-90%-a az alternatív splicing révén a molekulák egész családját fedi, amelyek szerkezetileg és funkcionálisan is eltérnek egymástól.

1.2. Az alternatív splicing jelensége

A Human Genom Project (HUGO) eredményeként vált ismertté (32), hogy a korábbi feltételezésekkel ellentétben az emberi genom alig 25.000 kódoló gént tartalmaz. A várakozásoknál, korábbi számításoknál lényegesen alacsonyabb génszám ismerete látszólag diszkrepanciát mutat a struktúr- és funkcionális proteinek elképesztő gazdagságával.

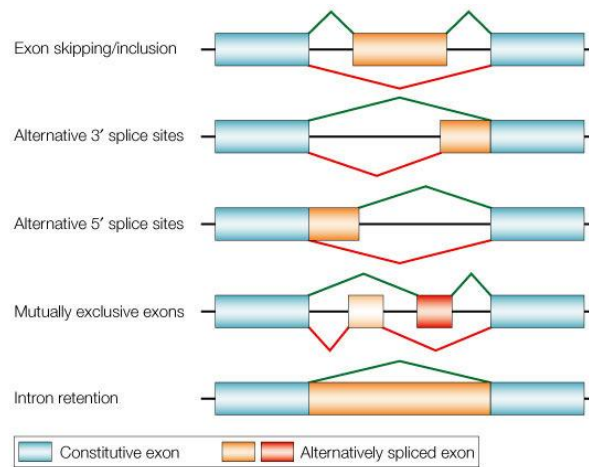
A DNS→RNS→protein szekvencia („centrális dogma”) során felismerhető multiplikáció háttérében számos mechanizmus közül az egyik legalapvetőbb az ún. alternatív splicing jelensége.

Az *alternatív splicing* a pre-mRNS szerkesztése során az intronok kivágását jelentő *konstitutív splicing* módosult változata, mely különféle, részben ismert, részben még feltárássra váró szabályozásbeli változások következtében különféle hosszúságú és exonösszetételű mRNS-ek átíródását teszi lehetővé egyazon génről kiindulva (33,34).

A *konstitutív splicing* folyamata részleteiben feltárt jelenség, mely ismert, meghatározott nukleotid szekvenciákat felismerő ún. spliceosomák segítségével megy végbe. A spliceosomák hat különféle snRNP (kis magi nukleoprotein) által alkotott, jól szabályozott komplexek, melyek az exon-intron határokat meghatározott donor- és akceptor-szekvenciák alapján ismerik fel.

Bizonyos környezeti faktorok hatására a splicing-mechanizmust szabályozó enhancer és silencer DNS régiók (ESS, EES, ISS, IES) eltérő súlyozású szerepet kapnak, aminek következménye a konstitutívnek tekintett (az esetek nagyobb százalékában létrejövő) splicing módosult változatának létrejötte. Ennek alapján korábbi erős spliceosoma kötőhelyek gyenge kötőhellyé, a 3', illetve 5' kötőhelyek ún. alternatív kötőhellyé válhatnak. További alternatív splicing mechanizmust jelent az exon skipping, az intron retenció, valamint a variábilis exon shuffling (ami valójában az exon skipping egy

speciális formája) (2. ábra). Utóbbi jelenség legismertebb példája a CD44 alternatív splicingja.



2. ábra: Az alternatív splicing létrejöttének főbb típusai vázlatosan (35)

Az alternatív splicing a protein izoformák keletkezésének alapmechanizmusa, szerény becslések szerint is a humán gének mintegy 75-95%-ánál fordul elő (36). Az egy génről akár egyazon sejtben átíródó számos különböző mRNS (illetve expresszálandó fehérje) lehetősége önmagában is hatalmas funkcionális, illetve szabályozási variabilitási potenciált hordoz. A jelenség mégis csupán akkor került az érdeklődés középpontjába, amikor világossá vált, hogy az alternatív splicing nem random folyamat (37,38). A normál szövetek, valamint ugyanezen struktúrákból kiinduló malignus elváltozások egyes gének jól meghatározott (adott esetben a malignus szöveti viselkedéssel szinkron megjelenő) alternatív splice-variánsait expresszálják. Az alternatív splicing jelenségének a tumorképződésben, a tumoros proliferációban, valamint a tumorprogresszióban betöltött funkcionális jelentősége, illetve ennek lehetősége a splicing mechanizmus szabályozására irányította a figyelmet (39). Úgy tűnik ugyanis, hogy számos aberráns/megváltozott/alternatív sejtműködés hátterében bizonyos gének alternatív splice variánsai állnak. Más, szintén elsősorban malignus szöveti jelenségek hátterében azonban kifejezetten a splicing-gépezet szabályozásában bekövetkező változások, az alternatív splicing megjelenése illetve a splice mintázat megváltozása állhatnak (40).

1.2.1. Alternatív splicing és a colorectalis carcinoma

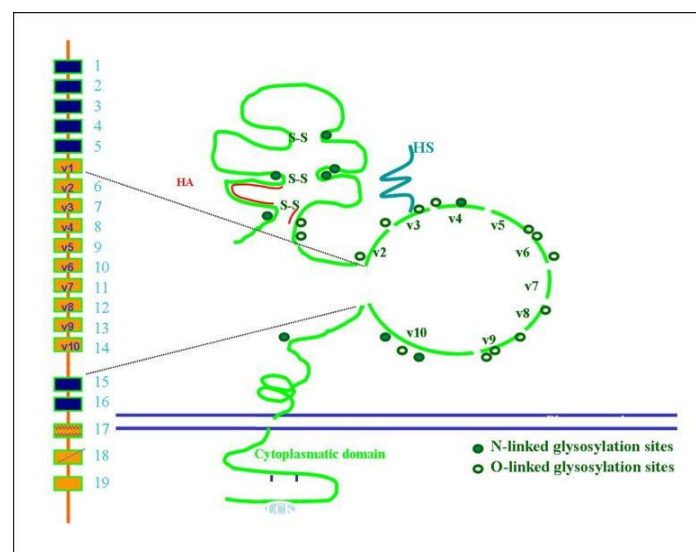
Számos a colorectalis karcinogenezisben szerepet játszó, alternatív splicing jelenségét mutató gént ismerünk: TP53, FN (fibronectin), FGF (fibroblast növekedési faktor), VEGF (vaszkuláris endothelialis növekedési faktor), KLF4 (Krueppel-like factor 4) és a CD44 (41–44). Ezen túl a splicing gépezet szabályozásában résztvevő faktorok (SR faktorok, hnRNP proteinek) hibái, módosult expressziója is számos tumorban, többek közt a vastagbélrákban is felismerhető.

1.3. A CD44 gén és protein

1.3.1. A CD44 alternatív splice variánsainak szerepe a daganatok progressziójában

Az alternatív splicing jelenségének nagyon demonstratív példája a CD44 expressziója során figyelhető meg (45). A CD44 génje a 11p13 kromoszómalokuszon helyezkedik el.

A CD44 gén filogenetikailag meglehetősen konzervatív, a humán és az egér CD44 gén kódoló régiójának nukleotid-szekvenciája 79%-os homológiát mutat. Extracelluláris régiót kódoló, variábilis exonsort tartalmazó középső „kazettája” extenzív alternatív splicing folyamaton képes keresztül menni. A részletes szerkezeti vizsgálatok alapján ma ismeretes, hogy a CD44 gén 20 exont tartalmaz, melyek közül az első öt exon standard, konstitutívan expresszálandó exon, melyeket 10 variábilis exon követ, végül ismét 5 standard exon zárja a „sort” (3. ábra)



3. ábra: A CD44 variábilis exonjainak reprezentációja a protein szerkezetében (46)

A normál, jellegzetesen elsősorban hám és hematogén eredetű, intenzív proliferációt mutató szövetekben expresszáldó izoforma a CD44s (standard, vagy hematogén forma), mely a 10 variábilis exon közül vagy egyiket sem, vagy csupán a v1 exonról expresszáldó régiót tartalmazza. Protein szinten a variábilis domén a CD44 molekula extracellularis, membránközeli régióján foglal helyet. (Utóbbi lokalizációnak, amint a későbbiekben látni fogjuk, komoly jelentősége van a membrán-asszociált receptor, ko-receptor és molekula-prezentáló képesség szempontjából.) Kombinatorikai alapon elvileg $2^{10}=1024$ féle CD44 variáns mRNS transzkripciója, illetve protein izoforma expressziója képzelhető el. További variációkat jelentenek az alternatív v3 splice-helyek, valamint az intronretenció lehetősége (47,48). A tapasztalat azonban azt mutatja, hogy a párhuzamosan többféle izoformát is expresszáldó sejtek/szövetek a valóságban csupán néhány, jól definiálható variánst produkálnak. Az expresszáldó CD44 izoformák (CD44v) funkciója, összetétele, valamint az expresszáldó izoforma-kombinációk szerepe az egyes malignus transzformáción átesett szövetek viselkedése, a karcinogenezis, valamint a malignus tumoros viselkedés és a tumorprogresszió szempontjából jórészt még nem ismert. Az egyes CD44 izoformák, valamint az izoforma-kombinációk funkcionális szempontú karakterizálása részleteiben máig várta magára.

A kép komplexitását fokozza a felismerés, hogy bizonyos exonok funkcióját más exonok expressziója modulálni képes. Például a CD44 HA-receptor érzékenysége arányosan csökken az expresszáldó variáns exonok számával (49–53), illetve egyes exonok által kódolt fehérjedomének funkcionálisan kooperációra képesek (v3-v6).

Tovább színezi a képet a felismerés, hogy mind a CD44s, mind a variáns formák a sejtfelszínen kívül arról leválva, ún. shedding mechanizmussal szabaddá válhatnak és ezen molekulák a továbbiakban a mátrixban kötött, az intersticiális térben, nyirokrendszerben és a vérplazmában pedig szabad formában is jelen vannak. A szabad CD44 frakciót sCD44-nek, szolubilis formának nevezzük. Az utóbbi években számos olyan vizsgálat folyt, amely a standard és variáns CD44 izoformák szolubilis frakciója, és a szöveti kötött formák expressziója közötti korreláció szerepét szándékozott igazolni (elsősorban prognosztikus faktorként): tumormarker, progressziós marker, metasztatikus marker funkciót igyekezvén találni a keringő sCD44 formájában (54,55).

Érdekes, részletesen ki nem dolgozott elképzelésként (enzimológiai, reakciókinetikai elméleti megfontolásokra alapozva) a mátrix-komponensként jelenlevő, illetve a szolubilis CD44 akár kompetitív antagonista, akár agonista funkciót is képviselhet a sejtfelszíni CD44 proteinnel szemben illetve mellett. Ugyanígy a CD44 glikoproteinnel kapcsolódó, ahhoz kötődni képes egyéb ligandumok számára szintén alternatív, más funkciójú, vagy funkcionálisan kívüli kötési felületet jelenthetne (heparán-szulfát, heparánáz, kollagén, kondroitin-szulfát, heparin-kötő növekedési faktorok stb.) az sCD44. Gyakorlati szempontból azonban a sejtfelszíni, funkcionális CD44 mennyiséggel korreláltható sCD44 kimutatása jelent elsősorban ígéretes lehetőséget a klinikai onkológia prognózis-vizsgálatai számára (27,56).

A CD44 alternatív splicing *szabályozásának* hátterében (feltehetőleg mikrokörnyezeti, illetve intracelluláris stimulusok által befolyásolt módon) ma már néhány faktor ismert: a hTra2- β 1 a v4 és v5 inklúziót elősegítő enhancer (40); a SRp40 splice-regulator protein expressziójának szintje emlőrák esetén mind a metasztatikus potenciállal, mind ezzel feltehetőleg összefüggésben egyes variáns CD44 izoformák expressziójával (v2, v3, v5, v6) pozitív korrelációt mutat (57). Az SRp40, melyet a TOPO1 foszforiláció révén ki-be kapcsol, exonon belüli kötési hellyel képes a splicing folyamat stimulálására (enhancer). Amennyiben a CD44v expressziós mintázatának változása a daganat progressziójával összefüggésben áll, az SRp40 potenciális terápiás célponttá léphet elő.

Hasonlóan colorectalis carcinomákon a β -catenin/TCF4 szignáltranszdukciós út SRp20-on keresztül a CD44 alternatív splicing gépezetét képes modulálni, azaz a CD44 splice variánsok expressziója és funkcionális *regulációja* a Wnt-szignálút aktiválásának egyik célpontja (58).

Mindezek alapján hangsúlyozni kell, hogy a szakirodalomban rendszeresen megjelenő „CD44”, „CD44v3”, vagy „CD44v6” megfogalmazás – melyekre az alábbiakban az irodalmi összefoglalóban is kényszerűségből ilyen formában hivatkozom - valójában helytelen, hiszen a fenti jelölések teljes molekulacsoportokat fednek, melyek szerkezetileg és funkcionálisan is akár jelentős különbségeket is mutathatnak.

1.3.2. Eredeti ismeretek a CD44-ről - hematológiai vonatkozások

Elsőként a CD44-et mint sejtfelszíni glikoproteint azonosították aktivált T-limfociták felszínén (59). A későbbiek során derült ki, hogy ugyanazon molekuláról van szó, mint amelyet a hyaluronsav elsődleges sejtfelszíni receptoraként azonosítottak röviddel azelőtt (60), illetve az ún. „Indian blood group” antigén determinánisa (epitop) is ugyanez a molekula.

A korai kutatások indirekt bizonyítékát találták annak, hogy a CD44 elsősorban a T-limfociták ún. „homing”-jában, azaz a nyirokszövet és a vérerek (vénák) felé irányuló specifikus, célzott migrációjában, szervspecifikus célorientált vándorlásában játszik szerepet (61). A későbbi részletes elemzés számos egyéb vérképzőszervi sejt felszínén (B-limfociták) (62), egyéb fehérvérsejt frakciók, makrofágok, monociták, felszínén (63), valamint magán az endothel felszínén is igazolta az expresszióját (64). (A nyirokerekben az utóbbi években az érdeklődés középpontjába kerülő LYVE-1 funkcionál a CD44 helyett hyaluronsav receptorként. (31))

Érdekes elvi kapcsolat vetődik fel ennek alapján a tumorok hematogén metasztatikus progressziója, valamint a limfocita homing között (65–67). Közös pontokként említhető: a hasonló migrációs célszervi mintázat (nyirokcsomó, máj, tüdő, csontvelő), hasonló szervpreferencia, a tumor infiltráló limfociták speciális „homing” jelensége, csontvelői disszeminált tumorsejt vizsgálatok elvi alapja, aktivált limfocita alapú immunterápiák elvi alapja, hematogén – limfogén áttétképzés molekuláris hátterének elkülönítése (vö. CD44 és LYVE1 differenciált expressziója).

Újabban ismételt a hematológiai és onkológiai kutatási vonal lehetséges összekapcsolódási pontjaként jelent meg a CD44, ugyanis a tumor infiltráló limfociták felszínén a v10 expresszió következetes kimutatása, illetve a tumor (pl. emlőrák) biológiai viselkedése között korrelációt sikerült kimutatni (68).

A lehetséges kapcsolódási esély ellenére a CD44 hematológiai-immunológiai és onkológiai kutatási vonalai alig érintik egymást.

Bizonyos CD44 izoformák szerepét krónikus gyulladáshoz kapcsolódó megbetegedések háttérében (rheumatoid arthritis, colitis ulcerosa, pneumonia stb.) is sikerült az elmúlt években igazolni (69–71).

1.3.3. A CD44 normál szöveti előfordulása

Immunhisztokémiai vizsgálatok számos normál szövetben igazolták a CD44 glikoprotein sejtfelszíni expresszióját. Alapvetően a hám eredetű szövetek (bőr, vékony- és vastagbél nyálkahártyájának hámja), az endotélium, bizonyos fehérvérsejt frakciók, tartoznak az intenzív, konstitutív CD44 expresszáló szövetek közé (72–76). Az embrionális arteriogenézisben is igazolták a CD44 központi szerepét (77). Különös figyelmet érdemel a csontvelői CD44 expresszió vizsgálata, ugyanis a hematopoetikus CD44+ őssejtek között szolid tumorok metasztatikus stádiumában (M1) egyes klinikai vizsgálatok a metasztatikus őssejtek (hám eredetű, szintén CD44+ sejtek) kimutathatóságát is felvetik (78). Meg kell azonban jegyezni, hogy a csontvelőben kimutatható tumorsejtek vonatkozásában az „alvó sejt” vs. metasztatikus sejt vita még nem jutott nyugvópontra.

Számos normál, intenzív proliferációt mutató hámjellegű szövetféleség esetén észlelhetünk CD44s pozitivitást (gyomor nyálkahártya, vékonybél nyálkahártya, prosztata, emlő ductusok hámja, bőr, szőrtüsző, urogenitális traktus átmeneti hámja) (74–76,79). A vastagbél nyálkahártyájának részletes vizsgálata során feltűnő, hogy pozitív CD44s (standard molekula) expressziót a bazális kriptákban találunk. A vékonybél Paneth-sejtek közt található, némiképp részletesebben karakterizált „intestinalis őssejtekhez” hasonlóan (3,80,81) a colon proliferatív sejtjei (őssejtjei), valamint a kiérési zóna bazális szakasza képes a CD44s expresszióra, míg a kiérett, mucosalis sejtek már membrán pozitivitást nem mutatnak (82). Ezen felismerés akkor nyer igazi jelentőséget, amikor összevetjük a jó és rosszindulatú colorectalis szövetszaporulatok CD44 expressziós tulajdonságaival, ahol a differenciációs jelként értékelhető CD44-pozitivitás elvesztése nem történik meg (73,83–85).

1.3.4. A CD44 daganatokban

Számos malignus és benignus daganaton (adenoma) sikerült CD44 membránexpressziót kimutatni (52). Itt azonban a normál szövetektől eltérő módon a benignus és malignus

tumoros szövetek az alternatív splicing mechanizmus (szabályozatlan v. szabályozott(!)) bekapcsolása nyomán a CD44 hyaluronsav receptor funkciójának gyengült változatát mutató, más (pl. heparán-szulfát) kötési képesség tekintetében azonban előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező, megváltozott funkciójú, variáns CD44 izoformák expresszióját figyelhetjük meg. (A pontosság kedvéért meg kell jegyezni, hogy az említett „receptor” szerep valójában glikanációs helyet jelent, azaz a CD44 extracelluláris doménje heparán-szulfáttal és egyéb poliszacharidokkal glikozilálódni képes.)

A hyaluronsav (HA) a normál szövetekben a sejt-sejt, sejt-mátrix közti kapcsolatok egyik legfőbb struktúr glikózaminoglikánja. E rendszerben a szoros sejtközötti kapcsolat, a normál szöveti differenciált struktúra megőrzésében játszik szerepet. Nyilvánvalóan a számos hám jellegű szövetben a sejtfelszíni HA-receptor és a CD44 előfordulása szintén e célt szolgálja. A normál epidermális szöveti differenciáltságot megalapozó sejt-sejt kapcsolat, az E-cadherin alapú dezmoszómák felbomlásának jelensége (E-cadherin down reguláció nyomán), illetve a következményes epiteliális-mezenhimális átalakulás (EMT) jelensége hátterében a Wnt-szignálút aktiválódása ismerhető fel. Ugyanez a jelátviteli út áll a CD44 variáns izoformák expressziójának/overexpressziójának hátterében (5,58). Rosszul differenciált, kóros, diszplasztikus és neoplasztikus szövetekben a kötött, rendezett sejt-sejt kapcsolat rendszer módosul, megbomlik, teret engedve a szöveti struktúrát nem mutató (organogenetikai szempontból aberráns) progresszióra azonban annál alkalmasabb tumorképződésnek. E jelenség egyik központi elemének tekinthető a standard CD44 molekula mellett a variáns CD44v izoformák sejtfelszíni expressziója is. A többszám e helyütt nem véletlen: e dolgozatban rámutatunk, hogy szövetenként, tumortípusonként változó számú és fajtájú CD44v izoforma szinkron expressziója figyelhető meg a neoplasztikus szövetekben. Emellett azonban a variáns régió expressziójával ezen régió (a különféle variáns exonok által kódolt protein domének) új, addig meg nem jelenő tulajdonságokat kölcsönöznek a CD44 molekulának és ennek következtében a hordozó sejtek és környezetének.

A CD44 variáns exonjainak jelenlétét RNS szinten és funkcionális, expresszált protein alkotójaként egyaránt számos malignus szövettípusban sikerült kimutatni. A

legintenzívebb CD44v expresszáló szövetek: gyomorrák, hasnyálmirigyrák, tüdőrák, melanoma, limfomák, leukaemia, emlőrák, pajzsmirigyrák, valamint a vastagbélrák (45,86–94).

Számos *in vitro*, állatkísérleti és humán klinikai vizsgálat kutatta a CD44v/s expresszió és a malignus klinikai jellemzők (grade, TNM, recid. ráta, túlélés) közti korrelációt (45,95–97). A klinikai tanulmányok azonban meglehetősen heterogén képet mutatnak. Általánosságban elmondható, hogy prognosztikai hatékonyságot sem a CD44 standard, sem az egyes variáns exonok expressziójának mérésével nem sikerült igazolni, bár a tanulmányok többsége több különféle variábilis CD44 exon (v3, v6, illetve v4, v5, v3-10, v2 és v10) overexpresszióját igazolta előrehaladottabb stádiumú (mind N1, mind M1, metasztatikus) colorectalis carcinomában (43,74,96,98–101).

1.3.5. A CD44 különféle variánsainak ismert funkciói

De milyen funkciók társulnak a neopláziával párhuzamosan észlelt, variáns régiót is tartalmazó CD44 fehérjéhez?

A CD44 számos biológiai funkciójának alapja, hogy a sejt-sejt, illetve sejt-ECM interakciók egyik legalapvetőbb közvetítője (102,103). Ezáltal szerepe igazolható számos fiziológias folyamatban, de kulcsszereplő a tumorsejt migráció (104,105) illetve a kemorezisztencia (105–114) jelenségében is.

A CD44 glikoprotein (GP) részletes funkcionális vizsgálata során kiderült, hogy a HA kötés ugyan a legfőbb CD44 GP funkciónak tekinthető (normál szövetek sejt-sejt, illetve sejt-mátrix kapcsolatában (49,50,94,95,111,113)), emellett azonban más GP-kötési potenciál is megfigyelhető. A CD44s molekula önmagában is receptora a chondroitin-szulfátnak és a kollagénnak (102,111), azonban effektív heparán-szulfát kapcsolódási felületet csak a v3 variábilis domén expressziója esetén figyelhetünk meg (85,93,112,115). Valószínűleg térszerkezeti okokkal magyarázható, hogy a hosszabb (több variábilis exonról átíródó) CD44 izoformák HA kötési képessége a molekula hosszával arányosan csökken (53,109). Úgy tűnik tehát, hogy funkcionális tekintetben a különféle GP kötési potenciálok egymás komplementereiként jelennek meg.

Az egyéb, elsősorban a v3 régiót tartalmazó CD44 variánsok, mint heparán-szulfát proteoglikánok számos funkcionális protein kötésére képesek (receptorként, prezentációs felületként is felfoghatók), így a heparin-kötő növekedési faktorok (HBGF) prezentációjában játszanak kulcsszerepet (85,115). Meg kell azonban jegyezni, hogy természetesen nemcsak a CD44v3 képes a heparán-szulfát kötésére: kompetitív, alternatív heparán-szulfát proteoglikánok, például a syndecan, glipican stb. mind normál, mind neoplasztikus szövetekben hasonló, átfedő, esetleg kompetitív funkciókat látnak el (116). Ily módon a kötött, prezentált növekedési faktorok indította szignáltranszdukciós utak inicializálásában kerül a CD44 központi szerepkörbe, kapuőr-funkcióba. Ennek a funkcionális szerepváltásnak a CD44s és CD44v-k között a későbbiekben a tumoros sejt illetve szöveti viselkedésformák szempontjából lesz jelentősége.

Tekintettel a nagyfokú szerkezeti variációs lehetőségre az expresszáldó CD44 izoformák viszonylatában, feltételezhető, hogy a molekulák funkcionális sajátosságai is ugyanilyen nagymértékben változékonyak. Érdekes módon szisztematikus, akár „vertikális”, azaz exononként történő, még inkább „horizontális”, azaz expresszáldó exon-kombinációnként történő részletes funkcionális jellemzése a molekulának, molekula-családnak máig várat magára.

Tekintsük át röviden az egyes variábilis doméneknek az eddigiekben kimutatott vagy feltételezett szerepét, funkcionális sajátosságait.

v1: Általánosan elfogadott nézet szerint emberben (!) nem valódi variáns exon, s a CD44s részeként konstitutívan expresszáldik (nem érvényesül esetében az alternatív splicing) (117). Ez az általánosan elfogadott elv az oka annak, hogy a v1 funkcionális szempontból történő karakterizálása ezidáig nem történt meg. Saját vizsgálataink során (melanoma, illetve colorectalis carcinoma sejtvonalakon végzett CD44 klónozási és szekvenálási adatok alapján) igazoltuk, hogy a v1 (valamennyi emlőshöz hasonlóan emberben is) variábilis exon.

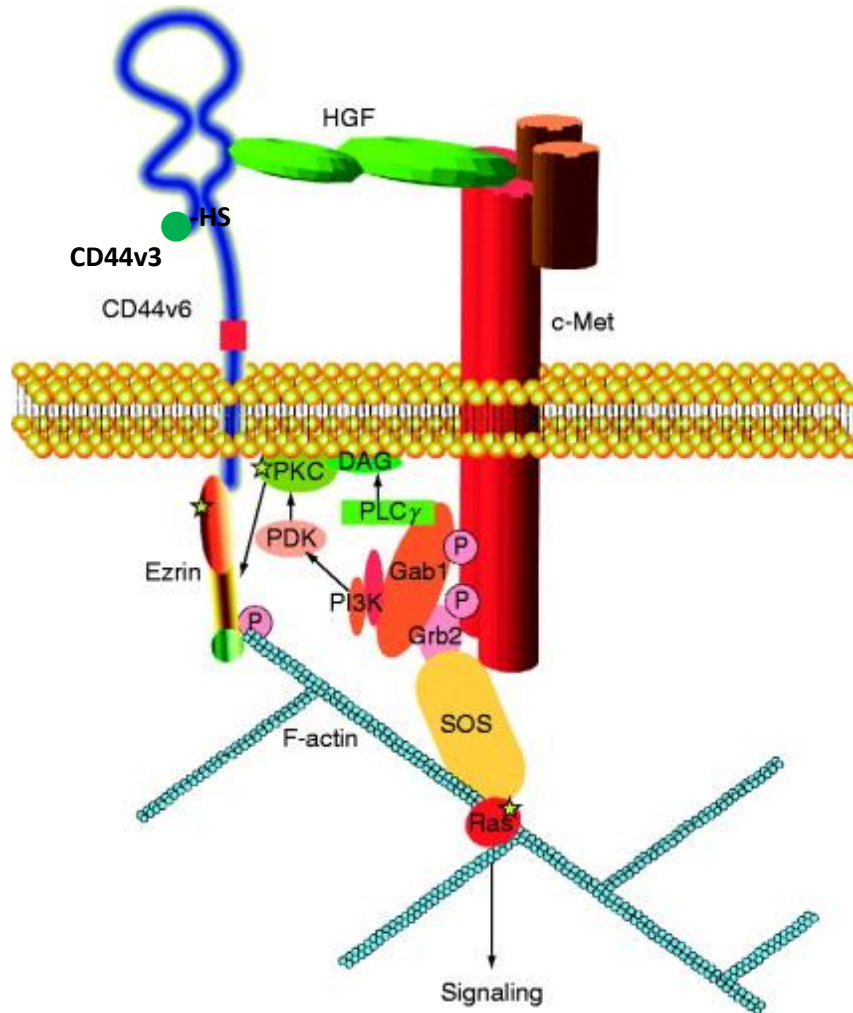
v2: A v3-mal együtt, vagy anélkül expresszáldik. Önálló funkciója nem ismert, feltehető azonban, hogy a v3-mal való együttes expresszió a v3 funkció modulálásában kaphat szerepet (100).

v3: Az egyetlen HSPG domén. Mint ilyen, számos HBGF sejtfelszíni kötését, prezentációját teszi lehetővé. Más oldalról tekintve ugyanezt a jelenséget: a tumorsejt mikrokönyezete által kínált növekedési faktorok a CD44v3 kötés révén immobilizálhatók mind a sejt körüli mátrixban, mind pedig a sejtfelszínen azok receptora közelében. Ennek alapján a tumorprogresszió hatásmechanizmusának vizsgálata kapcsán a v6 mellett a v3 a legtöbbet vizsgált domén. Az EGF, VEGF, b-FGF, KGF, valamint a HGF növekedési faktorok széles irodalmi háttérrel rendelkező, részletekbe menően jellemzett tulajdonságai révén tudjuk, hogy a tumoros proliferációban és progresszióban, a progrediáló klónok szelekciójában mikrokönyezeti drive-ként kulcsszerepet játszó molekulák (85,115,118,119). Normál és tumoros mintapárok vizsgálata során a v3 exont hordozó molekulák expressziós szintjének emelkedése (overexpresszió) a T/N stádiumok vonatkozásában a primer tumor vaszkuláris inváziójával mutatott korrelációt (120).

A CD44 v3-at hordozó variánsainak (mint HSPG-nek) a viszonya az általa ténylegesen, vagy potenciálisan kötött HBGF-okkal (HBEGF, KGF, bFGF, HGF, VEGF stb.) azok funkcionális jelentősége miatt figyelemreméltó. Ezen molekuláris interakció modulátoraként a humán heparanase enzim jelentősége vetődik fel. A v3 és a humán heparanase kooperációja a sejt differenciáció/proliferáció/tumorprogresszió szempontjából kulcsfontosságú szabályozó rendszer lehet, jóllehet az ezt megerősítő kísérleti bizonyítékok egyelőre csak szerény számban és súllyal állnak rendelkezésre (23,28,121–124).

Némileg komplexebb rendszer képe rajzolódik ki az Orian-Rousseau által felvetett v6 és a c-Met kooperáció alapján. A feltevés szerint a CD44 v6-ot hordozó protein izoforma a HGF, mint távoli áttétképzésben szerepet játszó növekedési faktor ko-receptorként viselkedik a tényleges, primer receptorral, a Met proteinnel (119). A szabályozó funkció bonyolultságát húzza alá a felismerés, hogy a v3 domén a HGF membrán-közeli prezentációjában játszik szerepet, míg a v6 domén a HGF receptor ko-receptora (4. ábra). A c-Met downstream-target gének, tehát, alapvetően a CD44 alternatív splicing megbízható, szervezett, összetett modulálásaként létrejövő variáns izoformák expressziójának függvényei. Megfelelő CD44v izoformák (akár a v3 és v6 közös expressziója révén, akár külön molekulán azok párhuzamos expressziója révén) kettős

támadásponttal szabályozzák a HGF prezentálását és dokkolását annak receptorán. A tumoros, klasszikusan „szabályozatlan”, elszabadult sejtfunkciók e ponton úgy tűnik, maximálisan szabályozottan, szervezeten zajlanak és vezetnek a tumoros sejtproliferáció/apoptózis arány pozitív eltolódásához, illetve a tumorprogresszióhoz.



4.ábra: A CD44 v3 és v6 doménjének együttműködése a HGF-Met interakcióban. (125)

v4,5: funkciójukról ezidáig kevés adat áll rendelkezésre. Statisztikai vizsgálatok tanúsága szerint mindkét exon, illetve termékeik expressziója jó korrelációt mutat különféle malignus daganatok esetén a távoli metasztázisok megjelenésével. V4 esetében a tumorok normál mucosához viszonyított overexpressziója (2x felett) a tumorok invazivitásával mutatott jó korrelációt (120).

v6: a HGF-receptor Met protein koreceptoraként funkcionál, ezáltal többek között a Met-Rho szignáltranszdukciós út iniciációs lépésében játszik szerepet (119,126). Ez a szignálút a Ca-calmodulin rendszeren keresztül kulcsfontosságú a sejtmotilitás és ennek révén az áttétképzés szempontjából. A HGF szerepe a májjáttétek képzésében (csakúgy mint a primer májtumorok kialakulásában) kísérleti evidenciákon nyugszik (119,127). A colorectalis tumorsejtek felszínén expresszáldó Met, mint HGF receptor olyan komoly jelentőséggel bír a májmetasztázis képződése szempontjából, hogy prognosztikus markerként, valamint metasztatikus markerként is (az nm23 mellett) az egyik legtöbbet és legjobb eredménnyel vizsgált molekula (128). E ponton kell megjegyezni hogy mind a c-Met, mind a koreceptor CD44v6 közös rendszer, a Wnt-szignálút célgénjei. Aktiválódásuk tehát közös gyökerekre vezethető vissza. Emellett létezik egy a CD44v6-c-Met koreceptor-rendszerrel induló, a RAS szignálutat aktiváló pozitív visszacsatolási kör, ugyanis a RAS/MAPK szignálúton keresztül splicing faktorok aktiválódnak (Sam68, SRm160), melyek további CD44 izoformák „upregulációját” irányítják (129).

v7-v8-v9: kevés a funkcionális ismeret a molekula ezen szakaszáról.

v10: jelenlegi ismereteink szerint az aktivált limfociták egyik meghatározó sejtfelszíni markere. A tumorinfiltráló limfociták (TIL) a legutóbbi definíciók szerint a tumor, mint immunmodulátor által a host (gazdaszervezet) részéről kiprovokált stroma-növekedés, stroma-produkció, illetve azt követően kiváltott limfocita reakció (kvázi immunreakció) képviselői. Onkológiai vonatkozásuként említésre méltó, hogy a TIL-ek sejtfelszínén is konzekvensen kimutathatók a CD44 v10 exonját expresszáldó izoformák (49,68,73,130). A tumor-TIL kapcsolat bonyolult kérdéskörére, valamint a két rendszer egymásra kifejtett moduláló hatására e helyen nem kívánok részletesen kitérni. Pusztán a tumor, mint a gazdaszervezetre, saját mikrokozonyzetére reagáló rendszer, valamint a tumorinfiltráló limfociták (TIL), mint a tumorra, azaz egy lokális mikrokozonyzeti tényezőre a szervezet részéről reagáló rendszer közös viselkedési és protein expressziós jellemzőire kívánunk rávilágítani.

Ismeretes, számos alapkutatósi vizsgálatban kimutatott tény, hogy egyazon tumor (illetve akár egyazon tumorsejt is) párhuzamosan többféle CD44 izoforma

expressziójára képes. Ennek megfelelően több különféle funkciójú CD44 fehérje izoforma együttes jelenléte igazolható egyazon sejt felszínén.

A CD44 expressziós mintázat mind transzkripciós, mind transzlációs szinten vizsgálható, azonban az eddigiekben publikált eredmények igen heterogének. Van Weering tanulmányában (131) RT-PCR vizsgálattal a teljes variáns régió feltérképezését célozta meg: exon-specifikus primerpárokkal az összes expresszált variáns izoforma azonosítására törekedett. Eredményei alapján általánosságban megfogalmazható, hogy (bár kivételekkel) a rövidebb splice-variánsok inkább az alacsonyabb sorszámú variáns exonok termékeinek elvesztése által jönnek létre (egyszerű megfogalmazásban: a v1 exon, illetve domén felől történik az alternatív splicing során az exon kivágása, a v10 felé haladva). Ugyanezen jelenség értelmében az alacsony sorszámú variánsok (v2, v3, v6) leginkább a hosszabb CD44 izoformákon található meg. (Meg kell jegyezni, hogy az e dolgozatban részletesen ismertetésre kerülő saját eredményeink Van Weering hipotézisét nem igazolták.)

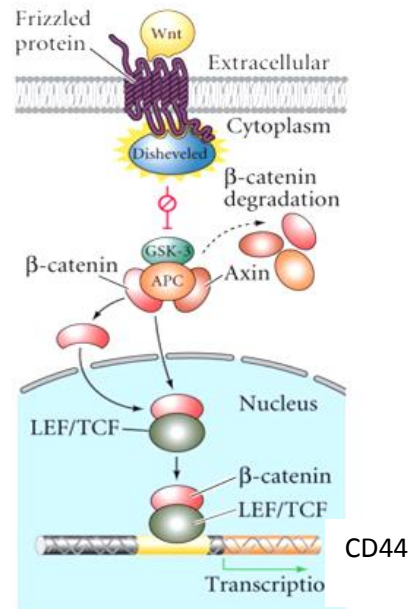
Fontos továbbá megjegyezni, hogy az exon-specifikus primerpárokkal végzett PCR vizsgálatok keresztmetszeti képet adnak: egyazon variáns exon többféle transzkripciós termékben is megjelenik, így azok szummált eredményéhez jutunk.

1.3.6. CD44 és a Wnt-szignálút

Az őssejtek (embrionális, germinális, szomatikus őssejtek) tulajdonságainak vizsgálata során néhány, a szomatikus (differenciált) sejteknél kevésbé ismert szignál-transzdukciós út felismerésére került sor. Ezek az „őssejt-szignálok” egy-egy jellegzetes, őssejt-típusú tulajdonság hátterét képezik: a Notch-szignálat a pluripotens sejt differenciálódásának kezdeti lépéseként, a SHH (Hedgehog)-szignálat pedig a sejtproliferáció szabályozásának kulcsfolyamataként ismerjük. Harmadikként meg kell említeni az embrionális őssejtekre jellemző, a differenciálódó szövetekben az „őssejt” túlélését szabályozó, azaz a túlélés/apoptózis mezejét jelentő szignálat, a Wnt-utat (132).

A daganatok működésének megértésében nagy segítséget nyújt más, a korai embrionális fejlődési eseményeinek ismerete. A daganatok (mint dedifferenciált, pluripotens sejtrendszerek) ugyanis számos vonatkozásban analóg viselkedést mutatnak ezen

ontogenetikai rendszerekkel, többek között bennük az embrionális fejlődésre jellemző korai szignálutak szabályszerűen reaktiválódni képesek. Így például az embriogenezis során a túlélés/apoptózis egyensúly beállítását végző Wnt-szignálút reaktiválódása annak célgénjeit, többek közt a c-Met-et, a c-MYC-et, valamint a CD44-et is érinti.



5. ábra: A Wnt-szignálút. (133)

A Wnt-k extracelluláris protein molekulák, melyek membrán receptorokhoz való (Frizzled-receptorok) kötés révén inaktíválják a β -catenin kötését végző komplexet (APC, GSK3 β , axin, CK1). A β -catenin így képes bejutni a sejtmagba és az ún. Wnt-célgénnek aktiválását éri el (5. ábra). Bármely, akár a β -cateninkötő komplexet (APC), akár a Wnt-ligand-receptor kötés rendszerét érintő mutáció, vagy abnormalitás a Wnt-szignál transzdukciós út megváltozását vonja maga után. A Wnt-út effektor rendszerében a szabaddá vált β -catenin más proteinekkel összekapcsolódva jut a sejtmagba ahol transzkripció faktoraként funkcionál. Ilyen „társ molekula” a TCF4 (T-cell factor 4). Ezen utóbbi faktor aktiválódása ismert többek között a colon bazális kriptában található őssejtek szabályozásában, illetve a colorectalis carcinoma kialakulásának egyik kezdeti lépése szintén a TCF-4 aktiválódása. A CD44 génjén direkt TCF-4 kötés hely ismert, emellett a CD44 splicing szabályozásában szerepet játszó gének szintén Wnt/TCF-4 célpontok. Legutóbb a végbélrák kemoterápia-rezisztenciájának hátterében is a TCF-4 szerepét igazolták, mely ismeret nemcsak

betegszelekciós, hanem terápiás aspektusokat is hordoz (58,134). Ismert, hogy a felszabadult β -catenin az E-cadherinhez is képes kapcsolódni, mely „kikapcsolása” révén (valójában az E-cadherint kikapcsoló molekulát, a SLUG-ot aktiválja a β -catenin) a hámsejtek sejt-sejt kapcsolatainak felbomlása, az epithelialis-mezenchimális átalakulás (EMT epithelial-mesenchymal transition) egyik kulcslépése következik be a tumorprogresszió folyamatának egyik iniciációs lépéseként (4,18,135,136).

A legfrissebb, a CD44-gyel, mint funkcionális proteinnel foglalkozó kutatások többségében szintén a Wnt-szignálút tükrében vizsgálják a molekulát (ld. előbb). Mint a Wnt-szignálút reaktiválódásának egyik kulcsfontosságú célmolekulája, a CD44 a legáltalánosabban említett és vizsgált őssejt-markerek egyikévé vált. Ezen tulajdonságára a következő fejezetben részletesen kitérünk.

Szintén e kérdéskörhöz kapcsolódó viszonylag új felfedezés, hogy bár úgy tűnik, a CD44 a karcinogenezisben közvetlenül nem játszik szerepet, inkább mint Wnt target gén felelős a túlélés/apoptózis arányának egy sajátos regulációjáért (5).

