

# A VASTAGBÉLRÁK PROGRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA KÍSÉRLETES ÁLLATMODELL SEGÍTSÉGÉVEL

Doktori tézisek

**Dr. Bánky Balázs**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola  
Onkológia program



Témavezető: Dr. Rásó Erzsébet, Ph.D

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

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Lakatos Péter, DSc  
Szigorlati bizottság tagjai: Prof. Dr. Szentirmay Zoltán, DSc  
Dr. Patócs Attila, Ph.D

Budapest  
2013

## **Bevezetés**

A korai stádiumú vastagbélrák sebészi kezelésének technikai kritériumai az elmúlt két évtizedben letisztultak, mely által kifejezetten jó hosszú távú túlélési eredmények érhetők el. Ezzel szemben a lokálisan invazív (T4), valamint még inkább a távoli áttétet adó (M1) elváltozások máig megoldatlan terápiás problémát jelentenek. Ezért a colorectalis tumorok (CRC) áttétképzési mechanizmusának a tanulmányozása, valamint e folyamat megértése központi jelentőséggel bír.

A vastag- és végbélrák karcinogenezisének egyes mozzanatait, azaz a normál vastagbél nyálkahártyától a jóindulatú polypoid elváltozásokon át a vastagbélrákig tartó morfológiai lépéssort jól meghatározott genetikai elváltozásokkal korreláltatható (adenoma-carcinoma szekvencia). Az eseménysor háttérében számos gén, így az APC, Tp53, KRAS, BRAF, DCC, EGFR, SFK, TGFR2, SMAD4 stb. mutációinak, illetve működészavarának sora vált ismertté. A „klasszikus” colorectalis karcinogenezis út mellett alternatív utakat (MSI, IBD, ER), szintén sikerült azonosítani. Ezen ismeretek ma már a gyógyszeres kezelés tervezésében is szerepet kapnak.

Hasonló, jól definiált „morfológiai” eseménysor fogalmazható meg az áttétképzés tekintetében is (invázió, epithelialis-mesenchymalis átmenet, angiogenezis, intravazáció, túlélés a vérkeringési rendszerben, adhézio, extravazáció, mesenchymalis-epithelialis átmenet, proliferáció a célszervben, ismételt angiogenezis). Úgy tűnik azonban, hogy a metasztázis folyamata a karcinogenezisnél lényegesen összetettebb, illetve dinamikusan változó, igen bonyolult genetikai, epigenetikai és szabályozási folyamat, így az adenoma-carcinoma szekvenciához hasonló, egyszerűsített séma a mai napig nem született.

A metasztatikus kaszkád hibátlan végrehajtásához tumor eredetű és mikrokörnyezeti, „host” eredetű feltételeket teljesülése szükséges. E kettősség jól tetten érhető a primer tumorban végbemenő, akár a „klónszelekciós elméletet” követő, akár a „metasztatikus össejt elméletet” alapul vevő, végső soron az áttétképzésre alkalmas sejtek kiválasztását eredményező szelekciós folyamatban, melyben jelenlegi felfogásunk szerint a tumor környezetének egyfajta szelekciós nyomása kulcsfontosságú tényezőként szerepel.

A HUGO program egyik fő eredményeként vált ismertté, hogy a korábbi feltételezésekkel szemben az emberben csupán mintegy 25.000 gén különíthető el. Az ennél lényegesen gazdagabb funkcionális, fenotípusos változatosságnak egyik fő oka a

gének akár 75-90%-át is érintő alternatív splicing jelensége. Mára nyilvánvalóvá vált, hogy az alternatív splicing nem véletlenszerű jelenség, hanem szigorúan szabályozott folyamat, mely a transzkripció változatosság által a daganatképződést, illetve a tumorprogressziót is érintő dinamikus szabályozási rendszert képvisel.

Az egyik legtöbbet vizsgált összejt marker, a CD44 alternatív splice mintázata kitüntetetten változatosnak ígérkezett. Ezernél is több potenciális mRNA izoformájával sokkal inkább CD44-családnak nevezhető. A 10 variábilis exonból a tapasztalatok szerint a hám eredetű normál szövetek csupán a v1-est expresszálják, míg daganatokban több variáns exont is tartalmazó CD44-izoforma is megjelenik. Az egyes standard és variábilis exonok (illetve a megfelelő fehérje domének) funkcionális sajátosságairól egyre többet tudunk, azonban ezek ko-expressziójakor módosuló viselkedése vagy akár együttműködése ma még részleteiben fel nem tárt terület. A szakirodalomban a tumorer (így a vastagbélrák) áttétképzése szempontjából funkcionális és prognosztikus jelentőséget leginkább a v3 és v6 exonoknak tulajdonítanak, az eredmények azonban meglehetősen heterogének, ellentmondásosak.

