

**MOLECULAR GENETICS OF END-STAGE KIDNEY AND
ASSOCIATED RENAL CELL TUMOURS**

PhD Thesis

Anetta Nagy, MD



Head of Doctoral School: Gábor L. Kovács, MD, PhD, DSc

Head of Doctoral Program: István Wittmann, MD, PhD, DSc

Supervisor: Gyula Kovács, MD, PhD, DSc, FRCPath

Medical School, University of Pécs

Pécs, Hungary

2016

INTRODUCTION

End-stage renal disease and its significance

The term end-stage renal disease' (ESRD) reflects a clinical condition in which there has been an irreversible loss of endogenous renal function, of a degree sufficient to render the patient permanently dependent upon renal replacement therapy (RRT) - dialysis or kidney transplantation - in order to avoid life-threatening uremia. ESRD is a substantial burden on health care systems, the associated high morbidity and mortality rates and high medical expenditures make it important from a public health perspective.

The prevalence of ESRD still increases worldwide. This is influenced by several factors (e.g. improved overall survival of patients at higher risk for ESRD, more liberal entry into and better survival on RRT), of which the global epidemic of type 2 diabetes mellitus, the increasing tendency of hypertension and the ageing of the general population are especially emphasized. The growth rates in dialysis and transplant patient numbers of 6-7% were observed for years of the 2000s and significantly exceeded the annual growth rate of 1.2% of general world population. In the United States, the number of patients treated with RRT was nearly 500.000 in 2005 (approximately 1.9 million worldwide) and based on estimations of United States Renal Data System (USRDS) it is projected to increase to more than 750.000 by 2020.

Morphological features of ESRD kidneys

The progressive structural changes of the characteristically shrunken end-stage kidneys as tubular atrophy, interstitial inflammation and fibrosis, severe arterial, arteriolar and glomerular sclerosis and widespraed deposition of calcium, calcium oxalate or calcium phosphat crystals have already been mentioned by Heptinstall in 1968. The RRT prolongs and improves the life of ESRD patients, especially when their disease is limited to the kidney and results in a novel type of renal histology that have rarely been seen before.

The unique morphologic changes were described in detail by McManus and Hughson in a series of papers more than 35 years ago. They have reported microscopic cellular nodules of smooth muscle cell proliferation arising around arterial and arteriolar necrosis as well as the increase in arterial intimal thickness due the increased growth of endothelial and smooth muscle cells. The diverse forms of tubules of end-stage kidneys were classified into „classic” atrophic tubules, tubules showing „thyroidization”, „endocrine” tubules and „super” tubules. The latter ones are enlarged and dilated and lined with hyperplastic/hypertrophic epithelium.

Fibrotic renal interstitium may harbour isolated single cells or loosely organized small groups of cells (clusters) with epithelial characteristics which are not surrounded by a visible basement membrane at the light microscopic level. In spite of atrophic, scarred structures, end-stage kidney shows a remarkable proliferative activity, especially in the epithelium of „classic” atrophic and „super” tubules. The unusual high proliferative activity has also been observed in papillary proliferation of cells lining dilated tubules or small microscopic cysts.

Acquired cystic renal disease (ACRD)

ACRD is a bilateral disorder characterized by the development of multiple renal cysts in uremic patients with initial cyst-unrelated renal disease. There is no uniform diagnostic criteria in the literature, the diagnosis of ACRD accepted generally requires the presence of more than 3 cysts or more than 25% of tissue involvement in each kidney and the exclusion of hereditary cystic kidney diseases. The multiple, bilateral thinwalled cysts disorganize the architecture of renal parenchyma. They predominate in the cortex, but occur also in the renal medulla or at corticomedullary junction. The cysts contain typically clear or straw-coloured fluid into which bleeding is not uncommon. Deposition of oxalate crystals is typical of ACRD and manifests often in the walls or cavities of the cysts or within the tubules or interstitium.

The cysts are lined by simple monolayer eosinophilic epithelium, sometimes higher hobnail-like cells. The proliferative cysts display in most cases a papillary growth of eosinophilic cells. In some cysts proliferation of large eosinophilic cells with vacuolated cytoplasm may be observed, which corresponds to precursor lesions of ESRD-associated eosinophilic tumours. Microdissection studies have demonstrated continuity between cysts and tubules suggesting that cysts begin as outpouching of any of the tubular segments and develop into cysts through continuous proliferation of tubular cells. Although cysts in ACRD may originate from different segments of nephron, lectin and immunohistochemical studies suggested that the vast majority of cysts are derived from proximal tubules. The similarity of marker distribution in the „super” tubules and cysts in ACRD also favours the assumption that cysts may originate from these tubules.

The occurrence of ACRD and the extent of cystic degeneration correlate consistently with the duration of dialysis confirming its progressive nature. The occurrence is reported from 30% to 95% in various populations of dialysis patients studied, presenting an overall rate of around 45% and reaching virtually 100% after 10 years of dialysis. The high occurrence of ACRD in those undergoing long-term dialysis suggest that its development is a natural consequence and the final fate of end-stage kidneys resulting from various diffuse renal parenchymal diseases.

Renal cell tumours in ESRD/ACRD

Renal cell tumours (RCTs) develop in patients with ESRD/ACRD at higher frequency than in the general population and RCT also occur frequently in native kidneys of renal transplant recipients. Of interest, RCTs develop 5-7 times more frequently in males, which is higher male predominance than the occurrence of ESRD/ACRD itself. Approximately 10% of ESRD/ACRD-associated RCTs are bilateral and around 30% of tumours are multifocal. However, the vast majority of tumours are less than 3 cm in diameter and remain asymptomatic.

Nearly 50% of the neoplasm in ESRD/ACRD display papillary or tubular-papillary growth pattern, whereas papillary RCT make up only 10% of cases in the general population. Recently, tumours with unusual histological pattern and DNA alteration occurring in ESRD/ACRD have been published. A unique type of ESRD/ACRD-associated tumour is characterized by solid/papillary/cystic growth of large eosinophilic cells having large cytoplasmic vacuoles. Moreover, intra-tumour calcium oxalate deposition in tumours composed of large eosinophilic cells with occasional cytoplasmic vacuolization and tumours with cribriform growth pattern or „clear cell papillary” renal cell carcinoma (RCC) have been described.

In addition to unique phenotypic features the genetic constitution of RCTs arising from end-stage kidneys may also differ from those known to be characteristic for sporadic cases. Based on molecular genetic analysis, the genetic alterations in some ESRD/ACRD tumours correspond with those characteristic in RCTs occurring in the general population but others just fail to present – partly or totally - the most typical chromosomal changes, may have distinct genetic changes or do not show any alterations. In the case of unusual tumour morphology, the diagnosis and biological behaviour of some of the ESRD/ACRD tumours remain uncertain even after molecular characterization. Although further studies are necessary, the available data suggest that the initial developmental step for RCC associated with ESRD/ACRD might be slightly different from those occurring in the general population.

Pathogenesis of ACRD and the related tumours

An increased rate of cell division has been found in cells of atrophic tubules as well as in stromal cells suggesting that end-stage kidney is not a quiescent organ. In spite of histochemical and molecular genetic studies, the biology of parenchymal and interstitial cells as well as the molecular mechanisms leading to formation of multiple cysts, remodelling the kidney parenchyma and development of unique type of tumours remains unknown.

Toxic effects because of the retention of potentially toxic uremic compounds may have pathological consequences as increased genomic damage which has been shown in uremic patients such as elevated rate of sister chromatid exchange or formation of micronuclei. The efficiency of DNA repair is decreased to about 60% in uremic patients but remained nearly normal in patients having a maintenance dialysis.

