

# **Tumor specifikus DNS/gén dózis szerepe a papilláris vesetumor kialakulásában**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Szerző: Dr. Sarlós Donát Péter

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ

Urológiai Klinika



Pécs, 2019.

Doktori iskolavezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Pajor László

Témavezetők: Prof. Dr. Kovács Gyula

Dr. Szántó Árpád

## Rövidítések jegyzéke:

BAC-array: bacterial artificial chromosome array, Bakteriális artefíciális kromoszóma array  
CB: comma shape body  
CGH: comparative genomic hybridisation, DNS alapú összehasonlító genomikus hibridizáció  
CMM: cap metanpphrikus mesenchyma  
cRCC: világossejtes veserák  
chRCC: kromofób veserák  
DNS: dezoxiribonukleinsav  
dNTP: dezoxiribonucleozid-trifoszfát  
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav  
HE: hematoxylin-eozin  
HNF1B: hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B  
ISUP: Uroptológusok Nemzetközi Társasága, International Society of Urological Pathology  
KRT17: keratin 17  
LRRK2: leucine-rich repeat kinase 2  
MDE: mutation detection enhancement  
MET: hepatocyte growth factor receptor  
MEST: mesoderm-specific transcript  
MTSCC: Mucinous Tubular and Spindle Cell Carcinoma, Mucinózus tubuláris és orsósejtes daganat  
NCBI: National Center for Biotechnology Information  
NR: nephrogén rest  
PCDH: protokadherin  
PCR: polymerase chain reaction  
pRCC: papilláris veserák  
PPL: papilláris prekursor lézió  
RCC: renal cell carcinoma, vesesejtes rák  
SSCP: single-strand conformation polymorphism  
TCF2: transcription factor 2  
TFE3: transcription factor E3  
TGIF2LY: transforming growth factor-beta-induced factor 2-like, y-linked  
TMA: tissue micro array  
WHO: World Health Organisation, Egészségügyi Világszervezet

## 1.Bevezetés

A vesesejtes rák (RCC) klasszifikációja hagyományosan a hematoxilin-eozinnal megfestett szövettani metszetek mikroszkopikus képén alapszik. A sejtek citológiai variabilitásán és növekedési formáján alapuló osztályozások után a 80-as évek végén és 90-es évek elején egy paradigmaváltás történt: az osztályozást a tumorokban előforduló specifikus kromoszóma eltérésekre alapozták (Kovacs, 1993 a,b). A Heidelbergi klasszifikáció a tumor-specifikus genetikai eltérésekre alapul, amik biztonsággal azonosítják a különböző vese tumorokat, még akkor is, ha szövettanilag nem egyértelműen kórismézhetők (Kovacs et al., 1997). A papilláris vesetumorokra szövettanilag heterogén megjelenés jellemző, azonban jól definiált kromoszómális és genetikai elváltozásokat mutat. A carcinogenezis során elsőként a 7-es és a 17-es kromoszóma tri-, illetve tetraszómiája jelenik meg, ezt követheti az Y kromoszóma elvesztése. Később a 3q, 8-as, 12-es, 16-as és a 20-as kromoszóma triszómiája is megjelenhet, ami az agresszívabb viselkedésű daganatok irányába való progressziót jelezheti (Kovacs 1993a, Szponar et al., 2009). Ezeknek az eredményeknek különös jelentősége van a mai WHO osztályozás tükrében, ahol a papilláris adenomát és karcinómát a tumorok mérete alapján különítik el, azaz papilláris tumorok 15mm alatt adenomának fölötte karcinómának kórisméznek (Moch et al., 2016). A papilláris adenoma és karcinóma azonosságát így elismerik, hiszen csak a méretük különböző. A WHO és ISUP által javasolt 15 mm-es határ (amelyet néhány éve még 5 mm-ben határoztak meg) alkalmazása esetenként téves pronózis becléshez vezet a papilláris vese tumorok biológiai-klinikai tulajdonságának megítélésénél. A papilláris vesetumor eredetéről kétféle elképzelés van. A WHO és ISUP (International Society of Urological Pathologists) szerint a papilláris veserák, a konvencionális veserákhoz hasonlóan, a felnőttkori vese differenciálódott tubulusainak hámsajtjeiből alakul ki (Moch et al., 2016). A másik elképzelés szerint a papilláris vesetumor hisztológiailag pre-neoplasztikus lézió-adenóma-karcinóma szekvenciát mutat (Kovacs, 1993 a,b), ahol azonban az éles határ az adenoma és karcinóma között nem húzható meg, így a malignitás meghatározása differenciáldiagnosztikai nehézséget jelent. A specifikus citogenetikai/DNS elváltozások kimutatásán kívül nincs más olyan eszköz a kezünkben, amellyel az adenomát és karcinómát meg tudjuk különböztetni.

## **2. Célkitűzés**

Hipotézisünk szerint a papilláris vesetumor nem, vagy csak részben differenciálódott perzisztáló embrionális sejtcsoportokból indul ki, és ennek megfelelően egy pre-neoplasztikus lézió-adenóma-karcinóma fejlődési szekvenciát mutat. Korábbi eredmények azt mutatják, hogy a papilláris vese tumorok korai fejlődési szakaszában megjelenő, általános genomikus eltéréseknek (trisómia 7 és 17 és az Y kromoszóma vesztese) és a hozzájuk kapcsolódó gének időben és térben megváltozott expressziójának jelentős szerepe van az embrionális sejtek differenciálódási zavarában és így a pre-neoplasztikus léziók majd felnőtt korban a papilláris vesetumor kialakulásában. A munka célja az, hogy a papilláris veserákra jellemző kezdeti kromoszómális elváltozásokhoz kapcsolódó gének kifejeződését főtális vesékben, a papilláris vese tumorokhoz társuló, többnyire mikroszkópos méretű pre-neoplasztikus léziókban és nagyszámú papilláris vesetumort tartalmazó tissue microarray-n kimutassuk, és így a közös génexpressziók azonosításával alátámaszunk a papilláris vesetumor embrionális eredetét és igazoljuk a papilláris vesetumor megkülönböztető biológiai és klinikai viselkedését.