Hasonlóan funkcionálisan igen eltérő tulajdonságokkal jellemezhető egy másik gén, a WT1. Jelenleg legalább 8 splice variánsa ismert. A transzkripció faktort kódoló (így onkogénként) és tumorszuppresszorként is viselkedő gén splice variánsai a tumorképződés és tumorprogresszió különböző fázisaiban, valamint a különféle szöveti környezetekben eltérően viselkednek. A WT1 gén és termékeinek pontos szerepe így nehezen meghatározható, leginkább dinamikusan változó szabályozó elemnek tekinthetjük. Újabban számos szolid és hematológiai malignitás, így a colorectalis carcinoma képződésében és viselkedésében meghatározó szerepet tulajdonítanak a WT1-nek, melynek alapján a gént és termékeit a célzott onkoterápia egyik potenciális célpontjaként tartják számon.

A WT1-gyel, mint jövőbeli potenciális célponttal ellentétben a klinikai gyakorlatban már létjogosultságot nyert, a célzott, biológiai terápia egyik legfontosabb predikciós markereként ismert a KRAS gén. A vastagbélrákok mintegy 30-50%-ában a KRAS aktiváló mutációja igazolható.

## **Célkitűzés**

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 tumorsejtekben és nyirokcsomó áttétekben) 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.
3. Vizsgálni kívántuk azt az aktuális klinikai relevanciával is bíró, máig nyitott kérdést, hogy a colorectalis primer tumor KRAS mutációs státusa megfelelően reprezentálja-e az áttét mutációs státusát.

## **Módszerek**

### *1. Állatkísérleti modellrendszer*

Kétféle tumorimplantációs rendszerrel dolgoztunk: izo- és xenograftokkal.

*Izograft* rendszerünkben Balb/C egereket oltottunk be szintén Balb/C egerekben indukált (izo) C26 colorectalis carcinoma sejtszuspenzióval. Izograft rendszerben immunológiailag „megengedő” közegbe történik implantáció, immunszuppresszióra nincs szükség.

*Xenograft* rendszerként *scid* egerekbe *humán* tumorsejt szuszpenziót implantáltunk (HT25, HT29, HCT116). Ebben az esetben a tumor graft immunológiai kilökődését a *scid* egerek immundeficienciája akadályozta meg.

### *1.1. Májmetasztázis modellek*

Háromféle, genetikailag eltérő humán colorectalis carcinoma vonalból (HT25, HT29 és HCT116) és egy egér vastagbélrák vonalból (C26) készített sejtszuszpenziót implantáltunk xeno- és izograftként különféle lokalizációkba. A beültetések ortotopikusan egér coecum falba, míg heterotopikusan lépbe történtek. Mindkét rendszerben az implantáció helyén primer tumor fejlődött, emellett a májban ortotopikus implantáció esetén valódi májáttét, lépbe történő implantáció esetén máj kolónia (nem valódi áttét) alakult ki. A továbbiakban a 8-12 héttel az implantációt követően végzett autopszia során eltávolított primer és szekunder tumorok párhuzamos vizsgálatára nyílt lehetőség.

### *1.2. A tumor mikrokozonyzetének vizsgálata az áttétképzésben: felnőtt-újszülött modell*

Háromféle humán colorectalis carcinoma vonalból nyert sejtszuszpenziót (HT29, HT25, HCT116) felnőtt és újszülött *scid* egerekbe implantáltunk *subcutan*.

Minden állatkísérletet a törvényi és bioetikai elvek és engedélyek szigorú betartásával végeztünk.

### *2. Tenyésztett humán colorectalis carcinoma sejtek terápiás érzékenységének vizsgálata*

Balb/C-C26 izograft modellen a valódi áttétképzési rendszerből nyert szolid tumorok (primer vastagbél tumor, annak nyirokcsomó áttéte és májáttéte) mellett izolált keringő tumorsejtjeiből is sejtenyészetet indítottunk. Az így nyert primer tenyészeteken a különféle lokalizációjú tumorok kemoszenzitivitását vizsgáltuk MTT-proliferációs teszttel. A klinikai gyakorlatban használt kemoterápiás és célzott biológiai terápiás szerek (5-fluoro-uracil, leukovorin, oxaliplatin, irinotecan, cetuximab, bevacizumab, imatinib) monoterápiában, illetve kombinációs terápiában mérhető proliferációgátló hatását vizsgáltuk azok dózis- és időfüggésének vonatkozásában.