The mitochondrial DNA (mtDNA) is more vulnerable to genotoxic agents and has a considerable higher mutational rate than that of nuclear DNA. Deletion of a 4977 bp segment known as the most common large-scale deletion of mtDNA in various human tissues have been described to occur in the skeletal muscle, in hair follicles and in peripheral blood cells of ESRD patients with a significantly higher incidence than in those of age-matched controls. Damage to mtDNA can accumulate and mutations may cause alterations in the components of the respiratory chain with decreased enzymatic activities resulting in increased generation and accumulation of intracellular reactive oxygen species (ROS). Mitochondria are considered to be the main source of intracellular oxidative stress by generation of ROS and their elevated level could further injure important proteins, interfere with metabolic pathways, contributes to nuclear genome damage and cancer initiation.

The role of growth factors and their receptors such as hepatocyte growth factor (*HGF*) and its receptor c-met (*MET*), epidermal growth factor (*EGF*), insulin-like growth factor-1 (*IGF-1*), hypoxia-inducible protein 2 (*HIF-2*) and hypoxia-inducible factor-1 α (*HIF-1 α*), a specific renal cell growth factor, mitogen substances or activation of signal transduction molecules (e.g. *cyclic AMP*) in cystic fluid has also been suggested to be involved in ESRD/ACRD biology. Altered expression of proto-oncogene or amplification of *c-erbB2*, activation of *c-jun* and hypermethylation of connexin 32 have been published. The role of cytokines such as interleukin-6 (*IL-6*), interleukin-8 (*IL-8*) and vascular endothelial growth factor (*VEGF*) accumulating in acquired cysts was also proposed. It was also suggested that possible mechanical effect of calcium oxalate monohydrate crystals deposited in renal epithelial cells may induce proliferation by altering their gene expression.

The aforementioned studies have analysed only one or two genes or one kind of genomic alteration, but no systematic analysis of the molecular microenvironment of ESRD/ACRD kidneys have been carried out.

AIMS OF THE STUDY

Based on the dynamic structural changes in ESRD/ACRD and because the phenotype and genotype of RCTs developing in ESRD/ACRD may differ from those occurring in the general population, an alternative pathway of tumour development reflecting the special microenvironment in ESRD/ACRD has been proposed.

The following issues have been raised:

- Are genotoxic effects of uremic milieu in ESRD patients responsible for genetic instability and subsequently for development of tumours?
- Which genes and mechanisms are involved in hyperplastic-cystic remodelling and/or strong predisposition for tumorous process of end-stage kidneys?
- Does this remodelling resemble a disorganized embryonal development or regeneration of kidneys, or correspond to a novel type of disease?
- Is there a common factor relevant to both the high risk of renal cell tumours and the increased overall cancer risk in ESRD?

In an attempt to clarify these problems, my work aimed to:

1. sequence the entire mitochondrial genome in renal parenchymal cells from patients with ESRD/ACRD and in RCCs arising in end-stage kidneys.
2. sequence the *VHL* and *MET* genes and analyse the genomic changes in ESRD/ACRD-associated tumours.
3. establish the global gene expression profile in ESRD/ACRD kidneys and compare to that of embryonal and adult normal kidneys and distinct types of renal cell tumours by using Affymetrix oligonucleotide microarray.
4. improve the expression of the selected genes in a panel of cDNA samples of the aforementioned tissues by quantitative RT-PCR.
5. determine the cellular localisation of the encoded proteins in embryonal, adult and ESRD/ACRD kidneys as well as in distinct types of renal cell tumours by immunohistochemistry.

PATIENTS AND METHODS

Sample collection and histological diagnosis

Fresh kidney specimens and renal cell tumours from patients with ESRD/ACRD as well as specimens of a large number of adult kidneys and distinct types of renal cell tumours were obtained from the Urological Departments in Germany (Heidelberg, Bad-Hersfeld), United Kingdom (Oxford Radcliffe Hospital), Hungary (Budapest), Austria (Linz) and Slovenia (Ljubljana). In end-stage kidneys, ACRD was diagnosed when the secondary cystic changes replaced at least 40% of the kidney parenchyma. The histopathological diagnosis of tumours arising in ESRD and non-ESRD kidneys was established according to the Heidelberg Classification and to Tickoo et al. (2006).

After nephrectomy, one part of fresh renal parenchymal tissue and of tumour tissue - beside a part of tumour tissue used for cell culture and cytogenetic analysis - was snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for DNA, RNA and protein analysis. The rest of tumour tissue and the remaining nephrectomy specimen were fixed in 4% buffered formaldehyde for histological examination. Paraffin embedded samples from 21 ESRD/ACRD cases were also available for histological analysis. Fetal kidneys from 13, 18 and 19 weeks of pregnancy were obtained after legal abortus at the Department of Gynecology, University of Pecs, Hungary.

Mitochondrial and genomic DNA analysis

Genomic DNA from tumour tissues of end-stage kidneys was extracted by phenol-chloroform according to standard procedures. The tumour cells were carefully scraped off or pushed out to separate them from stromal tissue under an inverted microscope by a pathologist (Professor Kovacs) experienced in this technique. Control DNA was extracted from corresponding kidney parenchymal specimens by the same method.

We have designed 24 pairs of primers that amplify overlapping fragments of approximately 900 bp of the complete 16 569 bp of mtDNA. The forward and reverse primers were tailed at their 5' ends with the sequences of universal primers UP21 for forward and RP29 for reverse one, to allow direct sequencing of the PCR (polymerase chain reaction) products. The PCR products was sequenced with universal primers UP21 labelled with IRD700 and RP29 labelled with IRD800 fluorescent dye by using the SequiTherm EXCEL™ II Long-Read DNA Sequencing Kit according to the manufacturer's instructions. Direct sequencing of some samples gave illegible sequences from the poly(C) tract of the D-loop region onwards, requiring these samples to clone into vector. PCR

fragments were ligated and transformed into XL1-Blue supercompetent cells, then the plasmid DNA was sequenced with the appropriate IRD700- and IRD800-labelled primers.

For separation of sequencing products, the electrophoresis was performed on a 66 cm polyacrylamide gel using a LI-COR Long ReadIR² 4200 Automated DNA Sequencer, which works with dual-laser system detecting IRD700 and IRD800 dyes. The raw data were collected and analysed with the eSeq2.0 Software creating two independent image files with information from the 700 nm and 800 nm channel and read sequences of both renal parenchymal cells and renal cell tumours were compared with those of the Mitomap database (<http://www.mitomap.org>).

Sequence analysis of the *VHL* and *MET*

The three exons of the *VHL* (von Hippel-Lindau) gene were sequenced from genomic DNA of 11 ESRD/ACRD tumours (6 conventional and 4 papillary RCCs and one oncocytoma) and 128 conventional RCCs from the general population. Sequences of exons 16-19 of the protein kinase domain of the *MET* gene were also analysed in five (4 papillary and 1 ACRD-associated eosinophilic type) ESRD/ACRD tumours. For both genes, after an amplification with nested and a re-amplification with tailed (UP21 and RP29) corresponding primers, samples were directly sequenced with the IRD700 and IRD800-labelled primer set of the Thermo Sequenase[™] Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza dGTP according to the manufacturer's instructions. Polyacrylamide gel electrophoresis was performed on a 41 cm gel using a LI-COR Long ReadIR² 4200 Automated DNA Sequencer. Data were analysed by eSeq2.0 (*VHL*) or BaseImagIR (*MET*) software and compared to the reference sequences.