## **3. Vizsgálati anyagok és módszerek**

### **3.1. Szövetminták**

Az RNS alapú vizsgálatokra a friss főtális veséket a Pécsi Tudományegyetem Nőgyógyászati Klinikáján gyűjtöttük, ezeket a feldolgozásig TRIzol-ban  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Hasonlóan a MET mutációhoz kötődő örökletes normál vese és vese tumor prekursor lézió mintákat (HD1651) TRIzol-ban fagyasztva tároltuk. Az örökletes esetből származó tumor mintákat az RNS vizsgálatokhoz biztosított anyag biztosítása után 4%-os formaldehidben fixáltuk és rutin szövettani feldolgozásnak vetettük alá.

A prekursor léziók és papilláris vesetumor közötti összefüggés vizsgálatára 15 papilláris vesetumor valamint 15 konvencionális veserák miatt eltávolított vesét a tumor diagnózis biztosítása után teljes mértékben, több száz paraffin blokkban feldolgoztunk. Minden blokkból több hematoxilin-eozin (HE) festett metszet készült, amelyekben mikroszkóp alatt prekursor léziókat kerestünk.

A papilláris vese tumorok vizsgálatára a Pécsi Egyetem Urológiai Klinikán 2000 január és 2014 december között radikális vagy parciális nephrectómián átesett betegek tumorai közül válogattuk ki a papilláris vesetumornak kórismézett eseteket. A paraffin blokkokat, és HE festett metszeteket a Pécsi Egyetem Patológiai Intézete bocsájtotta rendelkezésünkre. A szövetminták gyűjtését és feldolgozását a PTE ÁOK Etikai Bizottság engedélyének birtokában végeztük (Etikai engedély száma: 5343/2014). A szövettani diagnózis minden esetben uropatológus (K.Gy.) által felülvizsgálatra került a heidelbergi klasszifikációs rendszernek megfelelően (Kovacs et al., 1997).

### **3.2. A *MET* tirozin kináz domén mutáció analízise**

A *MET* tirozin kináz domén 16, 17, 18, és 19 exonját amplifikáltuk (Fischer et al., 1998). A PCR termékeket IR800 és IR700 jelölt primerrel szekvenáltuk Thermosequenase Cycle Sequencing kit segítségével (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany) a gyártó utasításai szerint. A jelölt PCR terméket mindkét irányból kettős lézer detektoros LICOR Long ReadIr 4200 szekvenáló géppel (MWG-Biotech, Ebersberg, Germany) a BaseImageIR software csomag segítségével vizsgáltuk. A mutációk kimutatására összehasonlítottuk az így kapott szekvenciákat a vad típusú szekvenciával (J02958).

### **3.3. A 19-es exon mutáció SSCP (Egyszálú DNS Konformációs Polimorfizmus) vizsgálata**

A genomikus AC004416 *MET* szekvencia felhasználásával az exon 19 melletti régióhoz kapcsolódó primerokat készítettünk, amelynek segítségével egy olyan 198bp fragmentumot tudtunk amplifikálni, melynek középső része tartalmazta az A3954C mutációt. Kombináltuk a K2d (nt:24839-24860) “cca cgg gta ata att ttg tcc” intron primert a K1r (nt:25019-25036) “cca cat ctg act tgg tgg tgg” primerrel, ami az exon 19 3' végén található. A 20 µl PCR-reakció 100 ng DNS-t, 200 µM dNTP-t, 1,5 mM MgCl<sup>2</sup>-t, mindegyik primerből 2 pmol-t (a K2d radioaktívan jelölt) és 0,5 ng Taq-polimerázt tartalmazott. 2 percig tartó kezdeti denaturálást hajtottunk végre 94 ° C-on, ezt 27 ciklus követte (30sec 94C-on, 30sec 55C-on és 40sec 72C-on). A végső fázis 5 percig tartott 72 ° C-on. Minden PCR-reakcióhoz 20 µl futtatópuffert, 2 µl 1M NaOH-t

és 2 µl 20 mM EDTA-t adtunk. A mintákat 2 percig 94 °C-on denaturáltuk, majd 3 µl –t 10%-os glicerolos MDE géltre töltöttük. Az elektroforézist 6 W-on állandó hőmérsékleten, éjszakán keresztül végeztük. Ezt követően a gélt megszárítottuk és egy éjszakán át röntgenfilmre exponáltuk.

### **3.4. A mutált és a vad típusú *MET* RT-PCR analízise**

Gyorsfagyasztott szövetmintákból, vagy sejt kultúrákból TRIzol (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) segítségével RNS-t izoláltunk a gyártó utasítása szerint. A cDNS első szálának szintézisét 2µg teljes RNA mintából, Superscript II reverz transzkriptáz (Invitrogen) felhasználásával a gyártó protokollja alapján végeztük el. A valós idejű PCR reakciót a DNA Engine Opticon rendszerrel (MJ Research Inc., Watertown, USA), Platinum SYBRGreen qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) végeztük el, kontrollként β aktint használtunk. Az összes reakciót kétszeresen hajtottuk végre, a végeredményeket a két reakció eredményeiből átlagolva kaptuk.

A 3.2-3.4 pontban felsorolt vizsgálatok a Heidelbergi Ruprecht-Karls Egyetem Molekuláris Onkológiai Laboratóriumában történtek tudományos együttműködés keretében.