### *3. Génexpressziós vizsgálatok*

#### *3.1. RNS-izolálás és RT-PCR*

A sejtvonalakból és a fagyasztva homogenizált tumormintákból (az állatkísérleti minták primer tumoraiból és áttéteiből) TRI Reagent<sup>TM</sup> –tel (Sigma<sup>®</sup>) totál RNS-t izoláltunk, majd DNase tisztítást követően reverz transzkripciót végeztünk. A reverz transzkripciót minden minta esetében  $\beta$ -actin „housekeeping” gén primerekkel végzett PCR reakcióval ellenőriztük.

#### *3.2. Kvalitatív PCR*

##### *3.2.1. CD44-ujjlenyomat PCR alapú detektálása, szekvenálás*

A CD44 variábilis régiójának vizsgálatára egy öt reakcióból álló sorozat PCR vizsgálatot végeztünk. A primer párok oly módon lettek megtervezve, hogy a teljes variábilis régiót általuk többszörös átfedéssel „áttekinthettük”, különös tekintettel a v3 és v6 variábilis exonokra. A PCR termékeket 3%-os agaróz gélen futtatuk meg és etidium-bromidos festés után Gel Doc 2000-ben (Bio-Rad<sup>®</sup>) UV fényel 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 (Roche 454 GS Junior) azonosítottuk nukleotid sorrendjüket.

##### *3.2.2. WT1 alternatív splicing mintázat azonosítása nested PCR-rel*

A WT1 expressziót nested PCR-rel vizsgáltuk. Total RNS izolálást és reverz transzkripciót követően a cDNS-ből két lépésben, egymásba ágyazott primer párokkal végeztünk amplifikációt. Az „inner” reakció termékét 4%-os agaróz gélelektroforézist követő etidium-bromiddal történő festés után Geldoc (Bio-Rad) rendszeren vizualizáltuk.

##### *3.3. CD44 variábilis exon specifikus primerekkel végzett qPCR (real-time PCR)*

A CD44v3 és v6 exont hordozó izoformák expressziós színjének vizsgálatához kvantitatív (q-PCR) reakciót használtunk. A reakciót humán-specifikus, v3 és v6 exonra tervezett primer párokkal végeztük. Pozitív kalibrációs kontrollként A431 humán

laphámrák cDNS-éből készített standard ötszörös hígítási sort használtunk. A kérdéses exon relatív expresszióját ugyanazon kiindulási mennyiségű cDNS  $\beta$ -actin expressziós szintjére normáltuk.

### *3.4. KRAS mutációs státus detektálása - RFMD (Restriction Fragment Microfluidic Based Detection)*

A Balb/C-C26 izograft rendszer primer colorectalis és metasztatikus tumormintáiból (bélfali primer, lép primer, nyirokcsomó áttét, májáttét) reprezentatív mintákat vettünk és belőlük primer sejtenyészetet hoztunk létre. A konfluens tenyészetekből totál RNS-t izoláltunk. Reverz transzkripciót követően a minták tisztaságát és az átírást a megfelelő egér  $\beta$ -actin PCR-reakciókkal ellenőriztük. A 12-es codont hordozó DNS szakaszt szekvencia-specifikus primerekkel felsokszoroztuk, majd a keletkezett terméket BstNI (New England BioLabs) restrikciós enzimmel hasítottuk. Reakciónkat Experion™ DNA 1K Analysis Kit (Bio-Rad) segítségével szemikvantitatívan értékeltük ki (Experion Automated Electrophoresis System – Bio-Rad).

## **Eredmények**

### *1. Állatkísérleti modellrendszer*

Izograft (Balb/C-C26) rendszerben mind az ortotopikus, mind a heterotopikus implantáció áttétképzési rátája 100%-os volt. Xenograft rendszerben az ugyanezen májáttét modellek mindhárom humán CRC sejttípus esetén 50% feletti áttétképzési arányt mutattak. Felnőtt-újszülött kísérleti rendszerünkben minden egyes példányban primer tumor fejlődött, a felnőtt egyedek egyikében sem találtunk távoli áttétet, míg minden egyes újszülött egérben tüdőmetasztázis fejlődött ki (100%).

### *2. Kísérletes colorectalis carcinoma primer és áttéti tumora kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenysége vizsgálat MTT teszt segítségével*

A valódi colorectalis carcinoma májáttét-képzési modelljének egy példányában a tumorprogresszió különböző fázisaiból nyert tumorsejt-tenyészetek (primer tumor, nyirokcsomóáttét, májáttét, keringő tumorsejt) eltérő proliferációs képességgel voltak jellemezhetők. Mindegyik esetben a proliferáció közel tökéletes exponenciális jelleget mutatott.