CGH (Comparative Genomic Hybridization)

Twenty tumours from 11 ESRD/ACRD patients were analysed for genomic DNA alterations by applying the Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH. High molecular weight DNA was isolated from short term cell-culture, whereas a pool of sex matched DNA isolated by phenol-chloroform method from five normal parenchymal kidneys was used as a reference for array CGH. DNA fragmentation and labelling were performed according to the Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis user guide (v. 3.1). Further hybridization to 4x44K array (AMADID 014950), washing and scanning procedures were carried out at the Genomics Core Facility, EMBL (Heidelberg, Germany) according to the manufacturers' protocol.

Data were further extracted from the scanned microarray image (.tif), filtered and normalized by the Agilent Feature Extraction software (v. 9.5), and analyzed using the Agilent CGH Analytics software (shot time free trial v. 3.4). Statistically significant regions of aberration in a given sample

were determined by the ADM-2 algorithm according to the sensitivity threshold at 6.0 and a moving average window of 1 Mb. A copy number gain was defined as a \log_2 ratio >0.3 and a copy number loss was defined as a \log_2 ratio <-0.3 .

Gene expression analysis

For expression analysis, total ribonucleic acid (RNA) was isolated from ESRD/ACRD kidneys, embryonal and adult kidneys as well as from distinct types of renal cell tumours including embryonal ones with TRIzol[®] reagent according to standard procedures.

Global gene expression analysis using Affymetrix platform. For microarray analysis, total RNA samples were purified by using the RNeasy Mini Kit. We have pooled RNA of best quality from six ESRD/ACRD kidneys, adult kidneys, tumours, papillary RCCs and conventional RCC samples with and without progression of the disease as well as from renal oncocytoma and chromophobe RCC.

The complementary RNA (cRNA) synthesis and array hybridization were performed by the Affymetrix Screening Service at the German Resource Center for Genome Research in Berlin (RZPD, <http://www.rzpd.de>). Each sample of high quality cRNA was hybridized once using the Affymetrix Human Genome U133 A and B array set. The scanned image files were converted by the GeneChip[®] Operating Software. The intensity data (44,928 probe-sets) were normalized using default settings in MicroArray Suite software (version 5.1) and further processed using Microsoft Excel. The gene expression was correlated to those of pooled normal adult kidneys as a baseline reference and relative expression values in pooled tumour samples were calculated.

We used correspondence analysis to explore the relationships between the samples in a low-dimensional projection of expression data. Genes showing a signal log ratio over 2 in ESRD samples and under 0 in nearly all other samples with corresponding detection and change call, i.e. specifically up-regulated in ESRD and down-regulated in other type of tissues, were selected for qRT-PCR. In addition, genes showing an increased expression in one type of RCTs besides ESRD/ACRD samples were also selected. To define functionally related genes among those specifically expressed in ESRD/ACRD kidneys and also in distinct types of renal cell tumours we applied the web-based DAVID Gene Functional Classification Tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/gene2gene.jsp>).

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). As first-strand complementary DNA (cDNA) synthesis, total RNA was transcribed with SuperScript[™] II Reverse Transcriptase Kit and 3' one-base-anchored oligo-dT₂₃ primers. For primer design, sequences of the

selected Affymetrix probes were obtained through the NetAffx™ Analysis Center. Primer pairs for the represented human genes and ESTs were constituted by the help of the Primer3 primer design software considering optimal parameters and information of NCBI (National Center for Biotechnology Information) Reference Sequences (RefSeq) and Human BLAT Search. Primers were synthesized by MWG Biotech AG.

A representing cDNA fragment of the selected human genes and ESTs was amplified in a series of 1:8 diluted cDNA originating from 2 normal foetus kidneys (13 and 19 weeks old), 5 normal adult kidneys, 8 ESRD/ACKD kidneys, 5 conventional RCCs, 5 papillary RCTs, 5 chromophobe RCCs and 5 renal oncocytomas with the Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix UDG Kit using a DNA Engine Opticon™ Real-Time System. Samples were parallel amplified for β -actin, as a reference (housekeeping) gene. The assays were analysed with the Opticon Monitor Software package (v. 1.4).

Immunohistochemistry (IHC)

Tissue sections from original formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissue blocks containing fetal, adult and ESRD/ACRD kidneys as well as TMAs (Tissue Microarray) including one with ESRD/ACRD associated tumours, one with papillary RCTs and another one with conventional RCCs were analysed by IHC. TMAs were constructed from original formalin-fixed, paraffin-embedded material of ESRD/ACRD associated tumours as well as from Wilms' tumours, conventional, papillary and chromophobe RCCs and renal oncocytomas from the general population using a Manual Tissue Arrayer 1.

After dewaxing, rehydration, treating in antigen unmasking solution of pH 9.0 and pH 6.0 in an 2100 Antigen Retriever, blocking the endogen peroxidase activity and nonspecific binding sites, the slides were incubated overnight at 4°C with primary antiserum at the indicated dilution. HRP (Horseradish Peroxidase) conjugated anti-rabbit and anti-mouse secondary antibody (MACH 4 Universal HRP-Polymer) was applied for 30 minutes and bound antibody was visualized with AEC (amino-ethyl-carbazol) or DAB plus (diaminobenzidine) chromogen solution. The sections were counterstained with Mayer's Hematoxylin and covered either with Ultramount or Pertex.

RESULTS

Pertinent clinical and histological data of ESRD/ACRD cases and their tumours are listed in the Thesis.

Morphology of ESRD/ACRD kidney

The morphology of ESRD as well as of ACRD kidneys correspond to that was described in the Introduction with diffuse hyalinisation (glomeruli, tubular basement and arteries), proliferation of smooth muscle and endothelial cells and large areas of „thyroidisation” composed of dilated tubules filled with eosinophilic fluid. In ACRD kidneys, the vast majority of cysts are lined by a single layer of epithelium composed of flat or small cuboidal cells and large columnar epithelium in some cysts. ACRD kidneys displayed frequently atypical proliferative cysts, which are possible precursor lesions for ACRD-associated tumours.

Morphology of microscopic lesions and tumours

Working up 12 entire kidneys obtained from patients with ESRD/ACRD in 393 paraffin blocks revealed 65 small papillary precursor lesions of small or medium sized cells, 42 precursor lesions with chromophobe RCC-like pattern, 24 small solid lesions with large eosinophil cells containing large vacuoles. As a strong correlation between the number and type of precursor lesions of microscopic size and tumours, precursor lesions and corresponding tumours showed similar histology in ESRD/ACRD kidneys. We detected several tumours of unusual morphology, e.g. the clear cell papillary RCC. Some papillary RCTs were composed of large eosinophil cells displaying cytoplasmic vacuoles or exhibited large eosinophil cells intermingled with clear cell like structures. Some tumours contained large oxalate crystals either in the cytoplasm or in stroma.

Mitochondrial DNA alterations in ESRD/ACRD kidneys and tumours

New sequence variants identified in the mitochondrial genome. Sequence variants detected in both normal and tumour DNA were classified as polymorphisms. We found 94 mtDNA polymorphisms (4–27 per individual) in the kidneys of the six patients. From these, 20 alterations were new polymorphisms and have not yet been recorded in the Mitomap database. Nearly half of the polymorphisms (44 of 94) were A to G substitutions. Nearly all of the polymorphic variants occurred in homoplasmic form (100% variants), but some of them were in heteroplasmic form, making up approximately 50–75% of the mtDNA. Only 34 of the 69 different sequence variants occurred in the protein coding region and of these, 19 (56%) resulted in alteration of the amino acid sequences.