### **3.5. Tissue microarray (TMA) készítése**

A TMA készítéséhez paraffinba ágyazott szövetmintákat használtunk fel. HE metszetek részletes kiértékelésével választottunk ki megfelelő mintavételi helyeket. A blokkokból Manual Tissue Arrayer (MTA1, Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, USA) eszközzel 0,6 mm átmérőjű szövethengereket vettünk ki. Papilláris vesetumороkat, és a festés ellenőrzéséhez főtális veseszövetet és felnőtt normál veseszövetet is felhasználtunk a tissue microarray (TMA) készítéséhez. Eltérő morfológiájú és grádusú részeket tartalmazó tumorokból több mintát vettünk. Az így kiválasztott mintákat egy kombinált paraffin blokkba helyeztük, így akár 150 különböző minta is vizsgálható egy mikroszkópos metszeten.

### 3.6. Immunhisztokémia

Az immunhisztológiai vizsgálatokra főtájis és felnőttkori veséket, pre-neoplasztikus léziókat tartalmazó szövetmintákat és papilláris vesetumorokat tartalmazó TMA-t használtunk fel. A sorozatmetszetekben készült 4 µm vastagságú lemezeket alacsony forráspontú paraffinba mártottuk az epitóp megőrzésére.

A paraffinba mártott metszeteket xilollal deparaffináltuk, és leszálló etil-alkohol sorozatban rehidráltuk. Az antigén feltárást 10 mM nátrium-citrát pufferben (pH 6,0) történő forralással értük el, a 2100-Retriever (Pick-Cell Laboratories, Amszterdam, Hollandia) készülék segítségével. A nem specifikus kötőhelyek és az endogén peroxidáz aktivitás blokkolása normál ló szérummal kevert (1%) hidrogén peroxidban (0,3%) történt szobahőmérsékleten 10 percig. Ezután a metszeteket a primer antitesttel fedtük le, és nedves kamrában inkubáltuk egy éjszakán keresztül 4°C-on. A felhasznált antitestek jegyzékét az 1. táblázat tartalmazza. Harminc percig történő HRP konjugált anti nyúl másodlagos antitest (DAKO) alkalmazását követően az előhívás AEC (3-amino-9-etilkarbazol) szubsztrát segítségével történt, majd a metszeteket Mayer hematoxilinnel festettük. A kiértékelést Leica LaborluxS mikroszkóppal végeztük a fotókat Leitz DMRBE mikroszkópra helyezett ProgRes C14 kamerával készítettük.

Antitest	Eredet	Termékkód	Puffer pH	Hígítás
anti-HNF1B	nyúl	HPA002083	citrát pH 6.0	1:200
anti-MET	nyúl	SC-12	citrát pH 6.0	1:100
anti-KRT17	nyúl	PA5-29919	citrát pH 6.0	1:200
anti-PCDH11Y	nyúl	PA5-38781	citrát pH 6.0	1:50

1. Táblázat. Immunhisztokémiai vizsgálatok során használt antitestek

## 4. Eredmények

### 4.1. A papilláris pre-neoplasztikus léziók gyakorisága és szövettana

A különböző típusú veserákot tartalmazó vesék teljes feldolgozása során több száz metszetet néztünk át a feltételezett pre-neoplasztikus léziók felismerésére. Amint az előzetes megfigyelésekből várható volt, a papilláris vese tumort hordozó vesékben találtuk meg a legtöbb mikroszkópos méretű, néha 1-2 mm átmérőjű tubulo-papilláris léziókat. 15 papilláris vesetumort hordozó vesében átlagosan 42 léziót figyeltünk meg. Ezekben a kis „kék” sejtektől a magasabb hámmal borított papilláris struktúrákig minden átmenet megtalálható volt. Ez a fokozatos átmenet a „kis” sejttől a „nagy” sejtig utánozza az embrionális vesefejlődés differenciálódási fázisait, azaz tubuláris epithel kialakulását metanephrogén blasztémából. Egyes szubkapszuláris léziók regresszív változáson mentek keresztül, ami a stroma fibrózisát, az epitheliális sejtek regresszióját és elmeszedését jelentheti. A konvencionális veserákot tartalmazó vesékben csak átlagosan 0.4 léziót figyeltünk meg, míg a vese onkocytómával átlagban 0.8 lézió társult. A kromofób veserák mellett egyetlen esetben sem találtunk tubulo-papilláris prekursor léziót (2. táblázat). Egy korábbi, hereditár papilláris tumort feldolgozó tanulmányban veséenként több, mint 1000 pre-neoplasztikus léziót találtak (Ornstein et al., 2000).

Tumor típusa	PNL/vese
Konvencionális veserák	0.4
Kromofób veserák	0.0
Vese onkocytóma	0.8
Sporadikus papilláris veserák	42.0
Familiáris papilláris veserák	>1000*

2. Táblázat. Mikroszkopikus prekursor léziók (PNL) száma tumoros vesében (\*Ornstein et al. 2000)



## **4.2. A papilláris vese tumorok szövettani heterogenitása**

A papilláris vese tumorok szövettani képe nagyfokú heterogenitást mutatott. A papilláris tumorok sok esetben hasonló szövettani képet mutattak, mint az azonos vesében talált pre neoplasztikus léziók legnagyobb része. Sok esetben azonban egyetlen tumoron belül is megfigyelhető volt a tumor sejtek növekedési formájának a heterogenitása. A jól differenciált, tisztán papilláris növekedésű tumor szabálytalan stromán ülő közepes grádusú sejteket mutatott, másik területen világossejtes papilláris növekedés valamint kromofób veserákra emlékeztető szerkezetek voltak felismerhetők. Időnként szabálytalan papilláris stromán ülő, magas eozinofil sejtekből álló tumort figyeltünk meg, amelyek sejtmagja a sejtek felszínén helyezkedett el. Ugyanez a tumor más területeken többmagsoros hámmal borított papillákat és cisztikus struktúrákat mutatott. Egy esetben a többmagsoros magas, bazofil sejtes primer tumor nyirokcsomó áttétében kissejtes forma fordult elő. A papilláris vese tumor, amennyiben jól differenciált kis sejtekből áll, az évek során nagyobb méretet is elérhet és vastag falú cisztaként kórismézhető. Azonban évek után szarkomatózus átalakulás mehet végbe, amely a gyors lefolyású és a beteg halálát okozza.