A monoterápiában alkalmazott 5FU (5-fluoro-uracil), oxaliplatin és imatinib időarányos gátló hatást produkált mind a négyféle sejttenyészetben. Minden esetben a keringő tumorsejtek és a nyirokcsomómetasztázis sejttenyészetei rezisztensebbnek bizonyultak a primer és májjáttéti tumortenyészeteknél.

Kombinációs kezelésben az 5FU, leukovorin és oxaliplatin terápia hasonlóan időarányos gátló effektust mutatott, azonban az egyes tenyészetek érzékenységbeli különbségei kiegyenlítődték.

Az irinotecan hatása monoterápiaként bizonytalan volt, 5FU/leukovorinnal kombinációban azonban kifejezetté vált mind a négy sejttenyészetben.

Végül a cetuximab és a bevacizumab proliferációgátló hatással nem rendelkezett.

### *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 jellegzetes „vonalkódszerű” képként azonosíthatók voltak, a kapott mintázatot alternatív splice mintázatnak (ASM) nevezzük.

#### *3.1. CD44 alternatív splice mintázata humán CRC vonalakon*

Az igen gazdag CD44 ASM mindhárom vizsgált humán colorectalis vonal esetén (HT25, HT29, HCT116) azonos volt.

#### *3.2. A CD44 ASM „megfejtése”, az expresszáldó CD44 izoformák azonosítása*

A next-generation sequencing (NGS) módszerrel klonális szekvenálást végeztünk. Ez lehetővé tette az egy tumormintában expresszált CD44 izoformák különösen nagy felbontású azonosítását.

A technika segítségével a CD44 ASM termékeiből direkt szekvenálással azonosított izoformáin túl számos további CD44 izoformát azonosítottunk, így elkészítettük a colorectalis carcinomára jellemző eddig ismert legrészletesebb CD44 izoformalajstromot, mely 26 jól elkülöníthető izoformából állt. Az azonosított CD44 variánsok



közt találtunk v0 változatot is, így igazoltuk, hogy az általános irodalmi vélekedéssel ellentétben a v1 exon emberben is variábilis.

### *3.3. A CD44 ASM colorectalis carcinoma specificitása*

A különböző genetikai eredetű CRC-k ASM-je néhány intenzitásbeli különbségtől eltekintve azonosnak bizonyult. Számos más szövettani eredetű (emlőrák, leukaemia, melanoma, laphámrák) tumor CD44 ASM-ével összevetve a vastagbélrák CD44 mintázata alapvetően eltérőnek mutatkozott, így igazoltuk annak colorectalis-specifikus jellegét.

### *3.4. A CD44 ujjlenyomat jellemzése a tumorprogresszió során*

Állatkísérleti tumormintáink primer vastagbél, áttéti és kolonizációs másodlagos májtumorai, valamint a primer subcutan tumorok mindegyike változatlan formában, azonos CD44 expressziós izoforma mintázattal volt jellemezhető, mint a primer sejttenyészetek.

### *3.5. Kvantitatív expressziós vizsgálatok a CD44v3 és v6 exonok vonatkozásában*

Tekintettel arra, hogy a felismert minőségi homogenitás nem feltétlenül jár együtt az egyes CD44 izoformák mennyiségi expressziós stabilitásával, ezért az áttétképzés szempontjából az érdeklődés középpontjában álló két exon, a v3 és v6 vonatkozásában állatkísérleti rendszereink kínálta tumormintáinkon szemikvantitatív méréseket végeztünk.

#### *Izograft (Balb/C-C26 modell)*

A kolonizációs rendszer primer (lép) és szekunder (máj) tumorai, a valódi májättétképzési modell colon és májättéti tumorainak relatív expressziós aktivitását vizsgáltuk  $\beta$ -actin expressziós intenzitásra normálva. Mindkét variábilis exon expressziós szintje több mint egy nagyságrenddel magasabbnak bizonyult a valódi áttétképzési rendszer metasztázisaiban, mint a primer tumorokban (mindkét exonnál a különbség statisztikailag szignifikáns volt). Ezzel szemben nem találtunk különbséget a kolonizációs rendszerben a lép primer és a májban kialakuló (gyakorlatilag más lokalizációban fejlődő primer) tumorok v3 és v6 expressziós intenzitásában.

### *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 potenciál jellemezte, három alapvetően különböző génexpressziós profilt kaptunk valósidejű PCR vizsgálataink eredményeként. A HT29 tumort a C26-hoz nagymértékben hasonló viselkedésűnek találtuk: a valódi májáttétek v3 és v6 expressziós intenzitása jelentősen magasabb volt a primer colon tumorokénál, míg mindkét variábilis exon expressziója változatlan szintet mutatott 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. Ezzel szemben a HT25, illetve a HCT116 azonos kísérleti összeállításban alapvetően eltérő expressziós intenzitásbeli jellegzetességet mutatott.