Alteration in the D-loop region. Two tumour samples showed a consistent T deletion and varying sizes of poly (C) tract between 9 and 11 C nucleotides (nt) in heteroplasmic form in the mtDNA control region. We found a C deletion at another poly (C) site at position nt303–309 in two cases.

There were one and two CA insertions in two of the six normal kidneys, respectively, at nt514 in a region of a (CA)*n* repeat with normally five haplotypes, but no allelic variation in the corresponding tumour cells.

Somatic mtDNA mutations in ESRD/ACRD associated tumours. We identified 9 somatic nucleotide changes in 7 tumours occurring exclusively in tumour cells, eight of them in homoplasmic form (listed in the Thesis). The mutations were nucleotide substitutions in 6 tumours (4 G→A, 1 A→G and 1 T→C substitutions). In addition, there were a C and a T insertions and an A deletion detectable in three cases, respectively. One of the G→A substitutions occurring in the *MT-ND2* (mitochondria encoded NADH dehydrogenase 2) coding region led to an alanine-threonine (Ala→Thr) exchange in the amino acid sequence, whereas the C insertion and the A deletion resulted in a frameshift mutation in *MT-ND4* and *MT-ND5* genes, respectively.

Mutations of *VHL* and *MET* in ESRD/ACRD tumours

In the coding region of the 3 *VHL* exons, 82 mutations occurring in 71 (55.5%) of the 128 cRCCs from the general population were detected: 45 point mutations (54.9%), 30 deletions (36.6%) and 7 insertions (8.5%). There were 2 mutations in seven and 3 mutations (in two codons) in two cases. Analysis of 11 ESRD/ACRD tumours revealed mutations exclusively in conventional RCCs. There were 5 mutations in 5 of six cRCCs (83%): 3 point mutations resulted in missense mutations with alteration in amino acid sequence and 2 deletions causing frameshift with early termination. Mutations of the *VHL* gene seem to be higher (83%) in cRCCs from end-stage kidneys comparing to those from the general population (55%). There were no any mutations in exon 16-19 of *MET* proto-oncogene of the five analysed ESRD/ACRD tumours.

Genomic alterations in ESRD/ACRD tumours

Each of the 7 conventional RCCs displayed the characteristic copy number loss at chromosome 3p. However, only 2 of the 5 papillary RCTs showed the characteristic chromosomal gains, whereas two of them displayed copy number gains only at chromosome 3 or 7 and 16. The ACRD-associated eosinophilic tumour showed similar alterations to the latter 2 pRCT. Loss of chromosome 17p occurred frequently in chromophobe-like RCCs. No alterations were seen on the renal oncocytoma and clear cell papillary RCC.

Expression signature of end-stage kidneys

Correspondence analysis. Correspondence analysis of normal foetal, adult and ESRD/ACRD kidneys and distinct types of kidney tumours revealed 5 sample clusters. Samples 17-22 in cluster 1

corresponding to ESRD/ACRD are far from the centroid and well separated from the other clusters containing normal kidneys and tumours of the kidney. This indicates a unique expression signature (Figure 1.).

We have selected 69 genes, which are specifically upregulated in ESRD/ACRD against normal adult kidneys. Quantitative RT-PCR analysis using a panel of cDNA from normal and ESRD/ACRD kidneys and distinct type of RCTs confirmed the prominent expression of 47 genes, of which 21 were expressed exclusively in end-stage kidneys and 9 exclusively in ESRD/ACRD samples and in papillary RCCs suggesting an association between the two diseases. The highest expression in end-stage kidneys was seen for the *LINC00973* RNA (Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 973), followed by the *CSF2*, *SCEL* and *GPR87* genes, of which *SCEL* was overexpressed in papillary RCTs as well.

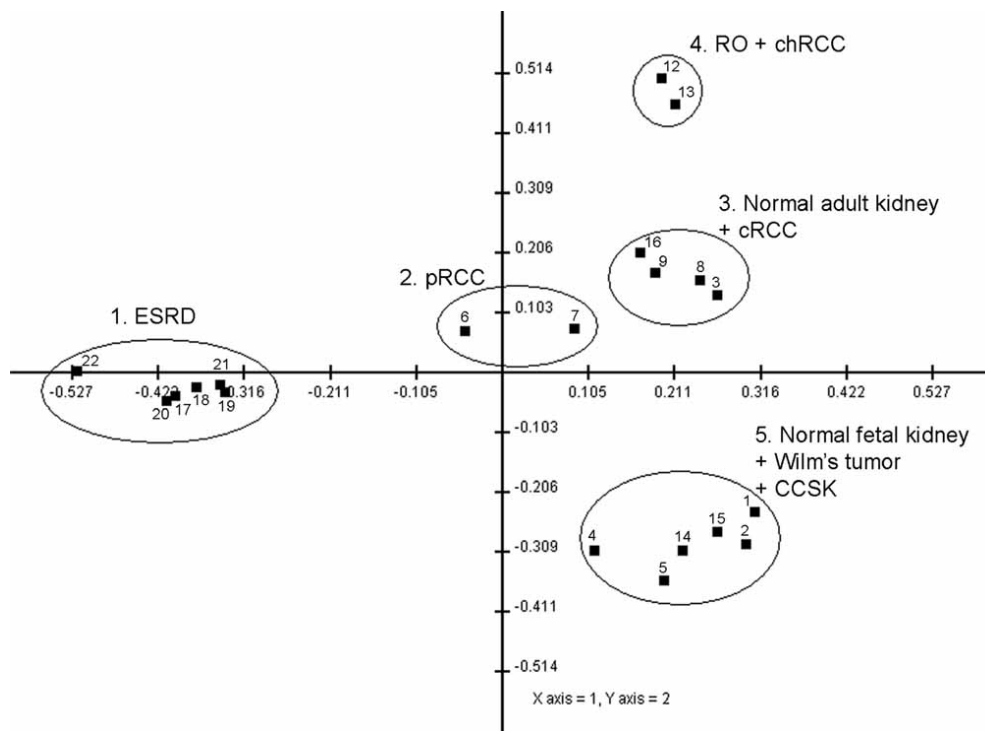


Figure 1. Correspondence analysis of the microarray experiments.
cRCC: conventional, pRCC: papillary and chRCC: chromophobe RCC; RO: renal oncocyoma;
CCSK: clear cell sarcoma of the kidney

Unsupervised hierarchical clustering. After normalizing the data to the expression level in normal kidneys, unsupervised analysis revealed distinct global gene expression patterns of ESRD/ACRD/papillary RCC, chromophobe RCC/renal oncocyoma, conventional RCC, and foetal kidneys together with the childhood tumours as grossly separated clusters. The SAM analysis with the available number of permutations and fold-change 2.0 was performed to estimate a statistical significance of the probe sets manually selected as transcripts associated with ESRD/ACRD and

ESRD/ACRD and papillary RCC. As result, 54 and 42 transcripts were upregulated in ESRD/ACRD and ESRD/ACRD and papillary RCC, respectively, as compared to other samples.

Analysis of most prominently expressed genes

LINC00973 (Hs.307772). *LINC00973* is an RNA gene (Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 973) located on the positive strand of chromosome 3 at base pairs 98699902-98701940. *LINC00973* belongs to the non-coding RNAs. Its function is not yet known, no data on its involvement in any biological functions has been published. We found the expression of *LINC00973* exclusively in ESRD/ACRD kidney, however, its high expression was detected in 5 of the 10 ESRD/ACRD-associated tumours.