A bemutatott példák diagnózisát minden esetben kromoszóma vizsgálat vagy array-CGH segítségével biztosítottuk.

## **4.3. A kromoszóma 7 duplikációja és a *MET* alterációja familiáris vesetumorban**

A *MET* tirozin kináz receptor szerepének igazolására módunkban állt egy csírarsejtes *MET* mutációt hordozó 37 éves férfi multiplex tumorának vizsgálatát elvégezni. A *MET* szekvenálása során egy kontroll, vad típusú vese mintához képest a betegnél mind a normális veseszövetben és tumorokban egy A-C mutációt találtunk. Mutáció specifikus primerek segítségével kimutattuk, hogy a beteg nem tumoros vesesejtjeiben és a tumorokban a vad típusú és mutációt hordozó allél is kifejeződött. SSCP vizsgálat egyértelműen megmutatta, hogy minden egyes tumorban a mutációt hordozó allél duplikálódott.

#### **4.4. A MET kifejeződése főtális vesében, pre-neoplasztikus lézióban és papilláris vese tumorban**

Immunhisztokémiai vizsgálattal MET expressziót láttunk a főtális vesében az ureterbimbóban, a cap metanephrikus mesenchymában (CMM), a kialakuló vese vezikulában (comma shape body, CB) valamint az S-forma disztális kompartmentjében. Ezt a kifejezett expressziót megtartották csírasejtes MET-mutációhoz társuló papilláris prekursor léziók csak úgy, mint azok, amelyeket sporadikus papilláris veserák kapcsán figyeltünk meg. Felnőttkori vesében csak a disztális vese csatornáknak fordult elő MET immun-reakció. A vizsgálat során 76 papilláris vese tumor közül közepes intenzitású MET expressziót találtunk 43 esetben (56,6%).

#### **4.5. A 17-es kromoszóma duplikációjához és amplifikációjához társuló HNF1B kifejeződése főtális vesében, prekursor lézióban és tumorban**

Figyelembe véve a 17-es kromoszóma duplikációját, megvizsgáltuk a HNF1B (TCF2) transzkripciós factor kifejeződését ugyanezen szöveti anyagon. Főtális vesében az ureter bimbó végén valamint a komma- és S-forma disztális kompartmentjében, valamint a differenciálódó disztális tubulusokban volt erős immun-reakció, míg a proximális tubulusok és Henle kacs sejtei csak gyenge sejtmag pozitivitást mutattak. Mind a MET mutációhoz társuló mind a sporadikus esetekből származó PPL erőteljes sejtmag pozitivitást mutatott a HNF1B antitesttel. A felnőttkori vesében a proximális és disztális tubulusokban figyeltünk meg gyenge sejtmag pozitivitást.

A papilláris vese tumorok 75%-a (n=57) mutatott pozitív sejtmag festődést a HNF1B antitesttel. Pozitív reakció volt megfigyelhető mind a szolid és papillárisan növekvő tumorokban is. A pozitívítás sokkal erősebb volt a papilláris vese tumorok perifériás, ún. növekedési zónájában, és sok esetben a tumor közepén csak elvétve lehetett egy-egy tumorsejtben magfestést látni.

A MET és a HNF1B gén ko-expressziója 76-ból 32 esetben (42,1%) volt megfigyelhető. A MET és HNF1B szerepére a papilláris vese tumorok kialakulásának korai szakaszára utal az a megfigyelés, hogy míg a prekursor léziókban mindkét gén kifejezett expressziója volt megfigyelhető, addig a tumorok centrális részein az immun-

pozitivitás általában gyengébb volt, mint a tumor széli részén, az ún. proliferációs zónában.

#### **4.6. A 17-es kromoszóma duplikációjához társuló *KRT17* kifejeződése normál vesében, prekursor lézióban és papilláris vesetumorban**

A *KRT17* elsőként a főtális vesében az ureterbimbóban és a gyűjtőcsatornában jelenik meg. Az ureterbimbó végénél az S-alakú test disztális részéhez csatlakozva láttunk gyenge festődést, de a jel a medulláris gyűjtőcsatorna mentén a vesepapilla irányába erősödik. A gyűjtőcsatorna és az ureterbimbó sejtjeinek mindegyike festődik, ami megfelel a főtális sejtek proliferációs állapotának. A felnőtt vesében, az összekötő csatornában membrán-attenuált és szelektív (a sejtek többsége, de nem minden sejt) festődést mutat. A medulláris gyűjtőcsatornák sejtjeinek többsége hasonló szelektív festődést mutat. A *KRT17* pozitív sejtek vélhetően a principális sejtek az összekötő csatornában és gyűjtőcsatornában.

A *KRT17* expresszióját papilláris vesetumorokban egy 151 daganatos mintát tartalmazó TMA segítségével vizsgáltuk. Ezen kívül 17 sporadikus papilláris vesetumor mellett jelentkező papilláris prekursor léziót vizsgáltunk, ezek között 8 olyat, ahol a betegnél ismert volt germ line MET mutáció. A *KRT17* mind a 17 vizsgált 1-3mm-es papilláris lézióban kifejeződött. A 151 vizsgált papilláris vesetumor közül 116 esetben diffúz citoplazmatikus festődést észleltünk, ami a membrán alatti részekben kifejezettebb volt. Több daganatban a *KRT17* erős kondenzációját figyeltük meg a sejtek apikális felszínén, néhol erős membrán pozitivitással. A papilláris vese tumorok összesen 76,8%-a (n=116) bizonyult pozitívnak *KRT17* immunhisztokémia során, függetlenül a sejtek méretétől, amit I-es típusú, II-es típusú és kevert típusúként is klasszifikálnak.