Protein szinten mindenesetre a splicing gépezet felpörgésnek jeleként a CD44s membrán-expresszió mellett a CD44 variáns izoformák expressziója a Wnt-szignál út bemeneti jeleként ismert APC mutációval egyidőben jelenik meg az adenoma-carcinoma szekvencia folyamatában.

1.3.7. CD44 – őssejt elmélet – colorectalis carcinoma őssejt, metasztatikus őssejt

Az embrionális őssejtekhez és a szomatikus (pl. intestinalis) őssejtekhez képest a daganat őssejtek bizonyos genetikai hibák sorát hordozzák magukban. Valószínűleg ennek következménye, hogy jóllehet őssejt jellegüket az önmegújító képesség, az anti-apoptotikus jellegzetesség, a proliferációs hajlam, illetve a kemorezisztencia tekintetében megőrizték, a differenciált szöveti kép kialakításához szükséges, organogenetikus potenciált elveszítették. Így a tumor őssejtekből, vagy metasztatikus őssejtekből képződő szöveti elemek a szövet- és szervképzési fenotípus részeként szükséges növekedési, invazivitási, proliferációs korlátokat „nem ismerik” (137). A néhány évtizede már leírt „klonogén sejt” elmélet szépen összhangba hozható az őssejt-elmélettel: a tumoros szövetek sejttömegének csak elenyésző hányadát adó, újabb kolónia képzésére alkalmas sejteit tekinthetjük tumor (illetve metasztatikus)

össejteknek. Hogy egy tumormassza eleve hordoz-e bizonyos arányban őssejteket (metasztatikus őssejteket) vagy bizonyos mikrokörnyezeti faktorok, valamiféle „drive” szükséges a tumorsejtek egy részének fenotípusbeli változásához, klón-szelekciójához, az még jelenleg egyértelműen nem tisztázott kérdés. (Az utóbbi distinkció terápiás szempontból nem jelentéktelen: a sztochasztikus őssejt elmélet alapján a teljes tumor minden sejtje terápiás target, míg a determinisztikus őssejt elmélet igaza esetén elegendő „csupán” az őssejteket céloznia a terápiának).

Az elmúlt évtizedben nagy erőket vetettek be különféle szöveti eredetű tumor őssejtek karakterizálására, azonosítására. A vizsgálatok többnyire génexpressziós chip, immunhisztokémiai reakció-komplexek, valamint FACS sorozatvizsgálatok eredményeként bizonyos sejtmarkerek együttes jelenléte vagy hiánya alapján jellemezték a potenciális őssejteket (pontosabban a sejteknek az őssejteket nagy valószínűséggel magába foglaló, valamivel tágabb körét) (3,81,138,139). Az egyik leggyakrabban szereplő, kolóniaképzést előrejelző markerként, őssejt markerként azonosított sejtfelszíni molekula (glikoprotein) éppen a CD44 (5,140–142). Emlőrák esetén CD44+/ESA+/CD24-; agydaganatok esetén MSI1+/CD44+/CD133+ szintén emlődaganatokban (más vizsgálatokban) a CD44+/CD24-/BRCA1+, vastagbélrákoknál a CD133+/CD166+/CD44+ kombinációt sikerült őssejtmarkerként igazolni (138,140,142–144). Számos funkcionális teszt, kemorezisztencia teszt és kolonizációs próba áll ezen őssejtmarker azonosítási kísérletek mögött, azonban elég csak belegondolni a CD44 molekula számtalan lehetséges (és igazoltan jelenlevő) izoformájába, látható, hogy a „CD44+” tumor jelentése igencsak „átfogó”, „összefoglaló” jellegű.

1.3.8. A CD44 feltételezett szerepe a metastatikus folyamatban

Úgy tűnik tehát, hogy az őssejt-jellegzetességeket produkáló tumorsejtek (jellegzetes fenotípusú tumorsejt klón) dinamikus változó rendszerként először a proliferációs tulajdonságok előtérbe kerülését, majd ezt követően az EMT-t, végül a progresszióért felelős (Wnt-target) gének aktív működését, bekapcsolását (esetleg csupán expressziós aktivitás-ingadozását) képesek bemutatni, illetve funkcionális szinten a jelenséget a tumorban prezentálni.

A metasztatikus összejt-szelekció és dúsulás jelenségéért (illetve ennek eredményeként magáért az áttéti tumor viselkedéséért) a genotípusos jellegzetességeken (genetikai hibák, mutációk, hipermetilált szabályozó régiók stb.) túl számos fenotípusos jellemző, jelenlegi elképzelésünk szerint mikrokörnyezeti hatásra (pl. növekedési faktorok, citokinek, kemokinek stb.) megjelenő tulajdonságok szükségesek. E két faktor együttesen adja a tumor metasztatikus jellegét, illetve a tumor metasztatikus viselkedésének molekuláris hátterét (136,145).

A colorectalis carcinoma esetén részleteiben sikerült feltárni a karcinogenezis (adenoma-carcinoma szekvencia) folyamatát, valamint a jelenség hátterében álló genetikai, illetve epigenetikai elváltozások sorát. Ellenben az áttétképzés szintén – elveiben, sematikusán – jól ismert lépéseinek hátterében álló genetikai jelenségek továbbra is meglehetősen töredezettek. Ezalatt nem az ismeretanyag mennyiségi hiányosságát értjük – rendelkezésre álló adatok tekintetében szinte átláthatatlan mennyiségről beszélhetünk -, hanem egy rendszerszintű, átfogó, a tumor plasztikus-dinamikus viselkedését tükröző modell nem kristályosodott még ki az ismeretanyag-halmazból (146). Az említett dinamikus tumorviselkedés számos kulcsmolekula időben változó, a karcinogenezis- és metasztatikus kaszkád egyes lépései során eltérő arculatot mutató, eltérő funkcionális sajátosságokkal jellemezhető tulajdonságában érhető tetten. Jónéhány ilyen molekulát ismerünk, melyek közül az egyik, az utóbbi évek során az érdeklődés középpontjába kerülő molekula a CD44. Eddig elegendő mértékben fel nem tárt, sokrétű funkcionális jellemzői, a funkcionális gazdagság és változékonyság hátterében álló alternatív splicing jelenségének érzékeny szabályozási rendszere kifejezetten alkalmassá teszi e molekulát a klónszelekciós-, valamint az összejt-modellre egyaránt jellemző rugalmas viselkedésre, alkalmazkodásra, illetve különféle szignálutakban való részvételre. Jelenleg aligha említhető olyan kulcsfontosságú lépés a metasztatikus folyamatban (klónszelekció, EMT, angiogenezis, intravazáció, homing (migráció), extravazáció, kemorezisztencia stb.), melyben ne mutatták volna ki a CD44 valamely izoformájának, illetve sajnálatos módon többnyire inkább egy-egy exonja által kódolt szakaszának szerepét. E sokrétű, ubiquiter megjelenés alapján jelenleg a CD44 intenzív kutatásától nem elsősorban diagnosztikus vagy terápiás célmolekulává válását várjuk, sokkal inkább remélhető, hogy általa a rosszindulatú tumorok metasztatikus

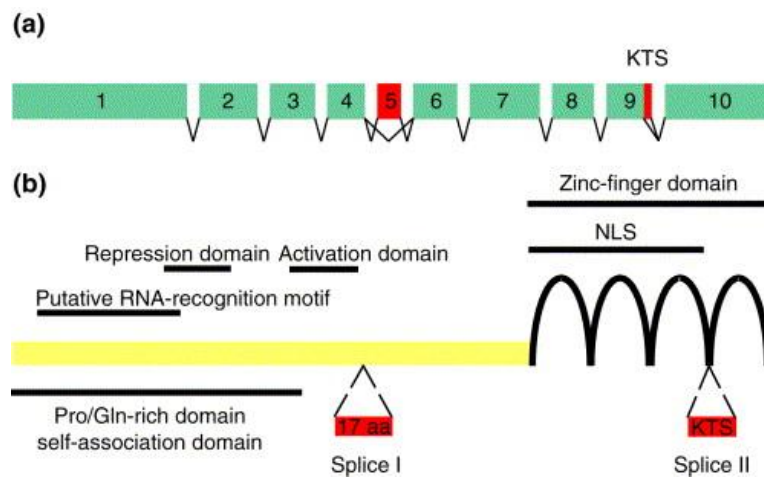
viselkedése, a viselkedési sémák, tehát egy mélyebb rendszer-szintű ismeret képének letisztulása érhető el.

1.4. A Wilms tumor 1 (WT1) gén (147)

1.4.1. A WT1 szerkezete

A humán 11. kromoszómán 11p13 lokalizációban elhelyezkedő WT1 (Wilms' tumor 1) gén egy a normál sejtfejlődésben, embrionális organogenezisben alapvető szerepet játszó proteint kódol.

A gén 10 exont tartalmaz (6. ábra), mely azonban alternatív splicing eredményeként több ismert mRNS izoformává képes átíródni. Az ötös exon skippingje (17AA-) és a 9. exon végén 9 aminosavat kódoló szakasz (KTS-) alternatív illesztése révén, a kettő kombinációjával 4 olyan alternatív splice variáns jön létre (17AA+,KTS+; 17AA-,KTS+; 17AA-,KTS-; 17AA+,KTS-), amelynek funkciójával kapcsolatban már kiterjedt irodalmi adatok állnak rendelkezésünkre. Az N-terminális vég alternatív iniciációja és alternatív transzkripciós starthelyei révén tovább bővül a variánsok száma, annál is inkább, mert azok kombinálódnak az előző variációs lehetőségekkel (148).



6. ábra: A WT1 gén szerkezete: a. mRNS exonjai b. protein. (149)

A WT1 protein számos funkcionális doménnel rendelkezik. Az N-terminális végen transzkripciós aktiváló és gátló doméneket, mRNS-felismerő régiót tartalmaz. A C-terminális végen 4 db Zn-ujj található, melyek DNS-, RNS- és protein-targetekkel rendelkezve számos, egészében ma még fel nem tárt funkciót hordoznak (150).

1.4.2. A WT1 funkciója

1.4.2.1. A WT1, mint transzkripció faktor

A WT1 protein, mint transzkripció faktor, számos gén működésének szabályozásában vesz részt. DNS-affinitása alapján elsősorban a KTS- variánsok működhetnek transzkripció faktorként. A célgének közé sejtnevekedést, anyagcserét, extracelluláris mátrix (ECM) komponenseket meghatározó gének, illetve más transzkripció faktorokat kódoló gének tartoznak (1. táblázat).

1. táblázat: *A WT1, mint transzkripció faktor által szabályozott gének (147)*

CÉLGÉN	HATÁS
NÖVEKEDÉSI FAKTOROK	
Amphiregulin	Aktiválás
Colony stimulating factor-1	Gátlás
Insulin growth factor II	Aktiválás/ Gátlás
Platelet derived growth factor	Gátlás / Aktiválás
Transforming growth factor- β	Gátlás
RECEPTOROK	
Androgen receptor	Gátlás
Epidermal growth factor receptor	Gátlás
Insulin receptor	Gátlás
Insulin growth factor I receptor	Gátlás
Retionic acid receptor α	Gátlás
TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROK	
c-Myb	Gátlás
c-Myc	Aktiválás / Gátlás
Cyclin E	Gátlás
Cyclin G1, IGFBP-4	Aktiválás
P21	Aktiválás
Pax-2	Gátlás
ENZIMEK	
Human telomerase reverse transcriptase	Gátlás
Ornithine decarboxylase	Gátlás
ECM	
E-cadherin	Növekedés
Thrombospondin 1	Gátlás
Syndecan-1	Aktiválás
EGYÉB	
Wnt-4	Aktiválás
Bcl-2	Aktiválás / Gátlás
Erythropoietin	Aktiválás

A transzkripciós szabályozás, mint funkció egy komplex rendszer finomhangolásaként képzelhető el, a WT1 ugyanis mind aktivátor, mind gátló funkciót hordozhat attól függően, hogy aktuálisan milyen szöveti környezetben, milyen differenciáltságú sejtben expresszálódik a WT1 protein, illetve a WT1 protein számos izoformájának egy megfelelő kombinációja.

1.4.2.2. A WT1, mint tumorszupresszor gén

A WT1 gént felfedezésekor egyértelmű ok-okozati összefüggésbe hozták a Wilms tumor kialakulásával. Ma már tudjuk, hogy bár a sporadikus Wilms tumorok mintegy 15%-ában valóban kimutatható a WT1 gén mutációja ezen tumorok többségében a vad típusú WT1 overexpressziója figyelhető meg.

A WT1 mutáció a Wilms tumor mellett komplex szervrendszeri fejlődési rendellenesség szindrómák kialakulásához vezet: WAGR (Wilms tumor, aniridia, genitourinaris rendellenességek, mentális retardáció), Danys-Drash szindróma, Frasier szindróma. Utóbbi két szindróma a 2. vagy 3. Zn-ujjak területén, illetve a KTS régióban bekövetkező pontmutáció eredményei, aláhúzza mindkét régió messzemenő funkcionális jelentőségét.

A WT1 tumorszupresszor hatását számos funkcionális kísérleti tapasztalat igazolja (különbéle szignálok befolyásolása, illetve apoptózis indukció révén (151)).

1.4.2.3 A WT1, mint onkogén

A WT1 gén központi szerepe a karcinogenezisben, illetve a daganatos sejt működés szabályozásában akkor merült fel, amikor a vad típusú WT1 gén overexpresszióját különféle, az urogenitális traktustól független szerv, szövet malignus elváltozásaiban sikerült kimutatni. Ezen elváltozások közé a legkülönbélebb szolid (astrocyta eredetű tumor, csont- és lágyrész sarcomák, agydaganat, emlőrák, vatagbélrák, tüdőrák, nyelvcső laphámrák, fej-nyaki laphámrák, mesothelioma, melanoma, neuroblastoma stb.) (147) és vérképzőszervi (leukaemia) malignitások tartoznak.

Legrészletesebb, funkcionális és terápiás következményekkel járó ismeretek a WT1 onkogenetikai szerepéről a leukaemiák esetében ismert. A normál hematopoietikus rendszer csupán igen alacsony szinten expresszál vad típusú WT1-et (CD34+ sejtek

által). Jelenlegi ismereteink szerint a korai hematopoietikus pluripotens sejtek önreprodukciós képességének fenntartásában van kulcsszerepe a WT1-nek, jóllehet ugyanennek a génnek overexpressziója már ellenkezőleg hat, a kolóniaképzést gátolja.

Akut myeloid leukaemiában (AML) mintegy 15%-ban WT1 mutáns DNS mutatható ki. Bár a leukaemiák többségében emelkedett a WT1 RNS és protein expressziós szint (a normál csontvelői, illetve perifériás vér WT1 expressziójához viszonyítva), az egyes leukaemia altípusok e tekintetben nem egységesek. Ezen kívül nemcsak az egyes leukaemia altípusok közt van WT1 expresszió tekintetében eltérés, hanem ugyanazon altípus (illetve ugyanazon beteg) különféle betegség-fázisaiban is jelentős eltérések igazolhatók (krónikus fázisban alacsony, blasztos krízisben emelkedett WT1 expresszió mutatható ki a perifériás vérben). Mind limfoid, mind myeloid akut leukaemiában a perifériás vérmintákban emelkedett a WT1 mRNS mennyisége, s a kemoterápiás kezelés során az emelkedés szintje rossz prognózissal (rossz kemoterápiás válaszkészséggel) mutat korrelációt. Másként megfogalmazva a WT1 expresszió mind minőség (izofорма), mind mennyiség (expressziós szint) tekintetében az adott daganat jellegzetes *fenotípus* meghatározó jegye. Ennek alapján a WT1 gén (valamint RNS és protein termékei) a daganatos betegség (leukaemia) egyik lehetséges terápiás célpontja lehet. Ezt igazolják az siRNS alapú vizsgálatok is, melyek egyes magas WT1 expressziójú AML sejtvonalak hatékony növekedésgátlását és apoptózis-indukciót produkáltak. A WT1 funkcionális heterogenitását mutatja azonban, hogy más sejtvonalakon ugyanezen kísérletek épp ellenkező hatást mutatnak.

A WT1 transzkripció aktiváló illetve gátló funkciójának háttérében a daganat szöveti, illetve szervezeti környezetének (a hostnak) kulcsfontosságú szerep tulajdonítható. Ennek háttérében nagy vonalakban az alternatív splicing szabályozása (pl. az N-terminális gátló domén alternatív iniciációs pont miatt történő kivágódása a WT1 transzkripció aktivátor funkcióját erősíti), poszttranszkripció modifikációk (pl. Zn-ujj domének foszforiláció által történő funkcionális inaktiválódása), illetve fehérje-fehérje interakciók állnak. Utóbbira igen fontos példa a WT1 protein p53-mal történő fizikai és funkcionális interakciója. A p53 hiányában a WT1 transzkripció faktorként működik (EGR1 konszenzus kötőhelyek), azonban ha a p53 fehérje „beköt” első két Zn-ujjához, ezt a feladatát nem képes ellátni. Tekintve az általa szabályozott gének számát és

változatos funkcióját, ez igen bonyolult és számos kimenetet eredményező hatáshoz vezethet, amely természetesen újfent nagyban függ a sejt funkcionális állapotától és a szöveti környezettől. Másrésztől azonban maga a WT1 (RNS-affinitás alapján elsősorban annak is a KTS+ splice variánsai) is hatékony poszttranszkripciók modifikátor. Az RNS-kötés kapcsán a WT1 pontos szerepe jelenleg még nem tisztázott, feltehetőleg meghatározott RNS formák stabilizálását, illetve destabilizálását végzi, s ezáltal részt vehet más gének splicing-szabályozásában. Erre utalnak az immunkolokalizációs tesztek, valamint a WT1 közvetlen együttműködése az U2AF65 splicing faktorról a sejtmagban (150,152). Végül meg kell említeni, hogy a WT1 onkogén sajátosságai szoros kapcsolatban állnak a KRAS szignálúttal: a WT1 és a szöveti hipoxia a KRAS-dependens sejtciklus kontrollra szinergikus stimuláló hatással vannak (153).

1.4.3. A WT1 szolid daganatokban

Különböző szolid daganatokban sikerült a WT1 változatos izoformáit, illetve azok overexpresszióját kimutatni.

Hogy ezen malignus tumorokban a WT1-nek, a tumor iniciációjában vagy progressziójában van inkább szerepe, egyelőre nem eldöntött kérdés.

Emlőrákban (*in vitro* modellkísérletekben) a WT1 egyes izoformái (17AA-/KTS-) a p21 gén aktivációja által proliferációs gátló hatást eredményeznek, míg más izoformák (17AA+/KTS+) az E-cadherin citoplazmatikus redisztribúciójával együttjáró epitéliális-mezenhimális átalakulás (EMT) indukciójában játszanak szerepet (154,155).

Prosztatarákban a WT1 overexpresszió a tumor progresszív stádiumában mutatható ki (156).

Végül az e dolgozat fő témáját adó vastagbélrákokban a WT1 szintén mind mRNS, mind protein szinten overexpresszálta a normál vastagbél nyálkahártyához képest (157). A vastagbélrák karcinogenezise során egy sor tumorszupresszor és onkogén szerepét ismerjük (p53, TGF β , EGFR stb.), melyek regulációjában a WT1-nek, mint transzkripciók modifikátornak ismerten szerepe van. Ilyen értelemben, mint központi jelentőségű, „karmester” funkcióval rendelkező, szabályozó fehérje, potenciális terápiás

célpontként merül fel. Ezt az elvet követve *in vitro* WT1-specifikus citotoxikus T-sejtek segítségével WT1 overexpresszáló vastagbélrák sejtvonalak lízise volt elérhető (158).

Legújabbban a WT1 gén központi regulátor szerepét igazolták a sejt homeosztázisának fenntartásában, valamint a mesenchymalis-epithelialis átalakulás (MET) és az epithelialis-mesenchymalis átalakulás (EMT) folyamatában különféle mezodermális szövetek esetén. A WT1 kiesése, kiütése EMT-t indukál, máskor éppen ellenkezőleg, a szöveti mikrokörnyezet függvényében éppen MET-t (155). Az alternatív splicing befolyásolásán túl ezen a ponton kapcsolódik szorosan össze a CD44 és a WT1 szerepe az áttétképzés molekuláris háttérében.

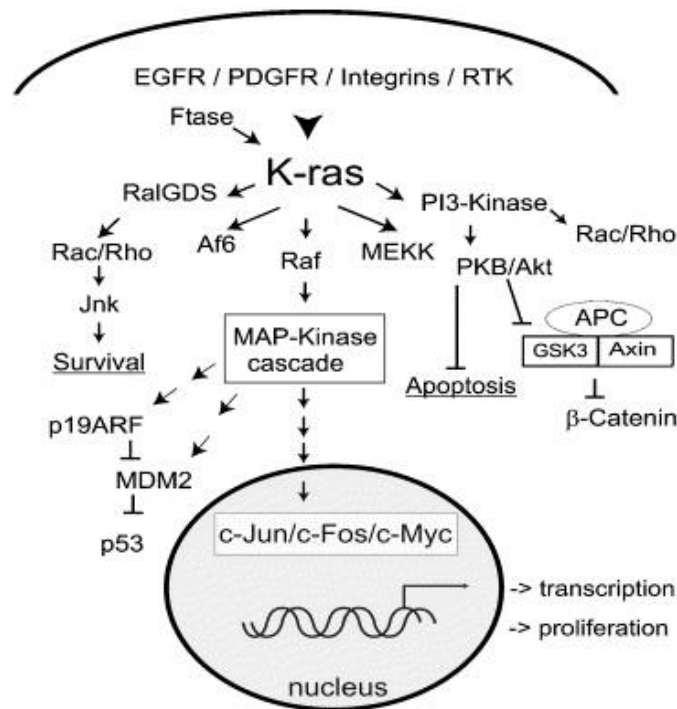
1.5. A KRAS gén és protein

A Ki-ras2 (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) egy 21kDa-os protein (p21), melyet a 12p12.1 lókuszon elhelyezkedő KRAS gén kódol. A KRAS egy géncsalád, a Ras szuperfamilia tagja. Ide tartozik még az NRas (Neuroblastoma Ras Viral Oncogene Homolog, 1p13.2 lókuszon), a HRas (Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog, 11p15.5 lókuszon), valamint a 19q13.3 lókuszon kódolt RRas (Related Ras Viral Oncogene Homolog), illetve a proteint nem kódoló KRAS1 pszeudogén (6p12-p11).

A Ras-gének mindegyike 21 kDa méretű proteint kódol, melyek aminosav-szekvenciában és szekunder-tercier szekvenciában is nagymértékben homológok egymással. Bár (emlősökben) minden sejtben expresszálódnak, expressziós szintjük, illetve mintázatuk a sejtek differenciáltságától, normál illetve tumoros jellegétől függően eltéréseket mutat.

Funkcionális szempontból a RAS proteinek a G-fehérjék családjába tartoznak. A sejtműködés szempontjából esszenciális jelentőségű KRAS2 gén fehérjeterméke (melynek két izoformája, splice variánsa ismert, a KRAS-a és KRAS-b) az intracelluláris jelátviteli folyamatok egyik legalapvetőbb csomópontját jelenti. Számos extracelluláris jel (növekedési faktorok (EGF, TGF β , PDGF stb.), citokinek, hormonok stb.) sejt felszíni receptora a KRAS protein stimulálása által indít intracelluláris szignálutat. Leszálló (downstream) jelátviteli utak tekintetében a KRAS hasonló változatosságot mutat (RAF, PI3K, MEKK, AF-6, PKC-gamma stb.) (7. ábra). Ennek alapján a „KRAS-szignálút” a normál sejtműködés számos területében játszik központi

szerepet (sejt-sejt kapcsolat, transzkripció, transláció, apoptózis, progresszió) (159), azaz egyazon upstream jelút a KRAS-on keresztül számos alternatív jelútra vezethet.



7. ábra: Szignálutak, amelyben a KRAS is szerepet játszik (160)

Amint korábban már megemlítettük, a KRAS aktiválása (akár külső szignál, akár mutáció révén) többek között a CD44 alternatív splicing gépezetét is aktiválja, mely egy pozitív visszacsatolási hurkon keresztül visszahat magának a KRAS-nak az aktivitására is oly módon, hogy a v6 tartalmú variánsok upregulációja koreceptorként növekedési faktorok sejtfelszíni dokkolását segíti elő (129).

1.5.1. A KRAS, mint onkogén

A rosszindulatú daganatok képződésének hátterében igen gyakran meghatározott genetikai változások, kulcsfontosságú génmutációk azonosíthatók. Ezen gének, ún. protoonkogének mutálódva „aktiválódnak”, onkogénné alakulnak.

A RAS-gének családja onkogénként számos tumortípusban mutatható ki: a KRAS mutáció pancreas-, colorectalis-, illetve tüdő adenocarcinómákban, NRAS akut myeloid leukaemiában, HRAS mutáció pedig bőrrákban és fej-nyaki laphámrákban mutatható ki,

jóllehet ok-okozati összefüggést a KRAS mutáció és a karcinogenezis között nem sikerült kimutatni (161).

A KRAS gén mutációja és a daganatképződés között kapcsolat elsőként dohányzó betegek tüdő adenocarcinómája esetén merült fel (162), azóta tudjuk, hogy az összes malignus daganat mintegy 30%-ában detektálható ez a genetikai eltérés. Vastagbélrákok esetében aktiváló KRAS mutációt az esetek mintegy 40-50%-ában lehet kimutatni. A Vogelstein-féle adenóma-carcinoma szekvenciát tekintve igazolható, hogy a KRAS mutáció a karcinogenezis során már az adenómákban is kimutatható. Ezen mutációk többségében jól meghatározott codonok, ún. mutációs forró pontok érintettek. Pontmutációt vastagbélrákban szinte kizárólag a 12-es, 13-as, illetve 61-es codonon találunk (84%, 15%, illetve <1%-ban). Mutáns KRAS gén esetén a protein termék GTP-áz aktivitásáért felelős domén konformációjának megváltozása miatt a fehérje folyamatosan „bekapcsolt” állapotban van, leszálló szignálútjai (többek közt a sejtproliferációért felelősek is) folyamatosan aktívak (163).

1.5.2. A KRAS mutáció jelentősége a vastagbélrák terápiájában

A vastagbélrákok terápiájában ugyan a hagyományos kemoterápiás kombináció (5-fluoro-uracil, leukovorin) igen jó hosszútávú túlélési eredményt biztosít, távoli áttétes daganatokról (platina-származékkal, oxaliplatinnal, illetve irinotecannal kiegészítve sem) ugyanez nem mondható el. Újabb reményt a 2000-es évek elejétől egyre szélesebb körben bevezetett ún. biológiai, célzott terápiás módszerek megjelenése jelentett. Vastagbélrákok esetében a daganatok egy részében overexpresszáldó, a malignus sejtproliferáció fenntartásában nagy szerepet játszó EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) ellenes, valamint a neoplasztikus neoangiogenezisben szerepet játszó VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor) ellenes monoklonális antitest terápia jelent meg első lehetőségként a targetált terápiák sorában. A korai tapasztalatok azonban az anti-EGFR terápiát az esetek jelentős részében hatástalannak találták (80-90%), s az utóbbi évek nagy klinikai vizsgálatai igazolták, hogy a korábbi elméleti megfontolásoknak megfelelően a terápia-rezisztens betegcsoport és a KRAS mutáns tumorral rendelkező betegcsoport jelentős átfedést mutat egymással. A KRAS szignálút további elemei, mint a BRAF mutációja, az esetek egy kisebb hányadában azonosíthatók a terápia-rezisztencia hátterében. Ennek alapján a KRAS mutációs státus

ismerete alapvető jelentőségű a vastagbélrákok esetében: az említett colorectalis carcinoma altípusok egyik fontos besorolási szempontja, mely mind prognosztikai, mind prediktív, terápiás konzekvenciákkal jár (164,165).

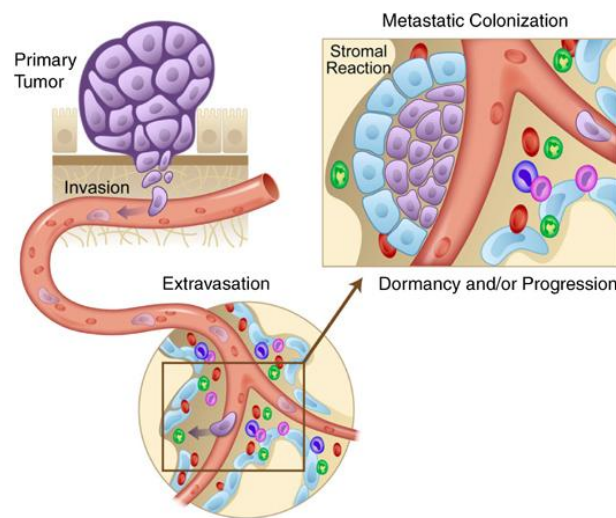
Számos, máig megnyugtatóan meg nem válaszolt kérdés vetődik azonban fel a biológiai terápia tervezése kapcsán. Ismeretes, hogy a KRAS mutációs státus sem egy adott beteg colonjának különböző szakaszain, sem egyazon beteg több adenomájának összevetésekor, sem pedig ugyanazon tumor különböző részein nem feltétlen mutat homogén eloszlást. A vad típusú és mutáns neoplasztikus sejtek aránya, illetve eloszlása így mind az egyes daganatos elváltozásokon belül, mind az egyes primer daganatos képletek között, mind pedig a primer és áttéti tumorok vonatkozásában eltérést mutathat. Ez a klonális heterogenitás kritikus kérdéssé egy adott (távoli áttétet hordozó vastagbélrákos) beteg terápiájának tervezésekor válik. Nincs ugyanis ezidáig elegendő kísérleti, klinikai tapasztalat arra vonatkozóan, hogy mely eljárással, milyen diagnosztikus érzékenységi igényrel, s milyen vad/mutáns klón arány szintjén húzható meg biztonsággal a terápiára érzékeny, illetve várhatóan rezisztens prognosztikus küszöb (166). Hasonlóképp tisztázatlan, hogy DNS, RNS vagy protein szinten vizsgálva prognosztizálható leghatékonyabban a terápia sikere (utalunk itt a különféle Ras-típusok nagy mértékű homológiájára, beleértve a KRAS pszeudogénjét is), illetve a diagnosztikus eszközök és technika standardizálási nehézségei szintén nehezítik a diagnosztikus eredményeknek a klinikai eredményekkel való valószínű összevetést.

A jelenlegi gyakorlat szerint a primer tumor fagyasztott, vagy gyakrabban FFPE mintájának egy tumorsejtekben megfelelően gazdag területéről izolált DNS mutációanalízise (direkt szekvenálás v. RFLP) alapján történik a beteg mutációs státusának vizsgálata, mely az áttéti daganat anti-EGFR terápiára való érzékenységét valószínűsíti, illetve az igen költséges terápiát a beteg számára engedélyezhetővé teszi. (A mutáció kimutatása a beteg számára az anti-EGFR terápia lehetőségét kizárja.) Az alkalmazott diagnosztikus eljárás érzékenysége tehát a mutációs státus diagnózisának korlátja (jelenleg direkt szekvenálás esetén kb. 5% mutáns allél) (167).

1.6 Keringő tumorsejtek jelentősége a vastagbélrák áttétképzésében

Régi törekvés az onkológiai alap- és klinikai kutatásban a malignus daganatos betegség progressziójának minél precízebb, korai detektálása. A daganat malignus jellegének definíció szerinti velejárója az áttétképzésre való hajlam. A progresszió stádiuma, annak pontos ismerete a daganatos beteg terápiája szempontjából alapvető fontosságú. Jelenleg képalkotó eljárásokkal (CT, MRI, PET), valamint a regionális nyirokcsomók szövettani vizsgálatával (colorectalis carcinoma esetén minimum 12 megvizsgált nyirokcsomó alapján történő N-stádium meghatározással, illetve a klinikai kutatási szinten levő sentinel nyirokcsomó biopsziával) történik a stádium meghatározás.

Az egyik ígéretes, attraktív elképzelés a már a primer tumorból „kijutó”, azaz az intravazáció stádiumán túllépő daganatos sejtek kimutatása. (8. ábra) Általánosságban elmondható, hogy a szervezetben több helyen lehet ún. disszeminált tumorsejtet keresni és detektálni.



8. ábra: *A metasztatikus kaszkád vázlatosan (168)*

A leggyakoribb disszeminációs célszerv a csontvelő és a vér. Jóllehet tudjuk, hogy daganatos sejtek azonosítása a keringési rendszerben önmagában nem ekvivalens távoli áttétek meglétével (169,170), azonban jogosan felvethető kérdés, hogy klinikailag azzal elegendő statisztikus koincidenziát mutat-e, azaz diagnosztikus effektivitása az említett „korai” áttét diagnosztikáját javítja-e.

A több mint 50 éve Engell által leírt keringő tumorsejtek (171) a sejtszeparálási, immundiagnosztikai, valamint nukleinsav-detektálási technológia fejlődésével „könnyen” azonosíthatóvá váltak (172,173). Tisztán a fenti statisztikai szempontokat célul tűzve a diagnosztikai „iparban” keringő tumorsejtek (CTC) számlálására alkalmas rendszerek jelentek meg (174). Egyebek között diagnosztikus effektivitását nagy esetszámú tanulmány keretében különböző stádiumú (TNM) vastagbélrákos betegen is tesztelték (175–177). Eredményeik szerint 7,5 ml vizsgált vérben detektálható 3-5 CTC küszöbérték felett rossz túlélési prognózis, magas metasztázis esély adható meg. Az eljárás igen drága, tisztán statisztikai szemléletű, prognosztikai és prediktív célokat szolgál. Ez önmagában azt is jelenti, hogy a „kifogott” CTC-k kvalitatív jellemzőinek értékelésére nem alkalmas, illetve jelentős fals pozitív (pl. keringő egyéb epithelialis sejtek) eredménnyel jár.

Egyre jelentősebb szakirodalom foglalkozik az utóbbi években az azonosítható CTC-k minőségi jellemzésével (178–180). Munkacsoportunk melanomákkal végzett állatkísérleti modellben igazolta, hogy a CD44v3 és CD44v6 variábilis exonokat hordozó izoformák összegzett mennyisége a keringő tumorsejtekben drámaian megemelkedik (181).

Vastagbélrákos betegektől nyert keringő tumorsejtekben a célzott terápia tervezése szempontjából jelenleg leginkább releváns EGFR/KRAS/BRAF szignálút elemeinek mutációs mintázatában jelentős heterogenitás mutatkozott áttétet hordozó és makroszkópos áttéttel nem rendelkező esetekben egyaránt. Egyéb klinikai mutatókkal való korrelációt azonban nem tudtak megfogalmazni (180).

DNS microarray eljárással valószínűsíthetővé vált néhány gén overexpressziójának áttétképzéssel való összefüggése, de ennek klinikai jelentőségét még nem igazolták (178,182,183).

Érdekes szempont és kutatási irány a keringő tumorsejtek „túlélési” potenciáljának vizsgálata a keringési rendszerben. Ezen kutatási irányvonalba vág a metasztatikus potenciállal bíró tumorsejtek „trombocita mimikri” jelenségének leírása (184). Lényegében trombocitákra jellemző sejtfelszíni receptor (α IIb β 3 integrin) és egyéb fehérje/glikoprotein markerek tumorsejteken való megjelenése a trombociták

aggregációjára jellemző képesség hordozására, ennek megfelelően egy trombocita burok, mint védőburok képzésének képességére utal.

Hasonló „mimikri” tulajdonság lehetősége vetődik fel az eredetileg limfocita „homing” receptorként leírt CD44, pontosabban bizonyos izoformáinak (ld. később) keringő tumorsejtekben kimutatható overexpressziója háttérében.

Meg kell jegyezni, hogy a keringő tumorsejtek relatív ritkasága (~5 db / 7,5 ml vér, azaz a nukleáris sejtpopulációban arányuk kevesebb, mint 1:1millió) mellett ezen kevés sejtnak is csupán töredéke ad ténylegesen áttétet (185,186). A jövőbeli kutatás iránya a CTC sejtpopulációból a valódi áttétképzésre alkalmas sejtek kiválasztása. Ez egyszerre mind a „metasztatikus” tumorsejt jellemzését, áttételesen az áttétképzés folyamatának részleteiben való értelmezését feltételezi, s újabb szűrési, prognosztikus és terápiás célpontok megismeréséhez vezethet.

2. Célkitűzések

- Elsődleges célunk egy olyan állatkísérleti modellrendszer megtervezése, összeállítása és tesztelése volt, mely a vastagbélrák áttétképzésében résztvevő gének vizsgálatára alkalmas.

A modellrendszerrel szemben elvárásunk volt, hogy segítségével választ kaphassunk olyan kérdésekre, mint hogy egy adott gén, vagy gének egy csoportja a bonyolult metasztatikus eseménysor mely fázisában vállal funkciót; lehetőséget adjon a primer tumorban, annak áttétében, illetve lehetőség szerint a két végpont közötti szakaszon (keringő tumorsejtek, nyirokcsomó áttétek szintjén) végbemenő molekuláris biológiai események differenciálására.

- Célul tűztük ki e modellrendszer segítségével, mintegy annak gyakorlati tesztjeként,
 1. a primer és áttéti tumor terápiás érzékenysége közötti különbség vizsgálatát a klinikumban használt terapeutikumok segítségével
 2. a CD44 alternatív splice variánsai expressziós mintázatának vizsgálatát humán colorectalis tumorok progressziója során. Kontrollként, párhuzamosan egy másik, szintén számos alternatív splice variánssal rendelkező, a colorectalis tumorokban *de novo* expressziót mutató gén, a WT1 szolgált különös tekintettel annak, a munkacsoport által leírt új alternatív splice variánsára.
 3. valamint vizsgálni kívántuk azt az aktuális klinikai relevanciával is bíró, máig nyitott kérdést, miszerint a colorectalis primer tumor KRAS mutációs státusa megfelelően reprezentálja-e az áttét mutációs státusát.

3. Módszerek

3.1. Állatkísérleti modell-rendszer

3.1.1. Graft-rendszerek

Kétféle tumorimplantációs rendszerrel dolgoztunk: izo- és xenograftokkal.

Izograft rendszerünkben Balb/C egereket oltottunk be szintén Balb/C egerekben indukált (izo) C26 colorectalis carcinoma sejtuszuspenzióval (preparálási protokollját ld. később). Többféle lokalizációba történt implantáció: ortotopikusan (coecum bélfalba), heterotopikusan (lépbe, subcutan). Izograft rendszerben az implantált tumorsejtek a „hostba”, mint immunológiailag „megengedő” közegbe kerülnek. A daganatsejtek „fiziológiás” működése, beépülése, beereződése érdekében, illetve kilökődésének megakadályozására immunszuppresszióra nincs szükség.

Xenograft rendszerként a C57B1/6 egerekben létrejött *scid* (severe combined immunodeficiency) mutációt hordozó (B6;129S7-*Rag1*^{tm1Mom}/J) állatokba *humán* tumorsejt szuszpenziót implantáltunk (HT25, HT29, HCT116).

Implantációra minden esetben 5×10^3 - 10^4 sejtszámú egysejt-szuszenziót használtunk.

3.1.2. Implantálandó egysejt-szuszenzió preparálása

Implantációra C26, HT25, HT29 és HCT116 colorectalis tumorsejt tenyészeteket használtunk. A konfluens tenyészetet EDTA-val mostuk, majd tripszin-EDTA-val leválasztottuk a sejteket az edényről és egyben megszüntettük a sejt-sejt kapcsolatokat is. A sejteket FCS-mentes RPMI-1640 médiumban reszuszpendáltuk, Bürker-kamrában a sejtszámot és a sejtek viabilitását ellenőriztük, majd a célkoncentrációt beállítottuk.

3.1.3. Állatok műtéti kezelése

Minden tumorimplantációt intraperitonealis Nembuthal (70 mg/kg) altatásban végeztünk. Mind a *scid*, mind a Balb/C egerek tumorimplantációjára kifejlett, ivarérett korban (nemtől függően nagyobb, mint 18-20 g-os testtömeg) került sor.