Colony Stimulating Factor 2 (*CSF2*). The granulocyte-macrophage colony stimulating factor 2 (*GM-CSF* or *CSF2*) has a cytokine function controlling the differentiation and function of granulocytes and macrophages. Our qRT-PCR revealed *CSF2* expression exclusively in the ESRD/ACRD kidneys without expression in tumour samples from the general population. Diffuse expression of the *CSF2* protein was seen in atrophic, rearranged and cystic dilated tubuli.

Sciellin (*SCEL*)

Expression of SCEL in ESRD/ACRD kidneys and tumours. The protein encoded by *SCEL* is a precursor protein to the cornified envelope of terminally differentiated keratinocytes and may function in the assembly or regulation of proteins in this envelope. It is expressed only in cornified epithelial cells of the skin, vagina, esophagus and tumours arising from such cells, but is not expected in parenchymal organs. Nevertheless, it was the third most prominently expressed gene in ESRD/ACRD kidneys and there was a consequent *SCEL* expression in papillary RCTs but not in the other types of RCTs of the general population.

Compared with extremely low expression in the normal (fetal and adult) kidneys, high copies of *SCEL* molecules were detected in 10 of the 12 ESRD/ACRD kidneys and in 5 of the 11 associated tumours including ACRD-associated papillary clear cell tumour and also a tumour with large vacuolized eosinophilic cells. These data suggest the possible role of *SCEL* in the proliferative processes playing a role in development of ESRD/ACRD and associated tumours.

We have also analysed the expression of the two splice variants of the *SCEL* by RT-PCR and visualised them on agarose gel. Both splice variants were detected with a strong predominance of the longer transcript variant 2 (with insertion of exon 12) in each ESRD/ACRD kidneys and papillary RCTs, but no visible expression was seen in normal kidneys, Wilms' tumours, conventional and chromophobe RCCs and renal oncocytomas obtained from the general population.

Expression of sciellin protein in ESRD/ARCD and renal cell tumours. In adult kidneys a positive staining was seen exclusively in distal convoluted tubuli. In scarring end-stage kidney single or clustered epitheloid cells, small tubules and also dilated tubules containing a papillary growth of cells were positive. We found positivity in papillary RCCs and small papillary precursor lesions arising in ESRD/ARCD. Conventional and chromophobe RCCs, renal oncocytomas and Wilms' tumors arising in the general population were negative for SC4 antibody.

Expression of *SCEL* and *VDUP1* (Vitamin D upregulated protein 1) genes in ESRD/ACRD kidneys. Because of the interaction between sciellin and VDUP1 as well as the low serum level of $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (active Vitamin D) in ESRD patients, we have also analysed the same panel of normal and ESRD kidneys and distinct types of RCTs for *VDUP1* by qRT-PCR just as *SCEL*. We found a *VDUP1* expression in all normal kidneys and also distinct types of renal cell tumours but no or very low expression in ESRD/ACRD kidneys and Wilms' tumours.

G Protein-Coupled Receptor 87 (*GPR87*). *GPR87* was one of the most prominently expressed gene in ESRD/ACRD kidneys compared to normal and various tumorous kidney samples in our panel. Besides of end-stage kidneys, only a collecting duct carcinoma showed similar and some oncocytomas a weak expression. By IHC with *GPR87* antibody, the vas afferens of cortical glomeruli presented an explicit reaction in adult and cells of outer medullary collecting duct showed a slight reaction in fetal and adult kidneys. A strong positivity was seen in small proliferating arterioles corresponding to the outer medullary region in ESRD/ACRD kidneys and also in chromophobe RCC-like precursor lesions and tumours.

Functional classification of selected genes

To define functionally related genes among those specifically expressed in ESRD/ACRD kidneys we used web-based DAVID Gene Functional Classification Tool. We identified two clusters of functionally related genes among the 47 genes confirmed by qRT-PCR.

Group 1: Inflammation related genes. Five genes of chemokines, *CXCL1*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL6* from the C-X-C subfamily and *CCL20*, a member of the C-C subfamily were clustered together with a high enrichment scores when classification stringency was set as "highest". In addition, *CXCL8* (*IL8*) was also assigned to the cluster of "high" stringency level. Two of the 47 genes overexpressed in end-stage kidneys based on qRT-PCR analysis, *CSF2* and *IL6* can be referred here as well, which encode also proteins belonging to the large group of cytokines. No or only minimal expression was detected in normal, non-ESRD/ACRD kidneys. These data suggest

that inflammatory cytokines may play a seminal role in the remodelling processes in end-stage kidneys and also in development of ACRD.

Expression and cellular localisation of CXCL8 and CXCR2. We have analysed the receptor protein *CXCR2* (*IL-8R2*) together with one of its ligands, *CXCL8* cytokine in the same slides by IHC in ESRD/ACRD kidneys and associated tumours. The vast majority of small “atrophic” tubules in sclerotic areas, small tubular and tubular-papillary lesions, ESRD/ACRD-associated precursor lesions as well as small tumors resembling chromophobe RCC showed positive staining for both antibodies. Smaller or larger cysts in ACRD kidneys lined with single or multilayered epithelial cells were strongly positive. Adult and fetal kidneys were negative for *CXCL8*. In summary, similar structures were stained with both antibodies presenting a generally weaker staining intensity for *CXCR2* than for its ligand *CXCL8*.

Expression of acute phase proteins SAA1 and LBP. As acute phase response genes may be also important transducer of inflammatory signals, we have analysed serum amyloid A1 (*SAA1*, also identified by the SAM analysis above), and lipopolysacchride binding protein (*LBP*, expressed in invasive cRCCs) for protein expression. Acute phase responsive proteins *SAA1* and *LBP* were strongly expressed in the vast majority of small or dilated tubular cells of ESRD/ACRD kidneys. The *LBP* protein was highly expressed in the fibrotic stroma of ESRD kidney, whereas the *SAA1* expression was less intensive in stromal areas. A weak cytoplasmic reaction with attenuated cell membrane *SAA1* staining was seen in several ESRD/ACRD-associated tumours. Conventional RCCs as well as chromophobe-like carcinomas developed in ESRD/ACRD kidneys revealed moderate to strong *LBP* staining.

Group 2: Altered cytokeratin assembly. Another cluster was made up by keratins, *KRT7*, *KRT19*, *KRT81* (*KRTHB1*), and *KRT23* at “highest” clustering stringency settings, and *KRTAP2-2* at a stringency set to “high”. *KRTAP2-2*, *KRT81* and *KRT23* were overexpressed exclusively in ESRD/ACRD kidneys, while *KRT19* and *KRT7* expressed in papillary RCTs as well. Based on the role of encoded proteins in epidermal development and maintenance, the *SCEL* as well as C15orf48 (*NMES1*, normal mucosa of oesophagus specific 1) might also be ordered to this functional group. The gene *AREG* encodes an autocrin growth factor promoting the growth of normal epithelial cells. Single layered epithelial cells express normally a pair of keratin type I and II such as *KRT8* and *KRT18*, which form heterodimer. The functional analysis of specifically expressed genes indicated, that proliferating cells in ESRD/ACRD kidneys shift their keratin profile by expressing *KRT7*, *KRT19* and *KRT23*. In normal kidneys, *KRT7* and *KRT19* proteins are expressed in cells of the collecting duct and in thin ascending loop of Henle.

We found a diffuse *KRT7* staining in nearly all areas of ESRD/ACRD kidneys, in small atrophic or in dilated tubules, definitely in latter ones with papillary growth within their lumen as well as in ESRD/ACRD-associated papillary RCTs. *KRT7* immunopositivity was demonstrated in papillary as well as in chromophobe-like precursor lesions and in ESRD/ACRD-associated chromophobe-like RCC. As with the *KRT7* staining, diffuse *KRT19* positivity was detected in the overwhelming majority of small atrophic, normal looking or dilated tubules in ESRD/ACRD kidneys. All cells of tubular or papillary growing tumours exhibited a strong positive *KRT19* immunostaining. Conventional RCCs were consequently negative for *KRT7*, but showed scattered positivity for *KRT19*.