### *CD44 v3 és v6 expressziós aktivitás vizsgálata permisszív és nem-permisszív hostban fejlődő CRC mintákon heterotop implantációs rendszeren (felnőtt-újszülött modell)*

A fenti három, genetikailag különböző humán CRC sejttenyészetet (HT25, HT29, HCT116) egy mesterséges, a host szerepének vizsgálatára kidolgozott állatkísérleti összeállításban 3-3 felnőtt és ugyanennyi újszülött *scid* egérbe implantáltuk subcutan. Felnőtt egerek esetén távoli áttétképződést sem makroszkóposan, sem mikroszkópos vizsgálatok során nem találtunk, ellenben minden egyes újszülött állatban már makroszkóposan is tüdőáttétek jelenlétét láthattuk. A v3 és v6 variánsok expressziós szintje tekintetében a felnőtt, nem metasztatikus és az újszülött, metasztatikus primer tumorok különbözőségét tapasztaltuk: a metasztatikus primer tumorok mindhárom tumortípus esetén magasabb CD44v3 és v6 expressziós szintet mutattak, mint áttétet nem adó párjaik.

#### 4. 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 progressziójával.

A kísérleteink során mindhárom humán colorectalis vonalunk WT1 expresszióját megvizsgáltuk. Mind *in vitro* sejttenyészetben, mind kétféle xenograft májáttétképzési modellünk primer és metasztatikus tumorain WT1-specifikus kvalitatív nested-PCR vizsgálatot végeztünk.

Ellentétben a CD44 alternatív splice-mintázatának feltűnő stabilitásával, a WT1 esetén igen heterogén expressziós képet kaptunk a colorectalis tumorok primer és áttéti mintáin. Gyakorlatilag mind a KTS+, mind a KTS-, mind a Zn-ujj hiányos splicevariánsok külön-külön és kombinációban egyaránt előfordultak a primer és áttéti tumorokban.

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

Megjegyzendő, hogy Zn-ujj hiányos WT1 variánsról colorectalis carcinoma esetén irodalmi közlés ez idáig nem jelent meg.

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

Balb/C-C26 ortotopikus implantációs és kolonizációs májmetasztázis rendszerekben a primer tumor, nyirokcsomó áttét, májáttét, valamint a keringő tumorsejtek tenyészetének KRAS (12-es lókus) mutációs státusát vizsgáltuk a vad/mutáns arányok meghatározásával.

Elsőként megállapítottuk, hogy a primer C26 sejttenyészet vad/mutáns aránya nem változott sem a colonban, sem a lépben történő primer tumor létrehozása során.

Megmutattuk, hogy valódi májáttét-képzési rendszerben a primer tumor KRAS mutációs státusához képest a nyirokcsomó metasztázisok és májáttétek vad/mutáns aránya statisztikailag nem mutatnak szignifikáns változást. Ezzel szemben a keringő tumorsejt-tenyészetben lényegesen magasabb, közel 50%-os mutáns/vad allélarányt mértünk.

Végül egyetlen, lépbe történő tumorimplantációból kapott többszörös májkolónia izolált vizsgálatával bizonyítottuk, hogy a kolonizációval a májban létrejövő szekunder tumor gócok egymástól ugyan eltérő, de a primer léptumorénál konzekvensen magasabb mutáns/vad KRAS allélaránnyal jellemezhetők.

### **Következtetések**

1. Összefoglalásul megállapítható, hogy sikerült egy olyan komplex *állatkísérleti modellrendszer*t 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.
2. Munkánk legfontosabb eredménye, hogy igazoltuk, a *tumor mikrokoznyezete* (host) központi szerepet játszik a primer colon tumor *metasztatikus fenotípusának a kialakításában*.
3. Az állatkísérleti modellrendszeren nyert tapasztalatok jelentős része a CD44 gén expressziójára vonatkozóan született. Míg a normál epitheliális 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 hátterében 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.
4. Megmutattuk, hogy létezik (képezhető) egy a *colorectalis carcinomára specifikus alternatív splice mintázat*, mely egyfelől jelentősen különbözik más eredetű malignus tumorok azonos technikával nyert ASM-étől, másfelől azonban olyannyira stabil, hogy a CRC sejtenyészetektől a tetszőleges lokalizációjú primer tumorokon át a metasztatikus kaszkád minden egyes fázisában változatlanul 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 intenzitásbeli) változásokat takar.

5. 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 áttétképzés megtörténjen. 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.

6. Igazoltuk továbbá, hogy a metastatikus szubklónhoz elméletileg legközelebb álló *keringő tumorsejtek* kísérleti körülmények közt izolálhatók, tenyészetként fenntarthatók és *vizsgálhatók*.