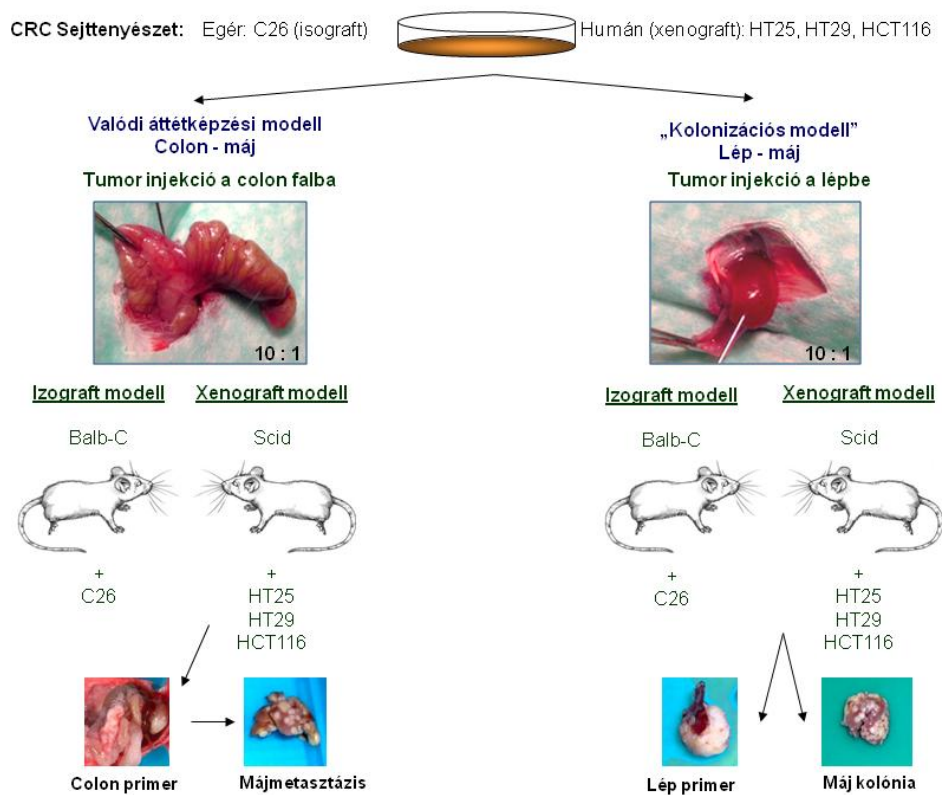
Centrális vér nyérésekor (thoraco-laparotomia végzésére) ugyanezen altatási protokollt alkalmaztuk.

A kísérletek terminálására 8-12 héttel a tumor implantációját követően túlaltatás útján került sor, melyet azonnali autopsia követett.

Állataink kezelése a hatályos törvényi és bioetikai elvek szigorú betartásával történt. (TUKEB 83/2009)

3.1.4. Modellrendszerek

3.1.4.1. Májmetasztázis modellek (9. ábra)



9. ábra: *Komplex állatkísérleti modellrendszer: izo- és xenograft colorectalis carcinoma májáttétképzési modelljei orto- és heterotopikus tumorimplantációval izo- és xenograft tumorokkal.*

Ortotopikus implantációból származó „valódi” áttétképzés

Nembuthal altatásban felnőtt egereken haránt hasfali metszést ejtettünk, majd az előemelt, jól azonosítható coecum falába (subserosusan) 5×10^4 sejtet tartalmazó tumorsejtszuspenziót implantáltunk. A szúrcsatornát 2x2x2 mm-es fibrinszivaccsal (Gelaspon® - Germed) zártuk. A hasfalat egy rétegben, felszívódó (3/0 Vicryl) öltéssel összevarrtuk.

8-12 héttel az implantációt követően autopsziát végeztünk, amelynek során a primer tumorokat, valamint a májjáttéteket eltávolítottuk. A minták további kezelése a várható kiértékelési technikáktól függően többféle módon történt. Szövetteni vizsgálatra 4%-os puffert formalinban fixáltuk, majd a szokásos módon paraffinba ágyasztuk őket. Immunhisztokémiai vizsgálatra folyékony N₂-ben hűtött izopentánba merítettük, majd -80 °C-on tároltuk feldolgozásig. Molekuláris biológiai vizsgálatokhoz (elsősorban azRNS-alapú munkákhoz) az előbbi módon vagy alternatívaként TRI Reagent™ – ben (Sigma®) -20°C-on tároltuk el.

Ortotopikus implantációt párhuzamosan végeztünk izo-(Balb/C) és xenotranszplantációs (*scid*) modellekben.

Heterotopikus implantáció a lépbe – máj kolonizáció:

Nembuthal altatásban colorectalis carcinoma sejtszuspenziót (5×10^4 sejt/0,05 ml) implantáltunk a kísérleti állatokba oly módon, hogy a lép vetületében ejtett haránt hasfali metszést követően a tűt a lép hossz tengelyével párhuzamosan vezettük be az izolált szervbe, majd annak óvatos kihúzását követően a szúrcsatornát Gelaspon®-nal zárva meggátoltuk a vérzést, illetve a tumorsejtek hasüregi szóródását. A hasfalat 3/0 Vicryl öltéssel egy rétegben zártuk.

8-12 héttel az implantációt követően autopsziát végeztünk, a primer léptumorokat, valamint a májban látható kolóniákat eltávolítottuk, és a mintákat az ortotopikus implantációnál felsorolt módokon eltároltuk.

Heterotopikus implantációt párhuzamosan végeztünk izo-(Balb/C) és xenotranszplantációs (*scid*) modellben.

3.1.4.2. A „host” szerepének vizsgálata az áttétképzésben – felnőtt/újszülött modell

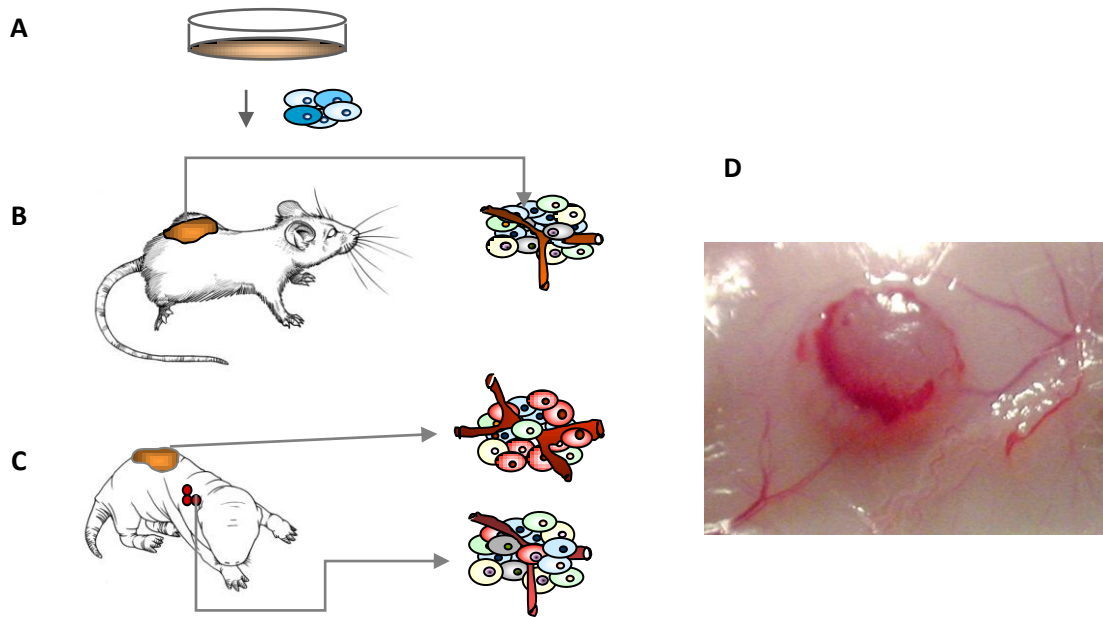
A tumor mikrokörnyezetnek, tágabb értelemben a „host” szervezetnek az áttétképzésben játszott szerepe vizsgálatára egy komplex kísérleti modellrendszert alakítottunk ki (Dr. Rásó Erzsébet tervei alapján) (10. ábra).

Nembuthal altatásban subcutan tumorsejteket implantáltunk párhuzamosan felnőtt és újszülött *scid* egerekbe. Minden egyedbe azonos (!) sejtszuszpenzióból azonos sejtszámot implantáltunk azonos lokalizációba (lumbaris régióba subcutan). Különbség a két kísérleti kar között csupán a host életkorában volt.

Implantátumként a három humán colorectalis carcinoma vonalat (HT29, HT25, HCT116) használtuk.

Az implantációt követő 28. napon az egereket túlaltattuk és autopsziát végeztünk. A felnőtt egyedek egyike sem produkált a primer tumoron túl távoli áttétképzést (0%), míg az újszülöttek mindegyike (100%) a primer tumoron túl tüdőáttétet képzett, melyet hagyományos szövettani feldolgozással (HE festéssel) igazoltunk.

A primer és metasztatikus tumorszövetekből a további molekuláris biológiai vizsgálatok számára totál RNS-t izoláltunk.

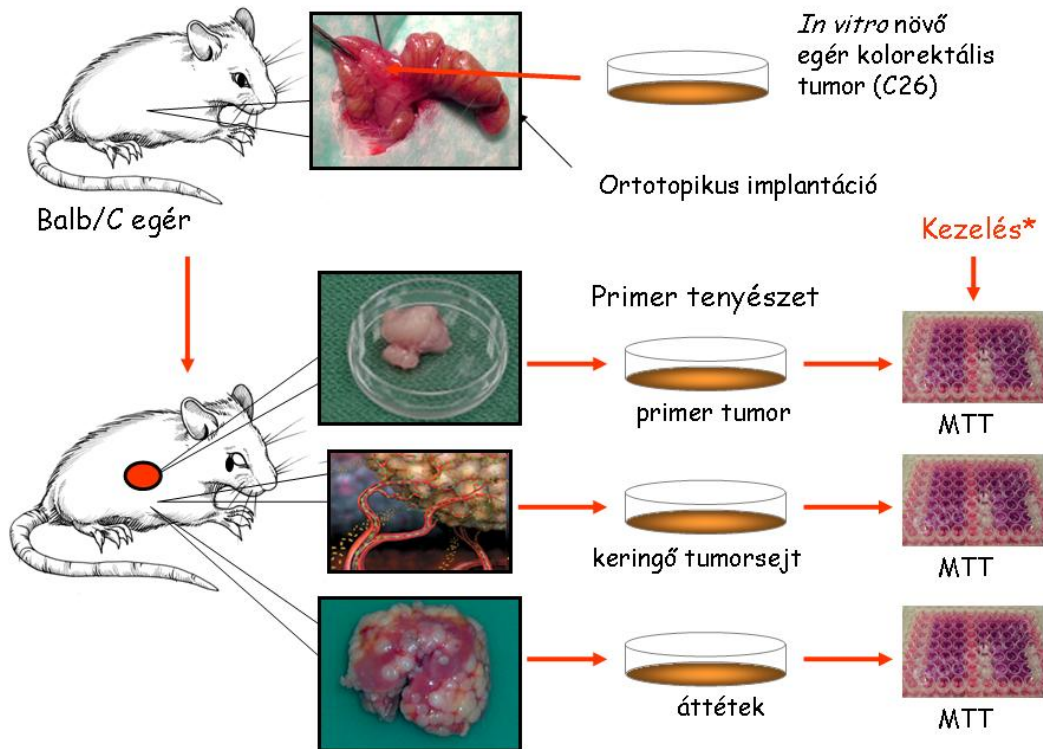


10. ábra: Kísérletes állatmodellünkben egyazon sejtenyészetből származó szuszpenziót (A) injektálunk felnőtt (B) és újszülött (C) scid egérbe. Primer tumor (D) mindkét esetben, míg tüdőáttét csak az újszülött egérben fejlődik (Rásó E)

3.1.4.3. Keringő tumorsejtek vizsgálata (CTC) (11. ábra)

Felnőtt Balb/C egérbe ortotopikusan (vastagbél falba) C26 sejtsuszpenziót (5×10^4 sejt/0,05 ml) implantáltunk Nembuthallal történő altatásban. 28 nappal később ismételt anesztéziában centrális vérmintát (szív direkt punkciója útján) vettünk, majd túlaltatást követően primer tumorból, nyirokcsomóáttétből és májáttétből sejtenyészeteket indítottunk. (Ld. fent)

A konfluenssé váló, fenttartható tenyészetek lehetőséget adtak MTT proliferációs tesztek elvégzésére valamint különféle kemoterápiás szerekkel, illetve biológiai válaszmódosító szerekkel való kombinált kezelést követően a primer és áttéti tumorok terápiás válaszkészségének összehasonlító vizsgálatára.



11. ábra: *Keringő tumorsejtek, valamint a áttétképzés különböző fázisaiból képzett sejtenyészetek kemorezisztencia tesztjének vázlatos felépítése.*

3.2. Sejtenyésztés

3.2.1. Sejtvonalak és tenyésztési körülmények

Három, genetikailag különböző humán colorectalis carcinoma sejtvonalat (HT25 – M. Hendricks, Iowa; HT29 – ECACC 91072201; HCT116 – ICLC HTL95025), egy egér colorectalis carcinoma sejtvonalat (C26 – Balb/C Colon26 – indukált carcinoma – ATCC, USA), valamint négy további neoplastikus sejtvonalat (MCF7 – humán emlőcarcinoma vonal – ATCC HTB-11; A431 – humán vulva laphámrák eredetű sejtvonal – ATCC CRL 1555; HT199 – humán malignus melanoma sejtvonal – a Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. sz. Patológiai Intézetében izolálva (Dr. Ladányi A., Ádám Attila)) használtunk kísérleteinkhez. A sejteket 10% FCS (fetal calf

serum, Sigma, St.Louis, MD) és 1% Penicillin/Streptomycin tartalmú RPMI 1640 mediumban 37 °C-on 5% CO₂ atmoszférában tenyésztettük.

Az *in vivo* kísérletekhez a konfluens tenyészetekből EDTA-val történő mosást, majd tripszin-EDTA-val (SIGMA) történő emésztést követően egysejtszuszpenziót hoztunk létre. Az előzetes kísérleti tapasztalatok alapján meghatározott optimális sejtszámot Bürker-kamrában történő sejtszámlálást követően FCS-mentes RPMI 1640 médiummal történő hígítással állítottuk be.

Colorectalis carcinoma vonalaink genetikai jellemzőit a tumorbankok ismeretanyaga alapján a 2. táblázatban foglaltuk össze.

3.2.2. Tenyészetek indítása *in vivo* modellből

Az *in vitro* tenyésztett vonalak *in vivo* implantációt követő változásainak nyomonkövetésére a tumor különböző lokalizációiból (subcutan, vastagbél és lép primer tumor, májáttétek és kolóniák, keringésből származó tumorsejtek) primer tenyészeteket hoztunk létre.

Keringő tumorsejtek tenyésztésére perifériás vérmintát a kísérletek végső kiértékelése során az altatott állat (Nembuthal 70 mg/kg i.p.) szívéből direkt punkcióval nyertünk EDTA-val történő véralvadásgátlás mellett. A nyert vérmintát 96-lyukú sejttenyésztő plate-re (Orange Scientific) osztottuk el steril feltételek mellett (100 µl/lyuk). 24 órás inkubációt követően a felülúszót elöntve, EDTA-val (Versene® (EDTA) 0,02% – Lonza) történő mosást követően a letapadt sejtekre 10% FBS-t (SIGMA) és 1% penicillin-streptomycint (SIGMA) tartalmazó RPMI 1640 (Lonza) tenyésztőfolyadékot pipettáztunk.

2. táblázat: *A kísérleteink során vizsgált sejtvonalak eredete és az irodalomból ismert molekuláris biológiai sajátosságai.*

Sejtvonal	Tulajdonság	Eredmény /Ref
HT29 (44 éves europid nő colon adenocarcinómájából izolálva)	MSS KRAS CEA CD4 galaktóz ceramid p53 c-Met	12-codon mutáció pozitív negatív pozitív overexpresszió, mutáns trunkált β-lánc
HCT116 (férfi colon adenocarcinómájából izolálva)	MSI-H PI3K KRAS CEA TGFβ1,2	MLH1 mutáns mutáns (Jhaver et al., 2008) 13-codon mutáció pozitív pozitív pozitív
HT25 (humán colorectalis sejtvonal)	c-Met	overexpresszió
C26 Indukált Balb/C izograft CRC vonal	KRAS	12-es codon mutáns

A különböző lokalizációból származó *tumorfragmentumokat* fiziológiás sóoldattal történő mosást követően 0,5x0,5x0,5 mm-es darabokra vágtuk, majd azokat 6 lyukú tenyésztő plate-re (Orange Scientific) szélesztettük tápfolyadék (RPMI 1640, 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin) segítségével.

48 órás 37 °C-os inkubációt követően a mediumot elöntöttük, majd 0,02% EDTA-val történő óvatos mosással eltávolítottuk az elhalt szövetdarabokat és a letapadt sejtekre friss tápfolyadékot pipettáztunk. A sejtek passzálását első alkalommal konfluens stádiumban végeztük el.

3.2.3. Tenyésztés különböző mátrixokon

Sejtproliferációs (MTT-teszt, ld. később) és génexpressziós (qPCR teszt, ld. később) vizsgálatok céljából humán colorectalis sejttenyészeteket különféle protein/glikoprotein mátrix alapokon tenyésztettük.

Az eljárás lépései röviden: fibronectin (FN), laminin (L), kollagén IV. (K), hyaluronsav (HA), valamint matrigel (MG-humán bazálmembrán kísérletes analóg) 50-50 µg/ml koncentrációjú 0,9%-os NaCl oldatát, valamint kontrollként 0,9%-os NaCl oldatot 96-lyukú (MTT-teszt), illetve 6-lyukú (génexpressziós vizsgálat) plate-re vittük fel, majd 3 órát inkubáltuk szobahőmérsékleten. A felülúszók eltávolítása után a vizsgálandó tumor egysejtszuspenziójából minden vizsgálati lyukba azonos (MTT teszt esetén 10^3 , expressziós teszt esetén 10^4) sejtszámú frakciót vittünk fel és azokat tápfolyadék (RPMI 1640, 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin) jelenlétében (a kísérlet jellegétől függően) szubkonfluens/konfluens stádiumig tenyésztettük.

3.2.4. Tenyésztett humán colorectalis sejtek terápiás érzékenységének vizsgálata

Különböző anyagok *in vitro* hatását követtük nyomon a tenyészetben lévő sejtek proliferációs aktivitásában és többféle gén expressziójában bekövetkező változás segítségével. Ennek alapja minden esetben a letapadt sejtpopuláció volt, amelyet megfelelő mintázat (koncentráció és időtartam) szerint kezelhetünk. Ehhez a tumor egysejtszuspenzióját 96-lyukú plate-re lyukanként 10^3 , 24-, illetve 6-lyukú tálcára lyukanként 10^4 sejtszámmal szélesztettük. 3 órás standard tenyésztési körülmények közötti inkubációt követően a le nem tapadt sejteket RPMI1640-nel lemostuk, a letapadt sejteket további 24 órán keresztül friss tápfolyadékban (RPMI-1640, 1% penicillin-streptomycin, 10% FCS) tenyésztettük.

Balb/C egérbe ortotopikusan implantált izograft (C26) colorectalis carcinoma primer (P), nyirokcsomóáttét (N), májáttét (M), valamint centrális vérmintáiból (C) készített sejttenyészetek egysejtszuspenzióit a fenti, a colorectalis carcinomák rutin klinikai terápiájában használt hatóanyagokkal teszteltük MTT-proliferációs assay-n.

Táblázatban (3. táblázat) foglaltuk össze a hatóanyagokat, valamint azok alkalmazott dózisait (mindegyiknél három-lépcsős 10x-es hígítási sort használva).

3. táblázat: *MTT teszt során használt kemoterápiás és célzott terápiás szerek, valamint dózisaik.*

		1x	10x	100x hígítás
5-fluoro-uracil	5FU	7,5 mM	750 µM	75 µM
Leukovorin	LV	1 mg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml
Oxaliplatin (Eloxatin)	Ox	13 µM	1,3 µM	0,13 µM
Irinotecan	Iri	100 µM	10 µM	100 µM
Cetuximab (Erbix)	Cet	10 nM	1 nM	0,1 nM
Bevacizumab (Avastin)	Bev	500 µM	50 µM	5 µM
Imatinib (Glivec)	Gli	34 µM	3,4 µM	0,34 µM

A hatóanyagokat monoterápiaként (5FU, Ox, Iri, Cet, Bev, Gli), valamint kombinációban adtuk (5FU-LV, 5FU-LV-Ox, 5FU-LV-Iri, 5FU-LV-Cet, 5FU-LV-Bev, 5FU-LV-Gli).

A kiindulási sejtszám 96-lyukú tálcán P, M és C mintákon 1000 sejt / lyuk, az N mintán 800 sejt/lyuk volt. Tenyésztési médiumként, valamint a terápiás hatóanyagok oldószereként 1% penicillin-streptomycint és 8% FCS-t tartalmazó RPMI-1640-et (Sigma) alkalmaztunk. 3 órás inkubációt követően a le nem tapadó sejteket eltávolítottuk, friss médiumot vittünk fel a letapadt sejtekre. A P, M, és C mintákat 3 napos, az N mintákat 4 napos tenyésztést követően kezeltük a fenti protokoll szerinti hatóanyagokkal.

3.3. MTT-proliferációs teszt

Az MTT tesztet az aktuális kezelést követő 24, 48 és 72 órát követően végeztünk el. Kontrollként *vak* (sejt nélküli médium/illetve hatóanyag), valamint *normál* (hatóanyag, illetve letapadási mátrix nélküli sejtenyészet) minták szolgáltak. Minden mérési pont 5 párhuzamosként volt jelen.

Az MTT-assay az élő sejtek azon képességén alapszik, hogy a vízdékony MTT-t (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) vízben nem oldható formában kristállyá képes átalakítani. Ez utóbbit a reakcióidő végén SDS-ben oldva optikai denzitás (570 nm) alapján meghatározhatjuk a koncentrációját, amely az élő

sejtek számával arányos. Ennek megfelelően 24, 48 illetve 72 órás, standard sejttenyésztési körülmények közt végzett inkubációt követően a mintákhoz 20 µl/lyuk 5 mg/ml-es 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) oldatot adtunk. 4 órás 37 °C-on történő inkubációt követően a felülúszót eltávolítottuk és a képződött kristályokat 100 µl SDS-ben (Sigma) feloldottuk. A minták fényextinkcióját ELISA Microplate Reader (Bio-Rad) segítségével 570 nm-en olvastuk le és rögzítettük.

Kiértékelés: IC50 (50%-os inhibíciós koncentráció) kalkulációt végeztünk *dózishatás-görbe* analízis útján.

3.4. Génexpressziós vizsgálatok

3.4.1. RNS-izolálás és RT-PCR

A sejtvonalakból és a fagyasztva homogenizált tumormintákból TRI Reagent™ – el (Sigma®), totál RNS-t izoláltunk a gyártó utasításainak megfelelően. A DNS szennyeződés elkerülésére a mintákat TURBO DNA-free™ kit-el (Ambion®) tisztítottuk. A reverz transzkripció első lépéseként 1 µl 10mM dNTP mix (Finnzyme®) és 1µl Random primer-oligo dT kombinációt (végkoncentráció 2.5 µM) adtunk 2 µg tisztított RNS-hez.

10 perces 70 °C-on való inkubálás után minden mintához 2 µl 10x M-MLV Reverz Transcriptáz Puffert (Finnzyme®), 1µl M-MLV Reverz Transcriptázt (200 units/µl, Finnzyme®), 0,5 µl RNáz Inhibitort (40 units/µl, Promega®) és 6,5 µl DEPC-kezelt vizet adtunk (végtérfogat 20 µl), amit 50 perces 37 °C-os, majd 10 perces 85 °C-os inkubáció követett. A reverz transzkripciót minden minta esetében β-actin „housekeeping” gén primerekkel (humán minták esetén βSI: 5’ TCT GGC ACC ACA CCT TCT AC 3’ és βA4: 5’ CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC 3’, eger tumor minták esetén MβS1: 5’ AGA CAA CAT TGG CAT GGC TT 3’ és MβA1: 5’ AAT GAA GTA TTA AGG CGG AAG ATT 3’) végzett PCR reakcióval ellenőriztük, melyben negatív kontrollként (szennyező DNS kimutatása) az eredeti RNS minta, non-templat kontrollként pedig (primerek hígításához és a reakcióban felhasznált DEPC-kezelt víz tisztaságának ellenőrzésére) DEPC-kezelt víz szolgált.

3.4.2. Kvalitatív PCR

3.4.2.1. A CD44 ujjlenyomat PCR alapú detektálása

A CD44 variábilis régiójának vizsgálatára egy öt reakcióból álló sorozat PCR vizsgálatot végeztünk. A PCR reakcióelegy a következőket tartalmazta: 2.5 µl 10X PCR puffer+Mg²⁺ (DyNazymeTM), 2 µl dNTP mix (2.5 mM mind), 0.4 µl DNS polimeráz (DyNazymeTM, 2 U/µl), 2.5-2.5 µl a megfelelő primer párból (**A**: Standard 5': AGT CAC AGA CCT GCC CAA TGC CTT T, **B**: Standard 3': TTT GCT CCA CCT TCT TGA CTC CCA TG, **C**: v3 5': GGG AGC CAA ATG AAG AAA ATG AAG ATG AAA G, **D**: v3 3': GGT GCC TGT CTC TTT CAT CTT CAT TTT CTT CAT TT, **E**: v6 3': TCT GTT GCC AAA CCA CTG TTC CTT CTG) (75), 2 µl vizsgált cDNS és 13.1 µl DEPC-kezelt víz, a végső 25 µl-es térfogat eléréséhez. A PCR körülmények a következők voltak: 94 °C 12 perc egyszer, majd 94°C 30 másodperc, 65°C 30 másodperc, 72°C 2 perc 35 cikluson keresztül, végül 72 °C 10 percig. A következő primer párosításokat alkalmaztuk: A-B, A-D, A-E, C-B, C-E, mely lehetővé tette a teljes molekula 'áttekintését'.

A PCR termékeket végül 3%-os agaróz gélen futtatuk meg és etidium-bromidos festés után Gel Doc 2000-ben (Bio-Rad[®]) UV fényvel tettük láthatóvá.

A keletkező PCR-termékeket High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) segítségével a gélből visszaizoláltuk, majd direkt szekvenálással (Big Dye Terminator, Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer), illetve újgenerációs szekvenálással azonosítottuk nukleotid sorrendjüket.

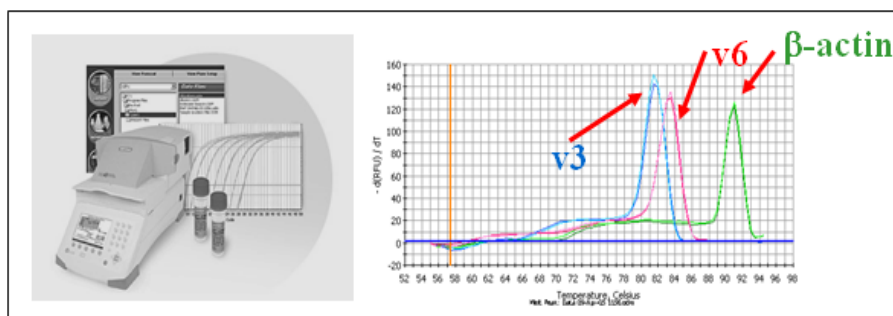
3.4.2.2. WT1 alternatív splicing mintázat azonosítása – nested PCR

A WT1 expressziót nested PCR-rel vizsgáltuk. Total RNS izolálást és reverz transzkripciót követően a cDNS-ből két lépésben végeztünk amplifikációt. A PCR reakcióelegy a következő összeállítású volt: 2 µl cDNS az outer reakcióban, illetve 1 µl outer PCR termék az inner reakcióban, 2,5 µl 10x PCR puffer+Mg²⁺ (DyNazymeTM), 2 µl dNTP mix (2,5 mM mind), 0,4 µl DNS polimeráz (DyNazymeTM, 2 U/µl), 2,5-2,5 µl a megfelelő primer párból. Outer primerként WT-oS: 5' GGc ATC TGA GAC CAG TGA GAA 3' és WT-oA: 5' GAG AGT CAG ACT TGA AAG CAG T 3', inner

primerként WT-iS: 5' GCT GTC CCA CTT ACA GAT GCA 3', illetve WT-iA: 5' TCA AAG CGC CAG CTG GAG TTT 3' szekvenciákat használtunk. A PCR reakció protokoll mind az outer, mind az inner reakcióban: 94°C 1 perc, 64 °C 1 perc, 72 °C 2 perc 30 ciklusszámmal volt. Az inner reakció termékét agaróz gélelektroforézist (10 µl termék, 4%-os sűrűségű gél) követő ethidium-bromiddal történő festés után Geldoc (Bio-Rad) rendszeren vizualizáltuk.

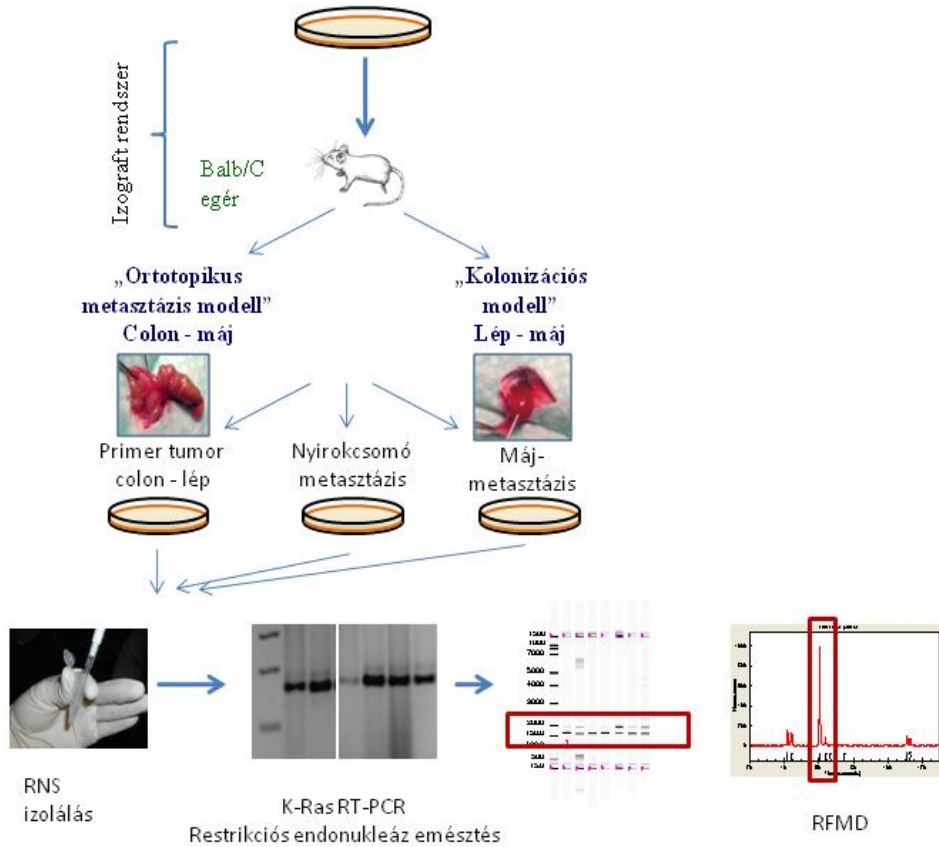
3.4.3. CD44 variábilis exon specifikus primerekkel végzett qPCR (12.ábra)

Egyes variábilis exonok expressziós szintjének vizsgálatához kvantitatív (q-) PCR reakciót használtunk. A real-time PCR reakcióelegy 12,5 µl 2x iQ SYBR® Green Supermix-et (Bio-Rad), 0,5-0,5 µl primert (végkoncentrációjuk 200nM) 2 µl cDNS-t és 9,5 µl dH₂O-t tartalmazott. A PCR körülmények a következők voltak: 95°C 3 perc (iTaQ™ DNS polimeráz aktiválása), majd 95°C 30 másodperc, 55°C 30 másodperc, 72°C 1 perc 40 cikluson át. A kiindulási mennyiségeket A431 humán laphámrák cDNS-ből, mint pozitív kontrollból készített standard ötszörös hígítási sorhoz (1x-625x) viszonyítva határoztuk meg. Primerként CD44v3 exonra: **v3S**: 5' CGT CTT CAA ATA CCA TCT CAG CA 3' és **v3A**: 5' ATC TTC ATC ATC AAT GCC TGA; CD44v6 exonra: **v6S**: 5' GGC AAC TCC TAG TAG TAC AAC G 3' és **v6A**: 5' GTC TTC TCT GGG TGT TTG GC 3' szekvenciákat használtuk. A kérdéses exon relatív expresszióját ugyanazon kiindulási mennyiségű cDNS β-actin expressziós szintjére normáltuk. (β-actin primer pár: **βS1**: 5' TCT GGC ACC ACA CCT TCT AC 3' és **βA4**: 5' CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC 3'.)



12. ábra: Real-time PCR hardver és szoftveres kiértékelés.

3.4.4. KRAS mutációs státus detektálás – RFMD (Restriction Fragment Microfluidic based Detection) (13. ábra)



13. ábra: A KRAS mutációs státus meghatározása a vastagbélrák áttétképzésének különböző fázisaiban.

A vizsgálandó tumormintákból (Balb/C C26 colorectalis tumor primer és metasztatikus mintáiból (bélfali primer, lép primer, nyirokcsomó áttét, májättét) reprezentatív mintát vettünk és belőlük primer sejtenyészetet hoztunk létre. A konfluens tenyészetekből TRI Reagent™ – el (Sigma®) totál RNS-t izoláltunk a gyártó utasításainak megfelelően.

A reverz transzkripciót követően a minták tisztaságát és az átírást a megfelelő egér β -actin PCR-reakciókkal ellenőriztük.

A 12-es codont hordozó DNS szakaszt szekvencia-specifikus primerekkel felsokszoroztuk, majd a keletkezett terméket BstNI (New England BioLabs) restriktációs enzimmel (250 perc, 60°C) hasítottuk. Az enzim által felismert szekvencia:



A felismerőhely a mutáns codon esetén elvész, azaz az emésztés nem következik be, amelynek vizualizált eredménye, hogy nagyobb reakcióterméket detektálunk a 3%-os agaróz gélen történő futtatás során. Reakciónkat Experion™ DNA 1K Analysis Kit (Bio-Rad) segítségével szemikvantitatívan is kiértékeljük (Experion Automated Electrophoresis System – Bio-Rad).

3.4.5. Szekvenálás

3.4.5.1. Direkt szekvenálás

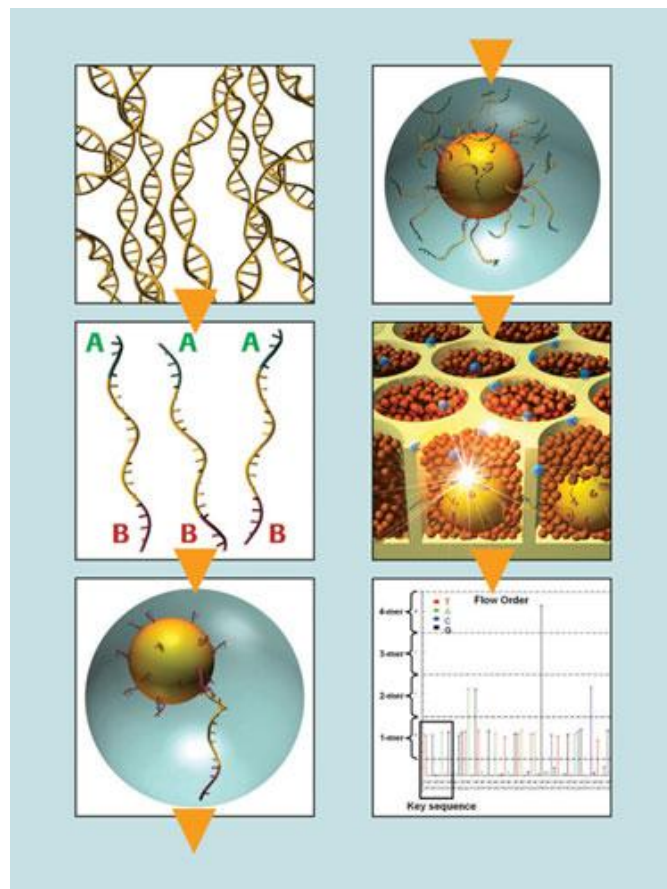
A szekvencia-specifikus primerekkel felsokszorozott mintákat agaróz gélen megfuttattuk, a megfelelő band-eket a gélből kivágtuk majd EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (Bio Basic) segítségével visszaizoláltuk a DNS-t. A szekvenáló reakciót a gyártó utasításainak megfelelően BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™ – by Life Technologies™) segítségével végeztük el. A minták tisztítását (BigDye® XTerminator™ Purification Kit - Applied Biosystems™ – by Life Technologies™) követően a PCR termékek nukleotid-szekvenciáját mindkét irányból az Applied Biosystems négykapillárisos szekvenátora (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) segítségével határoztuk meg.

3.4.5.2. Újgenerációs szekvenálás (Next-generation sequencing (NGS) – Roche 454 GS Junior)

A módszer követi a gyártó utasításait, amely röviden összefoglalva a következő:

A humán colorectalis carcinoma sejtvonalakból (HT29, HT25 és HCT116) RNS izolálás és reverz transzkripciót követően exon-specifikus primerekkel felszaporítottuk a „fingerprintben” szereplő nukleinsav-szakaszokat. Az ampikonokat MinElute PCR Purification Kit (QUIAGEN) segítségével megtisztítottuk, majd minta-specifikus adaptorokat ligáltunk (Roche 454 multiplex identifier – MID) rájuk, ezzel egyben univerzális primer-kötőhelyeket létrehozva az emulziós PCR-hez. Az ampikonokat a

következő lépésben mágneses szeparátor segítségével (Ampure beads – Agencourt) megtisztítottuk a be nem kötött adaptoroktól. Az amplifikációt a gyártó utasításainak (Roche 454) megfelelően emulziós PCR (emPCR) segítségével végeztük el. A könyvtár szekvenálása ezt követően klonálisan, piroszekvenálással (454 GS Junior - Roche) történt. A reakció 200 ciklust foglalt magába és az átlagos leolvasási hossz 400 bázispár. A kép- és szignálfeldolgozás Amplicon Variant Analyzer Software (Roche Diagnostics) segítségével történt. Ez a folyamat magába foglalja az eredmények MID-ek szerinti leválogatását, a primerek termékről való virtuális „levágását” valamint a kapott termékek referenciaszekvenciákkal történő összevetését. (14. ábra.) Az egy indítás alatt leolvasott 100.000 szekvenciából, az általunk kidolgozott „fishing” technikával azonosítottuk a variánsokat. A módszer lényege, hogy a variánsban exon-specifikus rövid szekvenciák segítségével azonosítottuk a benne szereplő exonokat. Az izoformát 90%-os szekvencia-egyezési küszöbérték mellett értékeltük pozitívnak legalább 50x-es leolvasási amplikonszám mellett.



14. ábra: Az újgenerációs szekvenálás (Roche 454) technológiai folyamatábrája. (187)

3.5. Statisztikai kiértékelés

MTT tesztek esetén a párhuzamos mérési eredményekből a vak (blank) átlagot kivonva a párhuzamosokat átlagoltuk (számtani középértéket vettünk). Az eredményeket a kontrollok számtani közepével vetettük össze dózishatás-görbéken.

Real-time PCR (qPCR) vizsgálati eredmények esetében a párhuzamos mérések (minimum 3 párhuzamossal számolva) átlagát (számtani közepét) vettük. A vizsgált gén expressziós átlagértékeit ugyanazon minta β -actin expressziós szintjére normáltuk.

Statisztikai számításra kitüntetett t-próbát használtunk, a szignifikancia szintet $p \leq 0,05$ határon húztuk meg. Amennyiben az összehasonlítandó halmazok eloszlása nem mutatott elegendő egyezést (ezt f-próbával ellenőriztük), t-próba helyett Welch-tesztet használtunk.

4. Eredmények

4.1. Az állatkísérletek áttétképzési mutatói

Májmetasztázis modellek xenograft rendszeren: HT25, HT29 és HCT116 humán tumorokat vizsgáltunk *scid* egérben colonba illetve lépbe történő implantációt követően. (4. táblázat.)