#### **4.7. Az X és Y kromoszóma elváltozása papilláris vese tumorokban**

##### **4.7.1. Az Y kromoszóma vesztese familiáris papilláris vesetumorokban**

Az Y kromoszóma vesztesét papilláris vesetumorokban már korábban kimutatták mind kromoszóma, Southern-blot és BAC-array vizsgálatokkal (Kovacs et al., 1994; Szponar et al., 2011). A fentebb tárgyalt familiáris papilláris tumor miatt vizsgált egyénnél, a

multiplex tumorok és pre-neoplasztikus léziók részletes genomikus vizsgálata során mind a kilenc lézióban előfordult a 7-es és 17-es kromoszómák duplikációjára utaló DNS elváltozás. Ezenkívül egy tumorban a 10-es kromoszóma és két további tumorban a 12-es kromoszóma duplikációja fordult elő. Ezek az eredmények egyértelműen igazolják a papilláris vese tumor diagnózisát. A tézisben tárgyalt, a papilláris vesetumorokban először megjelenő, alapvető genetikai elváltozások szempontjából fontos elváltozás volt továbbá az Y kromoszóma hiánya.

#### **4.7.2. A PCDH11XY gén kifejeződése főtális vesében, pre-neoplasztikus léziókban és papilláris vesetumorokban**

Korábban az Yp11.2 régióhoz lokalizált legkisebb genomikus régióban két gén, a PCDH11Y és a homeobox gén TGIF2LY található, amelyek közül karcinogenezis szempontjából elsősorban a PCDH11Y-nak lehet jelentősége. A PCDH11Y az X kromoszómán előforduló homológ PCDH11X génhez képest egy 13 bázis pár (bp) deléciót mutat, ami megváltozott peptid szignált eredményez. Ezt a 13 bp különbséget fel tudtuk használni az X és Y specifikus PCDH11 szekvenciák kimutatására PCR reakcióval. Mind a PCDH11Y és PCDH11X génnek számos izoformája ismert. Az Y kromoszóma hiánya mellett az X kromoszómán elhelyezkedő PCDH11X gén 4-es izoforma kifejeződésének hiányát találtuk papilláris vesetumorokban, míg ez az izoforma az egészséges veseszövet mellett a placentában, főtális agyban, és hereszövetben magas fokon kifejeződött. Az 1-es, 2-es és 3-as izoformák a legtöbb papilláris vese tumorban is pozitív reakciót adnak.

Immunhisztokémiai vizsgálattal a főtális vese kéregállományában jelentős PCDH11XY kifejeződést találtunk. A PCDH11XY protein az elágazódó ureterbimbó sejtek felszínén a kéregállomány aktív differenciálódási régiójában figyelhető meg, de a már differenciálódott kivezető csatornák sejtjeiben hiányzik a PCDH11XY protein. Feltűnő az ureterbimbó körül tömörült blasztémális sejteknek, azaz a CMM sejteknek a citoplazmájában látható PCDH11XY pozitivitása, ami a renális vezikula (az S-forma előalakja) kialakulása, azaz a mesenchyma-epithelium-transzformáció után már nagyrészt a sejtek felszínén jelenik meg. Az S-formában, különösen a disztális kompartmentben a PCDH11XY protein szintén többségében a sejtek felszínén található

meg. A PCDH11XY kifejlődő tubuláris rendszerben elsősorban a lenyúló Henle kacs és disztális tubulus kezdeményekben fejeződik ki, a proximális tubulus kezdemények csak gyenge pozitívítást mutatnak. A felszálló Henle kacs és a disztális tubulusok pozitív festődése következtében a macula densa sejtjei is pozitív reakciót adnak.

A munkába bevont összes preneoplasztikus lézió és papilláris vesetumor a PCDH11XY immunhisztokémiával negatív reakciót mutatott.

## 5. Megbeszélés

### 5.1. Papilláris vesetumor eredete

Mintegy 25 évvel ezelőtt javaslat született a papilláris vese tumorok embrionális maradványokból való kiindulására (Kovacs és Kovacs, 1993; Kovacs 1993a,b). Korábban közölték, hogy a csírasedes MET mutációhoz társuló familiáris papilláris veserákhoz akár több ezer mikroszkópos méretű papilláris prekursor lézió társul (Ornstein et al., 2000). Mi kimutattuk, hogy a sporadikus papilláris vese tumorok mellett is veséenként átlagban 42 hasonló prekursor lézió fordul elő (Bányai, Sarlós et al., 2018). Ennek a jelentőségét alátámasztja az a tény, hogy a konvencionális veserákot tartalmazó vesékben átlagosan csak 0.4 hasonló jellegű PNL fordul elő (Bányai, Sarlós et al., 2018). A differenciálatlan epitheliális sejtekből álló prekursor léziók morfológiája sok esetben hasonlít a Wilms tumorhoz társuló nephrogén maradványok (NR) szövettani képére. A papilláris vese tumorhoz társuló léziók eloszlása hasonló a perilobuláris NR-hez. A papilláris veserákot tartalmazó vesékben elsősorban a perilobuláris léziók dominálnak. Ezzel kapcsolatban érdemes megemlíteni, hogy mind a szövettani megfigyelések, gén expressziós és genetikai vizsgálatok alapján a Wilms tumorhoz társuló perilobuláris NR és interlobuláris NR szöveti formája meghatározza a belőlük kiinduló WT morfológiáját (Beckwith et al., 1990; Fukuzawa et al., 2008).

Eredményeink alapján úgy véljük, hogy bizonyítottan tekinthető a papilláris vese tumorok keletkezése és az embrionális szöveti differenciálódásának zavara közti összefüggés. Korábbi eredmények alapján már az 1-2 mm nagyságú papilláris preneoplasztikus léziókban minden esetben megtalálható 7-es és 17-es együttes triszómiája (Kovacs, 1989). A túlnyomóan férfiakban kiinduló papilláris vese tumorok 85%-ában a 7-es és 17-es kromoszómák triszómiájához az Y kromoszóma vesztese járul (Kovacs et al., 1994). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a két kromoszómának és a rajtuk

elhelyezkedő gének elváltozásainak valamint az Y kromoszóma vesztésének a tumor kialakulásának korai fázisában van szerepe.