7. 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.

8. 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 ezidáig csak epidemiológiai, retrospektív klinikai statisztikai vizsgálatok támasztották alá.

9. Végül állatkísérleti xenograft májmetasztázis modellünkön megmutattuk, hogy a *colorectalis carcinoma* primer és metasztatikus tumorai a számos daganatos sejtfunkcióban meghatározó szabályozó szerepet hordozó *WT1-et konzekvensen expresszálják*. Az ismert splice variánsokon túl „új”, ez idáig nem közölt *Zn-ujj hiányos variánsok jelenlétét* is sikerült *igazolnunk*. A WT1 ASM azonban ellentétben a CD44 ASM-mel nem következetes, ami fokozottan aláhúzza a CD44 splice mintázata stabilitásának jelentőségét.

## Saját publikációk jegyzéke

### A dolgozattal szorosan összefüggő cikkek:

1. Characteristics of CD44 alternative splice pattern in the course of human colorectal adenocarcinoma progression. **Balázs Bánky** - Livia Rásó-Barnett, Tamás Barbai, József Tímár, Péter Becságh, Erzsébet Rásó. *Molecular Cancer* 2012, 11:83 Epub doi:10.1186/1476-4598-11-83
2. Demonstration of a melanoma-specific CD44 alternative splicing pattern that remains qualitatively stable, but shows quantitative changes during tumour progression. Livia Raso-Barnett - **Balazs Banky**, Tamas Barbai, Peter Becsagh, Jozsef Timar, Erzsebet Raso. *PLOS ONE* 2013; 8 (1)| www.plosone.org

### A dolgozattal szorosan összefüggésbe nem hozható cikkek:

1. Colonic obstruction caused by intra-luminal haematoma. Robert Thomas, **Banky Balazs**, Catherine Hobday, Davis W Borowski. *BMJ Case Rep.* 2012 Oct 9. Epub doi: 10.1136/bcr-2012-006801.
2. Revisiting CB1 Receptor as Drug Target in Human Melanoma. István Kenessey - **Balázs Bánki**, Agnes Márk, Norbert Varga, József Tóvári, Andrea Ladányi, Erzsébet Rásó and József Tímár. *Pathol Oncol Res* 2012 Oct; 18(4):857-66. (Epub 24 March 2012) PMID 22447182.
3. Óriás retroperitoneális liposzarkóma – esetbemutató. **Bánky B.**, Bányász Zs., Almási K., Szűcs I., Mayer Á. *Magyar Sebészet* 58, 190-194, June, 2005.

### Kongresszusi prezentációk a dolgozat témájában:

1. Is K-RAS mutation status of primary colon cancer appropriate for estimating anti-EGFR therapy response of its liver metastasis? – poszter (1. díj). **Bánky Balázs**, Barbai Tamás, Rásó Erzsébet, Tímár József. Magyar Onkológusok Társaságának Kongresszusa, Budapest, 2009. november 12-14.
2. Keringő tumorsejtek vizsgálata colorectalis carcinomás betegeken: a vastagbél rák „leukémiás fázisa”. – Előadás. **Bánky B.**, Varga K, Barbai T., Rásó E., Járay G. Komárom-Esztergom Megyei Orvosok, Kisbér, 2009. november 5-6.

3. Disszeminált tumorsejtek vizsgálata colorectalis carcinomás betegeken. – Előadás. **Bánky B.**, Varga K, Barbai T., Rásó E., Járny G. Magyar Sebész Társaság Coloproctologiai Szekciójának Kongresszusa, Sopron, 2009. február 13-14.
4. Alterations in the expression of CD44v3/v6 variants in colon cancer progression models.- poster. **B. Bánky**, L. Rásó–Barnett, J. Tímár, E. Rásó. European Multidisciplinary Colorectal Cancer Congress, Berlin, Germany, 2008. február 24-26.
5. Expression of CD44v2, v3 and v6 variable exons during the progression of colon carcinoma iso- and xenografts. – poster. **Bánky B.**, Mészáros L., Tímár L., Rásó E. European Association for Cancer Research XIX. Congress, Budapest, 2006. július 1-4.
6. Expression of CD44v3/v6 variants in iso- and xenograft colorectal metastatic systems – előadás. **Bánky B.**, Mészáros L., Tímár L., Rásó E. Fiatal Sebészek és Onkológusok Fóruma, Kecskemét, 2006. április 14-15.
7. A CD44 v3/v6 variánsainak expressziós változása kísérletes metasztatikus colorectalis szövetmintákon – előadás. **Bánky B.**, Mészáros L., Rásó E., Tímár J. Magyar Onkológusok Társaságának XXVI. Kongresszusa, Budapest, 2005. november 10-12.
8. A CD44v3/v6 variánsok expressziója vastagbél rák progressziója során. – előadás. **Bánky B.**, Mészáros L. PhD Kongresszus, Semmelweis Egyetem, Budapest, 2005. április 14-15.
9. A CD44v3/v6 variánsainak expressziója a vastagbél rák progressziójában – xenograft modell – előadás. **Bánky B.**, Mészáros L. Fiatal Sebészek Fóruma, Kecskemét, 2004. április 16-17.