4. táblázat: *A májattét létrejöttének gyakorisága ortotopikus (vastagbél fal) és heterotopikus (lép) colorectalis carcinoma implantációt követően humán sejtenyészet scid egérbe történő xenoimplantációját követően.*

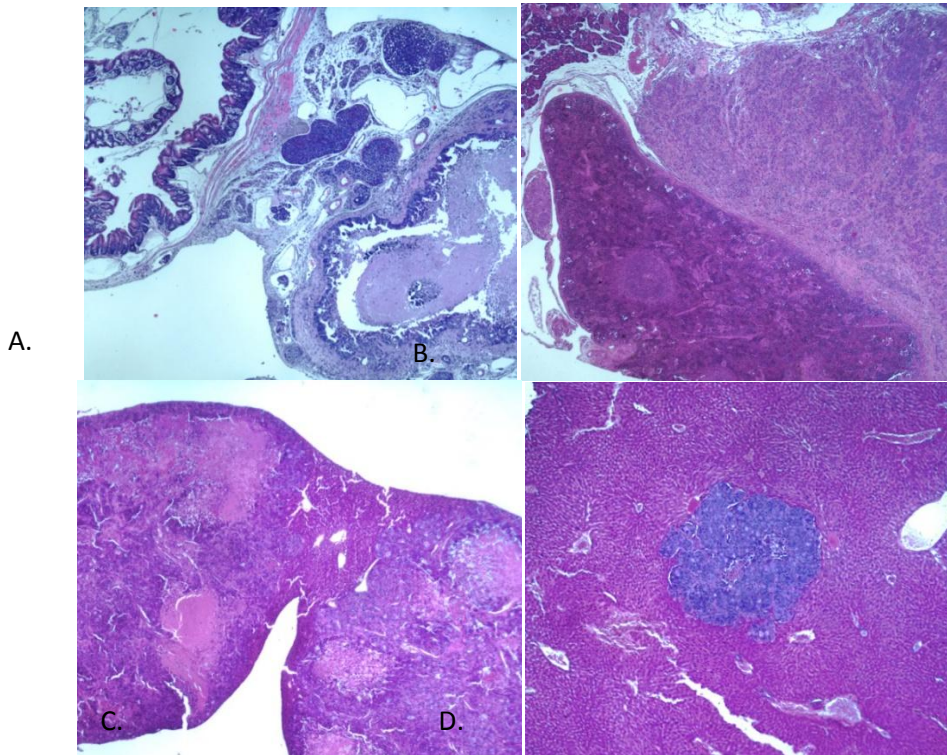
	Lép-máj	Colon-máj	Össz
HT25	3/6	5/19	8/25
HT29	1/4	14/ 20	15/24
HCT116	6/6	1/1	7/7
Össz	10/16	20/40	30/56

Az áttétképzést autopsziánál a szervek makroszkópos vizsgálatával, majd paraffinba ágyazott szövetmintákon hematoxilin-eozin (HE) festést követően mikroszóp alatt ellenőriztük. (15. ábra)

Izograft rendszerben 4-4 db Balb/C egeret oltottunk C26 tumor szuszpenzióval lépbe és colonfalba. *Minden* (4/4) oltás sikeres volt, azaz *minden* (4/4) állatban kialakultak a valódi áttétek. (5. táblázat)

5. táblázat: *A scid egérbe subcutan implantált colorectalis carcinoma szuszpenziókból származó tüdőáttét képzési arányok (xenograft HT25, HT29 és HCT116 implantátumokkal).*

	Felnőtt	Újszülött
HT25	0/3	3/3
HT29	0/3	2/2
HCT116	0/2	4/4



15. ábra: A. Colon primer adenocarcinoma (HT29), B. Lép primer colorectalis tumor, C. Valódi májattét (colonból), D. Máj kolonizációval képzett tumora lépbe történő implantációt követően. (HT29 humán colorectalis carcinoma - scid egér xenograft rendszer. HE festés.)

Tehát felnőttbe történő subcutan implantációkor távoli áttétképzést soha nem észleltünk (primer tumor minden egyedben kialakult), míg újszülöttbe történő oltáskor a primer tumoron túl tüdőáttét létrejöttét figyeltük meg minden egyes kísérleti egyedben.

4.2. Kísérletes colorectalis carcinoma primer és áttéti tumora kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata MTT teszt segítségével

A colorectalis carcinoma viselkedése a progresszió különféle fázisaiban eltérő lehet. A különféle kemoterápiás szerek és biológiai válaszmódosító (máshol célzott biológiai terápiás) szerek proliferációra gyakorolt hatását *in vitro* teszteltük. Primer tumorból (C26 egér colorectalis carcinoma ortotopikusan, colon falban növekvő tumorából) (P), nyirokcsomóáttétéből (N), májáttétéből (M), valamint keringő tumorsejtekből indított sejtenyészeteit (C) teszteltük MTT proliferációs assay segítségével. Az eredményeket a kezelés nélküli proliferációs aktivitásra normáltuk a „vak” értékek kivonását követően.

Minden mérést 5 párhuzamossal végeztünk, a kontrollminták párhuzamosainak száma 12 volt.

A 24, 48 és 72 órás vizsgálatok mono- és kombinációs terápiás összeállítására a következő volt:

Monoterápia: 5-fluoro-uracil (5FU), Oxaliplatin (Ox), Irinotekán (Iri), Cetuximab (Cet), Bevacizumab (Bev), Imatinib-mesilate (Gli). A Cetuximab terápia tekintetében megjegyzendő, hogy a C26 ismert KRAS mutáns (a 12-es lókuszon), Cetuximab csupán a KRAS vad típusú sejtpopuláción lehet hatékony. Mivel humán/egér chimera monoklonális antitest, így teoretikusan egértumoron is hatékony. Ezzel ellentétben a humanizált, humán specifikus VEGF-A inhibitor bevacizumab az egér VEGF növekedési faktorról igen gyenge kölcsönhatást mutat (188), ezért a proliferációs teszthez egy nagyságrenddel magasabb dózisokat használtunk, mint amely humán tumorsejteken hatékonyak várható.

Kombinált kezelés: 5FU+leukovorin (LV), 5FU+LV+Ox, 5FU+LV+Iri, 5FU+LV+Bev, 5FU+LV+Gli.

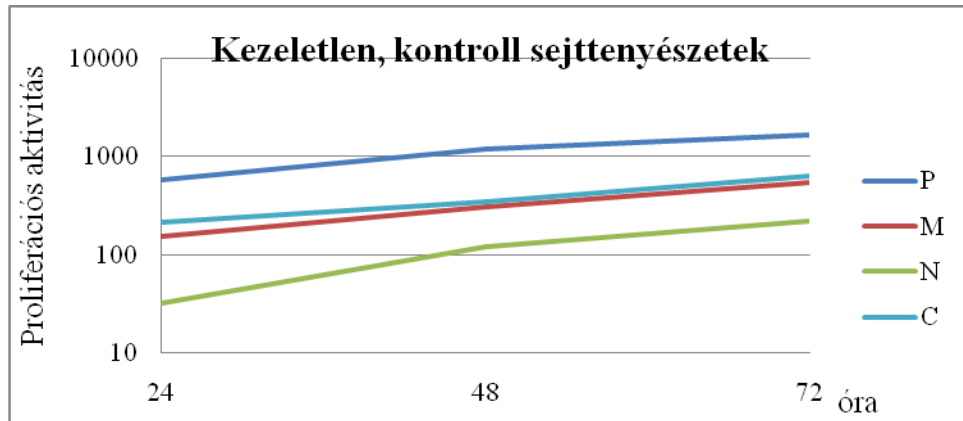
Mindegyik hatóanyagot 3 különböző dózisban alkalmaztuk nagyságrendi ugrásokkal.

Elsőként a kezelés nélkül észlelt proliferációs aktivitásokat mutatjuk be (kontroll minták). Látható, hogy a progresszió különböző fázisaiból nyert tumorsejt tenyészetek igen eltérő proliferációs képességgel jellemezhetők (1. diagram, 6. táblázat).

6. táblázat: *C26 colorectalis carcinoma sejtenyészetek proliferációs aktivitása (MTT) a metasztatikus kaszkád különböző fázisaiban (P-primer tumor, M-májáttét, N-nyirokcsomó áttét, C-keringő tumorsejt tenyészete, SD-standard deviáció).*

Extinkció (570 nm)	P ± SD	M ± SD	N ± SD	C ± SD
24. óra	568 ± 55,8	154 ± 26,2	31,6 ± 17	216 ± 17,2
48. óra	1172 ± 103	304 ± 68,4	121 ± 76,8	350 ± 52,2
72. óra	1636 ± 175	547 ± 161	218 ± 57,7	622 ± 283

1. diagram: *Primer tumorból (P), májástétből (M), nyirokcsomóástétből (N) és keringő tumorsejtekből (C) képzett, illetve fenntartott colorectalis carcinoma sejtenyészetek (C26-egér colorectalis carcinoma vonal) proliferációs aktivitása kezelés nélkül.*



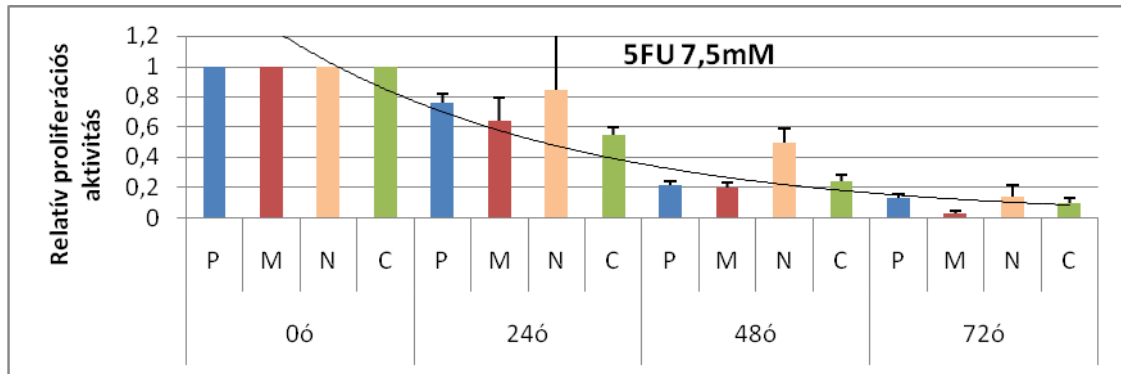
A legintenzívebb sejtproliferációt a primer tumor tenyészetete mutatta. A keringő tumorsejtek, valamint a májástét tenyészetét igen hasonló proliferációs aktivitásúnak találtuk.

Az ideális exponenciális (logaritmikuskálán lineáris) proliferációs görbéhez képest a „C” minta kivételével minden tenyészet enyhe deklinációt mutat 72 óránál.

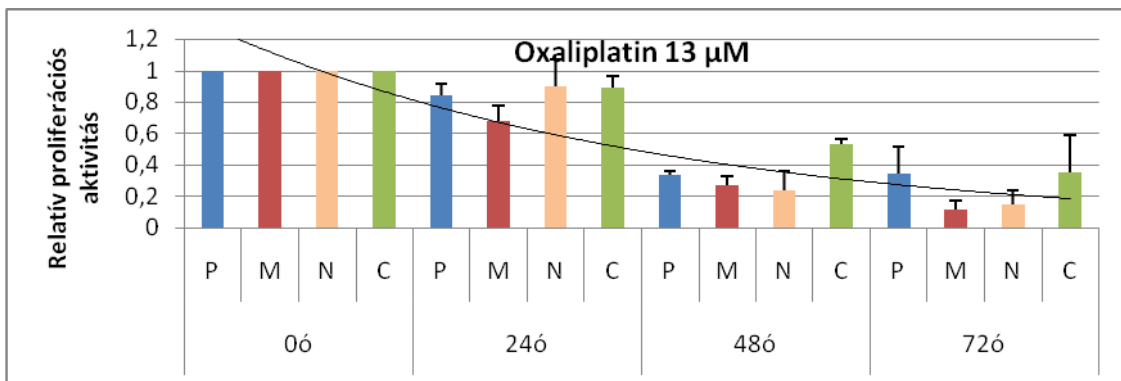
A jelentős eltérések a vizsgált 4 sejtenyészet proliferációs képessége között a további, már kemoterápiás szerekekkel és biológiai terápiás szerekekkel végzett vizsgálatok értékelésénél az eredményeknek a kezeletlen tenyészetekből nyert proliferációs aktivitásokra való normálását teszik szükségessé. A továbbiakban tehát a kezeletlen kontroll értékekre normálva adjuk meg a kezelt minták proliferációs aktivitását.

A következő diagramok a primer, metasztatikus, valamint CTC sejtenyészetek proliferációs aktivitását ábrázolják kemoterápiás szerekekkel monoterápiában (Id. Módszerek), illetve kombinációban történő kezelés nyomán. (P-primer tumor, M-májástét, N-nyirokcsomó áttét, C-keringő tumorsejt tenyészetete.) Az ordinátán kezeletlen sejtenyészetre normált proliferációs aktivitásokat tüntettük fel. (2-13. diagram)

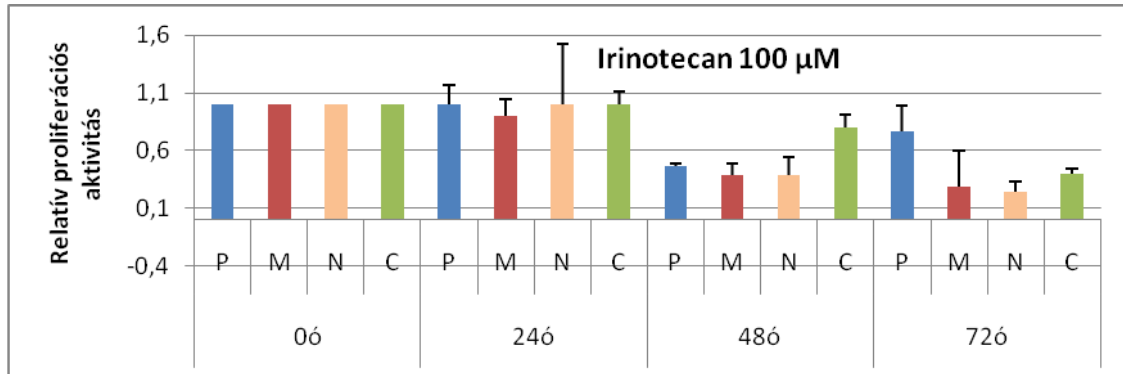
2. diagram: 5FU: A terápiára a májástét (M) tenyésztete bizonyult legérzékenyebbnek, a nyirokcsomó (N) és CTC tenyészetek enyhébben reagáltak 5FU-ra. A gátló hatás mindegyik tenyészteten időarányos, szignifikáns (kivétel az „N” tenyésztet, melyen csak 48 óra és 72 óra között szignifikáns a gátló hatás).



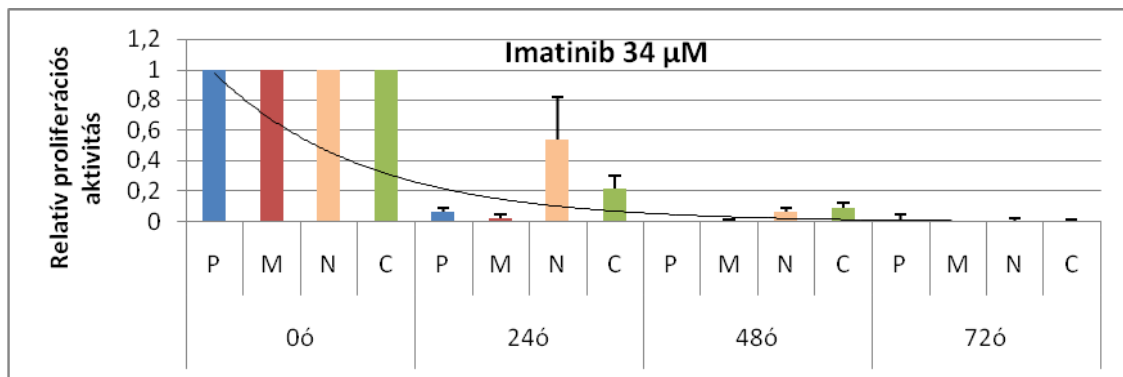
3. diagram: Oxaliplatin: Leginkább a májástét (M) reagált a gátló hatásra érzékenyen, a keringő tumorsejt tenyészteten a proliferáció-gátló hatás enyhébb volt. Szignifikáns időarányos gátló hatást „N” és „C” tenyészteteken csupán 24 órát követően kaptunk, 48 óra után a további gátló hatás az „M” kivételével minden tenyészteten megszűnt.



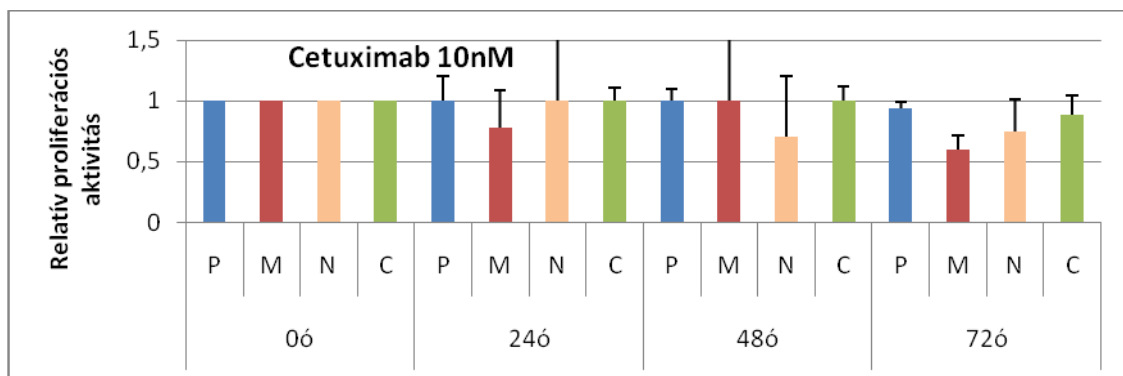
4. diagram: *Irinotecan: szignifikáns gátló hatást a „P”, „N” és „M” tenyészeteken 24 és 48 óra között tapasztaltunk, a CTC tenyészetben a gátló hatás enyhébb volt, azonban 24 óra után időarányosnak bizonyult.*



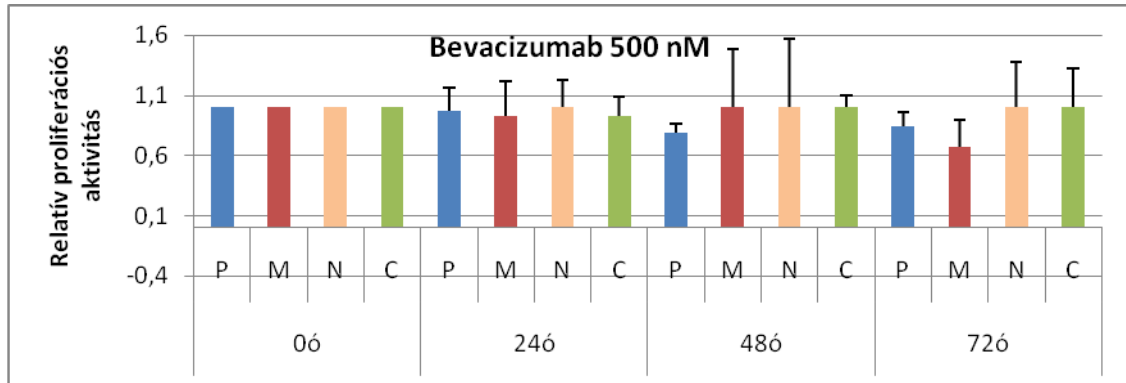
5. diagram: *Imatinib: Igen hatékony (szignifikáns) proliferációgátló hatást mértünk a „P” és „M” tenyészeteken (24 óránál már csaknem teljes gátlást találtunk), a nyirokcsomó áttét („N”) ugyanezt csupán 24 óra után, késleltetve produkálta, míg a keringő tumorsejt („C”) tenyészetben időarányos, szignifikáns, enyhébb proliferáció-gátlást tapasztaltunk.*



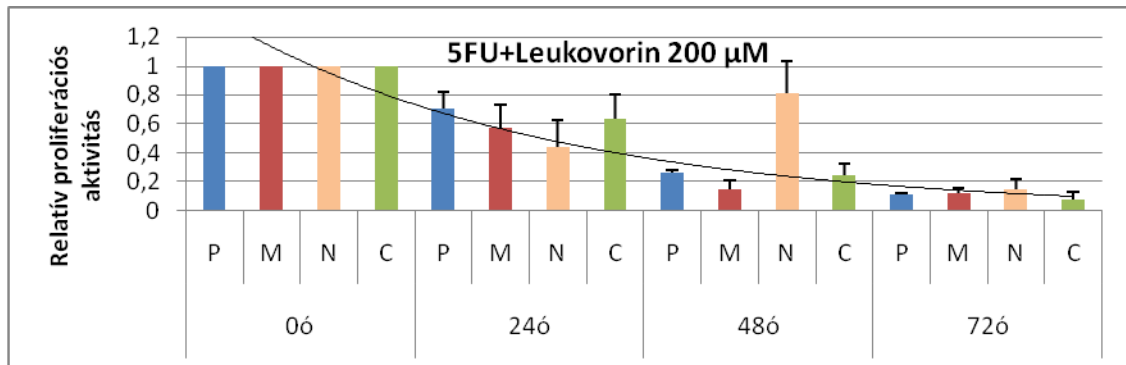
6. diagram: *Cetuximab: hatástalan volt proliferációs aktivitás tekintetében.*



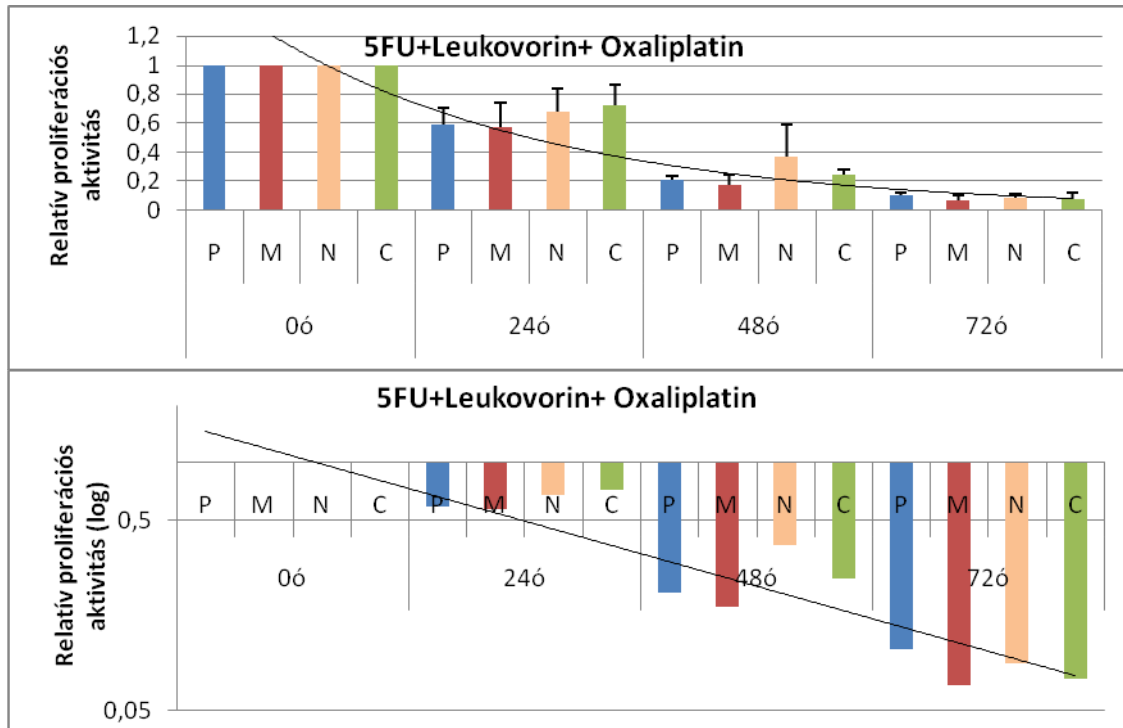
7. diagram: *Bevacizumab: nem találtunk szignifikáns proliferáció-gátló hatást.*



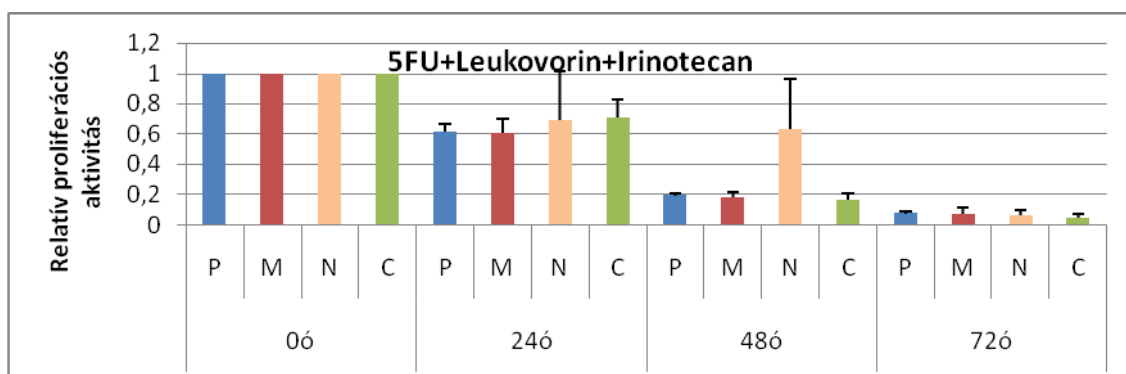
8. diagram: *5FU/Leukovorin kombináció: Időarányos, egyenletes, szignifikáns gátló hatást mértünk "P" és „C” tenyészeteken (a CTC-n enyhébb gátló hatással, ld. trendvonalat), az „N” tenyészet 48 órás mérése eltér a tendenciától, az „M” tenyészet a gátló hatás időarányos, a legintenzívebb hatás egészen 48 óráig.*



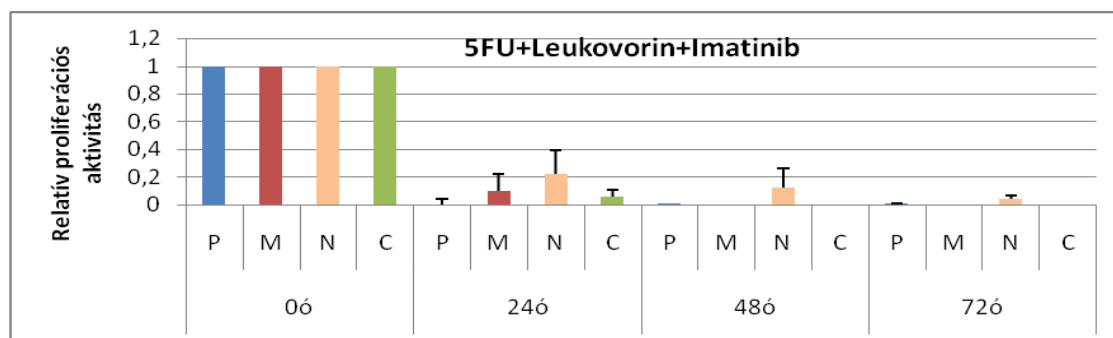
9. diagram: 5FU/Leukovorin/Oxaliplatin kombináció: Kienyensúlyozott, időarányos, szignifikáns proliferáció-gátlást találunk mind a négy sejtvonalon. A gátló effektus az egyes tenyészetek közt nem mutat szignifikáns eltérést. A gátló effektust logaritmikus skálán is ábrázoltuk.



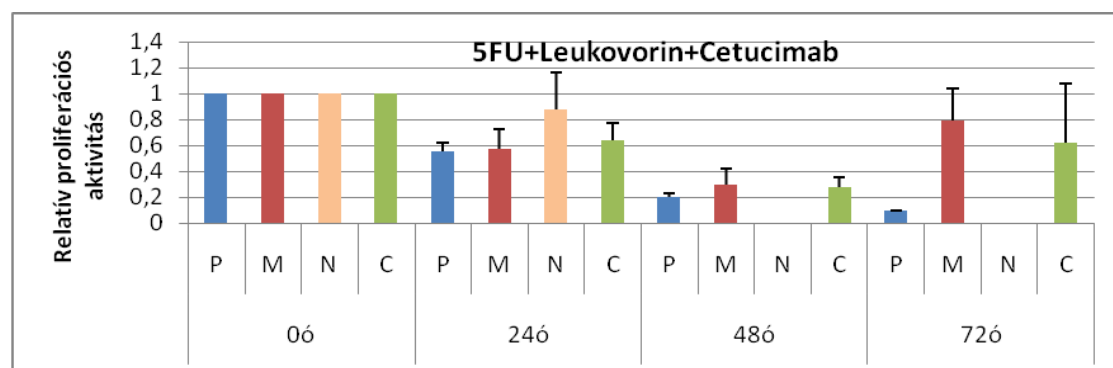
10. diagram: 5FU/Leukovorin/Irinotecan kombináció: Kienyensúlyozott, időarányos proliferáció-gátlást találunk a „P”, „M” és „C” sejtvonalakon. Az eltérés az egyes tenyészetek között nem szignifikáns. A nyirokcsomó metasztázisokon szignifikáns gátló hatás csupán 72 óránál jelent meg.



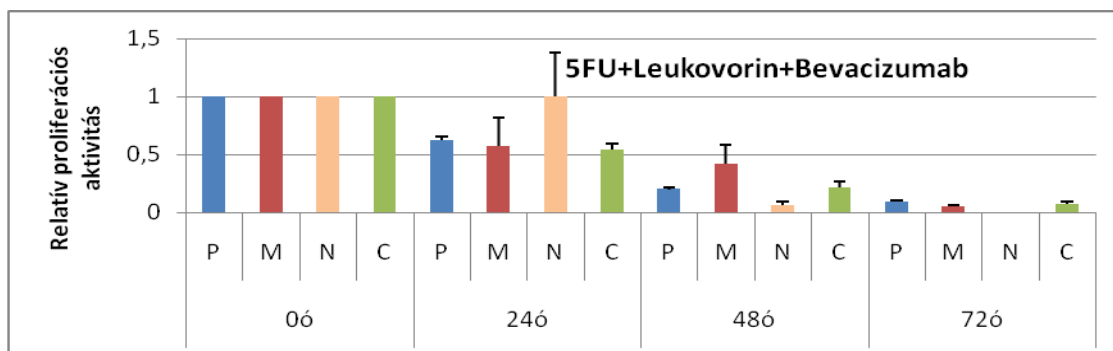
11. diagram: 5FU/Leukovorin/Imatinib kombináció: hatékony, szignifikáns gátló hatást észleltünk mind a négy tenyészetben 24 óránál, mely hatás később nem volt fokozható.



12. diagram: 5FU/Leukovorin/Cetuximab: A Cetuximab az 5FU/Leukovorin kezelés effektusát rontotta, 72 óránál a májattét és a CTC tenyészetek mintha „repopulálódtak volna”.

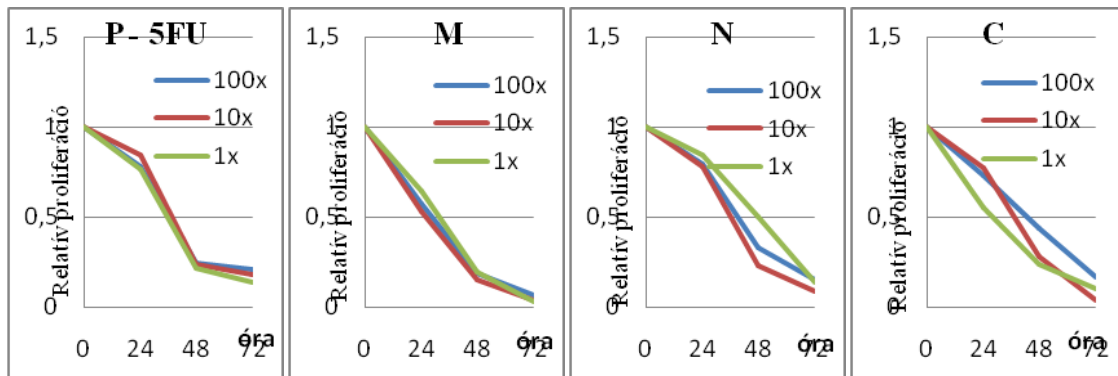


13. diagram: 5FU/Leukovorin/Bevacizumab: Mind a négy tenyészetben időarányos gátló hatást észleltünk, az „N” tenyészetben az effektus csupán 24 óra után (késleltetéssel) jelent meg.

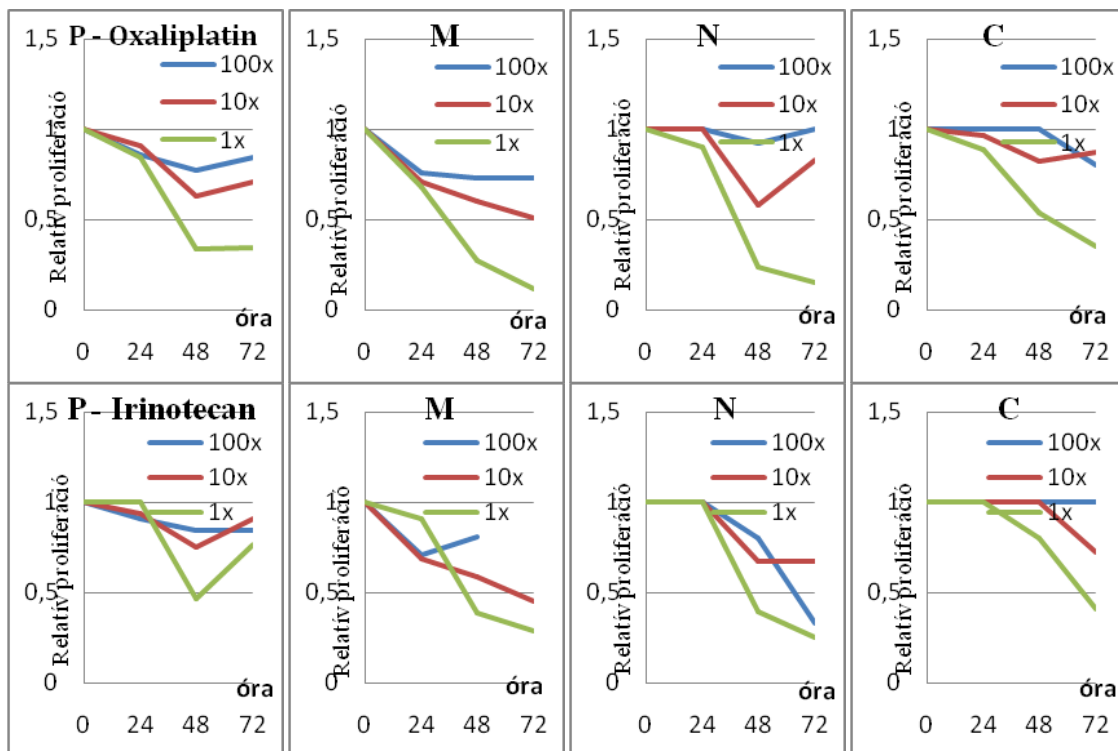


Ugyanilyen kísérleti összeállításban tízszeres (10x) és százszoros (100x) hatóanyag hígítással dózis-hatás görbéket vettünk fel. (Zöld görbe: 1x-es, piros görbe: 10x-es, kék görbe: 100x-os hatóanyag hígítást jelöl.) (14-15. diagram)

14. diagram: 5FU: mind a négy sejtenyészet dózisfüggetlen, időarányos proliferáció-gátlást szenvedett el.



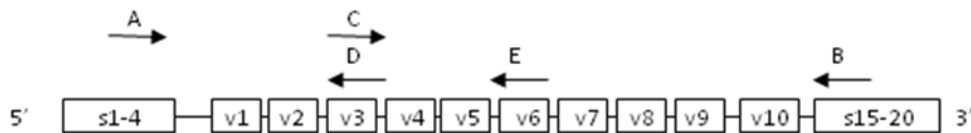
15. diagram: Szignifikáns dózisdependens proliferációs gátló hatást csupán az Oxaliplatin (48 óránál és 72 óránál) és az Irinotecan („N” és „C” tenyészeteken 48 óránál, illetve 72 óránál) ért. Az Imatinibnek csupán legnagyobb dózisa volt hatékony.



Összefoglalásul elmondható, hogy alapvetően az 5FU/LV alapú terápia jellemezhető időarányos gátló hatással minden tenyészet proliferációjára vonatkozóan. Az 5FU-hoz adott kombinációs szerek érdemben nem voltak képesek befolyásolni annak a proliferációra gyakorolt hatását. Ez alól csupán az Imatinib volt kivétel, mely legnagyobb koncentrációjában alkalmazva már 24 óránál teljes proliferáció-gátlást produkált. Egyhe dózisdependens gátló hatást az Oxaliplatin, az Irinotecan és az Imatinib mutatott. A keringő tumorsejt tenyészeteken és a nyirokcsomó áttétek tenyészetén enyhébb gátló effektust tapasztaltunk. A Cetuximab és Bevacizumab lényegében a proliferációra hatástalannak bizonyult, míg a Glivec a legmagasabb dózisában közel 100%-os gátló hatással bírt. Az egyes sejtvonalak terápiára való érzékenységében különbség volt kimutatható: a nyirokcsomóáttét tenyészet, illetve a keringő tumorsejt tenyészet 5FU és annak kombinációs kezelésben történő alkalmazása esetén dóziszfüggő proliferáció-gátlást szenvedett el, míg a primer és májáttéti eredetű tenyészeteken a legalacsonyabb terápiás dózis is azonos mértékben hatékonynak bizonyult, mint a magasabb hatóanyag koncentrációk.

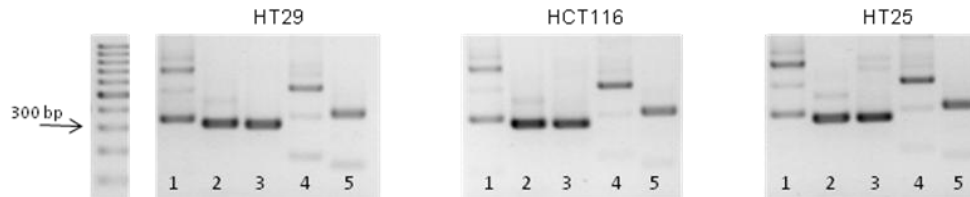
4.3. A CD44 expresszió vizsgálata colorectalis carcinoma vonalakon és tumormintákon

Sorozat PCR vizsgálatot végeztünk humán colorectalis carcinoma sejttenyészeteken (HT25, HT29, HCT116) és kísérleti tumormintákon. A PCR termékeket megfelelő sorrendben futtatva agaróz gélelektroforézissel a CD44 gén alternatív splicingjának eredményeként létrejött izoformái sematikusan azonosíthatók. Célunk annak vizsgálata volt, hogy létezik-e egy, a colorectalis carcinomára specifikus alternatív splice expressziós mintázat (ASM). A tumortípus-specifikus jelleg miatt e mintázat egyszerűen CD44 ujjlenyomatnak is tekinthető, melynek alapján akár tumortípus azonosításra is vállalkozhatunk. Megvizsgáltuk továbbá, hogy a CD44 ASM változik-e a vastagbélrák progressziója során. Vizsgálatunk során a következő állandó primerpár sorrendet használtuk: 1. A-B, 2. A-D, 3. A-E, 4. C-B, 5. C-E. (16.ábra)



16. ábra: Az 5 primer pár kötési helyei a CD44 cDNS-en.

4.3.1. CD44 alternatív splicing mintázat humán CRC vonalakon



17. ábra: A vizsgált három, genetikailag különböző humán colorectalis vonal (HT25, HT29 és HCT116) tenyésztének CD44 alternatív splice mintázata.

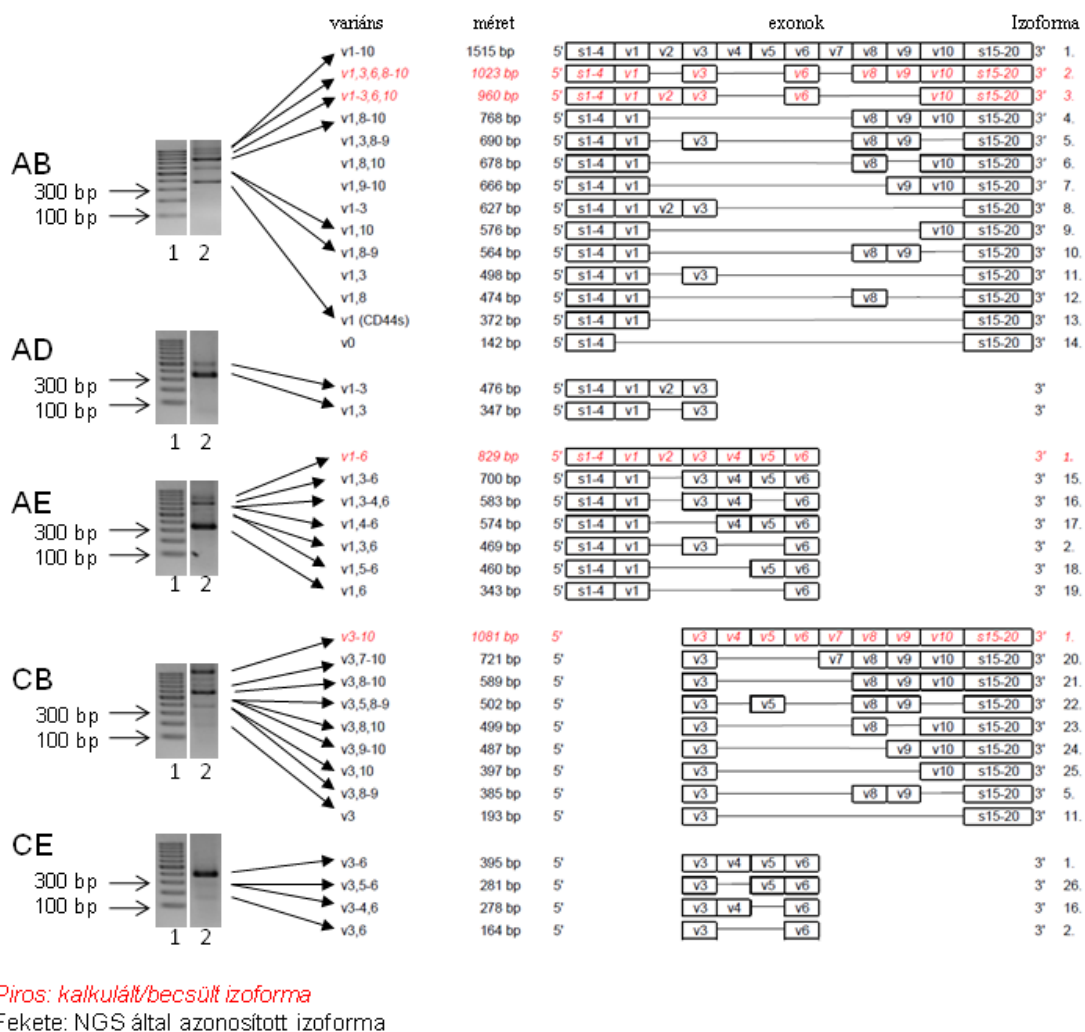
Az igen gazdag mintázat mindhárom vonal esetén azonos. 17. ábra. A teljes variábilis régiót átfedő primer párral (1. oszlop, A-B primer pár) öt különböző termék jelenik meg. Ez a PCR reakció elméletileg minden egyes CD44 variáns izoformát felszaporoz. Direkt szekvenálással az öt band közül 3 esetén (372 bp, 564 bp, 768 bp) sikerült konkrét CD44 izoformát azonosítani. Ezek, illetve még inkább azon bandek, melyeket direkt szekvenálással nem sikerült azonosítani, elvileg több hasonló hosszúságú terméket rejthetnek. A direkt szekvenálással azonosított band-ek közül egyik sem tartalmazott v3 vagy v6 exonról átírt szekvenciát. Azt, hogy v3- és v6-tartalmú izoformák is expresszálódnak további 4 PCR reakcióval bizonyítottuk. (Ezekben az esetekben a primerek direkt az egyik, másik, vagy mindkettő exonra voltak tervezve, így a reakció pozitivitása önmagában az exonok transzkripciójának bizonyítéka.)