DISCUSSION

Are toxic effects responsible for increased risk of tumour?

Mutation of mtDNA. Our study presented a higher mutational rate of the mtDNA in ESRD tumours (9 somatic mutations in 7 of the 9 RCTs) than found generally (23-70%) in other types of malignancies. This may correspond to the increased level of ROS in renal parenchymal cells in ESRD/ACRD thought to be caused by uremic status or maintenance dialysis. Most somatic mutations described in the mitochondrial genome are nucleotide transitions which correspond to ROS-induced nucleotide changes and are homoplasmic suggesting a selective replication advantage of mutant mtDNA. We suggest that the somatic nucleotide changes in ESRD tumours occur at a very early stage of tumorigenesis, probably in progenitor cells and are selected during tumour progression as a homoplasmic mutation.

During cystic remodelling characterized by a high rate of cell proliferation, cells are activated by distinct stimuli, they produce ROS which can act as a second messenger and stimulate other cellular signalling pathways. There is a cross talk between the cellular redox status and signalling pathways which may lead to programmed cell death or cell proliferation, both necessary for cystic remodeling processes. It is likely, that endogenic or exogenic toxic effects through increased levels of ROS promote a cell proliferation and in this complex way contribute to the development of tumours which have a high rate of ROS-specific mtDNA mutations.

Genomic instability, mutation of the VHL gene. Although, only few tumours from ESRD/ACRD cases have been subjected to mutation analysis of the *VHL* gene, the high frequency (83%) against those of observed in conventional RCCs in the general population (55%) may suggest a causal association of uremic- toxic status and mutation of the *VHL* gene. The increased level of ROS and hypoxic microenvironment in ESRD/ACRD may be also responsible for the higher rate of

mutation and the increased proliferation of cells may fix the mutations in the starting population of tumorigenic cells.

Recalling Virchows hypothesis: the inflammatory microenvironment

Our systematic analysis identified a functional group of signature genes belonging to the chemokine family which are specifically expressed in ESRD/ACRD. These chemokines compose a cell-surface signalling assembly with CXCL8 (*IL8*) receptors *CXCR1* and *CXCR2*. Based on previous observations, these participants mediate chemotactic and angiogenic activity on different cells types or have stimulatory effects on growth or differentiation (e.g. *CCL20*, *IL6* or *CSF2*), might trigger neoplastic cell transformation (e.g. *CXCR2* activation) and can play a significant role in proliferation or invasion of tumour cells (as *IL8*).

The inflammatory microenvironment in end-stage kidney is formed by stromal and infiltrating immune cells and this changes activate the host immune system including the acute phase response. On the other hand, cancer cells may shape their own microenvironment by de novo production of inflammatory mediators and acute phase proteins. In end-stage kidneys and associated tumours both acute phase response proteins, *SAA1* and *LBP* are expressed. *LBP* catalyzes a signal via a CD14-enhanced mechanism to a receptor complex including TLR4 (Toll-like receptor 4) leading to the release of pro-inflammatory cytokines such as *IL-6*. Cytokines such as *TNF-alpha* and *IL6* may also play crucial role. Both *TNF-alpha* and *IL6* induce free radicals or can synergistically trigger the *TGF-beta* signalling pathway and thus promoting epithelial to mesenchymal transition and tumour invasiveness.

Our findings recall Virchow's observation that cancers occur preferentially at sites of chronic inflammation. The finding that several genes are expressed exclusively in ESRD/ACRD and associated tumors also suggests that the inflammatory microenvironment in ESRD/ACRD can be connected to tumor development. This observation seems to improve our hypothesis on the role of specific molecular microenvironment in the development of unusual types of tumors in ESRD/ACRD, which replaces the specific genomic alterations occurring in RCTs in the general population.

Increased plasticity of kidney cells during remodelling

The cells of the nephron in chronic renal disease gradually loss their normal function and suspend their program of terminal differentiation. Proximal tubular cells of the kidney, as highly specialized parenchymatous epithelial cells express only *KRT8* and *KRT18* in their normal state, this may change dramatically in reactive conditions such as inflammation or atrophy. The homeostatic

response features major alterations in keratin gene expression. The cells can switch on *KRT7* and *KRT19*, sometimes also *KRT17* and thus express four or five instead of two keratins. This increased keratin expression appears to parallel the reduction in degree of differentiation.

In normal kidney, *KRT19* similarly to *KRT7* is expressed by IHC in the principal cells of the collecting duct. Our finding that *KRT7* especially *KRT19* is expressed in nearly all tubular structures in ESRD/ACRD kidneys can not be interpreted as an exclusive proliferation of principal cells of collecting duct but rather reflect the shift of keratin pattern of all types of tubular cells from *KRT8* and *KRT18* to *KRT7* and *KRT19*. This shift in keratin expression profile enables to form new cytoskeletal proteins resulting in altered shape and increased plasticity necessary for the remodeling process and tumour development.

Several other overexpressed and selected genes can play a seminal role in remodelling and tumour development. *LAMA3*, *LAMB3* and *LAMC2* are the three components of the laminin332 which - by interacting with other extracellular matrix components - mediates the attachment and migration during regeneration, tumorigenesis and metastasis. Proliferation and migration of cells is necessary for reorganising the normal structure in end-stage kidneys and in development of ESRD/ACRD-associated tumours. The protein encoded by *DCBLD2* (ESDN, endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin-like protein) modulates vascular smooth muscle cell growth and is a marker of vascular remodelling.

***VDUPI/TXNIP*, tissue remodelling and increased risk of tumour**

The *VDUPI/TXNIP* which is expressed under normal conditions in several tissues, is a multifunctional protein involved in maintaining the cellular homeostasis. Increasing number of data suggest that *VDUPI/TXNIP* control the cell proliferation and possible the cell migration in tumour cells as well. The low level of *VDUPI* and suspended interaction with the *SCEL* may contribute to the remodeling process and intensive proliferation of distal convoluted tubuli. In addition, it can be linked to the observation, that ESRD patients show, in general, an increased risk for cancer involving not all but a number of organs.

Most patients with end stage kidneys have a decreased serum level of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and, as we presented, a decreased expression level of *CYP27B1* and a substantially decreased expression of *VDUPI/TXNIP* which indicate the involvement of these factors in extensive remodelling process occurring in ESRD/ARCD and possible, in the high frequency of RCT development.

CONCLUSIONS

Our study provides first time evidence that:

1. Remodeling of kidney parenchyma in ESRD/ACRD is associated with a unique gene expression signature. The specific inflammatory microenvironment, altered plasticity and proliferation rate of cells may be responsible for the structural changes in non-functioning kidneys and for the high frequency of development of RCT with unique pheno- and genotype.
2. The continuous expression of inflammatory cytokines yielding high level of free radicals may cause mitochondrial and genomic DNA damage and mutations which can lead to tumour development.
3. Decreased expression of the multifunctional protein VDUP1/TXNIP in kidneys and other organs of patients with end stage renal disease and its suspended interaction with several molecular pathways may lead to impaired cellular homeostasis and trigger cell proliferation and tumour development.