#### **Egyéb kongresszusi prezentációk**

1. Hepatocelluláris carcinoma és mCRC kerekasztal. Nexavar szimpózium. **Bánky B.** Szent Borbála Kórház, Tatabánya. 2012. november 6.
2. Comparative analysis of open, laparoscopic and single-port access reversal of Hartmann’s procedure – poszter. **B. Banky**, A. Banerjee, D. Garg, A. Agarwal, M.A. Tabaqchali, T.S. Gill, D.W. Borowski. ESCP Congress, Vienna, 2012. szeptember 26-28.
3. Nyílt, laparoscopos és „single-port” Hartmann-rekonstrukció összehasonlító elemzése – előadás. **B. Banky**, A. Banerjee, DW. Borowski, D. Garg, MA. Tabaqchali, A. Agarwal,



- TS. Gill. Magyar Sebész Társaság 61. Kongresszusa, Szeged, 2012. szeptember 13-15.
4. Mi történik azon lokálisan előrehaladott végbélrákos betegeinkkel, akiken neoadjuváns radio-kemoterápiát követően sebészi resectiót nem végzünk? – poszter. **B. Banky**, A. Banerjee, DW. Borowski, D. Garg, MA. Tabaqchali, TS. Gill, A. Agarwal. Magyar Sebész Társaság 61. Kongresszusa, Szeged, 2012. szeptember 13-15.
  5. What happens to patients diagnosed with locally advanced rectal cancer who do not undergo surgery after neoadjuvant chemo-radiotherapy? – poster. **B. Banky**, A. Banerjee, F. Ross, DW. Borowski, MA. Tabaqchali, TS. Gill, D. Garg, D. Wilson, A. Agarwal. ACPGBI Congress, Dublin, UK, 2012. július 2-5.
  6. Reversal of Hartmann's through the stoma site – előadás. **Bánky**, Banerjee, Garg, Tabaqchali, Agarwal, Borowski, Gill. North Tees Hospital, Clinical Governance Meeting. 2012. június 1.
  7. Reversal of Hartmann's through the stoma site. Is this the way forward? – előadás. A Banerjee, **B Bánky**, D Garg, M Tabaqchali, A Agarwal, D Borowski, TS Gill. ASGBI Congress, Liverpool, 2012. május 9-11.
  8. No need for lymph node dissection in GIST. Is it evidence based? – poszter. **Bánky** Balázs, Pápai Zsuzsanna, Szentirmay Zoltán, Járay Géza. Magyar Sebész Társaság 60. Kongresszusa, Siófok, 2010. szeptember 8-11.
  9. Novel techniques to reveal various tumor associated antigens through the natural humoral immune response. – előadás. Kotlan B, Ravindranath MH, **Banky**, Raso E, GlassyMC. 7th International Conference on Autoimmunity, Ljubljana, 2010. május 5-9.
  10. Laparoskopos inguinális hernioplastika – saját tapasztalatok. – Előadás. **Bánky B.**, Farkas A., Burány Á., Járay G. Komárom-Esztergom Megyei Orvosok, Kisbér, 2009. november 5-6.
  11. Gyomor GIST és tüdő karcinoid. Kettős malignitás egy betegben. Valóban független tumorokról beszélünk? – poszter. **Bánky Balázs**, Burány Ákos, Pintér Antal, Szűcs Iván, Járay Géza. Magyar Sebész Társaság 59. Kongresszusa, Debrecen. 2008. június 18-20.
  12. A gyomorrák aktuális terápiás aspektusai – előadás. **Bánky Balázs**, Járay Géza. Gyomorrák kerekasztal, Szent Borbála Kórház, Tatabánya, 2008. június 3.