Hasonló CD44-ujjlenyomatot kaptunk mindhárom tumortípus esetén különféle ECM-protein alapokon történő *in vitro* tenyésztést követően: a CD44 ASM tehát a tenyésztési környezettől független.

4.3.2. A CD44 ASM „megfejtése”, az expresszáló CD44 izoformák azonosítása

A next-generation sequencing (NGS) módszer lehetőséget nyújt a minták klonális szekvenálására ami az expresszált CD44 izoformák különösen nagy felbontású beazonosítását tette lehetővé. Ez a piroszekvenálós technikát alkalmazó rendszer

minden, az izolátumban lévő molekula szekvenálását egyenként végzi el, azaz elvben technikailag a mintában expresszáldó összes izoforma azonosítására alkalmas - egyetlen futás alatt - akár szemikvantitatív expressziós jellemzőkkel kiegészítve. Ezzel az eljárással mind az öt, a fingerprint alapjául szolgáló primerpárral előállított reakciótermék-pool szekvenálását elvégeztük. Számos további CD44 izoformát azonosítottunk, amelyet a 18. ábrán már beillesztettünk az egyéb módszerekkel azonosított variánsok sorába.



18. ábra: A colorectalis carcinomára jellemző CD44 ASM háttérében azonosított izoformák listája. (Feketével jelöltük a szekvenálással azonosított, pirossal a csupán kalkulált izoformákat) (189).

A 18. ábrán a három különböző tumornál azonosított összes izoforma unióját mutatjuk be, jóllehet meg kell jegyezni, hogy az összes izoforma csupán a HT25 mintán jelent meg. Ennek – tekintve a gyakorlatilag azonos CD44 ujjlenyomatokat – feltehetőleg reakciókinetikai, illetve technikai oka van, nem jelenti azt, hogy valóban nem történt meg az adott izoforma expressziója.

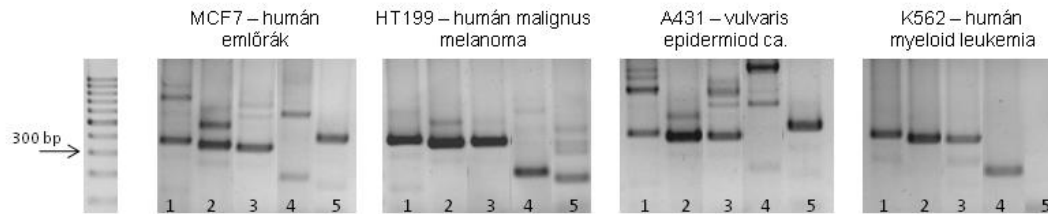
Ezúttal (elvárásainknak megfelelően) v3 és v6 exon terméket tartalmazó izoformák is megjelentek az A-B reakció termékeinek repertoárjában. További 8 olyan izoforma is azonosíthatóvá vált NGS segítségével, melyek band-jei a kvalitatív képről hiányoznak (az igen alacsony expresszált kópiaszám következtében). Ezek között találhatóak a CD44v0 variánsok is, melyekből a konstitutívan expresszálódnak vélt v1 exon is hiányzik.

A további négy PCR reakció termékeinek sora is gazdagodott a direkt szekvenálási eredményehez képest az NGS alkalmazásával. Végül az egyes variáns exonok hosszának pontos ismerete, valamint a primerek kötési helyének egzaktága lehetővé tette, hogy egyes, elsősorban nagyon hosszú izoformákat, melyek a szekvenálási eljárások során rejtve maradtak, becsléssel, termék hosszúság kalkulálással a láthatóan megjelenő izoformák hossza alapján megnevezzünk. (Ez utóbbi „kalkulált” izoformákat az ábrán piros színnel, elkülönítve jelöltük.) A fenti eljárásokkal összesen 26 biztonsággal elkülöníthető CD44 izoformát azonosítottunk. (A 18. ábrán jelölve.)

4.3.3. A CD44 ASM colorectalis carcinoma specificitása

A technikailag bonyolult NGS eljárással szemben az öt PCR reakció termékeinek rendszerezett, állandó sorrendben történő futtatása agaróz gélelektroforézissel vizualizálható jellegzetes CD44 expressziós mintázatot mutatott. Láthattuk, hogy ez a mintázat a három vastagbélrák sejtvonalon teljesen azonos. Normál humán vastagbél nyálkahártyán végzett azonos sorozat PCR vizsgálattal a variáns izoformákat nem tudtuk kimutatni. A colorectalis tumorra specifikus mintázat igazolására több más típusú daganatból származó sejtenyészeten is megvizsgáltuk az ily módon generált ASM-et. Így humán emlőrák, leukaemia, melanoma, laphámsejtes rák, Kaposi szarkóma, tüdőrák, prosztatata adenocarcinoma vonalakat teszteltünk (181). Demonstrációként itt csupán négy vonalat mutatunk be.

A négy különböző eredetű sejtvonal látványosan különböző mintázatot ad, amely nagymértékben aláhúzza a colorectalis tumorokra specifikus mintázat jelentőségét. 19. ábra.



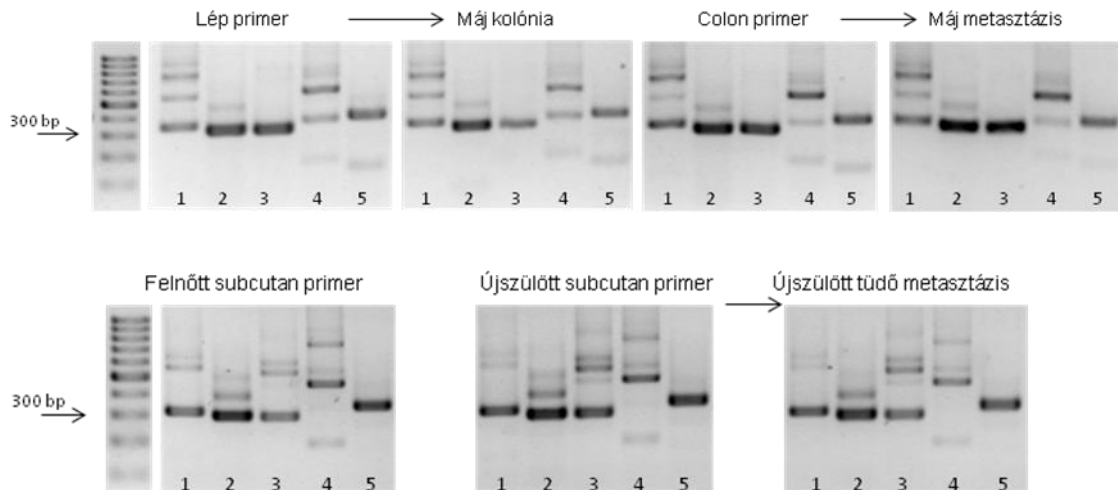
19. ábra: *MCF7* emlőrák, *HT199* melanoma, *A431* laphámrák és a *K562* leukaemia vonalak *CD44* ASM-je. Mind egymástól, mind a colorectalis carcinoma ASM-től különböznek.

4.3.4. A CD44 ujjenyomat jellemzése a tumorprogresszió során

Az *in vitro* sejtenyészeteken végzett sorozat PCR-t xenograft modelleinken is elvégeztük. A CD44 ASM-t változatlanak találtuk mindhárom általunk vizsgált colorectalis tumor (*HT25*, *HT29*, *HCT116*) *scid* egérbe történő implantációját követően nyert *in vivo* eredetű mintákban. Igaz ez az ortotopikusan növekvő (vastagbél) és a heterotopikus primer tumorok esetén (lég, subcutan), felnőtt és újszülött állatokban egyaránt. A CD44 ASM-ot mind a 30 áttétet adó májmetasztázis modell primer tumorán, valamint a 13 subcutan (felnőtt–újszülött modell) tumoron elvégeztük és egyöntetű expressziós mintázatot kaptunk. Itt csupán demonstrációként mutatjuk be a *HT29* különféle lokalizációban mutatott expressziós képét.

A colorectalis carcinomára specifikus CD44 expressziós mintázatot tovább vizsgáltuk a különféle áttétet eredményező modellrendszerünkben. A mintázatot a sejtvonalakhoz, illetve a primer tumorokéhoz képest változatlanak találtuk függetlenül a progresszió technikai módjától.

A 20. ábra a *HT29* tumor xenoinplantációs modelljének eltérő lépéseiből származó ASM-mintázatokat mutatja csupán. Teljesen azonos mintázatot detektáltunk azonban a *HT25* és *HCT116*-tal végzett analóg kísérletek során.



20. ábra: *A primer tumorokéval megegyező CD44 ASM-et mutatnak mind újszülött állatban a tüdőáttétek, mind felnőtt állatban a valódi (colonfalba történő implantációt követően kialakuló) és kolonizáció során (lép implantációt követő) májmetasztázisok.*

4.3.5. A CD44 v3 és v6 exonjainak expressziója – szemikvantitatív expressziós vizsgálatok

A kvalitatív stabilitás nem feltétlen jelent kvantitatív állandóságot is. Exonspecifikus primerekkel, valósídejű PCR segítségével meghatároztuk annak a két exonnak a mennyiségi, expressziós intenzitásbeli változásait, amelyek leginkább az irodalmi érdeklődés középpontjában állnak a tumorprogresszió vonatkozásában.

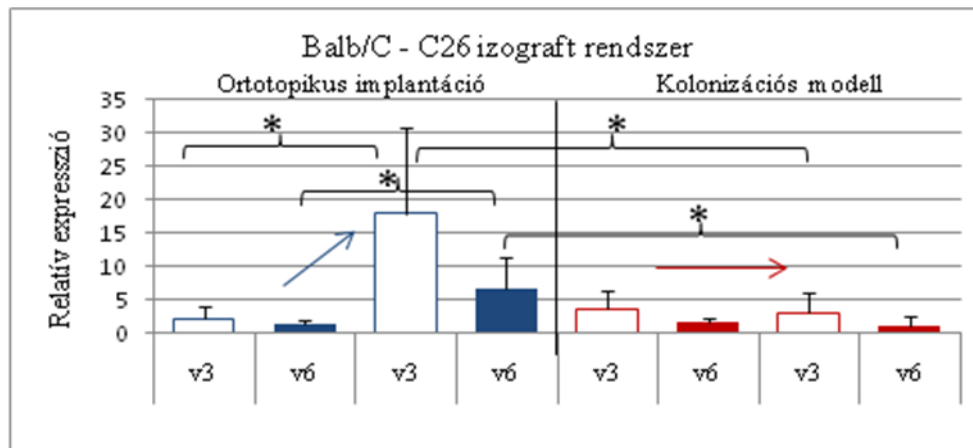
4.3.5.1. Izograft rendszer: májmetasztázis modellek

A kvalitatív CD44 expressziós mintázat a colorectalis carcinomákban a v3 és v6 tartalmú izoformák intenzív expresszióját (transzkripcióját) igazolta. A stabil kvalitatív expressziós mintázat a NGS eredmények tanúsága szerint jelentős transzkripciós kópiaszám különbséget rejthet.

A CD44v3 és CD44v6 expressziót real-time PCR vizsgálattal mennyiségileg, szemikvantitatív mérési rendszerben vizsgáltuk a májáttét képzése során izograft (Balb/C – C26) rendszerben.

A kolonizációs rendszer primer (lép) és szekunder (máj) tumorai, a valódi májattétképzési modell colon és májattéti tumorai, valamint egészséges kontroll állatok colonjából származó minták relatív expressziós aktivitását vizsgáltuk β -actin expressziós intenzitásra normálva (16. diagram).

16. diagram: *A két izograft májattét-képző rendszer tumorainak CD44v3/v6 expressziója.*



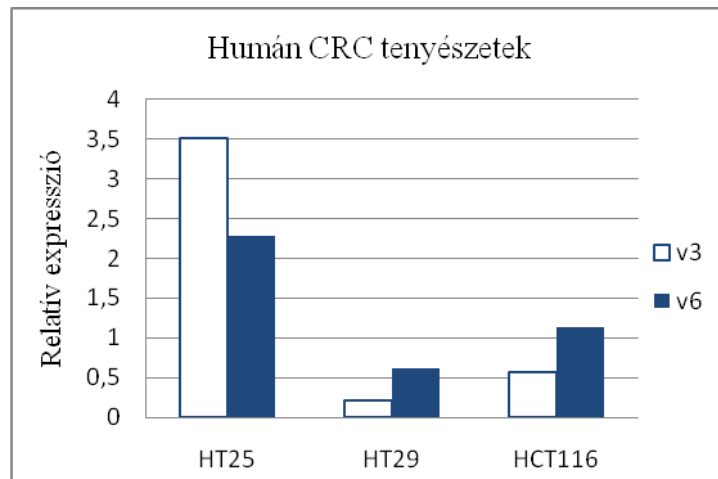
A kontrollként használt a normál Balb/C és *scid* egér colonjából származó minták sem a CD44v3-at, sem a CD44v6-ot nem expresszálták.

A tumormintákból származó eredmények azt mutatják, hogy mindkét variábilis exon expressziós szintje több mint egy nagyságrenddel magasabb a valódi áttétképzési rendszer metasztázisaiban, mint a primer tumorokban (mindkét különbség statisztikailag szignifikáns). Ezzel szemben nem találtunk különbséget a kolonizációs rendszerben a lép primer és a májban kialakuló (gyakorlatilag más lokalizációban lévő primer) tumorok v3 és v6 expressziós intenzitásában. További megfigyelésünk, hogy a két különböző modellrendszerben a primer tumorok között szignifikáns expressziós intenzitáskülönbség nincsen, míg a valódi májattétek statisztikailag szignifikánsan magasabb expressziós intenzitásokkal jellemezhetők, mint a máj kolonizációval kialakuló tumorai. Nem jelentéktelen, s a diagramról egyértelműen leolvasható jelenség a kétféle variáns expressziós szintjének virtuális együttmozgása sem. Úgy tűnik, hogy – legalábbis a Balb/C-C26 rendszerben – a v3 és v6 tartalmú variánsok aránya mindig v3 túlsúlyt mutat.

4.3.5.2. Humán CRC vonalak v3 és v6 expressziós aktivitása (*in vitro*)

In vitro sejttenyészeinket szintén teszteltük v3 és v6 expressziós intenzitás tekintetében a két vizsgált variábilis exonra (v3/v6).

17. diagram: *Humán colorectalis carcinoma sejttenyészetek CD44v3/v6 expressziója.*



A legmagasabb expressziós aktivitást a HT25 sejttenyészet mutatta, míg a legalacsonyabbat a HT29. A különbség több mint tízszeres volt (17. diagram).

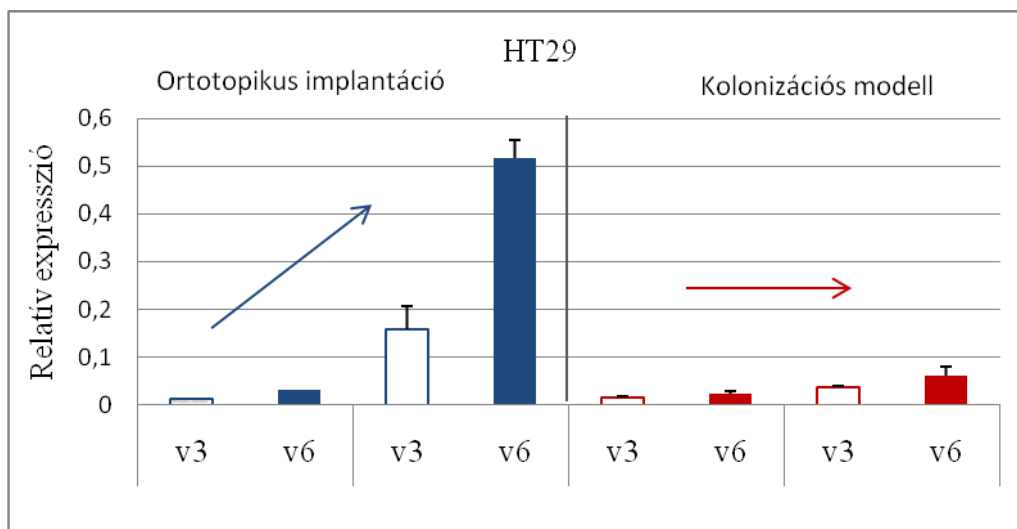
4.3.5.3. Humán CRC májmetasztázis modell xenograft rendszerben

Májáttét és máj kolonizációs xenoimplantációs modelljeinkben, az izograft rendszerhez hasonlóan megmértük a humán colorectalis carcinoma vonalaink CD44v3 és CD44v6 relatív expressziós szintjét a tumorprogresszió során. Jóllehet mindhárom tumortípust mindkét rendszerben egyaránt hasonló metasztatikus potenciálúnak észleltük, három alapvetően különböző génexpressziós profilt kaptunk real-time PCR vizsgálataink eredményeként. Reprezentatív tumormintákon 3-3 párhuzamos méréssel (az izograft rendszerrel bemutatott séma szerint) összehasonlítottuk a colon és lép primer tumorok, valamint a májáttétek és a máj kolóniáinak v3 és v6 expressziós aktivitását.

A HT29 tumort a C26-hoz nagymértékben hasonló viselkedésűnek találtuk: a valódi májáttétek v3 és v6 expressziós intenzitása jelentősen magasabb a primer colon tumorokénál, míg mindkét variábilis exon expressziója változatlan szintet mutat a kolonizációs rendszer primer és szekunder tumoraiban. A kétféle lokalizációban a primer tumorok hasonló expressziós szintet mutattak. Szintén figyelemreméltó a v3 és

v6 expressziójában bekövetkező ingadozások párhuzamos volta, szinte kapcsolt mozgása. Különbség azonban a C26 rendszerhez képest, hogy humán mintákon a v6 expresszió következetesen meghaladja a v3-ét. (Ez azonban reakciókinetikai szempontból diszkutálható jelenség, hiszen a v3/v6 expressziós intenzitásbeli különbségek háttérben potenciálisan a fajspecifikus primerek eltérő kötési affinitásában fennálló különbségek is meghúzódhatnak) (18. diagram).

18. diagram: A HT29 colorectalis carcinoma primer és metasztatikus tumorainak CD44v3/v6 expressziója májáttét-képzési rendszerekben.

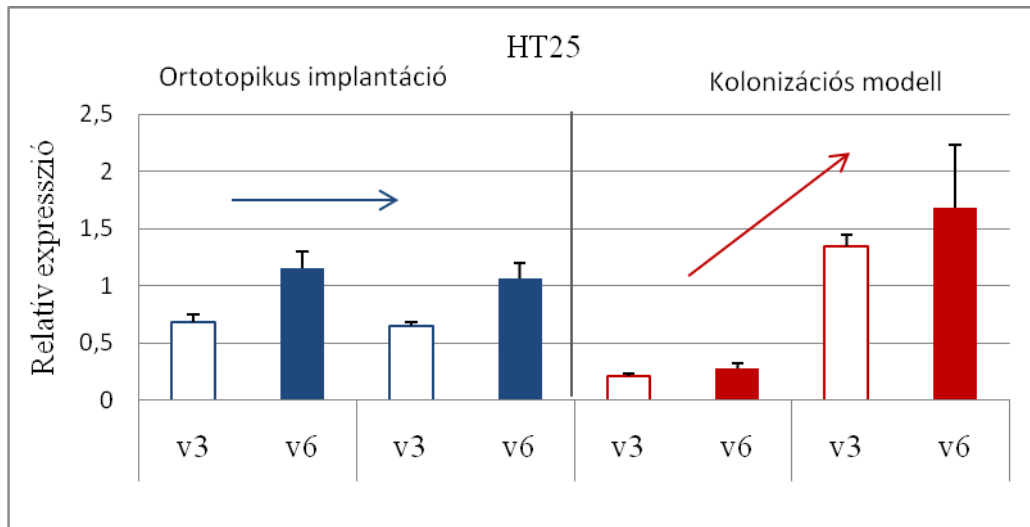


Ezzel szemben a HT25, illetve a HCT116 azonos kísérleti összeállításban alapvetően eltérő expressziós intenzitásbeli jellegzetességet mutat.

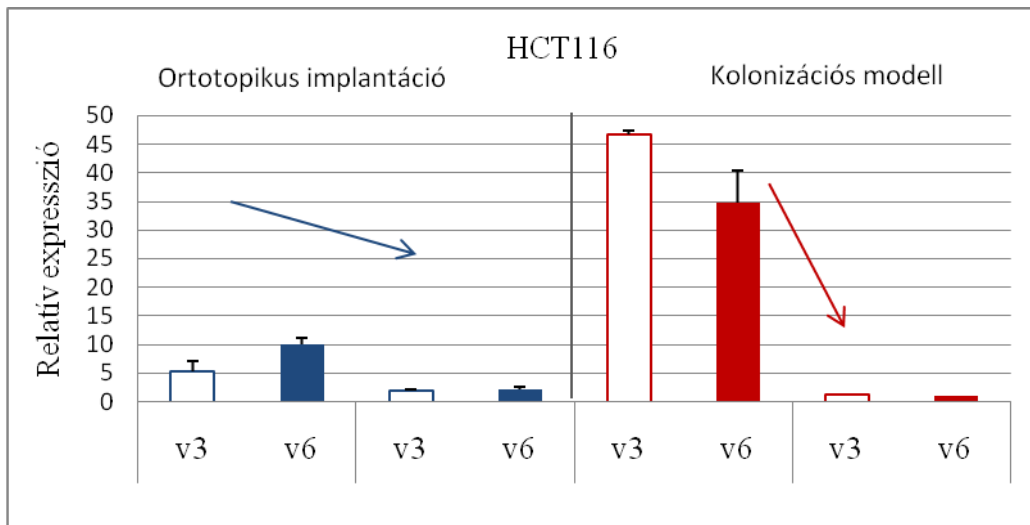
A HT25 éppen a Balb/C-C26 rendszerrel ellentétesen viselkedik. Az ortotopikus rendszerben a primer és az áttét azonos expressziós szintet mutatott, míg a lépimplantációt követően kialakult májkolónia egy nagyságrenddel magasabb expressziós szintet adott (19. diagram).

HCT116-tal hasonló modell rendszerben érdekes eredményt kaptunk. A primer tumorok extrém magas CD44v3/v6 expressziót mutattak. Ehhez képest mindkét forrásból származó májáttétek egy nagyságrenddel alacsonyabb expressziós szintet képviseltek. A harmadik sejtvonal tehát egy egészen más, harmadik féle viselkedési módot reprezentált (20. diagram).

19. diagram: A HT25 colorectalis carcinoma primer és áttéti tumorainak CD44v3/v6 expressziója valódi áttétképző és lép-máj kolonizációs rendszerben.



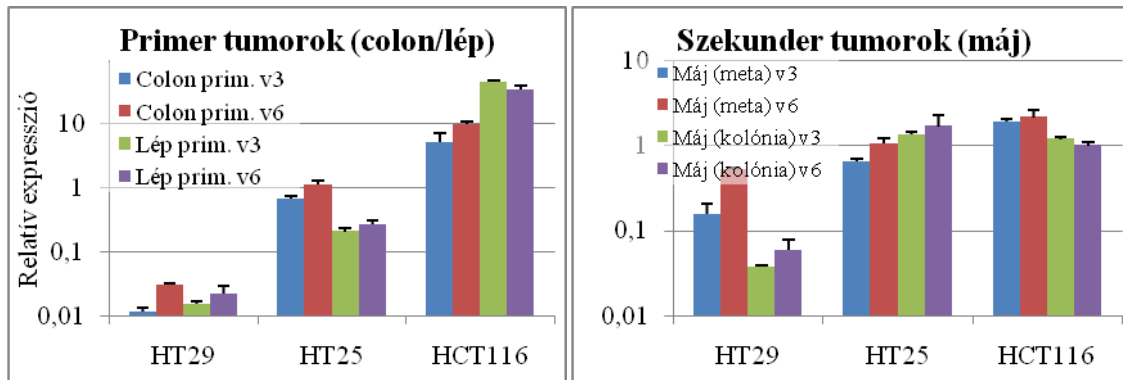
20. diagram: A HCT116 colorectalis carcinoma primer és áttéti tumorainak CD44v3/v6 expressziója máj-áttét-képzési rendszerekben.



Van-e rendszer mégis az eredményeinkben? Érdekes egymás mellé állítani az egyes primer tumorokat, illetve májtumorokat, a nagyságrendi expressziós szintkülönbségek jobb érzékeltetésére logaritmikus skálát használunk (21. diagram).

Az egyes tumortípusok colon és lép primerei egymással hasonló expressziós szintet mutatnak. A különféle sejttípusok v3 és v6 expressziós aktivitása közti különbség azonban rendkívül nagy, a 3-4 nagyságrendet is eléri.

21. diagram: *Colorectalis xenograftok primer (colon és lép) tumorának, májattéteinek és májkolóniáinak CD44v3/v6 expressziója logaritmikus skálán.*



Máj szekunder tumorok esetén a primerekkel összevetve jelentősen csökken a különféle tumortípusok v3 és v6 expressziós szintjei közötti eltérés. Megfigyelhető, hogy a 3-4 nagyságrendbeli szórás itt 1-2 nagyságrendre csökken. További tapasztalatunk, hogy valódi májattéteknél ez a különbség még kisebb is, mint a lépből történő kolóniaképződéskor.

4.3.5.4. CD44 v3 és v6 expressziós aktivitás vizsgálata permisszív és nem-permisszív hostban fejlődő CRC mintákon heterotop implantációs rendszeren

A fenti három, genetikailag különböző humán CRC sejtenyészetet (HT25, HT29, HCT116) egy mesterséges, a host szerepének vizsgálatára kidolgozott állatkísérleti összeállításban 3-3 felnőtt és ugyanennyi újszülött *scid* egérbe implantáltuk subcutan. (Egy felnőtt és egy újszülött állat veszteségünk volt a kísérlet során.) Az implantált sejtszuszpenzió, illetve az implantált sejtszám a felnőtt és újszülött kísérleti karokon azonos volt.

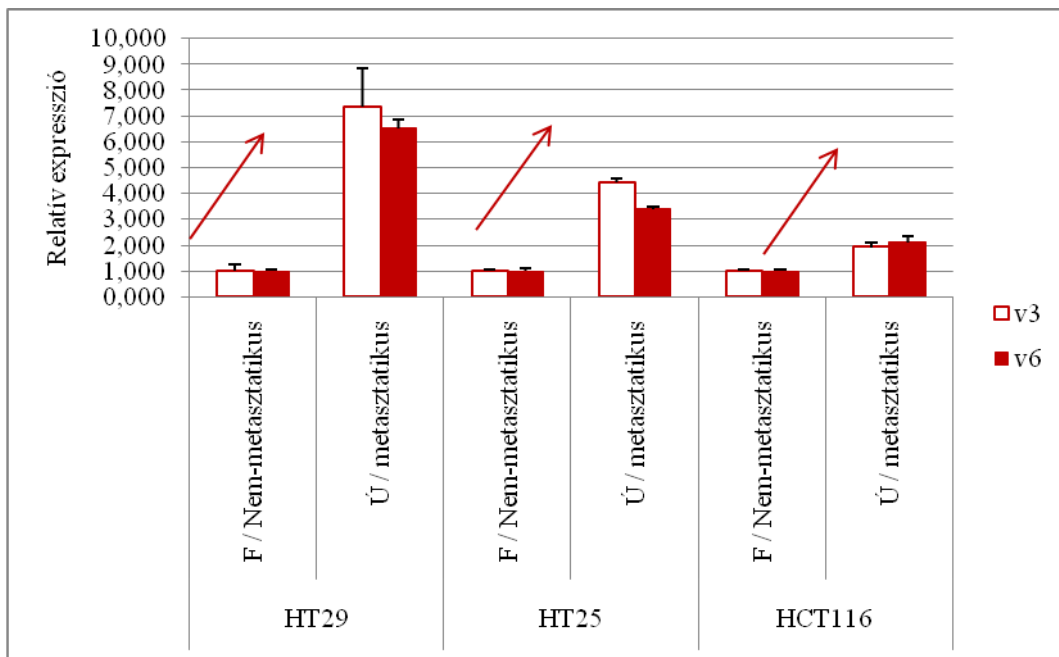
Felnőtt egerek esetén távoli áttétképződést sem makroszkóposan, sem mikroszkópos vizsgálatok során nem találtunk, ellenben minden egyes újszülött állatban már makroszkóposan is tüdőáttétek jelenlétét láthattuk, melyet szövettanilag is igazoltunk.

A CD44v3 és CD44v6 variábilis exonok expresszióját valósídejű PCR-vizsgálatokkal a metasztatikus (újszülött) és nem metasztatikus (felnőtt) primer tumorok reprezentatív mintáin vizsgáltuk (7. táblázat, 22. diagram).

7. táblázat: *Primer subcutan xenograft colorectalis carcinomák CD44v3/v6 expressziója β -actin expressziós szintjére normalva. (n=3)*

		v3 \pm SD	v6 \pm SD
HT29	felőtt	0,099 \pm 0,026	0,317 \pm 0,025
	újszülött	0,732 \pm 0,147	2,068 \pm 0,104
HT25	felőtt	0,678 \pm 0,057	1,429 \pm 0,159
	újszülött	3,010 \pm 0,110	4,857 \pm 0,124
HCT116	felőtt	4,840 \pm 0,339	3,182 \pm 0,203
	újszülött	9,323 \pm 0,780	6,738 \pm 0,744

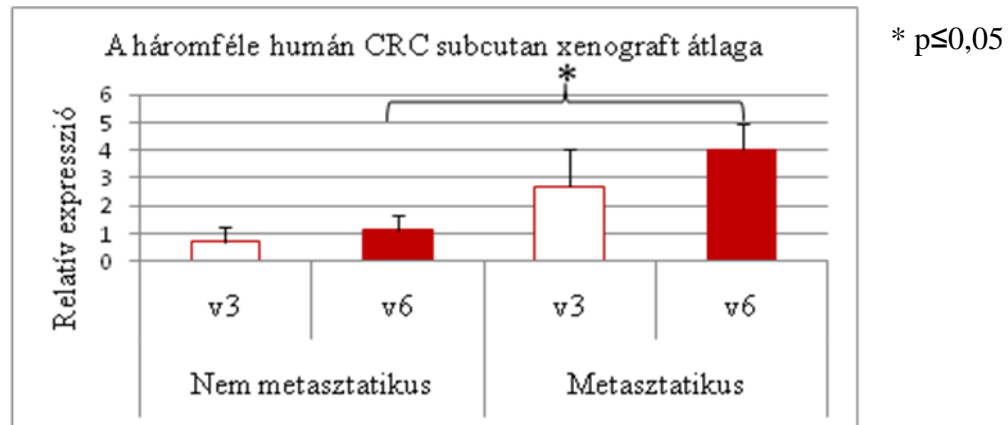
22. diagram: *Felött és újszülött scid egerekbe subcutan implantált humán CRC primer tumorainak CD44v3/v6 expressziója. A felött állatokban kialakult primer tumorok soha nem adtak áttétet, ezzel szemben az újszülött állatokban minden esetben megfigyelhettük azok megjelenését. (Felött tumorok expressziójára normált adatokat ábrázoltunk.)*



A v3 és v6 variánsok expressziós szintje tekintetében látható a felött, nem metasztatikus és az újszülött, metasztatikus primer tumorok különbségét, mely tendencia a tumorok típusától függetlenül egyöntetűen érvényes. A metasztatikus primer tumorok mindhárom tumortípus esetén magasabb CD44v3 és v6 expressziós

szintet mutattak, mint áttétet nem adó párjaik. Jóllehet a tendencia, a legalább 2-3x-os intenzitásbeli különbség egyöntetűnek bizonyult, az összes vizsgált állaton mért átlagos expressziós szintekben. Statisztikailag szignifikáns különbséget csupán HCT116 esetén sikerült kimutatnunk. A háromféle sejttípussal végzett kísérletek poolozása alapján az újszülött állatok metasztatikus tumorainak v3 és v6 expressziója a felnőtt állatok primer tumorainak v3/v6 expressziójánál egyértelműen magasabb, statisztikailag szignifikáns szintet a különbség a v6 exon vonatkozásában ért el (23. diagram).

23. diagram: A három általunk vizsgált humán colorectalis carcinoma (HT25, HT29, HCT116) CD44v3/v6 expressziója átlagának összehasonlítása felnőtt (nem metasztatikus) és újszülött (metasztatikus) subcutan primer tumora esetén.



Megjegyzendő továbbá, hogy a v3 és v6 expressziós intenzitásbeli szintek a teljes modell-rendszerben mindvégig együtt mozogtak, ismételten „kapcsolt” v3–v6 expressziós ingadozásokat észleltünk v6 dominanciával.

4.3.5.5. Szolid tumorok intratumorális heterogenitásának vizsgálata a CD44 v3 és v6 expresszió vonatkozásában

Ugyanezen kísérlet (subcutan implantáció) keretén belül megvizsgáltuk, hogy a CD44 variánsok tekintetében releváns-e a mintavétel helye és nagysága. A kérdés súlyát a „klónszelekció” elve adja. Feltételezhető ugyanis, hogy – adott esetben a tumor mikro környezetének, vagy általánosságban a hostnak hatására nem a teljes primer tumor génexpressziós profilja változik, hanem a proliferáció során elegendő egy „metasztázikus szubklón” kialakulása. Ez egyszersmind a makroszkóposan és

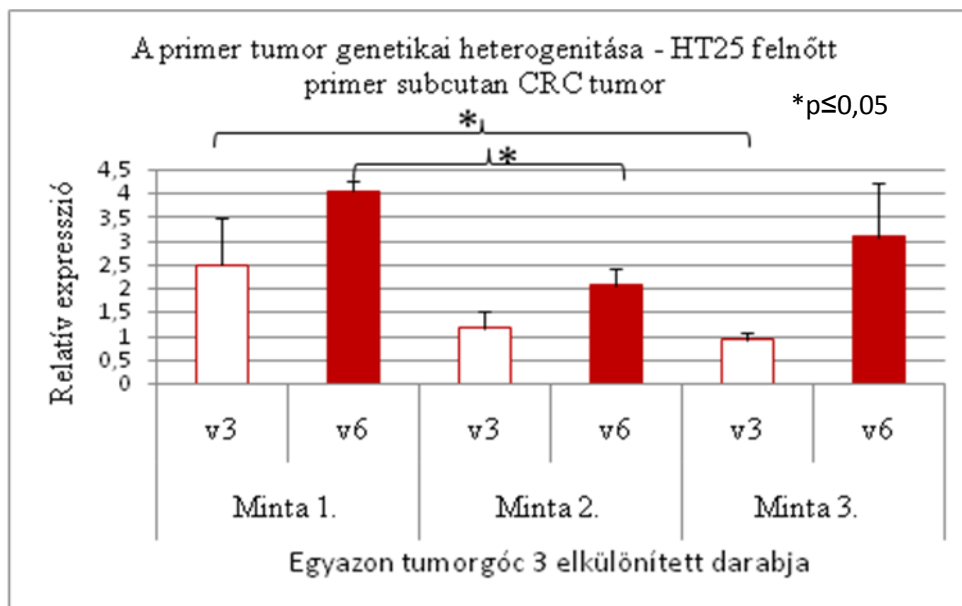
mikroszkóposan is egységes képet mutató primer tumor genetikai (és funkcionális) heterogenitását, oligoklonalitását jelentené.

A jelenség vizsgálatára összehasonlítottuk egyazon felnőtt *scid* egérben subcutan növesztett HT25 humán colorectalis xenograft tumor három különböző lokalizációjából vett részmintájának CD44v3 és CD44v6 kvantitatív expresszióját (8. táblázat, 24. diagram).

8. táblázat: Egyetlen tumor három részegységének CD44v3/v6 expressziója.

HT25 felnőtt subcutan primer tumor			
	Minta 1. \pm SD	Minta 2. \pm SD	Minta 3. \pm SD
v3	2,49 \pm 0,98	1,16 \pm 0,36	0,92 \pm 0,15
v6	4,03 \pm 0,21	2,05 \pm 0,35	3,07 \pm 1,15

24. diagram: Egyetlen tumor három részegységének CD44v3/v6 expressziója.



Egyazon tumormasszán belül szignifikáns eltérést tapasztaltunk mind CD44v3, mind CD44v6 relatív expressziója inenzitálásának tekintetében annak három különböző lokalizációból vett mintáján végzett real-time PCR vizsgálattal. Itt a mérési hiba (három párhuzamos mérés alapján minden egyes mintán) a tumoron belüli heterogenitásból adódó szórásnál kisebbnek bizonyult. Ez a különbség bár esetenként szignifikáns volt, nem mutatott nagyságrendbeli eltéréseket.

4.3.6. CD44 v3 és v6 expressziós szintek vizsgálata humán CRC vonalak különféle ECM proteineken történő proliferációja során

A tumor mikrokörnyezete („host”) által humán CRC sejtvonalainkon generált hatás, mely a tumort metasztatikus, illetve nem-metasztatikus fenotípussal ruházta fel jól korreláltható volt a primer tumorok CD44 v3 és v6 exonjainak expressziós (transzkripció) intenzitásával. Ezt a mikrokörnyezeti hatást egyszerűsített formában különféle extracelluláris mátrix (ECM) proteinek és glikoproteinek egyenkénti jelenlétének vizsgálatával, *in vitro* próbáltuk modellezni. Célunk annak kiderítése volt, hogy az *in vivo* körülmények között is jelenlevő molekulák közül melyek azok, amelyeknek szerepe lehet a potenciálisan metasztatikus CD44 fenotípus kisselektálásában. Mátrigel (MG), fibronectin (FN), laminin (Lam), kollagén IV.(Coll) illetve hyaluronsav (HA) jelenlétében és kontrollként a szokásos módon *in vitro* növesztettünk HT25, HT29 és HCT116 sejteket. Korábban megmutattuk, hogy tumorsejt tenyészetünk CD44 alternatív splice mintázata (CD44-ujjlenyomata) az ECM alapoktól függetlenül stabil .

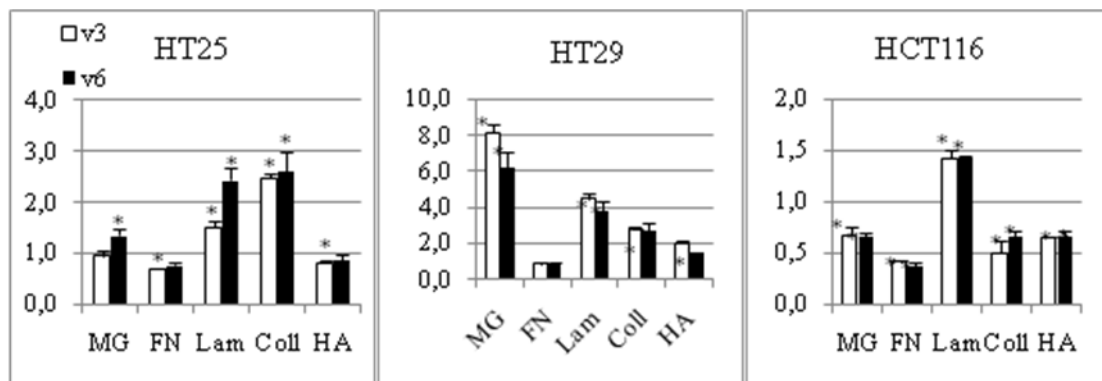
Valósídejű PCR segítségével megmértük a CD44v3 és v6-os exonok kvantitatív expressziójának változását (9.táblázat, 25. diagram).