To characterize the unusual morphology of kidneys in ESRD/ACRD, Heptinstall applied the term “trans-Stygian pathology” referring to life beyond the mythical river. Our study indicates that the long survival of patients with chronic renal disease allows the kidneys to enter a "new molecular life" different from the previous one. Taking into account that an increasing number of patients are being alive "beyond the Styx" due to improved RRT and that an increasing number of these patients may develop cancer, the signaling pathways instrumental in the biology of ESRD/ACRD and related tumors merits further investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude to Professor György Kakuk, the previous head of the 1st Department of Medicine and its Division of Nephrology and Professor József Balla, the current head of the Division of Nephrology in the Medical University of Debrecen for their generous support enabling my scientific work and study abroad and helping me in respect to my grants. From the great nephrological team, I am genuinely grateful to Dr. János Mátyus who had a significant role that I could contact my later supervisor and could realize my scholarship in Heidelberg. His earlier professional support and exemplariness, and collegial friendship means a great deal to me.

I am sincere and deep thankful to my supervisor, Professor Gyula Kovács who gave me the opportunity to establish my research work from the first steps and provided all the facilities in the Laboratory of Molecular Oncology, Ruprecht-Karls University of Heidelberg and supported me to finish my work in Pécs. I have the honour to possess his scientific guidance, steadfast support and motivation and I am grateful that he appreciated my efforts. My gratitude is extended to all my former fellows in this laboratory who helped me to acquire the technical knowledge and shared me experiences.

I appreciate the possibility to complete my work in a Doctoral School leaded by Professor Gábor Kovács L. including a program leaded by Professor István Wittmann at the University of Pécs Medical School. I am truly grateful to Dr. Tamás Beöthe from the Department of Urology, for his valuable collegial help.

I owe sincere and deep thankfulness to my family, especially my parents and my sister for doing their best and standing by me every time I needed. This thesis is dedicated to my parents constantly providing loving care for my family life as well as supporting my studies.

PUBLICATIONS OF THE AUTHOR / A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓI

Original research publications related to the thesis / Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

Nagy A, Walter E, Zubakov D, Kovacs G. High risk of development of renal cell tumor in end stage kidney disease: the role of microenvironment. Tumor Biol 2016;37:9511-9519.

IF: 3.611 cit: 4

Nagy A, Banyai D, Semjen D, Beothe T, Kovacs G. Scellin is a marker for papillary renal cell tumours. Virchows Archiv 2015;467:695-700.

IF: 2.651 cit: 0

Kuntz E, Yusenkov MV, Nagy A, Kovacs G. Oligoarray comparative genomic hybridization of renal cell tumors that developed in patients with acquired cystic renal disease. Hum Pathol 2010 41:1345-9.

IF: 2.998 cit: 11

Chudek J, Nagy A, Kokot F, Podwinski A, Wiecek A, Ritz E, Kovacs G. Phosphatemia is related to chromosomal aberrations of parathyroid glands in patients with hyperparathyroidism. J Nephrol 2007;20:164-72.

IF: 1.138 cit: 3

Nagy A, Wilhelm M, Kovacs G. Mutations of mtDNA in renal cell tumours arising in end-stage renal disease. J Pathol 2003;199:237-242.

IF: 4.933 cit: 36

Nagy A, Chudek J, Kovacs G. Accumulation of allelic changes at chromosomes 7p, 18q, and 2 in parathyroid lesions of uremic patients. Lab Invest 2001;81:527-533.

IF: 3.934 cit: 7

Berczi C, Nagy A, Matyus J, Balazs G, Kakuk G, Lukacs G. [Results and complications of parathyroidectomy in secondary hyperparathyroidism] Magy Seb 2001;54:356-360. Hungarian

IF: 0 cit: 0

Original publications not related to the thesis / Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent - eredeti közlemények

Beothe T, Nagy A, Farkas L, Kovacs G. P53 mutation and LOH at chromosome 9 in urothelial carcinoma. Anticancer Res 2012;32:523-527.

IF: 1.713 cit: 1

Yusenkov MV, Nagy A, Kovacs G. Molecular analysis of germline t(3;6) and t(3;12) associated with conventional renal cell carcinomas indicates their rate-limiting role and supports the three-hit model of carcinogenesis. Cancer Genet Cytogenet 2010;201:15-23.

IF: 1.551 cit: 4

Nagy A, Buzogany I, Kovacs G. Microsatellite allelotyping differentiates chromophobe renal cell carcinomas from renal oncocytomas and identifies new genetic changes. Histopathology 2004;44:542-546.

IF: 2.955 cit: 32

Balint I, Muller A, Nagy A, Kovacs G. Cloning and characterisation of the RBCC728/TRIM36 zinc-binding protein from the tumor suppressor gene region at chromosome 5q22.3. Gene 2004;332:45-50.

IF: 2.705 cit: 11

Nagy A, Zoubakov D, Stupar Z, Kovacs G. Lack of mutation of the folliculin gene in sporadic chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. Int J Cancer 2004;109:472-475.

IF: 4.416 cit: 31

Nagy A, Balint I, Kovacs G. Frequent allelic changes at chromosome 7q34 but lack of mutation of the BRAF in papillary renal cell tumors. Int J Cancer 2003;106:980-981.

IF: 4.375 cit: 11

Nagy A, Wilhelm M, Sukosd F, Ljungberg B, Kovacs G. Somatic mitochondrial DNA mutations in human chromophobe renal cell carcinomas. Genes Chromosomes Cancer 2002;35:256-260.

IF: 4.199 cit: 40

Cumulative impact factor / Összesített impakt faktor: 41.179

Citations / Hivatkozások száma: 190

Hirsch index: 7

Oral and poster presentations / Szóbeli és poszter előadások

Nagy A, Mátyus J, Kakuk Gy. Analgeticum nephropathiás betegek követése során szerzett tapasztalataink. Magyar Nephrologiai Társaság XV. Nagygyűlése, Budapest, 1998.

Nagy A, Chudek J, Kovacs G. Frequent allelic changes at chromosomes 7p, 18q and 2p in parathyroid lesions of uremic patients. Magyar Nephrologiai Társaság XVII. Nagygyűlése, Budapest, 2000.

Nagy A, Chudek J, Kovacs G. Coexpression of HGF/SF and its receptor MET in renal epithelial cells in end-stage renal disease. Magyar Patológusok Társaságának 2000. évi Kongresszusa, Eger, 2000.

Chudek J, Nagy A, Kovács Gy. A HGF/SF és MET koexpressziója vese parenchymális sejteken végstádiumú veseelégtelenségben. Magyar Nephrologiai Társaság XVIII. Nagygyűlése, Balatonaliga, 2001.

Nagy A, Wilhelm M., Kovács Gy. Mitokondriális DNS mutációk urémiás betegekben kialakult vesesejt tumorokban. Magyar Nephrologiai Társaság XIX. Nagygyűlése, Siófok, 2002.

Nagy A, Kovács Gy. Globális génexpresszió vizsgálata végstádiumú vesében. Magyar Nephrologiai Társaság XXI. Nagygyűlése, Eger, 2004.

Nagy A, Fellenberg K, Kovacs G. New life after death: a unique expression profil during remodelling of end stage kidneys. Magyar Patológusok Társaságának 2005. évi Kongresszusa, Pécs, 2005.

**A VÉGSTÁDIUMÚ VESE ÉS A TÁRSULT VESESEJTÉS
TUMOROK MOLEKULÁRIS GENETIKÁJA**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dr. Nagy Anetta



Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Kovács L. Gábor
Doktori Program vezetője: Prof. Dr. Wittmann István
Témavezető: Prof. Dr. Kovács Gyula

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar**

Pécs

2016

BEVEZETÉS

Végstádiumú veseelégtelenség és annak jelentősége

A végstádiumú veseelégtelenség (ESRD, end-stage renal disease) kifejezés egy klinikai állapotot tükröz, melyben a vesefunkció irreverzibilis károsodása oly mértékű, hogy a betegnek az életet veszélyeztető urémia elkerüléséhez vesepótló kezelésre – dialízisre vagy transzplantációra - van szüksége. Az ESRD jelentős terhet ró az egészségügyi rendszerekre, a hozzá társuló magas morbiditási és mortalitási ráta és magas egészségügyi kiadások teszik fontossá az egészségügyi ellátás szempontjából.