A részletes szövettani vizsgálatok eredménye, és a papilláris vesetumorokhoz társuló pre-neoplasztikus léziók magas száma a két elváltozás közötti szoros összefüggésre utal. Továbbá nem hanyagolható el a pre-neoplasztikus léziók és a klinikailag észlelt tumorok hasonló citológiai megjelenése. A vizsgálatok során tett fontos megfigyelés volt, hogy a tumorokhoz társuló pre-neoplasztikus léziók minden esetben a tumorral azonos immunreakciót mutattak. A MET, HNF1B és KRT17 immunhisztológia mind a papilláris vesetumorban és a hozzá kapcsolódó pre-neoplasztikus lézióban pozitív volt.

Az irodalomban korábban leírt ún. kortikális adenomák tulajdonképpen a prekursor léziók már makroszkóposan is észlelhető formájának felel meg. Keyes (1890) több, mint 100 éve utalt ezen léziók gyakoriságára “we do not regard it as extremely rare, since, owing the small size and inoffensive character of the growths, they are liable to be passed over without notice”. Cristol és mtsai (1946) 22 veserák miatt eltávolított vese részletes vizsgálatával 37 papilláris szerkezetű “adenomát” figyeltek meg. Apitz (1944) több mint 4000 boncolásból 725 makroszkóposan észlelhető “adenomát” írt le. Mivel a papilláris veserák előfordulása férfiakban 5-10-szer gyakoribb, mint nőkben, és a férfiak és nők aránya Cristol és Apitz vizsgálatában 10:1 illetve 4.2:1 volt, feltételezhetjük, hogy mindkét szériában az “adenomák” papilláris vesetumorhoz társultak.

Ezek az adatok megerősítik a prekursor léziók és tumorok közti kapcsolatot, azt a feltevésünket, hogy a papilláris vesetumor embrionális eredetű prekursor léziókból indul ki. Mindezek ellenére, a nemzetközi irodalomban a papilláris vese tumorok és társuló pre-neoplasztikus léziók szoros kapcsolatát figyelmen kívül hagyják és a papilláris vesetumor eredetét a vese differenciált tubulus sejtjeiben jelölik meg (Moch et al., 2016).

## **5.2. A 7-es kromoszóma duplikációja/amplifikációja valamint a *MET* gén expressziója a papilláris vesetumor kialakulásában**

A MET szekvenálása vezetett a csirasejtes mutáció és a familiáris papilláris vese tumor közötti összefüggés felismerésére (Bentz et al. 1996; Schmidt et al., 1997). Mind a

familiáris mind a sporadikus papilláris vesetumorokban alapvető elváltozás a MET gén kópia számának változása és fokozott kifejeződése. A MET csírasejtes mutációja prekursor léziók ezreinek, és papilláris vesetumoroknak a keletkezésével jár, amely fiatal korban, 30-40 éves hordozókban jelentkezik (Ornstein et al., 2000, Schmidt et al., 1997, Fischer et al. 1998). A vizsgálatainkba bevont csírasejtes MET mutációt hordozó egyén 37 éves korában került műtetre multiplex kétoldali vese folyamat miatt. A klinikailag észlelt tumorok mellett számos mikroszkópos nagyságú papilláris léziókat találtunk. A fenti adatok arra utalnak, hogy a 7-es kromoszómán lokalizált MET lókuszt duplikációjához, amplifikációjához társuló fokozott gén expresszióknak valószínűleg fontos szerepe van az embrionális vese differenciálódási zavarában és a papilláris prekursor léziók kialakulásában. A papilláris vesetumorokhoz hasonlóan a MET működésének zavarát a Wilms' tumor kialakulásával is összefüggésbe hozták. A nephrogén restek 22%-ában és a belőlük kialakuló Wilms' tumorok 54%-ában a MET expresszió növekedését észlelték (Vuononvirta et al., 2009). A HGF génje szintén a 7. kromoszómán található (7q21.11). Eddig nem mutatták ki HGF lokusz amplifikációját, így valószínűleg a papilláris vesetumorban, a 7. kromoszóma számbeli növekedésével „csak” egy extra HGF gén kópia fordul elő. Viszont a MET vad típusú allél amplifikációja sporadikus tumorokban felveti annak a lehetőségét, hogy a nagy sejtfelszíni denzitása miatt a MET receptor kináz a HGF interakciója nélkül is autofoszforilálódik és aktíválódik (Fischer et al., 1998; Zhuang et al., 1998; Glukhova et al., 2000). Immunhisztokémiával MET pozitívitas igazolódott a prekursor léziókban és a tumorokban egyaránt. Kifejezett expresszió mutatkozott a periférián, a tubuláris-papilláris struktúrák és a normál vesesejtek határán.

### **5.3. A 17-es kromoszóma duplikációja és a HNF1B (TCF2) transzkripciós faktor a papilláris vese tumorok kialakulásában**

A HNF1B (TCF2) gén a 17-es kromoszóma hosszú karján a q12 régióban egy 58.817 bázispárnak megfelelő DNS szegmensben helyezkedik el. Ennek a körülírt DNS régióknak a papilláris vesetumorban felfedezett amplifikációja vezetett a gén felismeréséhez (Szponar et al., 2011). A HNF1B vese fejlődése során az ureterbimbó elágazódásában, a nephronok kialakulásának iniciálásában fontos szerepet játszik (Massa et al., 2013). A HNF1B felnőttekben kizárólag a polarizált epitheliális sejtekben