Megállapítható, hogy az ECM proteinek a CD44v3 és v6 expresszió tekintetében nem hatástalanok. Egyértelműen állítható, hogy a három, genetikailag és fenotípusosan is különböző colorectalis tumor az ECM-alkotókra való válaszkészségük tekintetében is különbözik. Míg a HT25 és a HT29 CD44v3 és v6 expresszióját a kollagén és laminin növeli, a HCT116 ezekre az ECM komponensekre igen mérsékelten reagál a fenti CD44 variáns expresszió tekintetében. HT29 esetén a Matrigel és a hyaluronsav is expressziós intenzitásbeli növekedést eredményez, HCT116 esetén egyedül a laminin CD44v3-ra és v6-ra gyakorolt expressziós intenzitásfokozó hatása detektálható.

9. táblázat: *Különböző ECM alapokon proliferáló colorectalis carcinoma sejtenyészetek CD44v3/v6 expressziós intenzitása. A statisztikailag szignifikáns eltérést ($p \leq 0,05$) vastag számmal jeleztük. Kontroll (Neg), Mátrigél (MG), fibronectin (FN), laminin (Lam), kollagén IV.(Coll), hyaluronsav (HA), standard deviáció (SD), mérésszám (n), szignifikancia szint (p)*

HT25		v3	SD	n	p	v6	SDN	n	p
		Neg	1,000	0,042	3		1,000	0,172	3
	MG	0,943	0,127	3	0,498	1,353	0,129	3	0,047
	FN	0,702	0,005	3	0,0003	0,785	0,047	3	0,104
	Lam	1,507	0,116	3	0,002	2,440	0,217	3	0,001
	Coll	2,477	0,092	3	0,00001	2,606	0,381	3	0,003
	HA	0,827	0,031	3	0,005	0,879	0,096	3	0,347
HT29		v3	SDN	n	p	v6	SDN	n	p
		Neg	1,000	0,109	3		1,000	0,095	3
	MG	8,137	0,456	3	0,00001	6,202	0,886	3	0,001
	FN	0,827	0,066	3	0,079	0,893	0,084	3	0,218
	Lam	4,475	0,334	3	0,00007	3,818	0,536	3	0,001
	Coll	2,829	0,017	3	0,00001	2,743	0,382	3	0,002
	HA	2,013	0,143	3	0,001	1,487	0,030	3	0,001
HCT116		v3	SDN	n	p	v6	SDN	n	p
		Neg	1,000	0,088	3		1,000	0,155	3
	MG	0,676	0,085	3	0,010	0,662	0,039	3	0,021
	FN	0,418	0,016	3	0,0004	0,360	0,050	3	0,002
	Lam	1,425	0,089	3	0,004	1,432	0,017	3	0,009
	Coll	0,503	0,120	3	0,004	0,645	0,076	3	0,024
	HA	0,654	0,003	3	0,002	0,661	0,053	3	0,023

25. diagram: *Különböző ECM alapokon proliferáló colorectalis carcinoma sejtenyészetek CD44v3/v6 expressziós intenzitása. * $p \leq 0,05$*



Összevetve ezt az eredményt az *in vivo* tapasztalatainkkal, észrevehető, hogy állatkísérleti rendszereinkben szintén a HT29 mutatkozott a legérzékenyebbnek a tumor mikrokörnyezet által aktivált CD44v3 és CD44v6 expresszió fokozódása tekintetében.

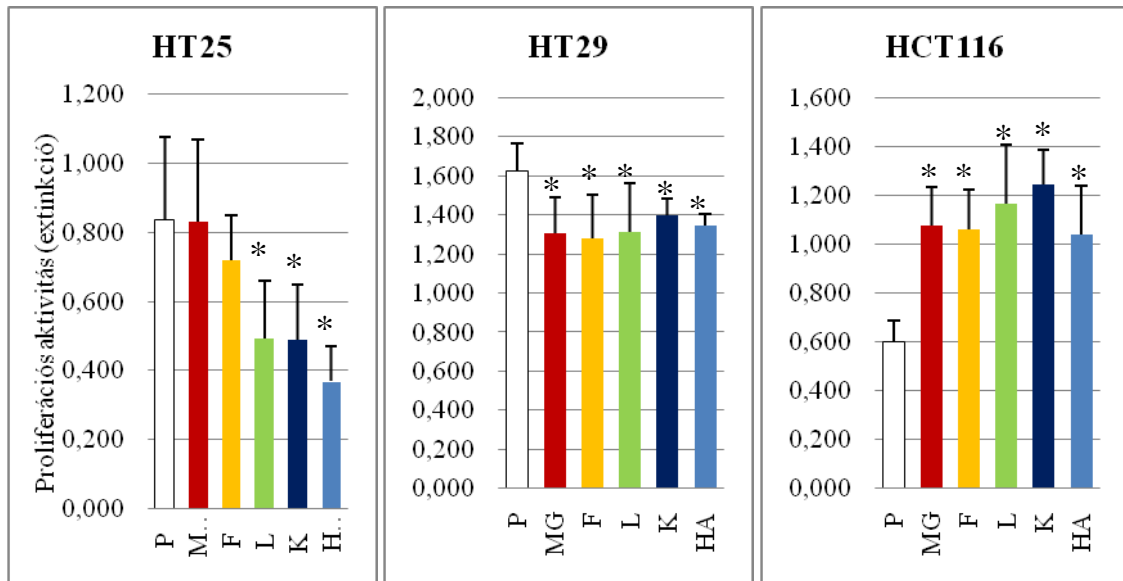
4.4. MTT teszt különféle extracelluláris mátrix protein alapon tenyésztő colorectalis carcinoma vonalakon

A tumor mikrokörnyezetének egyszerűsített modelljeként az extracelluláris mátrix egyes komponensein tenyésztve 3 különböző humán colorectalis carcinoma vonalon az ECM alapoknak a proliferációra való hatását vizsgáltuk. A 10. táblázat a „vak”, azaz tumor nélküli extinkciós eredmények kivonásával nyert adatok alapján készült. Az egyes ECM proteineken növő tumorok átlagos proliferációs aktivitását a kezeletlen (plasztik=P) lyukakban produkált proliferációs aktivitásokhoz hasonlítottuk. Minden egyes mérési csoportban 10 párhuzamossal dolgoztunk, a legalacsonyabb és a legmagasabb értékeket nem vettük figyelembe. (26. diagram)

10. táblázat: *HT25, HT29 és HCT116 humán colorectalis carcinoma vonalak proliferációs aktivitása (MTT) különböző ECM komponens alapokon történő tenyésztés során. P- plasztik (kontroll), MG – matrigel, F – fibronectin, L – laminin, K – kollegén IV., HA – hyaluronsav. Átlag – számtani közép, SD – standard deviáció, n- párhuzamos mérések száma, p – konfidencia szint*

	HT25				HT29				HCT116			
	Átlag	SD	n	p	Átlag	SD	n	p	Átlag	SD	n	p
P	0,837	0,239	8		1,626	0,139	8		0,599	0,088	8	
MG	0,832	0,238	8	0,97	1,308	0,184	8	0,0016	1,076	0,159	8	3x10 ⁻⁶
F	0,719	0,131	8	0,242	1,277	0,228	8	0,0024	1,060	0,162	8	6x10 ⁻⁶
L	0,493	0,168	8	0,005	1,315	0,245	8	0,0075	1,167	0,240	8	8x10 ⁻⁴
K	0,488	0,160	8	0,0041	1,402	0,085	8	0,0016	1,242	0,147	8	4x10 ⁻⁸
HA	0,369	0,101	8	0,0002	1,347	0,059	8	0,00015	1,038	0,199	8	9x10 ⁻⁴

26. diagram: A HT25, HT29 és HCT116 MTT proliferációs tesztjei alapján ábrázoltuk a különféle ECM komponensek proliferációra gyakorolt hatását. * $p \leq 0,05$



A HT25 proliferációját a laminin, kollagén IV. és hyaluronsav jelenléte szignifikánsan lassította. Hasonló proliferációt csökkentő hatást tapasztaltunk a HT29 tumorra vonatkozóan mind az öt ECM komponens esetén. Ezzel ellentétben a HCT116 sejtenyészet proliferációját valamennyi tesztelt ECM komponens szignifikánsan fokozta.

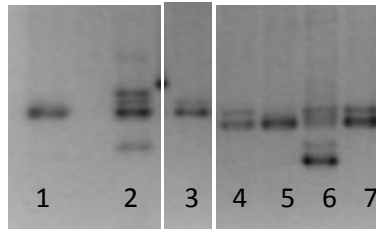
4.5. A WT1 génexpresszió kvalitatív jellemzése a humán CRC progressziója során

A WT1 gén ektópiás expressziójának megjelenése colorectalis tumorokban irodalmi tény. Számos tumor esetén ismert a gén overexpressziójának illetve bizonyos splice variánsainak asszociációja a tumor progressziójához.

A kísérleteink során mindhárom humán colorectalis vonalunk WT1 expresszióját vizsgáltuk.

Mind *in vitro* sejtenyészetben, mind kétféle xenograft májattétképzési modellünk primer és metasztatikus tumorain WT1-specifikus kvalitatív nested-PCR vizsgálatot végeztünk.

Sejtvonalainkon a következő eredményt kaptuk (21. ábra):



21. ábra: *HT25, HT29 és HCT116 humán CRC sejtenyészetek és állatkísérleti minták WT1 splice mintázata: 1. HT25 szuszpenzió, 2. HCT116 szuszpenzió, 3. HT29 szuszpenzió, 4. HT29 colon primer tumor, 5. HT29 májáttét, 6. HT29 hasúri áttét, 7. HT29 nyirokcsomó metasztázis.*

HT25: KTS+, KTS-, 1 Zn-ujj hiányos splice variáns

HT29: KTS+, KTS-, gyenge 1 Zn-ujj hiányos splice variáns

HCT116: KTS+, KTS-, 1 Zn-ujj hiányos splice variáns

Humán colorectalis carcinoma sejtenyészetek *scid* egérbe történő ortotopikus (vastagbél falba) és heterotopikus (lépbe történő) implantációját követően a májban valódi áttétek illetve az utóbbi esetben kolóniák alakultak ki. Mind a primer, mind a májba lokalizálható tumoroknak (illetve a nyirokcsomó áttétnek) megvizsgáltuk a WT1 expressziós splice mintázatát (11. táblázat).

Összevetve a CD44 alternatív splice-mintázatának feltűnő stabilitásával, a WT1 esetén igen heterogén expressziós képet kaptunk a colorectalis tumorok áttéti mintáin. Gyakorlatilag mind a KTS+, mind a KTS-, mind a Zn-ujj hiányos splice variánsok külön-külön és kombinációban egyaránt előfordulnak a primer és áttéti tumorokban. Mintáink statisztikai elemzésre nem alkalmasak, azonban a heterogén kép demonstrálására feltétlenül igen. HT25 és HCT116 rendszereinknél a valódi áttétképzési modellrendszerben (vastagbél – májáttét) a primer tumorok mindegyike KTS+ és KTS- splice variánsokat egyaránt expresszált, míg a májáttétekben csupán KTS- splice variáns jelent meg. A HT29-es hasonló rendszerben változatosabb képet kaptunk, a primer

tumorminták fele KTS+ és KTS- kettős expresszázó volt, míg másik fele csupán KTS-variánst expresszált. A májmetasztázisok között is mindkét variáció előfordult.

11. táblázat: *Primer és metasztatikus humán CRC (ortotopikus implantációból és lép-máj modellből származó) xenograftok WT1 splice variánsai.*

Egér kódja	Implantált sejttípus	Oltás helye	WT1 splice variánsok (RT-PCR)		
			Primer tumor	Májmeta.	Nyirokcsomó
III/1	HCT116	lép	KTS+,KTS-,BB	KTS+,KTS-	∅
III/4	HCT116	lép	KTS+,KTS-	KTS+,KTS-	∅
III/5	HCT116	lép	KTS+,KTS-	KTS+,KTS-	∅
III/7	HCT116	vastagbél	KTS+,KTS-	KTS-	∅
Á9	HT25	lép	KTS+, KTS-	KTS+,KTS-	∅
Á26	HT25	lép	KTS+, KTS-	BB	∅
Á8	HT25	lép	neg	∅	KTS+, KTS-
Á11	HT25	lép	neg	KTS-	∅
Á13	HT25	lép	neg	KTS+, KTS-	∅
Á1	HT25	vastagbél	KTS+, KTS-,	KTS-	∅
Á14	HT25	vastagbél	KTS+,KTS-	KTS-	∅
Á22	HT29	lép	KTS+, KTS-	KTS+, KTS-	∅
Á23	HT29	vastagbél	KTS+, KTS-	KTS+, KTS-	KTS+,KTS-
II/Á31	HT29	vastagbél	KTS+, KTS-	KTS+, KTS-	∅
II/Á15	HT29	vastagbél	KTS+, KTS-	KTS-	KTS+, KTS-
Á25	HT29	vastagbél	KTS-	KTS+, KTS-	∅
Á28	HT29	vastagbél	KTS-	KTS+, KTS-	∅
II/Á33	HT29	vastagbél	KTS-	KTS+, KTS-	∅
II/Á20	HT29	vastagbél	neg	neg	KTS+, KTS-
II/Á35	HT29	vastagbél	neg	neg	KTS+, KTS-

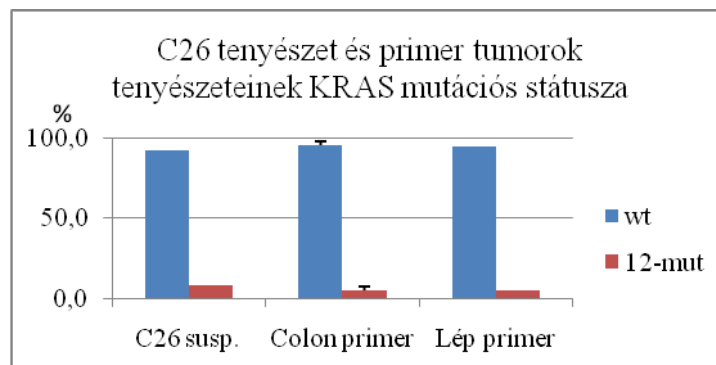
Megállapítható továbbá, hogy a KTS- splice variánsok (ahol WT1 expresszió kimutatható volt) konstitutívan jelen vannak, eltérést pusztán a KTS+ variánsok, illetve a Zn-ujj hiányos variánsok tekintetében kaptunk.

4.6. KRAS mutációs státus vizsgálata a C26 – Balb/C metasztatikus izograft rendszereken

4.6.1. A KRAS státus szinkron vizsgálata primer colon tumoron, keringő tumorsejten (CTC) és áttétekben

Mindenekelőtt lássuk, hogy az eredeti C26 sejttenyészet KRAS vad/mutáns allél aránya hogyan változott a Balb/C egérbe történő implantáció (májba, illetve lépbe), majd az autopsziát követően e tumorokból létrehozott sejttenyészetek növekedése során.

27. diagram: Egér C26 CRC sejttenyészet, valamint a kétféle primer tumor (colon, lép) KRAS 12-lókuszt vad/mutáns allél aránya. $n=13$



Jóllehet statisztikai elemzésre a minta nem alkalmas, nyilvánvalóan érdemben nem változott a vad/mutáns allél aránya. Látható, hogy RNS (transzkripció) alapú vizsgálat esetén a KRAS mutáns C26-sejtszuszpenzió kevesebb, mint 10%-ban expresszál mutáns allélt (27. diagram). Az ortotopikus implantációs rendszerben 11 állatból sikerült a primer tumoron kívül legalább egy áttétből is értékelhető, vizsgálható sejttenyészetet nyernünk. E kísérlet keretein belül összesen 1 keringő tumorsejtből származó tenyészetet sikerült fenntartanunk. A következő 12. táblázatban a 12-es lokusz mutáns allélek arányát mutatjuk be. Ez a százalékos érték éppen fele a kalkulálható mutáns sejtek arányának heterozigóta mutáns sejteket és egyenletes vad/mutáns transzkripciót feltételezve (12. táblázat).

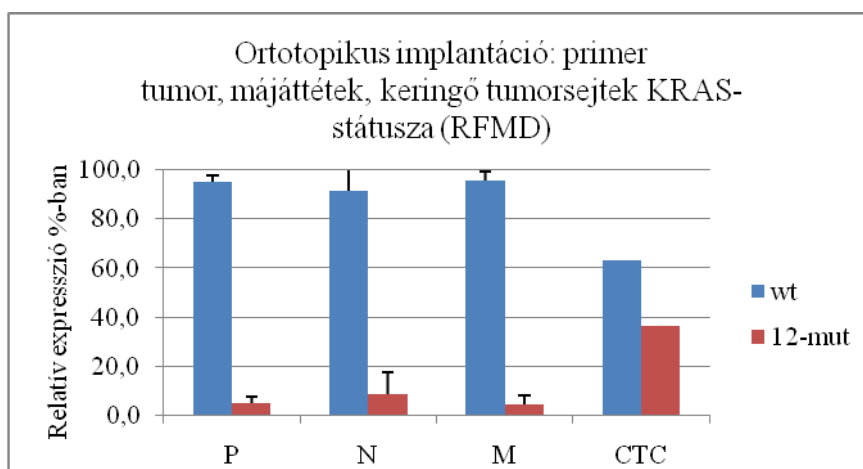
Méréseink azt igazolják, hogy a szolid (tetszőleges lokalizációban proliferáló) tumorok tenyészetei szignifikáns mértékben nem mutatnak a vad/mutáns KRAS allél expressziós arányban eltérést.

12. táblázat: *KRAS* mutáns allél % (mutáns/összes*100) C26 egér CRC valódi májattét-képzési rendszerének primer (P), metasztatikus máj (M) és nyirokcsomóáttéti (N) tumorainak, valamint keringő tumorsejtek (CTC) tenyészetén.

Egér kódszáma	P	N	M	CTC
1	8,8	4,4	13,5	
2	6,7		2,8	36,7
3	3,9	6,5	4,9	
4	1,8	4,5	0,9	
5	3,5	6,6		
6	8		1,9	
7	2		5,8	
8	3,6		3,5	
9	3,5	7,8	3	
10	3,3	28,1	4	
11	9,1	2,4		

Ellenben az egyetlen CTC tenyészetünk jelentősen eltérő allél százaléokban, közel 40%-os mutáns rátát mutatott, mely közel 80%-os mutáns sejt aránynak felel meg (28. diagram).

28. diagram: *KRAS* mutáns és vad allélok aránya C26 egér CRC valódi májattét-képzési rendszerének primer (P), májattét (M) és nyirokcsomóáttéti (N) tumorainak, valamint keringő tumorsejtek (CTC) tenyészetén. n=11

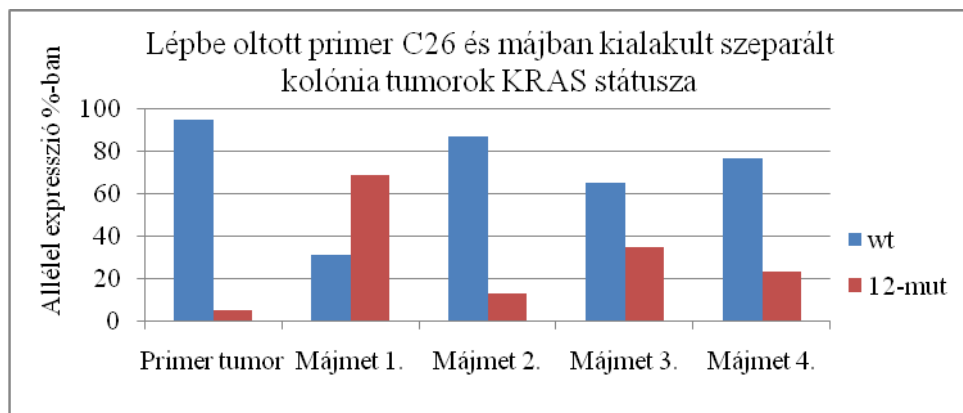


4.6.2. A lép-máj modellrendszer (máj kolonizációs rendszer) értékelése a máj szekunder tumorai KRAS mutációs státusának függvényében.

Egyetlen Balb/C egérbe heterotopikusan, lépbe történő C26 sejtszuszpenzió implantáció nyomán a primer tumoron kívül 4 különálló májmetasztázis gócot izoláltunk. Mind a primer tumorból, mind a klóniákból sejtenyészetet indítottunk, melyekből RNS izolálást követően KRAS mutációs státus meghatározást végeztünk.

Kolonizációs rendszerben a lép primer tumor tenyészetéhez képest (melyről igazoltuk, hogy az eredeti C26 sejtvonal tenyészetéhez képest változatlan vad/mutáns expressziós allél arányt tart) májban képződő kolóniák tenyészetei jelentősen magasabb arányban expresszálják a mutáns KRAS allélt. A magasabb mutáns/vad arányok inkább a keringő tumorsejteknek a kapott arányt tükrözik.

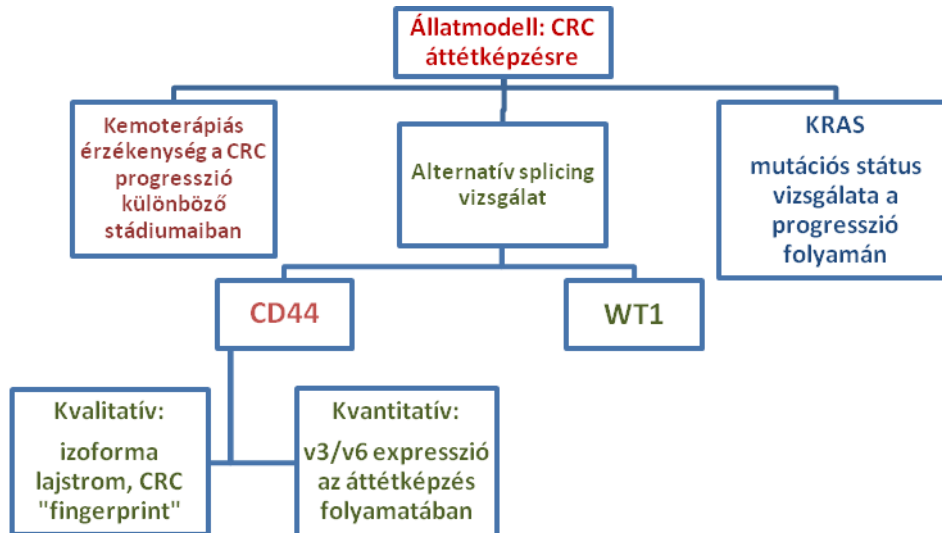
29. diagram: *KRAS mutáns és vad allélok aránya C26 egér CRC lép-máj modelljén: egyetlen primer tumor és négy kolonizációval létrejövő májgátét összehasonlítása.*



A májban kialakuló kolóniák egymásól eltérő vad/mutáns KRAS expressziós arányt mutatnak (29. diagram).

5. Megbeszélés

Kísérleti összeállításunk a következő logikai sémát követte: 22. ábra.



22. ábra: Kísérleti összeállítás logikai sémája

5.1. Az állatkísérleti rendszer értékelése

A colorectalis carcinoma kialakulásának (karcinogenezis) szekvenciális jellege, az egymást követő morfológiai lépések genetikai háttére (a normál mucosától a jóindulatú elváltozásokon át a carcinomáig) részleteiben ismert jelenségsor (2,7). Ezzel szemben a szintén „szekvenciálisnak” mondható távoli áttétképzés eseménysorának háttérében álló genetikai és epigenetikai változások sokkal kevésbé ismertek (12). Ennek egyik alapvető oka, hogy bonyolult, egymásra épülő kaszáddal állunk szemben. A primer tumorból az áttétképzésre alkalmas sejtek/sejtcsoport kiszakadása már bonyolult folyamat eredménye, melyről tudjuk, hogy központi eleme az EMT, a primer tumor angiogenezise, valamint a tumorsejtek intravazációja. Központi jelentőséget feltételezünk e helyen a tumor és a stroma interakciójának (ahol a stromális komponensek alapvetően a „host” eredetű mikrokörnyezetet képviselik). A tumorsejteknek a nyirok-, illetve vérkeringés rendszerében való túlélése, az

immunrezisztencia, valamint különböző célszervekben való átmeneti (csontvelő), illetve végleges kitapadása talán a legkevésbé ismert lépése a metasztatikus kaszkádnak. Végül a metasztázis célszervében való kitapadás, az extravazáció, illetve az új mikrokozonyezetben való proliferáció egy a primer tumorban lezajlott eseményekkel ellentétes, MET jelenségen keresztül történik meg. Nyilvánvaló tehát, hogy bár egyetlen sejt, vagy legalábbis egyetlen sejtklón fut végig a teljes metasztatikus eseménysoron, annak különféle fázisaiban fenotípusosan alapvetően eltérő igényeknek kell megfelelnie.

Annak érdekében, hogy az áttétképzés folyamatának egyes fázisai részleteiben vizsgálhatók legyenek, illetve a tumor és mikrokozonyezetének interakciója a metasztatikus sejtklón plasztikus modulálásában tetten érhető legyen, egy komplex állatkísérleti modellrendszert dolgoztunk ki.

Kétféle valódi áttétet generáló modellünk volt: májmetasztázis és a kizárólag mesterséges körülmények közt létező tüdőmetasztázis modell. A **valódi áttétképzés** lényege, hogy a tumorsejt az áttét kialakulásáig végigjárja a teljes metasztatikus kaszkádot, azaz a primer tumor kialakulását követően a daganatsejt kilép a keringésbe (intravazáció), túléli a keringés megpróbáltatásait (találkozás az immunrendszer sejtjeivel, mechanikus behatások) kitapad a célszervben majd kilépve a keringésből (extravazáció) az új mikrokozonyezet feltételeihez alkalmazkodva, azokat akceptálva új utódpopulációt hoz létre. Ez történik a colorectalis tumorok ortotopikus, azaz colonfalba történ implantációját követően. Ezzel ellentétben a heterotróp, azaz lépbe történő implantáció során („lép-máj model”) a sejtek kihagyják a kaszkád intravazációs lépését sőt a keringésben is rövidített utat tesznek meg, hisz a lépből direkt úton kerülnek a májba. Ezt a folyamatot kolonizációnak tekintjük. Az új mikrokozonyezethez (máj) ebben az esetben is ugyanúgy alkalmazkodniuk kell a CRC sejteknek, mint a valódi áttétképzés során, ezzel lehetőséget adva számunkra, hogy meghatározzuk, milyen expressziós mintázat köthető az új mikrokozonyezethez és milyen a valódi áttétképzésre alkalmas sejtek expressziós mintázata (bármely génről vagy génmintázatról legyen is szó) (190). Azaz a kétféle modell párhuzamos vizsgálata a metasztatikus kaszkád **korai** (primer tumorban zajló) **eseményeinek a késői** (extravazáció, proliferáció a májban) jelenségektől való **elkülönítését** tette lehetővé. Amennyiben ugyanis az azonos

tumorsejtek a kétféle módon képzett utódpopulációban különböző viselkedést (génexpressziót) mutatnak, úgy az eltérésért az áttétképzés korai fázisa okolható. A két rendszert háromféle, genetikai tulajdonságaikban ismertén különböző humán colorectalis sejttípussal párhuzamosan teszteltük immundeficiens, *scid* egereken, xenograft rendszerben. Az **immunrendszernek a tumorprogresszióra gyakorolt** modulátor hatásainak kontrolljára hasonló összeállításban a kétféle modellt izograft rendszeren is leteszteltük Balb/C egérben izograft C26 tumor szuszpenzió implantációjával. A valódi áttétképzés vizsgálatára alkalmazott másik modellünk, a tüdőmetasztázis modell lényege, hogy felnőtt és újszülött egerekbe (itt *scid* egérbe implantált humán colorectalis carcinoma szuszpenzió) heterotopikusan, a lumbális régió subcutan területén képeztünk primer tumort. Ennek a colorectalis tumor szempontjából mesterséges rendszernek az érdekessége, hogy subcutan primer tumor távoli áttétet felnőtt állatban sohasem képez (ilyen értelemben a „host” az áttétképzésre nem-permisszív), ellenben az újszülött állatok mindegyike primer subcutan tumort és hematogén áttétként szórt tüdőmetasztázisokat is képez (az újszülött „host” az alapvetően áttétképzésre hajlamos carcinoma sejtek számára permisszív környezetet biztosít). Mivel a kísérlet során az újszülött és a felnőtt állatba egyazon tumorsejt tenyészetéből történik implantáció, a tumorsejtek „viselkedése”, illetve az annak hátterében tettenérhető genotípusos és fenotípusos változások egyértelműen a „host” hatásának tulajdonítható. Ez a rendszer tehát indierkt módon a **tumor mikrokozonyzetét/host/stroma hatását** vizsgálja. Méréseinket azonban magán a tumoron végeztük: a xenograft rendszer ugyanis humán specifikus primerek használatával a daganat humán tumorsejt/egér stróma komponensei között képes differenciálni. Az *in vivo* rendszerből származó mintákból létrehozott **in vitro tenyészeteink** lehetővé tették számunkra, hogy az ugyanazon egyedből származó primer, áttéti és esetenként keringő tumorsejtek tulajdonságait teljes stromális „szennyezettség” nélkül vizsgáljuk.

Valamennyi fent részletezett modellünk a gyakorlatban kivitelezhetőnek bizonyult minden vizsgált tumortípussal (C26, HT25, HT29, HCT116) és molekuláris biológiai vizsgálatokra alkalmas mintákat szolgáltatott számunkra. A fenti bonyolult rendszer összes vizsgálati karján primer tumorok (subcutan, lép, colon) és azok áttétei (tüdő, máj, nyirokcsomó, keringő tumorsejt) voltak izolálhatók. Májáttét képzése tekintetében

mindhárom tumortípus 50% feletti áttétképzési rátát mutatott, mely a további molekuláris genetikai vizsgálatok relevanciájának feltétele volt. Felnőtt – újszülött modellünk a 0% - 100% áttétképzési arányokkal az „elméleti” ideális eredményt adta.

Ez a kísérleti modellrendszer csak akkor értékelhető igazán, ha működése során új és lényeges információkkal szolgál az áttétképzés hatásmechanizmusáról. Három olyan gén segítségével, amelynek szerepe a colorectalis tumorok progressziójában már közismert volt, tettünk fel olyan kérdéseket, amelyekre ezidáig a technikai feltételek hiánya miatt nem volt lehetőség.

5.2. A CD44 génexpresszió jellemzése a colorectalis carcinoma progressziója folyamatában

Jóllehet publikációk száza foglalkoznak a CD44 különféle fiziológiás és patológiás, elsősorban a rosszindulatú daganatokban játszott szerepével, máig nincs egységes képünk a CD44 gén és termékeinek viselkedését illetően. Talán az egyetlen egyezés a sokféle vélemény között, hogy a CD44 „valamiféle” szerepet játszik a rosszindulatú daganatok működésében, elsősorban azok progressziójában (43,191). Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a DNS-chipektől (microarray) egészen az immunhisztokémiai vizsgálatokig a szakirodalom túlnyomó része figyelmen kívül hagyja a tényt, hogy a „CD44” egy egész izoforma családot képvisel, mely izoformák a CD44 gén 9 (saját vizsgálataink tanúsága szerint 10) variábilis exonjának alapján alternatív splicing mechanizmussal jönnek létre. Így minden teszt (primer, oligo, antitest), melyet a CD44 standard régiójára specifikusan terveznek a CD44 különféle izoformáinak egész tárházát ismeri fel (illetve jelöli meg), hiszen a standard régió minden egyes izoforma közös eleme. (Ide tartozik maga a hyaluronsav-kötő régió is, mely minden CD44 molekulán megjelenik, affinitása, funkciója azonban függ a szomszédos variábilis régió jellegétől.)

Jó példája ennek a colorectalis adenocarcinoma, melynek kialakulása során az expresszálódó CD44 variánsok változatos variációi mutathatók ki (52,73), míg a normál colon nyálkahártya bazális kriptáiban csak a variábilis exonok nélküli izoforma (CD44s) expresszálódik (intenzív membrán expresszió) és a variáns régiót tartalmazó izoformák hiányoznak. Súlyos diszpláziával járó adenomákban, valamint a primer és

metasztatikus carcinomában különféle variáns izoformák sokasága jelenik meg mind mRNS, mind protein szinten (45,83,84,108,130,192).

Ezen újonnan megjelenő izoformáknak egy része v3 és v6-os variáns domént is tartalmaz, mely a molekulának egy teljesen új arculatot kölcsönöz, a CD44s már meglévő funkcióit új funkciók egész sorával egészíti ki: a CD44v6 (azaz a v6 domént tartalmazó izoformák összessége) a Met protein ko-receptora, a CD44v3 pedig a heparinkötő növekedési faktorok (többek között a HGF, a Met legfontosabb liganduma) családjának egyik legfontosabb kötőfelülete, „prezentáló molekulája” (115,119).

A sokféle CD44 variáns izoforma együttes jelenléte számos technikai nehézséggel jár a „CD44” illetve kiemelt régióinak funkcionális értékelésekor. Elsőként figyelembe kell venni, hogy egyazon izoformán többféle variáns domén egyszerre képes megjelenni, ezáltal gazdagítva az adott izoforma funkcionális tárházát és molekulán belüli domén-domén interakciót is lehetővé téve. Másodsorban feltételezhető, hogy funkcionális jellemzői tekintetében a rövid, például csupán a v3 domént tartalmazó CD44v3 izoformák különböznek a CD4v2-10 variánstól, jóllehet mindkét izoforma típus tartalmazza a v3 régiót, azaz a v3-specifikus próbák (primerek, anitestek) az összes ilyen izoformát együttesen, „egybe” mérik. Megfordítva, ez annyit jelent, hogy bármely meghatározott variáns exonra/doménre tervezett próba a CD44 izoformák egy széles spektrumát mutatja ki, mindazokét, melyek az adott régiót tartalmazzák. Harmadik problémás pont, hogy legtöbb vizsgálatunkat egy összetett rendszeren, tumor szöveti elemek keverékén, oligoklonális tumorok sejttömegén, valamint stromális komponensek, ill azok gén- és protein termékeinek konglomerátumán végezzük. Végeredményben méréseink a fenti komponensek egy átlagolt, szummációs képét adják. Radiológiai hasonlaltal élve: az egyirányú, szummációs hagyományos röntgen felvételen egymásra vetülő képletek csak alternatív irányokból készített másodlagos felvételekkel különíthetők el, illetve számtalan ilyen többirányú felvétel szükséges a 3D részletességű CT kép eléréséhez. Ennek megfelelően a CD44 izoformák feltérképezése során mi is megmutattuk, hogy „több irányú” vizsgálattal, vizsgálatsorral az expresszálódó izoformák is elkülöníthetők, azonosíthatók.

A fenti megállapítások figyelembevétele szükséges a CD44 kvalitatív expressziós képének értékelésénél, illetve természetesen befolyásolja a génexpresszió tekintetében

végzett kvantitatív mérési eredmények értelmezését is. A fenti „bonyolult” kép egyben elegendő indoka a szakirodalom diverzív eredményeinek.

Mindenekelőtt célul tűztük ki a vastagbélrák által expresszált CD44 izoformacsalád rendszerbe szedését, lajstromozását. Ez első lépésként lehetőséget nyújt ugyanis annak megítélésére, hogy milyen komplex rendszerrel állunk szemben a „CD44” vizsgálatokor. Emellett kísérletet tettünk egy esetleges „malignus colorectalis” CD44 expressziós izoforma-mintázat meghatározására. Amennyiben ilyen izoforma-mintázat létezik, szükségesnek láttuk megvizsgálni ennek a mintázatnak a stabilitását: kimutatható-e minőségi (izoforma összetételbeli), avagy mennyiségi (meghatározott variáns régió génexpressziós intenzitásában bekövetkező) változás a vastagbélrák progressziója során. A fenti vizsgálatok elvégzésére állatkísérleti modellrendszerünk kiváló tesztalpnak bizonyult. Amint azt már említettük, ez a rendszer alkalmas volt az áttétképzési folyamat különböző fázisainak elkülönítésére, valamint a tumor mikro környezet hatásainak elemzésére. Ennek megfelelően az esetlegesen kimutatható CD44 génexpressziós változásokat (melyre a v3 és v6 exonok expressziója tekintetében számos irodalmi utalás van) e szempontok szerint elemezhetjük.

5.3. Az expresszáldó CD44 variáns izoformák listája

Elsőként három humán colorectalis carcinoma vonalunkon megpróbáltuk azonosítani az expresszáldó CD44 izoformákat egy sorozat-PCR vizsgálattal nyert alternatív splice mintázat (ASM) alapján. Már a vizsgálatunk kezdetén világossá vált, hogy bár az elméletileg létező 2^{10} számú CD44 izoformák mindegyike a valóságban nem expresszáldódik, a ténylegesen expresszáldó, lényegesen alacsonyabb számú variáns azonosítása is meglehetősen összetett feladat. Három megközelítés alapján állítottuk fel azt a CD44 izoforma panelt, amely reményeink szerint jól tükrözi (ha nem is fedi le teljesen) a colorectalis tumorokra jellemző mintázatot:

(i) Az A-B primer párral végzett PCR, mely bár a teljes variábilis régiót lefedve elvileg minden egyes izoformát felsokszorozna, csak néhány domináns izoforma expresszióját igazolta az öt jól elkülöníthető PCR termék direkt szekvenálásakor. Néhány további izoforma meglétét a termék hossz alapján jósolni lehetett. A további négy PCR reakció, melyek primerei kifejezetten a v3 és v6 exonokra specifikusan lettek megtervezve (az

A-B reakcióból ugyanis a várakozásokkal ellentétben sem v3 sem v6 tartalmú izoformákat nem sikerült visszaigazolnunk), további néhány izoforma jelenlétét igazolta direkt szekvenálással verifikálva.

(ii) A Next generation sequencing (NGS) eljárás klonális szekvenálás lévén elméletileg teljes CD44 izoforma listát képes produkálni. A „fingerprintet” létrehozó PCR termékek újgenerációs szekvenálása során – a Sanger szekvenálással már megismert variánsok megerősítése mellett - valóban számos további izoformával sikerült kiegészítenünk colorectalis CD44 splice variáns expressziós listánkat. Az eljárás technikai korlátait elérve (elsősorban az 500bp-os optimális leolvasási hossz miatt) be kellett látnunk, hogy a eredményeink még nem teljesek.

(iii) A hosszabb termékek azonosításának biztosabb eszköze az ugyanezen PCR termékek klónozását követő szekvenálás volt (181).

Az általunk felállított listán 26 biztonsággal elkülöníthető izoforma jelenik meg, némelyik ezek közül (mivel a CD44 variábilis régióknak csak egy szegmensét reprezentálja) elméletileg további izoforma(ák) alkotója lehet. Elsőként írtuk le kísérleti tényekre alapozva, hogy létezik CD44v0 variáns is, azaz megalapozatlan és téves az irodalomban általánosan elfogadott dogma, miszerint emberben a v1 exon a standard régió része. A v1 exon tehát ténylegesen variábilis exon. A humán és egér CD44 cDNS szekvencia összehasonlításakor válik világossá a „v1-standard exon paradoxon”: egérben egy további standard exon, kvázi v0 exon az, mely konstitutív expressziót mutat, nem pedig a humán v1-gyel homológ egér v2!

Meg kell tehát állapítanunk, hogy a CD44 splicing sokkal gazdagabb expressziós képet hordoz malignus vastagbélrákban, mint amit a rendelkezésre álló technológiák érzékenységekben produkálni tudnak. Fontos és igen izgalmas kérdés, hogy ennek a rendkívüli összetettségnek, mely a CD44 alternatív splice mintázatában tükröződik van-e valami különleges funkcionális jelentősége.

5.4. Colorectalis carcinoma specifikus CD44 alternatív splice mintázat (ASM)

Az expresszált CD44 izoformák megjelenítésére illetve mintázatában a tumor progressziója során bekövetkező változásainak nyomonkövetésére egy egyszerűsített

eljárást dolgoztunk ki. A variábilis régiót lefedő öt PCR-primer párral felszaporított PCR reakcióterméket meghatározott sorrendben gélelektroforézissel megfuttattuk. Az így létrejövő alternatív splice mintázat (ASM) mindhárom colorectalis tumor sejtvonal esetén gyakorlatilag azonos mintázatot adott. Ez a kvalitatív ASM változatlanak bizonyult a colorectalis carcinoma vonalak különféle extracelluláris mátrixalkotó komponensein történő tenyésztése, majd tetszőleges lokalizációban (subcutan, lép, colon) képzett primer xenograft tumorokban, valamint az azokból képződő áttéti (máj, tüdő) tumorokban is. Bár tudjuk, hogy ez az expressziós mintázat nem mutatja a CD44 variáns izoformák teljességét, azonban egyszerűsített képet ad a domináns (nagy kópiaszámban előforduló) variánsok jelenlétéről.