13. Cannabinoid receptor-1 modulation induces apoptosis of human melanoma cells. – Poszter. Jozsef Timar, **Balazs Banky**, Norbert Varga and Istvan Kenessey. 99th AACR Annual Meeting, San Diego, CA, 2008. április 12-16.
14. A malignus strumák sebészete – 10 éves retrospektív tanulmány.- előadás. König R., **Bánky B.**, Kovács B., Solymosi A., Bányász Zs. Magyar Sebész Társaság Nyugat-Dunántúli Szekciójának Éves Kongresszusa, Hencse, 2007. szeptember 21.
15. A GIST sebészi kezelése. **Bánky Balázs**, Bányász Zsolt. GIST Kerekasztal, Szent Borbála Kórház, Tatabánya, 2007. május 7.
16. „Fast-track” care after laparoscopic assisted rectal resection. **Bánky Balázs**, Bányász Zsolt, Martin K. Walz, Andreas Ommer. Fiatal sebészek és onkológusok fóruma, Kecskemét, 2007. április 26-27.
17. A gyomor GIST sebészi kezelésének taktikája. **Bánky Balázs**, Burány Ákos, Lakatos Miklós, Bányász Zsolt. Magyar Sebész Társaság Kongresszusa, Budapest, 2006. szeptember 6-9.
18. A gyomor GIST sebészi kezelése. Burány Ákos, **Bánky Balázs**, Lakatos Miklós, Bányász Zsolt. Magyar Gastroenterológusok Társaságának Éves Kongresszusa, Szeged, 2006. június 17-21.
19. 19. Endoszkópos sebészeti tevékenység Komárom-Esztergom megyében. – előadás. Bányász Zs., Jankovich M., Rigler A., **Bánky B.**, Herczegh Zs., Csőkör Z., Farkas Z., Lakatos M., Járay G. Magyar Sebész Társaság Endoszkópos Sebészeti Szekciójának XI. Kongresszusa, Zalakaros, 2005. november 3-5.
20. Endoszkópos sebészeti tevékenység Komárom-Esztergom Megyében. – előadás. Bányász Zs., Jankovich M., Rigler A., **Bánky B.**, Herczegh Zs., Csőkör Z., Farkas Z., Lakatos M., Járay G. Komárom-Esztergom Megyei Orvosnapok, Kisbér, 2005. október 28.
21. Ewing szarkóma az emlőben. – előadás. **Bánky B.**, Lakatos M., Járay G., Bányász Zs., Szűcs I. Komárom-Esztergom Megyei Orvosnapok, Bábolna, 2004. november 12.
22. A unique case of extraskeletal Ewing's sarcoma in the breast – előadás (2. díj). **Bánky B.**, Lakatos M., Járay G., Bányász Zs., Szűcs I. Young Surgeons’ English Language Case

- Report Congress, Győr, 2004. november 5.
23. Emlő Ewing szarkóma – előadás. **Bánky B.**, Lakatos M., Járay G., Bányász Zs., Szűcs I. Magyar Sebész Társaság Nyugat-Dunántúli Szekciójának Kongresszusa, Kehidakustány, 2004. október 15-16.
  24. Vastagbélrák okozta bal colonsigmoid ileus sürgősségi kezelése. – előadás. **Bánky B.**, Matvan K., Farkas A., Burány Á., Bányász Zs. Magyar Sebész Társaság 57. Kongresszusa, Pécs, 2004. június 16-18.
  25. Óriás retroperitoneális liposzarkóma. – előadás. **Bánky B.**, Almási K., Farkas Z., Pernecky L., Farkas A., Bányász Zs. Magyar Sebész Társaság 57. Kongresszusa, Pécs, 2004. június 16-18.
  26. A bal colonsigmoid ileus akut sebészete – retrospektív tanulmány – előadás. **Bánky B.**, Matvan K., Farkas A., Burány Á., Bányász Zs. Magyar Sebész Társaság Coloproctologiai Szekciójának Kongresszusa, Eger, 2004. március 18-20.
  27. Giant retroperitoneal liposarcoma. – előadás (dicséret). **Bánky B.**, Pernecky L., Farkas Z., Farkas A., Almási K. Young Surgeons' English Language Case Report Congress, Budapest, 2003. november 7. Honoured presentation
  28. A bal colonsigmoid obstrukciót okozó tumorának terápiája – előadás. **Bánky B.**, Bánfalvi P., Burány Á., Rettegi M., Bányász Zs. Fialat Sebészek Fóruma, Debrecen, 2003. március 20.
  29. A máj malignus daganatainak ablatív technikái. – előadás. **Bánky B.** Kórházi Referálás, Szent Borbála Kórház, Sebészeti Osztály, Tatabánya, 2002. december 16.
  30. Multimodality treatment efforts in progressive stage-IV. colorectal cancer. **Bánky B.**, Sótónyai P., Péter M. European Society of Surgeons Congress. Young Surgeons' English Language Case Report Congress, Budapest. 2002. november 28-30.
  31. A májdaganatok kezelésének új eljárásai. **Bánky B.**, Kóbori L. Fialat Sebészek Fóruma, Nyíregyháza, 2002. október 25-26.