fejeződik ki (Fisher és Pontoglio, 2008). A vese tubuláris rendszer, a nefron a mesodermális blasztémából fejlődik ki és az ureter bimbó hatására alakul ki a tubuláris sejtek polarizációja. A HNF1B inaktiválása vagy a HNF1B domináns negatív formájának fokozott kifejeződése a vese tubulusok cisztikus kialakulásához vezet (Gresh et al., 2004; Hiesberger et al., 2004). A HNF1B funkciójának kiesése a vese és a húgyúrendszer komoly kongenitális fejlődési rendellenességet okozhatja (Nakayama et al., 2010). Vizsgálataink szerint a HNF1B először az epitelizáció során a renális vezikulában és az S forma disztális kompartmentjében valamint a disztális tubulusokban mutat erőteljes kifejeződést, míg az urterbimbó és a proximális tubulusok csak enyhe reakciót adnak a HNF1B antitesttel. A prekursor léziók a mesenchyma epitheliális tranzícion átment polarizált embrionális képletekből indulnak ki. Vizsgálataink során a csirasejtes MET mutációhoz valamint a sporadikus papilláris vesetumorokhoz társult epitheliális prekursor léziókban kifejezett HNF1B pozitivitást találtunk.

#### **5.4. A 17-es kromoszóma duplikációja és a KRT17 expressziója a pre-neoplasztikus léziókban és papilláris vesetumorokban**

A keratinok intermedier filamentumok, amik a sejt integritásában és stabilitásában kulcsfontosságú szerepet játszanak. A KRT17 expresszióját kimutatták gyomor adenocarcinómában, petefészek- és emlő carcinómában, papilláris pajzsmirigy rákban, de e szervek ép szöveti körülményei között a KRT17 nem fejeződik ki. Ezek alapján a daganatokban a KRT17 neo-expressziójától beszélhetünk. A KRT17 kifejeződése egyes daganatok progressziójával és metasztázis hajlamával hozható összefüggésbe. A KRT17 kifejeződése a daganat progressziójával és metasztatizáló hajlamával korrelál. (van de Rijn et al., 1996; Ide et al., 2012; Escobar-Hoyos et al., 2014; Mockler et al., 2011; Wang et al., 2011; Kim et al., 2015; Hu et al., 2018). Kimutattuk, hogy a KRT17 megtalálható az ureterbimbóban és a főtális vese gyűjtőcsatornájában és a felnőtt vese összekötő csatornájában. Első alkalommal került leírásra egyszerű (egy sejt soros) epitheliumban a KRT17 jelenléte. A papilláris tumorok 77%-ban megtalálható volt a KRT17, sejt morfológiától függetlenül. Figyelembe véve, hogy a papilláris vese tumorok döntő többségében megtalálható a KRT17, és, hogy ezen daganatok mindösszesen 6%-es mutatott metasztázis hajlamot 5 éves utánkövetési idő során, a KRT17 papilláris vese tumorok progressziójában játszott szerepe kétséges.



A KRT17-nek, mint a basalis epithelialis és myoepithelialis sejtek specifikus markerének kifejeződése egy egyszerű, egy rétegű epitheliumban a főtális és felnőtt vesében, önmagában érdekes felfedezés. Ez mellett a KRT17 folyamatos kifejeződése a fejlődő vesében, a prekursor léziókban és a papilláris vese tumorok közel 80%-ában arra enged következtetni, hogy a KRT17 a papilláris vesedaganatok karcinogenezisében is szerepet játszhat.

### **5.5. Az Y kromoszóma hiánya és a PCDH11XY expressziója prekursor léziókban és papilláris vesetumorban**

A PCDH11Y csakúgy, mint az Xq21.3 régióban lokalizált PCDH11X gén a protokadherin gének családjába tartozik, amelyeknek fontos szerepe van a sejt-sejt kapcsolatban és az agy szegmentális kifejlődésében és funkciójában (Hirano et al., 1999; Blanco et al., 2000). Immunhisztológiai vizsgálatunk arra utal, hogy a PCDH11Y génnek jelentős szerepe van a vese fejlődés korai szakaszában. A már kondenzálódott blasztémális sejtekben jelenik meg először és a mesenchyma epitheliális tranzíciója során egyre fokozott kifejeződését figyeltük meg. Ez arra utal, hogy a protokadherin PCDH11Y expressziója fontos a blasztémális sejtek epitelizációjához, a disztális tubuláris rendszer normális kifejlődéséhez. Feltételezésünk szerint a PCDH11Y hiánya a mesenchyma epitheliális tranzíciójának kezdeti szakaszán átment sejtek további differenciálódási zavarához és így a prekursor léziók kialakulásához vezet.

### **5.6. Modell a papilláris vesetumor kialakulására**

A papilláris vese tumor embrionális eredete, a normális vesefejlődés során lokálisan kialakult differenciálódási zavar, a prekursor léziók perzisztálása az élet folyamán és jóindulatú és azon túlmenően rosszindulatú tumor kialakulásához vezető későbbi proliferációja alapján javasoljuk a differenciálódási zavar - prekursor lézió - adenómakarcinóma szekvenciát a papilláris vese tumorok kialakulására (Kovacs, 1993; Bányai, Sarlós et al., 2018). Ezeket a morfológiai/biológiai megjelenési formákat a papilláris léziókban kialakuló genetikai elváltozásokkal tudjuk alátámasztani. Az ú.n. klonális tumor fejlődés szerint nagyobb proliferációs képességgel rendelkező klónok túlnövik a

többi sejtek és a későbbiekben meghatározzák az egész tumor genetikai karakterét és biológiai viselkedését.

Molekuláris patológiai szemlélet alapján helytelen, hogy a jelenleg érvényes tumor klasszifikáció szerint a jóindulatú adenómát és a rosszindulatú daganatot csupán mérete különbözteti meg egymástól (Moch et al., 2016). Ha következetesen a papilláris vesedaganat kifejezést használjuk, az mind az adenómát, mind a karcinómát magába foglalja. Korábban a genetikai vizsgálatokra alapozva papilláris vese tumorok osztályozására adenóma-karcinóma szekvencia volt javasolva (Szponar et al., 2009). Ez szerint az adenoma a 7-es és 17-es kromoszómák triszómiájával társul, míg karcinómában 8-as, 16-os és 20-as kromoszómák triszómiája, majd további aberrációk jelennek meg. A HNF1B és MET expressziója embrionális vesében, prekursor lézióban és papilláris vesetumorban, ennek összefüggése a 7-es és 17-es kromoszómák triszómiájával, és a csírsejtes *MET* mutációs kromoszóma duplikációjával arra utal, hogy összefüggés van a megnövekedett gén-dózis és a génexpresszió közt.