A colorectalis carcinomák CD44 ASM-jét, melyről bizonyítottuk, hogy *in vitro* sejtenyészetektől a primer tumorokon át a metasztázisokig kvalitatív értelemben állandó, összevetettük más szöveti eredetű malignus tumorsejtvonalak hasonló mintázatával. Azt találtuk, hogy egyazon tumortípus (pl. colorectalis carcinoma, malignus melanoma) különböző vonalai egymással egyező CD44 ASM-t produkálnak, míg a különféle tumorok CD44 ASM-je egymástól jól elkülöníthető. Ennek alapján fogalmaztuk meg, hogy az alkalmazott sorozat PCR vizsgálattal, mely a CD44 variábilis régiójának részletes feltérképezését célozza, tumortípus-specifikus CD44 expressziós mintázat, kvázi egy CD44-ujjlenyomat nyerhető.

A megismert stabil CD44 ASM annak igazolása, hogy a karcinogenezissel ellentétben a tumorprogresszió folyamán újabb CD44 variáns izoformák már nem jelennek meg. Így tehát feltételezhető, hogy az irodalomból ismert expressziós változások meghatározott variánsok (exonok) vonatkozásában az expresszált izoformák mennyiségi változásainak lehetnek csak a következményei.

5.5. A CD44 v3 és v6 tartalmú variánsainak expressziós intenzitásbeli változása a tumorprogresszió folyamán

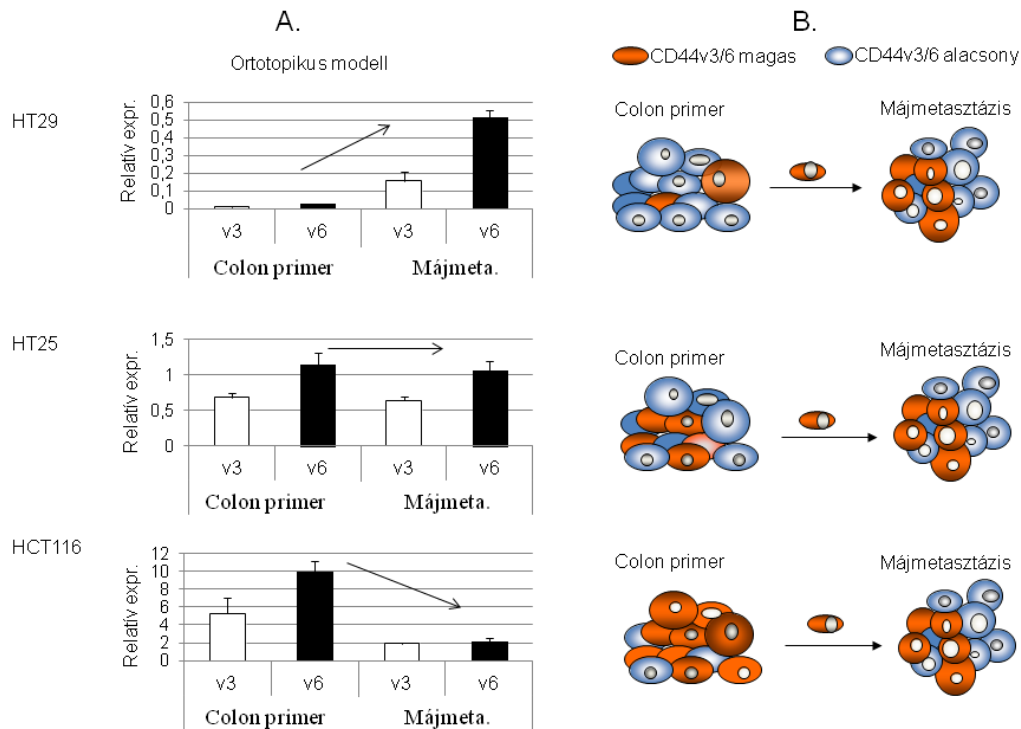
Az irodalom - még ha helytelen megközelítésben is, hisz szinte soha nem tesz említést az ezen exonok termékeit hordozó komplex molekulák változatosságáról - a CD44 izoformái közül a v3 és v6 exonokat tartalmazó változatokról közöl részletes kvalitatív és kvantitatív adatokat. Tekintve ezen adatok ellentmondásos mivoltát,

modellrendszerünk és az ASM fent említett eredményei segítségével a v3- és v6-hordozó variánsok expressziójának kvantitatív vizsgálatára helyeztük a hangsúlyt a vastagbélrákok áttétképzésének vizsgálata során. Lehetőségünk volt a metasztatikus kaszkád korai és késői fázisának elkülönített vizsgálatára is. Ezen felül betekintést nyertünk a tumor mikrokozonyzatának, másképp fogalmazva a „hostnak” a CD44 splicing folyamatára ható moduláló szerepébe mely a tumor metasztatikus potenciáljával mutatott szoros összefüggést.

Izograft (Balb/C – C26) májmetasztázis rendszerünkön igazoltuk, hogy csak valódi áttétképzés során történik a folyamattal egyértelműen összefüggésbe hozható mennyiségi változás a v3/v6 expressziójában. Ennek egyértelmű bizonyítékát adta az a tény, hogy mind a lép és colon primer tumorai, mind pedig a lépbe történő implantáció nyomán létrejött direkt kolonizációval létrehozott fókuszok azonos össz-v3 és -v6 expressziós szintet produkáltak. Ezzel ellentétben a valódi, colonból származó, a teljes metasztatikus kaszkádot (EMT, intravazáció, túlélés a keringésben, extravazáció, MET, proliferáció a célszervben) végigjáró tumorsejtek által indukált májáttétek szignifikánsan magasabb expressziót mutattak mindkét vizsgált variáns tekintetében. Ez egyben annak bizonyítéka, hogy a magas v3 és v6 expressziós intenzitásszint nem a máj, mint metasztatikus mikrokozonyzet hatása, hanem egy, a primer tumorban már meglevő, alapvető tulajdonsága a metasztatikus sejtklonnak.

Megfigyelhető emellett, hogy az elméleti megfontolásokkal jól korrelálva a v3 és v6 expressziók (funkcionális kapcsolatuknak megfelelően) gyakorlatilag ko-expresszióknak minősíthetők, a modell minden elemében együtt mozogtak. Hasonló megállapítást fogalmazhatunk meg a továbbiakban tárgyalásra kerülő xenograft rendszereken is.

A fenti elméletet humán xenograft modelleinken is megvizsgáltuk. A HT29 humán colorectalis carcinoma xenograft a C26-hoz nagyon hasonló eredményeket produkált, míg a HT25 és a HCT116 eltérően viselkedett. Ez az eltérő viselkedés a szakirodalmi ellentmondásokat is jól reprezentálja. Figyelembe véve a primer tumorok β -actinra normált CD44v3 és v6 expressziós intenzitását, jelentős, nagyságrendbeli különbség mutatkozik a háromféle humán vastagbélrák vonal között. Erre alapozva feltételezzük, hogy egy magas v3 és v6 expressziós szint szükséges, de nem elégséges feltétele a primer tumor metasztatikus jellegének.



23. ábra: A humán HT25, HT29 és HCT116 CRC xenograftok valódi májáttét-képzési modellje alapján felállított elméleti modell: elsősorban a primer tumorban szelektálódó, magas CD44v3/v6 expressziót mutató klónok képesek a májáttétek képzésére.

Erre utal az a megfigyelésünk, hogy mindhárom humán sejtvonalunk valódi májáttétek v3 és v6 expressziója egymáshoz közeli tartományban jelentkezett ellentétben a primer colon tumorok 3 nagyságrendbeli szórásával (23.ábra) Ez egyben azt is jelenti (sematikusan magas és alacsony CD44v3 és v6 expressziót mutató sejtek különböző arányát feltételezve a tumormassza magas illetve alacsony v3 és v6 expressziójának a háttérben), hogy egy adott primer tumor „metasztatikus” jellege szempontjából önmagában nem szükségszerű a magas v3/v6 expresszáló sejtek magas száma, következésképpen elméletileg egyetlen „magas v3/v6 expresszáló” sejt jelenléte a primer tumorban elegendő lehet annak metastatikusává válásához.

Ezt az elméletet támasztja alá a melanómák áttétképzésének vizsgálatakor a keringő tumorsejtekből képzett sejttenyészetben (kvázi metasztatikus klónon) mért extrém magas CD44v3 és v6 expressziós szint is.

Adott tumormasszára jellemző klonális heterogenitás egy egyszerű méréssel, az egy adott primer tumor három különböző kis szegmenséből származó minta össz-v3 és -v6 expressziós intenzitásának meghatározásával is demonstrálható volt. Bár nagyságrendbeli eltéréseket nem kaptunk, az egyes tumorfrakciók között 2-3-szoros (szummált) expressziós intenzitásbeli különbség volt mérhető.

Összevetve a fenti elméleti megfontolásokat mérési eredményeinkkel: a HT29 primer tumor produkálta a legalacsonyabb v3 és v6 expressziós intenzitást, míg a HT25 és HCT116 primer colon tumorok lényegesen magasabb számú “magas expressziót mutató” sejtet tartalmazhattak. (Ismételten emlékeztetünk itt méréseink szummációs jellegére, azaz arra a tényre, hogy méréseink a teljes vizsgált tumormassza összes sejtjének v3 és v6 expressziós intenzitását átlagolják.) Így lehetségessé válik, hogy egy alapvetően magas v3/v6 expressziós szinttel jellemezhető primer tumor májattéte akár a primer tumorénál is alacsonyabb expressziós szintet mutasson: mivel ez esetben a magas CD44v3/v6 expresszió alapvetően meglévő tulajdonság, az áttétképzés szempontjából ez nem jelent szelekciós tényezőt egy adott szubklón számára, véletlenszerűen akár relative alacsonyabb expressziós szinttel is áttétképzővé válhat a primer tumor egy alkónja. Mindezt a klinikai gyakorlatra lefordítva meg kell állapítanunk, hogy egy bizonyos tumorminta alacsony CD44v3 és v6 expressziója önmagában nem zárja ki annak áttétképzésre való képességét és önmagában nem képvisel prognosztikus értéket sem.

5.6. A primer tumor mikro környezetének hatása

Az eddigiekben megállapítottuk, hogy a primer tumorból kilépő tumorsejtek közül az áttétképzésben minden jel szerint azon sejtek lesznek sikeresek, amelyek szummált v3 és v6 expressziója magas. Ezt a jelenséget megpróbáltuk egy alapvetően különböző állatkísérleti modellen is igazolni.

A tumor mikro környezetének szerepét a primer tumor metasztatikus jellegének szabályozásában egy “felnőtt–újszülött” modellen vizsgáltuk. *Scid* egerekbe subcutan

történő humán CRC xenograft szuszpenziók implantálását követően felnőtt állatok távoli áttétet nem képeztek, míg az újszülött állatok mindegyikében tüdőáttétet találtunk. Az előző modellnél tapasztaltakkal összhangban, a szummált v3 és v6 expressziós szintek az azonos sejtsuszpenzióval oltott, genetikailag tökéletesen azonos, csak életkorukban (fiziológiai paramétereikben) különböző *scid* egerekben különbséget mutattak: az újszülött egerek subcutan primer tumorai mind a három vizsgált tumortípus esetén szignifikánsan magasabb expressziós szinttel voltak jellemezhetők, mint felnőtt primer tumor párjaik. Ez az eredmény azt látszik igazolni, hogy a host mint környezet (pl. az immunrendszer fejlettsége, vaszkuláris permeabilitásbeli különbségek, citokinek és kemokinek stb.) erőteljes szelekciós nyomást gyakorol a növekvő tumorsejtekre. A klinikai gyakorlat számára ennek lényeges következménye, hogy a tumorgazda fiziológiai paramétereit a metasztatikus folyamat szempontjából jelentőséggel bírnak. A fent említett kísérletek a tumor mikrokörnyezetet mint komplex, fiziológiai, biológiai környezetet vizsgálták. A teljesség igénye nélkül megvizsgáltuk, hogy egy, a tumor környezetét rendkívül leegyszerűsítő modellen ki tudunk-e mutatni hasonló hatást a szummált v3 és v6 expresszió tekintetében. Különböző ECM alapokon vizsgáltuk három humán CRC vonalunk proliferációs és össz-v3 illetve -v6 expressziós tulajdonságait. HT25 esetén proliferációt gátló hatást mértünk a laminin, kollagén IV. és a hyaluronsav jelenlétében, a HT29 proliferációját mind az öt vizsgált ECM komponens gátolta (MG, F, L, K, HA), végül a HCT116 ezzel ellentétesen, intenzívebb proliferációval reagált a fenti öt ECM összetevőre. Mindezt összevetve a hasonló mintákon mért szummált v3 és v6 expressziós intenzitásokra gyakorolt hatással elmondhatjuk (13. táblázat): HT25 esetén a laminin és a kollagén expressziós intenzitást növelő hatású volt (azonban a hyaluronsav az expressziós aktivitást nem módosította), a HT29 a fibronectin kivételével valamennyi ECM komponens alapon v3 és v6 expresszió fokozódást mutatott, míg a HCT116 ellenkező tendenciával, a lamininre expresszió fokozódással, a többi négy ECM alkotóra csökkenő expressziós változással reagált.

13. táblázat: *Proliferációs és a szummált v3/v6 expressziót mérő tesztek eredményeinek összevetése különféle ECM jelenlétében növekvő háromféle humán CRC sejtenyészetben. 0 = nincs hatás, + = stimuláló hatás, - = gátló hatás*

	HT25		HT29		HCT116	
	Proliferáció	össz-v3, -v6 expresszió	Proliferáció	össz-v3, -v6 expresszió	Proliferáció	össz-v3, -v6 expresszió
MG	0	0	-	+	+	-
FN	0	0	-	0	+	+
L	-	+	-	+	+	+
K	-	+	-	+	+	-
HA	-	0	-	+	+	-

Az ECM komponensek szempontjából vizsgálva a jelenséget: a MG a három tumoron háromféle hatást váltott ki: a HT25-re sem proliferáció, sem v3/v6 expresszió tekintetében nem hatott, HT29-en proliferációt gátolt és v3/v6 expressziót fokozott, végül a HCT116-on proliferációt fokozó és v3/v6 expresszió gátló hatása volt. A fibronectinre a HT25 sem proliferáció, sem a vizsgált génexpresszió tekintetében nem reagált, míg a HT29 és HCT116 minimális, nem konzekvens reakciót mutatott. A laminin tekintetében különleges, hogy mindhárom sejtvonalon a v3/v6 expressziót fokozta, míg proliferáció tekintetében a HT25-ön és HT29-en gátló, HCT116-on stimuláló hatást mértünk. A kollagén a MG-hez hasonlóan konzekvens hatást produkált olyan értelemben, hogy ahol proliferációt aktivált (HCT116), ott a v3/v6 expressziót mérsékelte, illetve fordítva (HT25, HT29). A CD44 szempontjából különösen fontos hyaluronsav sem proliferáció, sem génexpresszió tekintetében a három sejtenyészetben következetes hatást nem tudott indukálni. Elmondható tehát, hogy az ECM komponenseknek mind a tumorsejt proliferáció, mind a szummált v3 és v6 expressziója tekintetében kimutatható hatása van, következetes aktiváló, ill gátló hatást, melyet “colorectalis carcinomára” kifejtene nem tudtunk kimutatni. A szövettanilag azonos kategóriába sorolható, ám genetikailag különböző eredetű tumorkok, eltérő extracelluláris interakciókkal jellemezhetők.

5.7. A keringő tumorsejtek vizsgálata: modellrendszer és kemorezisztencia vizsgálat

A primer tumorban végbemenő metasztatikus klónszelekció, melynek egyik következménye a CD44 v3 és v6 tartalmú izoformáinak magas expressziós intenzitása, s melynek háttérében a tumor mikrokörnyezet/stroma stimuláló hatása sejthető, mind klinikai, mind experimentális megfontolásból a keringő tumorsejtekre irányítja a figyelmet. Ezek azok a sejtek, melyek a primer tumorból kilépve a keringési rendszerbe jutottak, azaz a metasztatikus kaszkád első lépéseit már végigjárták. Klinikai minták vizsgálata azt igazolta, hogy a vér maggal rendelkező sejtes elemei között a CTC-k száma meglehetősen alacsony, izolált tumorsejtek expressziós mintázatát a célszerv mikrokörnyezete még biztosan nem változtatta meg. Humán melanomák áttétképzésének vizsgálatát célzó kísérleteink (e dolgozat keretében részletesen nem ismertetve) igazolták, hogy a keringő tumorsejtek extrém magas CD44 splice variáns (többek között v3 és v6) expressziós intenzitással jellemezhetők.

Állatkísérleti modell rendszerünk lehetőséget kínál a metasztatikus kaszkád különféle fázisainak szeparált és egyidejű vizsgálatára: a primer tumor, a loko-regionális nyirokcsomó áttét, a távoli májáttét, valamint a keringő tumorsejtek (illetve azok tenyésztési) együtt vizsgálhatók, összehasonlíthatók.

Colorectalis tumormodelljeink közül a Balb/C-C26 izograft rendszerből származó keringő tumorsejteket sikerült tenyészetben fenntartani. Mivel ugyanazon állatból primer és áttéti (nyirokcsomó és májmetasztázis) tumorból is primer tenyészettel rendelkezünk, ez az áttétképzés valamennyi fázisát reprezentáló mintasor alkalmat adott kemoszenzitivitásuk összehasonlító vizsgálatára. Irodalmi adatok szerint tenyészetbe vitt sejtpopulációk 10 passzázsra keresztül megőrzik génextpressziós mintázatukat (193), így azok az *in vivo* eredményeket megbízhatóan reprezentálják.

A gyakorlatban sokszor tapasztalt, de az irodalomban kevésbé vizsgált tény, hogy a primer és az áttéti tumorok kemoterápiás érzékenysége eltér egymástól. Tekintve, hogy az áttétképzés klónszelekciós folyamat, azaz valamennyi áttét egy tumorsejt utódpopulációjának tekinthető, nehezen megjósolható, hogy a jelenség mennyiben random, azaz az áttétképzés valamennyi lépését teljesíteni képes tumorsejtpopulációk

következésként szenzitívebbek vagy rezisztensebbek lesznek, vagy az áttétképzés és a kemoterápiás szenzitivitás egymástól független jelenségek.

A CD44 a szakirodalom tanúsága szerint a kemorezisztencia kialakulásában résztvevő egyik kulcsmolekula (64,78,113,134,194), amit elsősorban hyaluronsav-receptor funkciójával hoznak összefüggésbe. A fokozott kemorezisztenciával jellemezhető colorectalis „őssejtek” egyik sejt felszíni kulcsmarkereként szintén a „CD44-et” ismerjük. A keringő tumorsejtek, illetve metasztatikus őssejtek kemorezisztenciája tekintetében pusztán néhány úttörő közlemény áll rendelkezésre (195,196).

Modellrendszerünk tesztelésére a primer tumor, nyirokcsomó- és májmetasztázis, valamint a CTC tenyészetek a jelenleg használt rutin kemoterápiás szerekkel, illetve azok kombinációival proliferációs tesztet végeztünk.

Kezeletlen, kontroll sejttenyészetek az ideálist közelítő, exponenciális proliferációs aktivitást mutatták 24, 48 és 72 órás inkubáció során. Ellenben proliferációs aktivitás tekintetében jelentős különbséget találtunk: a primer és a májmetasztázis tenyészetek a nyirokcsomó metastázis és CTC tenyészeteknél lényegesen intenzívebb proliferációt mutattak. Utalhatunk itt a Krompecher-féle elvre, mely szerint a „tumor” vagy proliferál vagy progrediál, mely állítás molekuláris genetikai háttere mára részben ismertté vált (197). Eredményeink alapján a következő megállapításokat tehetjük: az 5FU+LV kombináció a primer tumorok és májmetasztázis tenyészeteknél időfüggő gátló hatást mutattak a vizsgált 3 lépcsős exponenciális dózistartományban a teszt dózistól függetlenül. A CTC és nyirokcsomó metastázisokon dózisdependens hatásgörbét kaptunk. Ez a jelenség a CTC tenyészet relatív kemorezisztenciája mellett szól. Jellegzetes, dózisfüggő proliferáció-gátló hatást tapasztaltunk az Oxaliplatin és Irinotecan terápiával, ez esetben is a CTC bizonyult a leginkább kemorezisztensnek. A cetuximab és a bevacizumab (tekintettel arra, hogy KRAS mutáns és humán-specifikus monoklonális antitestekről van szó), a várakozásoknak megfelelően hatástalan volt. Kiegészítő vizsgálatként Imatinibbel (a GIST és CML terápiájában alkalmazott TKI-val, melynek *in vitro* colorectalis sejttenyészeteken antiproliferatív hatását mutatták ki (198)) is elvégeztük az MTT proliferációs tesztet. Az alkalmazott legmagasabb dózisban extrém hatékonynak bizonyult a proliferáció gátlásában, mely hatás az 5FU-val kombinációban még kifejezettebbnek mutatkozott. A primer és májmetasztázis tumorok

tenyészetekhez képest a nyirokcsomóáttét és a CTC tenyészetek Imatinibre is kevésbé mutatkoztak érzékenyek, míg az előbbi kettőnél a teljes proliferáció-gátlás 24 óránál, addig nyirokcsomó áttéten csak 48, míg CTC-tenyészetben 72 óránál volt kimutatható.

Összességében eredményként könyvelhetjük el, hogy a colorectalis carcinoma áttétképzése eseményláncának négy elkülöníthető eleméből oly módon sikerült sejtenyészetet létrehozni és fenntartani, hogy az kísérleti fenotípusos, kemoterápiaszenzitivitási tesztek elvégzésére alkalmasnak bizonyult. E rendszeren végzett vizsgálataink a colorectalis carcinoma jelen kezelésének rutin kemoterápiás hatóanyagaival szemben a keringő tumorsejtek egy relatív rezisztenciájának meglétére utalnak. Ez a felismerés további, klinikai orientáltóságú CTC vizsgálatok tervezésének szükségességét veti fel.

5.8. A WT1 gén alternatív splicing vizsgálata a colorectalis carcinoma áttétképzése során

Látva a CD44 ASM stabilitását a colorectalis tumorok progressziója során, felmerült a kérdés, hogy minden alternatív splicing-ot mutató molekula esetén hasonló-e a helyzet, vagy ez egy CD44-specifikus (alternatívaként a molekulák egy csoportjára jellemző) jelenség. Ezért ebből a szempontból megvizsgáltunk egy másik, terápiás célpontként ma már egyre fontosabb szerepet játszó és több alternatív splice variánsal rendelkező gént, amely a colorectalis tumorokban szinte minden esetben kimutatható: a Wilms tumor 1 (WT1) gént.

Xenograft colorectalis carcinoma májmetasztázis modelleinken (mind a valódi áttétképzési rendszerben, mind a lép-máj rendszerben) megvizsgáltuk a primer és a máj másodlagos tumorainak WT1 splice variánsainak expressziós mintázatát. A vastagbélrák kapcsán igen szegényes WT1-szakirodalom két variáns, a KTS- (elsősorban transzkripciós faktorként funkcionáló) és a KTS+ (mint poszttranszkripciós modifikátor, illetve a splicing folyamatában részt vevő szabályozó) variánsait ismeri.

Tumormintáinkon a WT1 splice variáns expressziója tekintetében a CD44 alternatív splice variánsainak mintázatával ellentétben, következetes rendszert nem tudtunk kimutatni. Alapvetően mind a KTS+, mind a KTS- variánsok együttesen és külön-külön is megjelentek primer és metasztatikus tumorainkon. A metasztatikus splice mintázat

sem a colon-máj, sem a lép-máj rendszerben nem követte a primer tumorét. A háromféle humán colon carcinoma tumortípus szintén eltérő expressziós mintázatúnak bizonyult. Egyetlen konzekvensnek mondható lelet, hogy mindhárom tumor minden egyes májáttéte és májkolóniája is expresszált KTS- variánst. További figyelemre méltó felfedezésünk egy a szakirodalomból más tumorok vonatkozásában ismert, azonban colorectalis carcinomákon ezidáig le nem írt Zn-ujj hiányos splice variáns kimutatása egy májáttéti tumoron. A Zn-ujj hiányos variánsok funkcionális jelentősége jelenleg még nem ismert.

Mivel következetes splice variáns mintázatot colorectalis carcinoma primereinken és metasztázisainkon nem találtunk, minden jel arra mutat, hogy a CD44 ASM stabilitásának egyedi és mindenképpen további vizsgálatra érdemes oka lehet.

5.9. KRAS mutáció vizsgálata az áttétképzés különböző fázisaiban

A jelenlegi klinikai gyakorlat szerint az anti-EGFR (Cetuximab) kezelést áttétet hordozó vastagbélrákos betegek kaphatják. A kezelésre való szenzitivitást vagy rezisztenciát befolyásoló KRAS mutációs státus meghatározása azonban szinte kizárólag a beteg primer tumorából történik, ahol igen alacsony (néhány laboratóriumok esetén akár 1%-os) KRAS mutációs arány is kizárhatja a beteget a terápiás célcsoportból. Kérdéses azonban, hogy az áttétképzésre kizárólagosan KRAS mutáns sejtek képesek-e ebből a heterogén populációból, hiszen ellenkező esetben a gyakorlatilag monoklonális eredetű áttétek akár tisztán KRAS mutációtól mentes „Cetuximab targetek” is lehetnek. Munkánk során olyan állatkísérleti modellrendszert dolgoztunk ki, amely lehetővé teszi, hogy a primer tumor, a nyirokcsomó és májáttét, valamint a máj mikrometasztázisok korai diagnosztikájában feltételezett szerepet játszó keringő tumorsejtek KRAS mutációs státusa összevethető legyen ugyanabban az egyedben és egyben alkalmas a fenti tumorminták kemoterápiára és biológiai terápiákra való érzékenységének tesztelésére is. KRAS-mutáns izograft tumort implantáltunk ortotopikus (colon) és heterotopikus (lép) lokalizációba. Megvizsgáltuk, hogy a keringő tumorsejt és több különböző lokalizációjú májáttét, valamint a nyirokcsomóáttétek KRAS mutációs mintázata mennyiben korrelál a kiindulási primer tumoréval.

Méréseink igazolták, hogy a KRAS 12-es kodont vizsgálva a C26 vastagbél és lép primer tumorok vad/mutáns allél aránya a primer sejttenyészethez képest változatlan volt (statisztikai értékelést az alacsony mintaszám miatt nem végeztünk). Ez egyben azt is jelenti, hogy egyik primer tumor lokalizációban sem módosította a tumor mikrokönyezet a vad/mutáns arányt, más szóval egyik genotípus sem jelentett szelektív előnyt a primer tumor proliferációja szempontjából.

A következő, ortotopikus áttétképző rendszerben 11 Balb/C egéren végzett vizsgálattal a keringő tumorsejtek tenyészetén (CTC) a primer tumor 10% alatti mutáns/vad arányával szemben közel 40%-os mutáns allél részarányt tudtunk kimutatni. Ez az eredmény a KRAS mutációt hordozó sejtek primer tumorból való „kiszakadása” és keringő tumorsejtté válása tekintetében élvezett szelektív előnyét veti fel. Különlegesen értékelhető ennek fényében a mindkét metasztatikus lokalizációban (nyirokcsomóban és májban) észlelt vad/mutáns arány „visszarendeződés”, mely a proliferáló sejttömeg szempontjából a primer tumorban látott vad/mutáns arányok tartását preferálja. Ez az eredmény egyben a metasztatikus colorectalis carcinoma terápiás tervének a primer tumor mutációs státusára történő alapozását igazolja.

Végül az egyetlen lép primer tumorból szóródó négy májattét (melyekről korábban igazoltuk, hogy inkább direkt kolonizációval létrejövő májtumorokként foghatók fel) vizsgálata alapján több megállapítást tehetünk. Elsőként szembevetendő, hogy a valódi metasztatikus rendszertől eltérő struktúrával állunk szemben újabb bizonyítékát adva a lép-máj és colon-máj modellek elvi megkülönböztetésének, illetve párhuzamos vizsgálatának. Másrészt megállapítható, hogy a négy májgócából nyert tenyészet négy gyökeresen különböző vad/mutáns allél arányt produkált. (Ez egyben bizonyítékot jelent számunkra, hogy releváns a feltételezésünk, mely szerint korlátozott passzázs-számig a szolid tumorokból nyert sejttenyészetek megőrzik jellegzetességeiket (jelen esetben tartják a 12-es lókuszt alapján meghatározott vad/mutáns KRAS allél arányt). Az eredmény ugyanakkor a primer tumortenyészet oligoklonalitásának a bizonyítéka is. Láttuk továbbá, hogy a négy májkolónia a primer tumorénál lényegesen magasabb mutáns allél részarányt mutatott. Ez azt mutatja, hogy a keringésben levő sejtek egyrészt (a direkt kolonizáció elvének megfelelően) véletlenszerűen tapadtak ki a májban, másrészt viszont a májban történő proliferáció szempontjából nem esszenciális a magas

mutáns/vad arány sem. Az 1. számú májattétből (kolóniából) képzett sejttenyészetben mért 50% feletti mutáns allél részarány vagy a homozigóta mutáns sejtek jelenlétének elvi lehetőségét, vagy a mutáns és vad allélek egyenetlen transzkripció aktivitását igazolja, hisz a mutációs státust RNS szinten vizsgáltuk.

6. Következtetések

- Összefoglalásul megállapítható, hogy sikerült egy olyan komplex *állatkísérleti modellrendszert* megterveznünk és néhány kulcsfontosságú génre letesztelnünk, mely a colorectalis carcinoma áttétképzésének folyamatát megfelelően reprezentálja. Képes a metasztatikus kaszkád különböző fázisainak a differenciálására, valamint lehetőséget nyújt a tumor és mikrokoznyezetének a tumorprogressziót befolyásoló interakciójának vizsgálatára.
- Munkánk legfontosabb eredménye, hogy igazoltuk, a *tumor mikrokoznyezete* (host) központi szerepet játszik a primer colontumor *metasztatikus fenotípusának a kialakításában*.
- Az állatkísérleti modellrendszeren nyert tapasztalatok jelentős része a CD44 gén expressziójára vonatkozóan született. Míg a normál epiteliális szövetek, mint a colon nyálkahártya, a CD44-nek csupán standard változatát expresszálják, a rosszindulatú daganatokban variáns CD44 izoformák egész tárháza jelenik meg. Ennek a jelenségnek a háttérében az alternatív splicing gépezet (illetve annak szabályozó rendszere) áll. Feltéve, hogy a különféle variáns CD44 izoformák egy sor újabb funkciót képesek megjeleníteni, a „CD44” általános vizsgálata elméletileg is *megkérdőjelezhető*.
- Megmutattuk, hogy létezik (képezhető) egy a *colorectalis carcinomára specifikus alternatív splice mintázat*, mely egyfelől jelentősen különbözik a más eredetű malignus tumorok azonos technikával nyert ASM-ától, másfelől azonban olyannyira stabil, hogy a CRC sejtenyészetektől a tetszőleges lokalizációjú primer tumorokon át a metasztatikus kaszkád minden egyes fázisában változatlanak mutatkozik. „Next generation sequencing” technikájával elkészítettük a jelenleg ismert legrészletesebb, a *colorectalis carcinomákra jellemző CD44 izoforma lajstromot* is. Az expressziós splice mintázat minőségi állandósága azonban bizonyos variánsok tekintetében kvantitatív (expressziós itenzitásbeli) változásokat takar.
- A CD44 variáns izoformák, különösen a funkcionálisan részletesen jellemzett *v3- és v6-tartalmú izoformák* tekintetében vizsgálati eredményeink alapján úgy

tűnik, hogy fontos szerepet játszanak a *metasztatikus fenotípus kialakításában*. Magasabb szummált v3/v6 ko-expressziós szintek a primer tumorban egy „kvázi-metasztázis gén” funkciót képesek reprezentálni a *metasztatikus kaszkád korai fázisában*. Vizsgálati eredményeink azonban arra utalnak, hogy már elegendő hogy ezen metastatikus fenotípust a primer tumor tömegének csupán egy elenyészően kis hányada hordozza ahhoz, hogy az egész primer tumor metastatikusként viselkedjen. Jóllehet minden colorectalis rák „működtet” magas szintű szummált v3/v6 expressziót mutató metastatikus szubklónokat, a metastatikus tumorsejtek csoportjának szelektív vizsgálata jelenleg nem megoldott kérdés. Ez annyit jelent, hogy nemcsak általában a „CD44”, hanem ugyanígy a v3/v6-tartalmú izoformák kvantitatív vizsgálata is a gyakorlatban *alkalmatlannak* tűnik egy bizonyos tumorra vonatkozó *metasztatikus viselkedés prognosztikájára* a vizsgálati technológiák szummatív jellege miatt.

- Igazoltuk továbbá, hogy a metastatikus szubklónhoz elméletileg legközelebb álló *keringő tumorsejtek* kísérleti körülmények közt izolálhatók, tenyészetként fenntarthatók és *vizsgálhatók*.
- Megmutattuk, hogy mind a CD44 v3 és v6 variábilis exonjait hordozó izoformák expressziója, mind az áttétes vastagbélrák egyik legalapvetőbb, terápiás célpontként is ismert szignáltranszdukciós kulcsmolekulája, a KRAS mutációs státusa tekintetében, mind pedig kemoterápiára való válaszkészség tekintetében az *izolált keringő tumorsejtek a primer és áttéti tumoroktól eltérően viselkednek*, újabb perspektívát nyitva a célzott biológiai kezelés tervezése, annak diagnosztikai hátterére vonatkozó kutatások előtt.
- Állatkísérleti bizonyítékát találtuk továbbá, hogy a metastatikus vastagbélrák célzott terápiájának tervezése során van létjogosultsága a *primer tumor és metasztázisainak összehasonlító kvantitatív KRAS mutáns allél expresszió meghatározásának*. Ezt a gyakorlatban elfogadott eljárást ez idáig csak epidemiológiai, retrospektív klinikai statisztikai vizsgálatok támasztották alá.
- Végül állatkísérleti xenograft májmetasztázis-modellünkön megmutattuk, hogy a *colorectalis carcinoma* primer és metastatikus tumorai a számos daganatos

sejtfunkcióban meghatározó szabályozó szerepet hordozó *WT1-et konzekvensen expresszálják*, s az ismert splice variánsokon túl „új”, *ezidáig nem közölt Zn-ujj hiányos variánsok jelenlétét* is sikerült *igazolnunk*. A WT1 ASM mintázata azonban ellentétben a CD44 ASM-al nem következetes, ami fokozottan aláhúzza a CD44 splice mintázata stabilitásának jelentőségét.

7. Összefoglalás

A colorectalis carcinoma áttétképzése a legalapvetőbb problémája e betegség kezelésének. Minden olyan információ, amely közelebb visz az áttétképzés mechanizmusának tisztázásához, egyben potenciálisan kulcsot ad egy lehetséges terápia megtervezéséhez. E dolgozatban bemutatunk egy olyan *in vivo/in vitro* kombinált kísérletes modellrendszert, amelyben az áttétképzés folyamata optimális feltételek mellett tanulmányozható. Immunkompetens egerekben izograft colorectalis tumor (C26) ortotopikus és heterotopikus implantációját követően vizsgáltuk, hogy a tumor áttétképzésében szerepet játszó tumor és host eredetű változások mennyiben igazolják az áttétképzésről jelenleg alkotott elképzelésünket. Immundeficiens *scid* egerekbe implantált három, genetikailag különböző humán colorectalis tumoron (HT29, HT25, HCT116) tovább közelítettük az immunkompetens (C26 Balb/C) modellen nyert információkat a humán klinikai gyakorlathoz. E modellekből nyert mintákon vizsgáltuk a CD44 és a WT1 gén alternatív splice variánsainak valamint a KRAS onkogén mutáns variánsának expressziós mintázatát a tumorprogresszió során. A primer tumorból, a keringő tumorsejtekből és az áttéti tumorokból létrehozott tenyészetek humán klinikai gyakorlatban használt terapeutikumokkal való kezelésével vizsgáltuk az áttétképzés különböző stádiumából származó sejtek kemoterápiás szenzitivitása közötti különbséget. Eredményeinket valósídejű PCR (Real-time PCR) illetve RFMD (Restriction Fragment Microfluidic-based Detection) rendszer segítségével tettük kvantitatívvá. Igazoltuk, hogy a CD44 alternatív splice variánsai csak mennyiségi és nem minőségi változást mutatnak a tumor progressziója során és ez a mennyiségi változás egy a primer tumor mikrokörnyezete által vezérelt klónszelekciónak az eredménye. A WT1 gén splice-mintázata a progresszió során nem mutat következetes változást. A megbízhatóan állandó expressziója azonban potenciális célponttá teszi a célzott biológiai terápiák számára. A jól ismert WT1 splice variánsokon túl egy, a colorectalis carcinoma szakirodalmában eddig meg nem jelenő Zn-ujj hiányos variáns is sikerült kimutatnunk. A KRAS onkogén mutációjának, mutációs státusának szerepét illetően igazoltuk, hogy annak az áttétképzés bizonyos lépései esetén meghatározó jelentősége lehet. Eredményeink előrejelzik, hogy a metasztatikus vastagbélrák célzott terápiájának tervezése során van létjogosultsága a primer tumoron és annak áttétein végzett összehasonlító kvantitatív KRAS mutáns allél expresszió meghatározásának.

Summary.

Metastasis formation is the most important problem of colorectal cancer disease. Any information which helps clarifying the metastatic process can potentially provide a new therapeutical tool, as well. In this study we report a complex *in vitro/in vivo* experimental model system which enables detailed investigation of the metastatic process under optimal conditions. C26 isograft colorectal cancer was orthotopically and heterotopically implanted into immunocompetent mice to examine how changes driven by the tumour and the host (either as a cause or as a result) can verify our current views on metastatic process. Via implantation of three genetically different human colorectal tumours (HT29, HT25, HCT116) into immunodeficient *scid* mice we managed to accomodate the results of the immunocompetent system to human clinical practice. Tissue samples of these animal models were tested focusing on the role of CD44 and WT1 alternative splice variants and the mutation of KRAS oncogene in metastasis. Difference in chemosensitivity of cell cultures derived from tumour samples of different phases of metastatic cascade (primary, lymph node and liver metastasis, as well as circulating tumour cells) was examined by routine human colorectal cancer chemotherapy agents. Our results were quantified by real-time PCR and RFMD (Restriction Fragment Microfluidic-based Detection).

We proved that alternative splice variants of CD44 can be characterized by qualitative stability and quantitative changes over the metastatic process and quantitative shifts of particular variant isoforms' expression in metastasis are results of a clone selection driven by microenvironmental factors of the primary tumour. Splice pattern variations of WT1 does not seem to be consequent over tumour progression of colorectal cancer. Constant expression of its variants can still suggest the gene as a potential therapeutical target. Furthermore we report a Zn-finger deficient splice variant of WT1 which was so far unknown in the literature of colorectal cancer. The role of KRAS oncogene mutation is still not clear in clinical practice. Our results underline its role in distinct steps of metastasis. Our results justify current practice of KRAS mutaton analysis on primary tumour in the design of targeted therapy of mCRC.

8. Irodalomjegyzék

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2012) Global cancer statistics, 2002. CA: a cancer journal for clinicians. 55(2):74–108.
2. Fearon ER, Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 61(5):759–67.
3. Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, Papavassiliou AG. (2012) Colorectal cancer stem cells. Stem Cells. 30(3):363–71.
4. Thorstensen L, Lothe RA. (2003) The WNT signaling pathway and its role in human solid tumors. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. 1–40.
5. Zeilstra J, Joosten SPJ, Dokter M, Verwiel E, Spaargaren M, Pals ST. (2008) Deletion of the WNT target and cancer stem cell marker CD44 in Apc(Min/+) mice attenuates intestinal tumorigenesis. Cancer Research. 68(10):3655–61.
6. Velho S, Moutinho C, Cirnes L, Albuquerque C, Hamelin R, Schmitt F, et al. (2008) BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? BMC Cancer. 8:255.
7. Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. (2012) Molecular biology of colorectal cancer. Current Problems in Cancer. 21(5):233–300.
8. Hao H, Muniz-Medina VM, Mehta H, Thomas NE, Khazak V, Der CJ, et al. (2007) Context-dependent roles of mutant B-Raf signaling in melanoma and colorectal carcinoma cell growth. Molecular Cancer Therapeutics. 6(8):2220–9.
9. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Ohnishi M, Fuchs CS. (2007) 18q loss of heterozygosity in microsatellite stable colorectal cancer is correlated with CpG

island methylator phenotype-negative (CIMP-0) and inversely with CIMP-low and CIMP-high. *BMC Cancer*. 7:72.