## 6. Következtetések

A WHO és ISUP klasszifikációja szerint a papilláris vese karcinóma a az epitheliális vese tubulusokból indul ki és az adenóma és karcinóma között csak a tumor mérete dönt:

*“Papillary adenomas are unencapsulated tumours with papillary or tubular architecture of low grade (ISUP) and a diameter <15 mm” (WHO, 2016).*

*“Papillary renal cell carcinoma is a malignant tumour derived from renal tubular epithelium. It has papillary or tubulopapillary architecture”. (WHO, 2016)*

A vizsgálataink célja volt a papilláris vese tumorok eredetének tisztázása. Figyelembe véve a legkorábbi genetikai eltéréseket, azaz a 7-es és 17-es kromoszómák duplikációját és amplifikációját és a változásokba bevont gének, mint a MET, HNF1B, KRT17 folyamatos kifejeződését főtális vesékben, prekursor léziókban és papilláris vesetumorokban, bizonyítottan tekintjük a papilláris vese tumorok embrionális differenciálódási zavaron alapuló eredetét. Elméletünket támogatja a PCDH11XY gén

fokozott, időben és térben meghatározott kifejeződése az embryonális vesefejlődés során, amely a differenciálódott nefronban és papilláris vesetumorban már nem mutatható ki. Összefoglalva, véleményünk szerint a papilláris vesetumor specifikus genomikus és génexpressziós elváltozásokon alapuló embrionális differenciálódási zavar, prekursor lézió, adenoma és karcinóma fejlődési szekvenciát mutat.

## 7. Közlemények

### 8.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

- Sarlós DP, Bányai D, Péterfi L, Szántó Á, Kovacs G. Embryonal origin of metanephric adenoma and its differential diagnosis. *Anticancer Res* 38:6663-6667, 2018. **IF 1,86**
- Sarlós DP, Péterfi L, Szántó Á, Kovacs G. Shift of keratin expression profile in end-stage kidney increases the risk of tumor development. *Anticancer Res* 38(9):5217-5222, 2018. **IF 1,86**
- Bányai D, Sarlós DP, Nagy A, Kovacs G. Recalling Cohnheim's theory: Papillary renal cell tumor as a model of tumorigenesis from impaired embryonal development to malignant tumors in adults. *Int J Biol Sci* 14:784-790, 2018. **IF 3,84**

### 8.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények

- Sarlós DP, Czétány P. Új laparoszko-pos vesetumor-reszekció gyakorló modell kifejlesztése. *Magyar Urológia* 30:8-11, 2018.
- Pusztai Cs, Bányai D, Jávornágy A, Kenyeres B, Sarlós P, Szántó Á. Laparoszko-pos parciális nephrectomia a technikailag komplex vesetumorkok sebészeti ellátásában. *Magyar Urológia* 27:148-153, 2015.
- Tamás A, Jávornágy A, Reglódi D, Sarlós DP, Bányai D, Semjén D, Németh J, Lelesz B, Fülöp DB, Szántó Z. Examination of PACAP-like immunoreactivity in urogenital tumor samples. *J Mol Neurosci* 59:177-183, 2016. **IF 2,229**
- Pusztai Cs, Bányai D, Sarlós DP, Farkas L, Szántó Á, Semjén D. Laparoszko-pia szerepe a vese angiomyolipomák sebészeti kezelésében *Magyar Urológia* 27:2-6, 2015.
- Farkas N, Szabó A, Lóránd V, Sarlós DP, Minier T, Prohászka Z, Czirják L, Varjú C. Clinical usefulness of measuring red blood cell distribution width in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 53:1439-45, 2014. **IF 4.475**
- Sarlós DP, Kispál ZF, Bíró E, Tornóczky T, Környey J, Sánta I, Pintér A, Vástyán A. Lézerbesugárzás hatása patkány gyomornyálkahártyára: szövettani és funkcionális vizsgálatok – előzetes közlemény. *Magyar Urológia* 23(2):34-38, 2011.

### Impakt faktor:

Első szerzős: 3,72

Kumulatív: 14,224

## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Prof. Dr. Kovács Gyulának, hogy a lehetőséget adott a vesedaganatok molekuláris onkológiájával foglalkozó kutatócsoporthoz való csatlakozásra, és kutatási tevékenységemet segítőkészen irányította, és Dr. Szántó Árpádnak, hogy a kutatási tevékenységemet mindvégig támogatta. Köszönet illeti a Heidelbergi Egyetem Molekuláris Onkológiai Labor munkatársait kutatásunk több, fontos vizsgálatának elvégzéséért. Köszönöm a PTE KK Pathológiai Intézet munkatársainak (Dr. Tornóczki Tamás, Dr. Kálmán Endre, Dr. Semjén Dávid, Dr. Pap Anita, Dr. Fincsur András, Dr. Gyömörei Csaba, Halas Zsuzsanna, Szilágyi Imréné Judit) kutatásunkhoz nyújtott önzetlen segítségét. Köszönöm korábbi témavezetőimnek, Prof. Dr. Czirják Lászlónak, Prof. Dr. Balogh Péternek, Dr. Vástyán Attilának hogy munkájukkal nagyban hozzájárultak tudományos fejlődésemhez. Köszönöm a PTE KK Urológiai Klinika minden munkatársának a kutatásban, és a betegellátásban nyújtott segítségüket.

Köszönöm családtagjaimnak, hogy mellettem álltak és szeretetükkel támogattak.