10. Merg A, Lynch HT, Lynch JF, Howe JR. (2005) Hereditary colon cancer-part I. *Current Problems in Surgery*. 42(4):195–256.
11. Merg A, Lynch HT, Lynch JF, Howe JR. (2005) Hereditary colorectal cancer-part II. *Current Problems in Surgery*. 42(5):267–333.
12. Kanthan R, Senger J-L, Kanthan SC. (2012) Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Pathology Research International*. 2012:597497.
13. Jain S. Colon tumor. Polyps. Adenoma-carcinoma sequence of colon. PathologyOutlines.com.
14. Ja S, Krumroy L, Plummer S, Aung P, Merkulova A, Skacel M, et al. (2009) Genetic and epigenetic classifications define clinical phenotypes and determine patient outcomes in colorectal cancer. *Br J Surg*. 96(10):1196-204.
15. Lipton LR, Johnson V, Cummings C, Fisher S, Risby P, Eftekhari Sadat A T, et al. (2004) Refining the Amsterdam Criteria and Bethesda Guidelines: testing algorithms for the prediction of mismatch repair mutation status in the familial cancer clinic. *Journal of Clinical Oncology*. 22(24):4934–43.
16. Jass JR, Young J, Leggett BA. (2001) Biological Significance of Microsatellite Instability-Low (MSI-L) Status in Colorectal Tumors. 158(2):2000–1.
17. Clevers H. (2011) The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine*. Nature Publishing Group. 17(3):313–9.
18. Pinto D, Clevers H. (2005) Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biol. Cell*. 97:185–96.
19. Biava PM, Basevi M, Biggiero L, Borgonovo A, Borgonovo E, Burigana F. (2011) Cancer cell reprogramming, stem cell differentiation, stage factors and an

- agent based model to optimize cancer treatment. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 12(4):1–12.
20. Baccelli I, Trumpp A. (2012) The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *The Journal of Cell Biology*. 198(3):281–93.
 21. Dalerba, Piero CM. (2007) Cancer stem cells and tumor metastasis: first steps into uncharted territory. *Cell Stem Cell*. 1(3):241–2.
 22. Djebali S, Davis C a., Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 489(7414):101–8.
 23. Chen J-Q, Zhan W-H, He Y-L, Peng J-S, Wang J-P, Cai S-R, et al. (2004) Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 10(6):776–82.
 24. Oliveira LA De, Artigiani-neto R, Waisberg DR, Fernandes LC, Lima FDO, Waisberg J. (2010) Nm23 protein expression in colorctal carcinoma using TMA (tissue microarray): association with metastases and survival. *Arq Gastroenterol*. (4):361–7.
 25. Tímár J. (2000) A metasztázisgének dialektikája. *Lege Artis Medicinae*. 10(1):16–8.
 26. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA SM. (1988) Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst*. 80(3):200–4.
 27. Dong W-G, Sun X-M, Yu B-P, Luo H-S, Yu J-P. (2003) Role of VEGF and CD44v6 in differentiating benign from malignant ascites. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 9(11):2596–600.
 28. Cao H-J, Fang Y, Zhang X, Chen W-J, Zhou W-P, Wang H, et al. (2005) Tumor metastasis and the reciprocal regulation of heparanase gene expression by nuclear

- factor kappa B in human gastric carcinoma tissue. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 11(6):903–7.
29. Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, Mukherjee S, Yeang C, Angelo M, et al. (2001) Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *PNAS*. 98(26):15149–54.
 30. Kenessey I, Bánki B, Márk A, Varga N, Tóvári J, Ladányi A, et al. (2012) Revisiting CB1 Receptor as Drug Target in Human Melanoma. *Pathology Oncology Research: POR*. 18(4):857-66.
 31. Prevo R, Banerji S, Ferguson DJ, Clasper S, Jackson DG. (2001) Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(22):19420–30.
 32. Consortium IHGS. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 431:931–45.
 33. Berget S, Moore C, Sharp P. (2000) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Rev Med Virol*. 10(6):356–62.
 34. Ravindra T, Lakshmi NK, Chaitanya K, Surender V, Ahuja YR. (2006) Review Article Clinical relevance of alternative splicing. *Indian Journal of Human Genetics*. 12(2):45–52.
 35. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature reviews. Genetics*. 3(4):285–98.
 36. Matlin A, Clark F, Smith C. (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6(5):386–98.
 37. Ghigna C, Valacca C, Biamonti G. (2008) Alternative splicing and tumor progression. *Current Genomics*. 9(8):556–70.

38. Wang Z, Burge CB. (2008) Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*. 14(5):802–13.
39. Skotheim RI, Nees M. (2007) Alternative splicing in cancer: noise, functional, or systematic? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39(7-8):1432–49.
40. Watermann DO, Tang Y, Zur Hausen A, Jäger M, Stamm S, Stickeler E. (2006) Splicing factor Tra2-beta1 is specifically induced in breast cancer and regulates alternative splicing of the CD44 gene. *Cancer Research*. 66(9):4774–80.
41. Qian Y, Liling T. (2012) Alternative Spliced Variants as Biomarkers of Colorectal Cancer. *Current Drug Metabolism*. 12(10):966–74.
42. Bahn JH. (2010) Alternative Splicing in Human Colorectal Cancer. Doctoral dissertation.
43. Gotley DC, Fawcett J, Walsh MD, Reeder J a, Simmons DL, Antalis TM. (1996) Alternatively spliced variants of the cell adhesion molecule CD44 and tumour progression in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 74(3):342–51.
44. Shin C, Manley JL. (2004) Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*. 5(9):727–38.
45. Wittig BM, Goebel R, Weg-Remers S, Pistorius G, Feifel G, Zeitz M, et al. (2001) Stage-specific alternative splicing of CD44 and alpha 6 beta 1 integrin in colorectal tumorigenesis. *Experimental and Molecular Pathology*. 70(2):96–102.
46. Rouschop K, Florquin S. (2007) CD44 in renal disease: friend or foe. *Nier*. 1–17.
47. Lynch KW. (2006) Cotranscriptional splicing regulation: it's not just about speed. *Nature Structural & Molecular Biology*. 13(11):952–3.
48. Goodison S, Yoshida K, Churchman M, Tarin D. (1998) Multiple Intron Retention Occurs in Tumor Cell CD44 mRNA Processing. *American Journal of Pathology*. 153(4):1221–8.

49. Ghatak S, Hascall VC, Markwald RR, Misra S. (2010) Stromal hyaluronan interaction with epithelial CD44 variants promotes prostate cancer invasiveness by augmenting expression and function of hepatocyte growth factor and androgen receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 285(26):19821–32.
50. Toole BP. (2010) Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clin Cancer Res*. 15(24):9–17.
51. Matsubara Y, Katoh S, Taniguchii H, Oka M, Kadota J, Kohno S. (2000) Expression of CD44 variants in lung cancer and its relationship to hyaluronan binding. *The Journal of International Medical Research*. 28(2):78–90.
52. Kim H, Yang XL, Rosada C, Hamilton SR, August JT. (1994) CD44 expression in colorectal adenomas is an early event occurring prior to K-ras and p53 gene mutation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 310(2):504–7.
53. Jackson DG, Bell JI, Dicknson R, Timans, Jackie, Shields J, Whittle N. (1995) Proteoglycan Forms of the Lymphocyte Homing Receptor CD44 Are Alternatively Spliced Variants Containing The v3 Exon. *The Journal of Cell Biology*. 128(4):673–85.
54. Masson D, Denis MG, Denis M, Blanchard D, Loirat MJ, Cassagnau E, et al. (1999) Soluble CD44: quantification and molecular repartition in plasma of patients with colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 80(12):1995–2000.
55. Yamane N, Tsujitani S, Makino M, Maeta M, Kaibara N. (1999) Soluble CD44 Variant 6 as a Prognostic Indicator in Patients with Colorectal Cancer. *Oncology*. 56(3):232–8.
56. Naor, David, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L FY. (2002) Display Settings: CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 39(6):527–79.
57. Huang C, Shen C, Wang H, Wu P, Cheng C. (2007) Increased expression of SRp40 affecting CD44 splicing is associated with the clinical outcome of lymph node metastasis in human breast cancer. *Clin Chim Acta*. 384(1):69–74.

58. Gonçalves V, Matos P, Jordan P. (2008) The beta-catenin/TCF4 pathway modifies alternative splicing through modulation of SRp20 expression. *RNA*. 14(12):2538–49.
59. Sreaton GR, Bell M V, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. (1992) Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *PNAS*. 89:12160–4.
60. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB SB. (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for. *Cell*. 61(7):1303–13.
61. Kawakami N, Nishizawa F, Sakane N, Iwao M, Tsujikawa K, Ikawa M, et al. (1999) Roles of Integrins and CD44 on the Adhesion and Migration of Fetal Liver Cells to the Fetal Thymus. *The Journal of Immunology*. 163:3211–6.
62. Camp BRL, Kraus TA, Birkeland ML, Purir E. (1991) High Levels of CD44 Expression Distinguish Virgin from Antigen-primed B Cells. *J. Exp. Med*. 173:3–6.
63. Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, et al. (2006) CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex . *Immunity*. 25(4):595–606.
64. Cao G, Savani RC, Fehrenbach M, Lyons C, Zhang L, Coukos G, et al. (2006) Involvement of endothelial CD44 during in vivo angiogenesis. *The American Journal of Pathology*. 169(1):325–36.
65. Jackson DG, Buckleyq J, Bell JI. (1992) Multiple Variants of the Human Lymphocyte Homing Receptor CD44 Generated by Insertions at a Single Site in the Extracellular Domain. *The Journal of Biological Chemistry*. 267(7):4732–9.
66. Shetty S, Pf L, Dh A. (2008) Lymphocyte recruitment to the liver: molecular insights into the pathogenesis of liver injury and hepatitis . *Toxicology*. 254(3):136–46.

67. Borchers AT, Shimoda S, Bowlus C, Keen CL GM. (2009) Lymphocyte recruitment and homing to the liver in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing. *Semin. Immunopathol.* 31(3):309–22.
68. Zalewski B, Stasiak-Barmuta a, Guzińska-Ustymowicz K, Cepowicz D, Gryko M. (2004) Molecule CD44 variant 10 expression in lymphocytes infiltrating tumour tissues and epithelial cells in patients with colorectal cancer. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku* (1995). 49 Suppl 1:91–3.
69. Brennan FR, Mikecz K, Glant TT, Jobanputra P, Pinder S, Bavington C, et al. (1997) CD44 expression by leucocytes in rheumatoid arthritis and modulation by specific antibody: implications for lymphocyte adhesion to endothelial cells and synoviocytes in vitro. *Scandinavian journal of immunology.* 45(2):213–20.
70. Kitano , Oshitani N, Matsumoto T KK. (1996) Display Settings: CD44 variants in ulcerative colitis and Crohn’s disease . *Lancet.* 348(9022):266–7.
71. Teder P, Vandivier RW, Jiang D, Liang J, Cohn L, Puré E, et al. (2002) Resolution of lung inflammation by CD44. *Science.* 296(5565):155–8.
72. Seiter S, Tilgen W, Herrmann K, Zöllner M, Schadendorf D, Patzelt E, et al. (1996) Expression of CD44 splice variants in human skin and epidermal tumours. *Virchows Archiv.* 428(3):2–3.
73. Woerner SM, Givehchian M, Dürst M, Schneider a, Costa S, Melsheimer P, et al. (1995) Expression of CD44 splice variants in normal, dysplastic, and neoplastic cervical epithelium. *Clinical Cancer Research.* 1(10):1125–32.
74. Fox SB, Fawcett J, Jackson DG, Collins I, Gatter KC, Harris AL, et al. (1994) Normal Human Tissues, in Addition to Some Tumors, Express Multiple Different CD44 Isoforms. *Cancer Research.* 54:4539–46.
75. Givehchian M, Woerner SM, Lacroix J, Zöllner M, Drings P, Becker H, et al. (1996) Expression of CD44 splice variants in normal respiratory epithelium and

- bronchial carcinomas: no evidence for altered CD44 splicing in metastasis. *Oncogene*. 12(5):1137–44.
76. Isabel Fonseca JFMN and JS. (2000) Expression of CD44 isoforms in normal salivary gland tissue: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Histochemistry and Cell Biology*. 114(6):5–6.
 77. Van Royen N, Voskuil M, Hoefer I, Jost M, De Graaf S, Hedwig F, et al. (2004) CD44 regulates arteriogenesis in mice and is differentially expressed in patients with poor and good collateralization. *Circulation*. 109(13):1647–52.
 78. Patel S a, Ramkissoon SH, Bryan M, Pliner LF, Dontu G, Patel PS, et al. (2012) Delineation of breast cancer cell hierarchy identifies the subset responsible for dormancy. *Scientific Reports*. 2:906.
 79. Grimme HU, Termeer CC, Bennett KL, Weiss JM, Schöpf E, Aruffo a, et al. (1999) Colocalization of basic fibroblast growth factor and CD44 isoforms containing the variably spliced exon v3 (CD44v3) in normal skin and in epidermal skin cancers. *The British Journal of Dermatology*. 141(5):824–32.
 80. Hughes KR, Sablitzky F, Mahida YR. (2011) Expression profiling of Wnt family of genes in normal and inflammatory bowel disease primary human intestinal myofibroblasts and normal human colonic crypt epithelial cells. *Inflammatory Bowel Diseases*. 17(1):213–20.
 81. Levin TG, Powell AE, Davies PS, Silk AD, Dismuke AD, Anderson EC, et al. (2010) Characterization of the intestinal cancer stem cell marker CD166 in the human and mouse gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 139(6):2072–2082.
 82. Terpe H-J, Stark H, Prehm P, Günthert U. (1994) CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelia of non-malignant human fetal and adult tissues. *Histochemistry*. 101(2):79–89.
 83. Wielenga VJM, Heider K, Johan G, Progression T, Offerhaus GJA, Adolf G, et al. (1993) Expression of CD44 Variant Proteins in Human Colorectal Cancer Is

- Related to Tumor Progression Advances in Brief Expression of CD44 Variant Proteins in Human Colorectal Cancer Is Related to. *Cancer Res.* 53:4754–6.
84. Rudzki Z, LeDuy L, Jothy S. (1997) Changes in CD44 expression during carcinogenesis of the mouse colon. *Experimental and Molecular Pathology.* 64(2):114–25.
 85. Van der Voort R, Taher TE, Wielenga VJ, Spaargaren M, Prevo R, Smit L, et al. (1999) Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met. *The Journal of Biological Chemistry.* 274(10):6499–506.
 86. Lyons a J, Jones J. (2007) Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 36(8):671–9.
 87. Kanke M, Fujii M, Kameyama K, Kanzaki J, Tokumaru Y, Imanishi Y, et al. (2000) Role of CD44 variant exon 6 in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery.* 126(10):1217–23.
 88. Rodrigues LR, Teixeira J a, Schmitt FL, Paulsson M, Lindmark-Månsson H. (2007) The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 16(6):1087–97.
 89. Faleiro-Rodrigues C, Lopes C. (2004) E-cadherin, CD44 and CD44v6 in squamous intraepithelial lesions and invasive carcinomas of the uterine cervix: an immunohistochemical study. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology.* 71(6):329–36.
 90. Vihinen PP, Pyrhönen SO, Kähäri V-M. (2003) New prognostic factors and developing therapy of cutaneous melanoma. *Annals of Medicine.* 35(2):66–78.
 91. Ermak G, Jennings T, Robinson L, Ross JS, Figge J. (1996) Restricted Patterns of CD44 Variant Exon Expression in Human Papillary Thyroid Carcinoma

- Restricted Patterns of CD44 Variant Exon Expression in Human Papillary Thyroid. *Cancer Research*. 56:1037–42.
92. Tahara E. (1995) Molecular biology of gastric cancer. *World Journal of Surgery*. 19(4):484–8.
93. Wielenga VJ, Van der Voort R, Taher TE, Smit L, Beuling E a, Van Krimpen C, et al. (2000) Expression of c-Met and heparan-sulfate proteoglycan forms of CD44 in colorectal cancer. *The American Journal of Pathology*. 157(5):1563–73.
94. Yamada Y, Itano N, Narimatsu H, Kudo T, Hirohashi S, Ochiai a, et al. (1999) Receptor for hyaluronan-mediated motility and CD44 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*. 90(9):987–92.
95. Naor D, Sionov R V, Ish-Shalom D. (1997) CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Advances in Cancer Research*. 71:241–319.
96. Zalewski B. (2004) Levels of v5 and v6 CD44 splice variants in serum of patients with colorectal cancer are not correlated with pT stage, histopathological grade of malignancy and clinical features. *World Journal of Gastroenterology*. 10(4):583–5.
97. Gröne J, Lenze D, Jurinovic V, Hummel M, Seidel H, Leder G, et al. (2011) Molecular profiles and clinical outcome of stage UICC II colon cancer patients. *International Journal of Colorectal Disease*. 26(7):847–58.
98. Kuniyasu H, Chihara Y, Tadahiko, Kubozoa, Tadateru T. (2002) Co-expression of CD44v3 and heparanase is correlated with metastasis of human colon cancer. *Int J Molec Medicine*. 10(3):333–7.
99. Barbour AP, Reeder JA, Walsh MD, Fawcett J, Antalis TM, Gotley DC. (2003) Expression of the CD44v2-10 isoform confers a metastatic phenotype:

importance of the heparan sulfate attachment site CD44v3. *Cancer Research*. 63(4):887–92.

100. Haruyama K, Matsumura Y, Moriya Y, Kakizoe T, Ochiai A, Kawaguchi M ST. (1999) Clinicopathological significance of the expression of CD44v2 in colorectal cancer. *Anticancer Research*. 19(5C):4421–8.
101. Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. (1998) Expression of CD44 and variant proteins in human colorectal cancer and its relevance for prognosis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 33(3):301–9.
102. Goodison S, Urquidi V, Tarin D. (1999) CD44 cell adhesion molecules. *Molecular Pathology*. 52(4):189–96.
103. Sneath RJ, Mangham DC. (1998) The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Molecular Pathology*. 51(4):191–200.
104. Marhaba R, Zöllner M. (2004) CD44 in Cancer Progression: Adhesion , Migration and Growth Regulation. *Journal of Molecular Histology*. 35(3):211–31.
105. Kuhn S, Koch M, Nübel T, Ladwein M, Antolovic D, Klingbeil P, et al. (2007) A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Molecular Cancer Research*. 5(6):553–67.
106. Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, Ezumi K, Terayama M, Hemmi H, et al. (2007) A multivariate analysis of adhesion molecules expression in assessment of colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*. 95(8):652–62.
107. Camp RL, Kraus T a, Puré E. (1991) Variations in the cytoskeletal interaction and posttranslational modification of the CD44 homing receptor in macrophages. *The Journal of Cell Biology*. 115(5):1283–92.

108. Bendardaf R, Algars a, Elzagheid a, Korkeila E, Ristamäki R, Lamlum H, et al. (2006) Comparison of CD44 expression in primary tumours and metastases of colorectal cancer. *Oncology Reports*. 16(4):741–6.
109. Marhaba R, Zöllner M. (2004) CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *Journal of Molecular Histology*. 35(3):211–31.
110. Fujisaki T, Tanaka Y, Fujii K. (1999) CD44 Stimulation Induces Integrin-mediated Adhesion of Colon Cancer Cell Lines to Endothelial Cells by Up-Regulation of Integrins and c-Met and Activation of Integrins CD44 Stimulation Induces Integrin-mediated Adhesion of Colon Cancer Cell Lines. *Cancer Research*. 59:4427–34.
111. Ghatak S, Misra S, Toole BP. (2002) Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(41):38013–20.
112. Kuniyasu H, Oue N, Tsutsumi M, Tahara E, Yasui W. (2001) Heparan sulfate enhances invasion by human colon carcinoma cell lines through expression of CD44 variant exon 3. *Clinical Cancer Research*. 7(12):4067–72.
113. Ohashi R, Takahashi F, Cui R, Yoshioka M, Gu T, Sasaki S, et al. (2007) Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell. *Cancer Letters*. 252(2):225–34.
114. Klingbeil P, Marhaba R, Jung T, Kirmse R, Ludwig T, Zöllner M. (2009) CD44 variant isoforms promote metastasis formation by a tumor cell-matrix cross-talk that supports adhesion and apoptosis resistance. *Molecular Cancer Research*. 7(2):168–79.
115. Bennett KL, Jackson DG, Simon JC, Tanczos E, Peach R, Modrell B, et al. (1995) CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *The Journal of Cell Biology*. 128(4):687–98.

116. Fujiya M, Watari J, Ashida T, Honda M, Tanabe H, Fujiki T, et al. (2001) Reduced expression of syndecan-1 affects metastatic potential and clinical outcome in patients with colorectal cancer . *Jpn J Cancer Res.* 92(10):1074–81.
117. Nedvetzki S, Golan I, Assayag N, Gonen E, Caspi D, Gladnikoff M, et al. (2003) A mutation in a CD44 variant of inflammatory cells enhances the mitogenic interaction of FGF with its receptor. *J Clin Invest.* 111(8):1211–20.
118. Bos PD, Zhang XH-F, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, et al. (2009) Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature.* 459(7249):1005–9.
119. Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H. (2002) CD44 is required for two consecutive steps in HGF / c-Met signaling. *Genes & Development.* 16:3074–86.
120. Hong MN, Adrian F, Peng KL, Denis C, Shing CH. (2002) Expression of CD44 variants in colorectal carcinoma quantified by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Lab Clin Med.* 139(1):59–65.
121. Edovitsky E, Elkin M, Zcharia E, Peretz T, Vlodaysky I. (2004) Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis, and metastasis. *Journal of the National Cancer Institute.* 96(16):1219–30.
122. Joyce J, Freeman C, Meyer-Morse N, Parish CR, Hanahan D. (2005) A functional heparan sulfate mimetic implicates both heparanase and heparan sulfate in tumor angiogenesis and invasion in a mouse model of multistage cancer. *Oncogene.* 24(25):4037–51.
123. Boyd DD, Nakajima M. (2004) Involvement of heparanase in tumor metastases: a new target in cancer therapy? *Journal of the National Cancer Institute.* 96(16):1194–5.

124. Elkin M, Ilan N, Ishai-Michaeli R, Friedmann Y, Papo O, Pecker I, et al. (2001) Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action. *FASEB Journal*. 15(9):1661–3.
125. Orian-Rousseau V, Ponta H. (2008) Adhesion Proteins Meet Receptors: A Common Theme? *Advances in Cancer Research*. 101:63–92.
126. Orian-Rousseau V, Morrison H, Matzke A, Pace G, Herrlich P, Ponta H. (2007) HGF-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin . *Molecular Biology of the Cell*. 18(1):76–83.
127. Spix Julie K, Chay Edward Y, Block Ethan R KJK. (2007) Hepatocyte growth factor induces epithelial cell motility through transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Exp Cell Res*. 313(15):3319–25.
128. Vande GW, Jeffers M, Cortner J, Alvord G, Tsarfaty I, Resau J. (1997) Met-HGF / SF: tumorigenesis , invasion and metastasis. *Ciba Found Symp*. 212:119–30.
129. Cheng C, Yaffe MB, Sharp PA. (2006) A positive feedback loop couples Ras activation and CD44 alternative splicing. *Genes & Development*. 20(617):1715–20.
130. Furuta K, Zahurak M, Yang XL, Rosada C, Goodman SN, August JT, et al. (1996) Relationship between CD44 expression and cell proliferation in epithelium and stroma of colorectal neoplasms. *The American Journal of Pathology*. 149(4):1147–55.
131. Van Weering DH, Baas PD, Bos JL. (1993) A PCR-based method for the analysis of human CD44 splice products. *PCR Methods and Applications*. 3(2):100–6.
132. Kopper L, Hajdú M. (2004) Minireview. Tumor Stem Cells. *Pathology Oncology Research: POR*. 10(2):69–73.

133. Gilbert SF, Page S. (2010) *Developmental Biology*, Ninth Edition. Book Chapter. 1-8.
134. Kendziorra E, Ahlborn K, Spitzner M, Rave-Fränk M, Emons G, Gaedcke J, et al. (2011) Silencing of the Wnt transcription factor TCF4 sensitizes colorectal cancer cells to (chemo-) radiotherapy. *Carcinogenesis*. 32(12):1824–31.
135. Walker F, Zhang H-H, Odorizzi A, Burgess AW. (2011) LGR5 is a negative regulator of tumorigenicity, antagonizes Wnt signalling and regulates cell adhesion in colorectal cancer cell lines. *PLoS ONE*. 6(7):e22733.
136. Fodde R, Brabletz T. (2007) Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Current Opinion in Cell Biology*. 19(2):150–8.
137. Alderton G. (2006) Tumour stem cells: Generating colon cancer. *Nature Reviews Cancer*. 6(12):906–7.
138. Koukourakis MI, Giatromanolaki a, Tsakmaki V, Danielidis V, Sivridis E. (2012) Cancer stem cell phenotype relates to radio-chemotherapy outcome in locally advanced squamous cell head-neck cancer. *British Journal of Cancer*. 106(5):846–53.
139. Dalerba P, Dylla SJ, Park I-K, Liu R, Wang X, Cho RW, et al. (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(24):10158–63.
140. Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, et al. (2008) CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clinical Cancer Research*. 14(21):6751–60.
141. Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, et al. (2008) CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clinical Cancer Research*. 14(21):6751–60.

142. Zhu J, He J, Liu Y, Simeone DM, Lubman DM. (2012) Identification of glycoprotein markers for pancreatic cancer CD24+CD44+ stem-like cells using nano-LC-MS/MS and tissue microarray. *Journal of Proteome Research*. 11(4):2272–81.
143. Fillmore C, Kuperwasser C. (2007) Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? *Breast Cancer Research: BCR*. 9(3):303.
144. Zeilstra J, Joosten SPJ, Dokter M, Verwiel E, Spaargaren M, Pals ST. (2008) Deletion of the WNT target and cancer stem cell marker CD44 in *Apc*(Min/+) mice attenuates intestinal tumorigenesis. *Cancer Research*. 68(10):3655–61.
145. Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. (2011) Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? *Cancers*. 3(1):716–29.
146. Djebali S et al. (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 489(7414):101–8.
147. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Saurez Saiz F, Minden MD. (2007) A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*. 21(5):868–76.
148. Dallosso AR, Hancock AL, Brown KW, Williams AC, Jackson S, Malik K. (2004) Genomic imprinting at the WT1 gene involves a novel coding transcript (AWT1) that shows deregulation in Wilms' tumours. *Human Molecular Genetics*. 13(4):405–15.
149. Englert C. (1998) WT1—more than a transcription factor? *Trends in Biochemical Sciences*. 23(10):389–93.
150. Mrowka C, Schedl A, Delbru M. (2000) Wilms' Tumor Suppressor Gene WT1: From Structure to Renal Pathophysiologic Features. *Journal of the American Society of Nephrology*. 11:S106–115.

151. Morrison DJ, English M, Licht JD. (2005) WT1 induces apoptosis through transcriptional regulation of the proapoptotic Bcl-2 family member Bak. *Cancer Research*. 65(18):8174–82.
152. Davies RC, Calvio C, Bratt E, Larsson SH, Lamond a. I, Hastie ND. (1998) WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes & Development*. 12(20):3217–25.
153. Scholz H, Kirschner KM. (2011) Oxygen-Dependent Gene Expression in Development and Cancer: Lessons Learned from the Wilms' Tumor Gene, WT1. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 4:4.
154. Burwell E, McCarty GP, Simpson LA, Thompson KA, Loeb DM. (2007) Isoforms of Wilms' tumor suppressor gene (WT1) have distinct effects on mammary epithelial cells. *Oncogene*. 26(23):3423–30.
155. Chau Y-Y, Hastie N. (2012) The role of WT1 in regulating mesenchyme in cancer, development, and tissue homeostasis. *Trends in Genetics*. 28(10):515–24.
156. Zaia A, GC F, Piantanelli L, Saunders GF. (2001) Transcriptional regulation of the androgen signaling pathway by the Wilms' tumor suppressor gene WT1 . *Anticancer Research*. 21(1A):1–10.
157. Oji Y, Yamamoto H, Nomura M, Nakano Y, Ikeba A, Nakatsuka S, et al. (2003) Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Science*. 94(8):712–7.
158. Koesters R, Linnebacher M, Jf C, Germann A, Schwitalle Y, Findeisen P, et al. (2004) WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells . *Int J Cancer*. 109(3):385–92.
159. Sebolt-Leopold JS. (2008) Advances in the development of cancer therapeutics directed against the RAS-mitogen-activated protein kinase pathway. *Clinical Cancer Research*. 14(12):3651–6.

160. Janssen K-P, Abadala M, El Marjou F, Louvard D, Robine S. (2005) Mouse models of K-ras-initiated carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1756(2):145–54.
161. Bos JL. (1989) Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Research*. 49:4682–9.
162. Nakano H, Yamamoto F, Neville C, Evans D, Mizuno T, Peruchot M. (1984) Isolation of transforming sequences of two human lung carcinomas: Structural and functional analysis of the activated c-K-ras oncogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 81:71–5.
163. Kiaris H, Spandidos D. (1995) Mutations of ras genes in human tumours (Review). *Int J Oncol*. 7(13):413–21.
164. Phipps AI, Buchanan DD, Makar KW, Win AK, Baron JA, Lindor NM, Potter JD NP. (2013) KRAS-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour. *British Journal of Cancer*. 108(8):1757–64.
165. Yokota T. (2012) Are KRAS / BRAF Mutations Potent Prognostic and / or Predictive Biomarkers in Colorectal Cancers? *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 12(2):163–71.
166. Marzinotto S, Sessa F, Franzoni A, Anselmi A, Gastaldo LR, Mason S, et al. (2011) KRAS Codons 12 and 13 Mutation Analysis: A Comparative Study between Direct Sequencing and a New Sensitive Real-Time PCR Assay. *Sequencing*. 2011(2011):1–7.
167. Tímár J, Hegedűs B, Rásó E. (2010) KRAS mutation testing of colorectal cancer for anti-EGFR therapy: dogmas versus evidence . *Curr Cancer Drug Targets*. 10(8):813–23.
168. Shiozawa Y, Havens a M, Pienta KJ, Taichman RS. (2008) The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia*. 22(5):941–50.

169. Lang JE, Hall CS, Singh B, Lucci A. (2007) Significance of micrometastasis in bone marrow and blood of operable breast cancer patients: research tool or clinical application? *Expert Review of Anticancer Therapy*. 7(10):1463–72.
170. Davis J, Nakanishi H, Kumar V, Bhadkamkar V, McCormack R, Fritsche H, et al. (2008) Circulating tumor cells in peripheral blood samples from patients with increased serum prostate specific antigen: initial results in early prostate cancer . *J Urol*. 179(6):2187–91.
171. Engell H. (1955) Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on the occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumour area at operation. *Ugeskr Laeger*. 117(25):822–3.
172. Lurje G, Schiesser M, Claudius A, Schneider PM. (2010) Circulating tumor cells in gastrointestinal malignancies: current techniques and clinical implications. *Journal of Oncology*. 1–9.
173. Williams SCP. (2013) Circulating tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110(13):4861.
174. Allard W, Matera J, Miller M, Repollet M, Connelly M, Rao C, et al. (2004) Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 10(2):6897–904.
175. Miller MC, Doyle G V, Terstappen LWMM. (2010) Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *Journal of Oncology*. 2010:1–8.
176. Sastre J, Maestro ML, Puente J, Veganzones S, Alfonso R, Rafael S, et al. (2008) Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables. *Annals of Oncology*. 19(5):935–8.

177. Cohen SJ, Punt CJ a, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. (2009) Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 20(7):1223–9.
178. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt-de Vries J, Van der Spoel P, Mostert B, Martens JWM, et al. (2009) Molecular characterization of circulating tumor cells in large quantities of contaminating leukocytes by a multiplex real-time PCR. *Breast Cancer Research and Treatment*. 118(3):455–68.
179. Sakaizawa K, Goto Y, Kiniwa Y, Uchiyama a, Harada K, Shimada S, et al. (2012) Mutation analysis of BRAF and KIT in circulating melanoma cells at the single cell level. *British Journal of Cancer*. 106(5):939–46.
180. Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M, Langer-Freitag S, Reeh M, Seifert A, et al. (2013) Heterogeneity of Epidermal Growth Factor Receptor Status and Mutations of KRAS / PIK3CA in Circulating Tumor Cells of Patients with Colorectal Cancer . *Clin Chem*. 59(1):252-60.
181. Raso-Barnett L, Banky B, Barbai T, Becsagh P, Timar J, Raso E. (2013) Demonstration of a Melanoma-Specific CD44 Alternative Splicing Pattern That Remains Qualitatively Stable, but Shows Quantitative Changes during Tumour Progression. *PLoS ONE*. 8(1):e53883.
182. Barbazán J, Alonso-Alconada L, Muínelo-Romay L, Vieito M, Abalo A, Alonso-Nocelo M, et al. (2012) Molecular characterization of circulating tumor cells in human metastatic colorectal cancer. *PloS ONE*. 7(7):e40476.
183. Smirnov D a, Zweitzig DR, Foulk BW, Miller MC, Doyle G V, Pienta KJ, et al. (2005) Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Research*. 65(12):4993–7.
184. Tímár J, Tóvári J, Rásó E, Mészáros L, Bereczky B, Lapis K. (2005) Platelet-mimicry of cancer cells: epiphenomenon with clinical significance. *Oncology*. 69(3):185–201.

185. Fidler I. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 3(6):453–8.
186. Tarin D, Price JE, Kettlewell MGW, Shunts P, Souter RG, Vass ACR, et al. (1984) Mechanisms of Human Tumor Metastasis Studied in Patients with Peritoneovenous Shunts. *Cancer Res*. 44:3584–92.
187. Glaser V. (2010) Third-Generation Sequencing Debuts. *Genetic Engineering and Biotechnology News*. 30(8).
188. Yu L, Wu X, Cheng Z, Lee C V, LeCouter J, Campa C, et al. (2008) Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 49(2):522–7.
189. Bánky B, Rásó-Barnett L, Barbai T, Tímár J, Becságh P, Rásó E. (2012) Characteristics of CD44 alternative splice pattern in the course of human colorectal adenocarcinoma progression. *Molecular Cancer*. 11(1):83.
190. Paku S, Lapis K. (1993) Morphological aspects of angiogenesis in experimental liver metastases. *The American Journal of Pathology*. 143(3):926–36.
191. Yamada Y, Itano N, Narimatsu H, Kudo T, Hirohashi S, Ochiai A, et al. (2003) CD44 variant exon 6 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Oncology Reports*. 10(6):1919–24.
192. Khoursheed M, Mathew TC, Makar RR, Sonia L, Abul H, Asfar S, et al. (2002) Expression of CD44s in human colorectal cancer. *Pathology Oncology Research*. 8(3):170–4.
193. Vogl A, Sartorius AU, Vogt T, Roesch AA, Landthaler AM, Stolz AW. (2005) Gene Expression Profile Changes between Melanoma Metastases and their Daughter Cell Lines: Implication for Vaccination Protocols. *J Invest Dermatol*. 124:401–4.

194. Kecmanovic DM, Pavlov MJ, Ceranic MS, Sepetkovski a V, Kovacevic P a, Stamenkovic a B. (2005) Treatment of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer by cytoreductive surgery and hyperthermic perioperative intraperitoneal chemotherapy. *European Journal of Surgical Oncology*. 31(2):147–52.
195. Gazzaniga P, Gradilone A, Naso G, Cortesi E, Gianni W, Frati L, et al. (2008) Chemoresistance profile of circulating tumor cells: toward a clinical benefit? *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer*. 123(7):1730–2.
196. Matsusaka S, Chin K. (2012) Detection and HER2 expression of circulating tumor cells in advanced gastric cancer patients . *J Clin Oncol* 30, Suppl. Abstr 10541.
197. Tímár J. (2004) A daganatos progresszió molekuláris mechanizmusa. Krompechertől a DNS-chipig. *Magyar Onkológia*. 48(1):3–11.
198. Stahtea XN, Roussidis AE, Kanakis I, Tzanakakis GN, Chalkiadakis G, Mavroudis D, et al. (2007) Imatinib inhibits colorectal cancer cell growth and suppresses stromal-induced growth stimulation, MT1-MMP expression and pro-MMP2 activation. *International Journal of Cancer*. 121(12):2808–14.

9. Saját publikációk jegyzéke

9.1. A dolgozattal szorosan összefüggő cikkek

1. **Bánky B** - Rásó-Barnett L, Barbai T, Tímár J, Becságh P, Rásó E. (2012) Characteristics of CD44 alternative splice pattern in the course of human colorectal adenocarcinoma progression. *Molecular Cancer* 11:83
2. Raso-Barnett L - **Bánky B**, Barbai T, Becsagh P, Timar J, Raso E. (2013) Demonstration of a melanoma-specific CD44 alternative splicing pattern that remains qualitatively stable, but shows quantitative changes during tumour progression. *PLOS ONE* 8(1):e53883

9.2. A dolgozattal szorosan összefüggésbe nem hozható cikkek:

1. Thomas R, **Bánky B**, Hobday C, Borowski DW.(2012) Colonic obstruction caused by intra-luminal haematoma. *BMJ Case Rep.* 9.EPUB
2. Kenessey I -**Bánky B**, Márk A, Varga N, Tóvári J, Ladányi A, Rásó E, Tímár J. (2012) Revisiting CB1 Receptor as Drug Target in Human Melanoma. *Pathol Oncol Res* 2012 Oct; 18(4):857-66.
3. **Bánky B**, Bányász Zs, Mayer A, Almási K, Szucs I. (2005) Óriás retroperitoneális liposzarkóma – esetbemutatás. *Magyar Sebészet* 58:190-193.

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik az elmúlt 10 évben figyelemmel kísérték és támogatták kutatómunkámat, melynek eredményeként ez a disszertáció megszülethetett. Mindenekelőtt feleségemnek, Beának és gyermekeimnek mondok köszönetet, akik nyugodt, biztos háttérrel adtak és adnak ma is mindennapi klinikai és kutatómunkámhoz; támogatásuk, biztatásuk és sokszoros lemondásuk nélkül munkám és eredményeim nem születhettek volna meg. Nekik szeretném ajánlani ezúton dolgozatomat. Hasonlóan köszönetet mondok szüleimnek kitartó biztatásukért, a tudományos kutatói munkában elérem állított életpéldájukért, valamint erőfeszítéseimet és eredményes munkámat támogató, azt végigkísérő imádságukért.

Tanáraim és mentoraim közül elsőként és kiemelt tisztelettel témavezetőmnek, Dr. Rásó Erzsébetnek szeretnék köszönetet mondani, amiért fáradhatatlan kitartással munkám első percétől egészen disszertációm elkészítéséig tanított, átadta tapasztalatait, szemléletmódomat formálta és tanácsaival, kritikájával, barátságával végigkísérte kutatásom minden mozzanatát, botlásaimat és sikereimet egyaránt. Szintén köszönettel tartozom Barbai Tamásnak és Dr. Rásó-Barnett Líviának, valamint Becságh Péternek, akik kutatótársaimként állandó intellektuális és baráti partnerek voltak elméleti és gyakorlati kísérleti munkámban a tervezési fázistól a kivitelezésen át az eredmények összegzéséig és interpretálásáig. Köszönettel tartozom Dr. Lotz Gábor Docens Úrnak, aki a II.sz. Patológiai Intézetben intézeti opponensként dolgozatomat figyelmével megtisztelte és megjegyzéseivel, valamint kérdésselvetéseivel eredményeim világosabb megfogalmazásában volt segítségemre. Végül köszönettel tartozom Tímár József Professzor Úrnak, aki munkacsoportjában bár klinikus vagyok, mégis lehetőséget biztosított számomra egy baráti, jó hangulatú, termékeny csapatmunkában való részvételre, kutatómunkámat az elmúlt években figyelemével megtisztelte és mind emberi, mind szakmai támogatásával kutatói tevékenységemnek biztos háttérrel teremtett. Nem feledkezhetem meg a laboratóriumi munkában segítséget nyújtó Piurkó Violettról, Parragné Derecskei Katalinról, valamint Francsovics Juditról sem.

A tatabányai Szent Borbála Kórház Sebészeti Osztályán sebész kollégáimnak is meg szeretném köszönni, hogy kutatómunkám ideje alatt a klinikai munkában oly sokat helytálltak helyettem. Különösen hálás vagyok egykori és jelenlegi osztályvezetőimnek,

Dr. Bányász Zsoltnak és Dr. Járay Gézának, akik a sebészeti munka mellett lehetőséget biztosítottak számomra a sebészeti szférában szokatlan molekuláris onkológiai kutatómunka folytatására és emellett baráti inspirációjukat is mindvégig élvezhettem. Végül név nélkül mindazoknak köszönetet mondok, akik a fenti felsorolásból kimaradtak ugyan, de bármily módon segítettek, támogattak, ösztönöztek, s ezáltal közelebb segítettek disszertációm elkészítéséhez. Remélem eddigi és jövőbeli munkámmal közvetlenül, vagy közvetve, mások segítése által lehetőségem lesz meghálálni bizalmukat, támogatásukat és mindennemű segítségüket.