Az ESRD prevalenciája jelenleg is világszerte növekszik. Ezt számos tényező befolyásolja (pl. az ESRD-re fokozottabb rizikójú betegek hosszabb átlagos túlélése, a vesepótló kezelésre bejutás szélesebb lehetősége, ezen betegek jobb túlélése), melyek közül a 2-es típusú cukorbetegség globális epidémiája, a magas vérnyomás növekvő tendenciája és az általános populáció előregedése különösen hangsúlyos. A vesepótló kezelésre szorulóknak 2000-es években megfigyelhető 6-7%-os évi növekedési rátája szignifikánsan meghaladta a világnépesség 1.2%-os évi növekedését. Az Egyesült Államokban 2005-ben közel 500 ezren részesültek vesepótló kezelésben (világszerte körülbelül 1.9 millióan), mely a Egyesült Államok Vese Adatrendszerének (USRDS, United States Renal Data System) becslései szerint 2020-ra több, mint 750 ezerre nő.

A végstádiumú vesék morfológiai jellemzői

A jellemzően zsugorodott végstádiumú vesékben látható progresszív strukturális változásokat, úgymint a tubuláris atrófiát, intersticiális gyulladást és fibrózist, súlyos artériás, arteriolás és glomeruláris szklerózist, valamint a kalcium, a Ca-oxalát és Ca-foszfát kristályok kiterjedt lerakódását Heptinstall már 1968-ban lejegyezte. A vesepótló kezelés meghosszabbítja és javítja a végstádiumú vesebetegek életkilátásait, különösen, ha betegségük elsősorban csak a vesére korlátozódik. Mindez új típusú, korábban ritkán látott elváltozásokkal is jár a vese szövettanában.

A sajátos morfológiai elváltozásokat részleteiben McManus és Hughson több, mint 35 évvel ezelőtt egy közleménysorozatban leírta. Beszámoltak a körülvevő artériás és arteriolás nekrozisban a simaizom sejtek proliferációja által keletkező mikroszkopikus sejtnodulusokról, valamint a megnövekedett endotheliális és simaizom sejtek nyomán megvastagodott artériás intimáról. A végstádiumú vese különböző atrófiás tubulusait „klasszikus“ atrófiás, „thyroidizációt“ mutató, „endokrin“ és „szuper“ tubulusokként osztályozták. Ez utóbbiak megvastagodott és tágult, hiperplastikus/hipertrófiás hámréteggel bélelt tubulusok.

A fibrotikus veseállományban olyan, epitheliális jellegű izolált sejtek vagy laza szerkezetű sejtcsoportok („cluster“) lelhetők fel, melyeket fénymikroszkópos szinten látható bazálmembrán nem vesz körül. Az atrofíás, heges struktúrák ellenére a végstádiumú vese jelentős sejtproliferációs aktivitást mutat, különösen a „klasszikus“ és „szuper“ tubulusok hámfájában. A szokatlan magas sejtszótódási aktivitás a tágult tubulusokat vagy kis mikroszkopikus cisztákat bélelő hám papilláris sejtszaporulataiban is megfigyelhető.

Szerzett cisztás vesebetegség (ACRD, acquired cystic renal disease)

Az ACRD az eredetileg cisztaképződéstől független alapbetegségben szenvedő urémiás betegekben kialakuló kétoldali elváltozás, mely multiplex veseciszták kifejlődésével jellemezhető. A szakirodalomban nincs egységes diagnosztikai kritériuma, általánosan elfogadott, hogy fennállásáról mindegyik vesében 3 vagy több ciszta jelenléte, ill. a parenchyma több, mint 25%-os érintettsége esetén beszélhetünk, örökletes vesebetegség kizárása mellett. A multiplex, kétoldali, vékonyfalú ciszták deformálják a veseparenchyma szerkezetét. Elsősorban a kéregben, de akár a velőállományban, ill. a kéreg- és velőállomány kapcsolódásánál is elhelyezkedhetnek. Tipikusan színtelen vagy szalmasárga folyadékot tartalmaznak, melyben vérvész sem szokatlan. Jellegzetes az oxalát kristályok lerakódása, gyakran a ciszták falában vagy üregében, a tubulusok lumenében vagy az interstíciumban.

A ciszták egyrétegű, eozinofil, ill. néha magasabb bakancsszegszerű hámmal bélelték. A proliferatív ciszták legtöbbször az eozinofil sejtek papilláris növekedését mutatják. Néhány cisztában vakuolizált citoplazmájú, nagy eozinofil sejtek proliferációja észlelhető, mely megfelel a végstádiumú vesékhez társult eozinofil tumorok prekursor lézióinak. Mikrodisszekciós tanulmányok folytonosságot mutattak a ciszták és tubulusok között, mely szerint a ciszták bármely tubulusszakasz tasakszerű kiboltosulásaként kezdődhetnek és a tubuláris sejtek folytonos szaporulata során alakulnak cisztává. Bár a nephron különböző szakaszaiból eredhetnek, lektin és immunhisztokémiai tanulmányok alapján a ciszták nagy többsége a proximális tubulusokból származhat. Ugyanezen feltételezést támogatja az epitheliális markerek eloszlásának hasonlósága a „szuper“ tubulusokban és a cisztákban.

Az ACRD előfordulása és a cisztás elfajulás kiterjedése egyenes arányosságot mutat a dialízis időtartamával, alátámasztva annak progresszív voltát. A dialízisbetegek különböző, vizsgált populációiban 30-95%-os előfordulást közöltek, mely egy 45% körüli átlagot jelent és 10 év dialíziskezelés után elérheti virtuálisan a 100%-ot. Az ACRD hosszútávú dialízisterápia alatti nagyfokú előfordulása azt sugallja, hogy ez a különböző parenchymás vesebetegségekből kialakult végstádiumú vesék természetes és végső sorsa.

Végstádiumú/szerzett cisztás vesékben kialakult vesesejtes tumorok

Vesesejtes tumorok (RCTs, renal cell tumors) nagyobb gyakorisággal fordulnak elő végstádiumú veseelégtelen⁺/-szerzett cisztás (ESRD/ACRD) betegekben, mint az általános populációban, gyakoriak vesetranszplantáltak natív veséiben is. Férfi betegekben 5-7-szer gyakoribbak, mint nőkben, mely előfordulási túlsúly kifejezettebb, mint maga a betegség ESRD/ACRD esetén. Az tumorok megközelítőleg 10%-a kétoldali és kb. 30%-a multifokális. Ugyanakkor a tumorok nagy többsége kevesebb, mint 3 cm átmérőjű és tünet nélkül marad.

Az ESRD/ACRD-hez kapcsolódó vesetumorok közel 50%-a papilláris vagy tubulopapilláris növekedést mutat, míg ez az általános populációban csak 10% körüli. A közelmúltban a szokottól eltérő szövettani és DNS elváltozásokat mutató vesetumorokról számoltak be ESRD/ACRD betegekben. Az egyik ilyen sajátos típust nagy citoplazmatikus vakuolákkal bíró, szolid/papilláris/cisztikus növekedésű nagy eozinofil sejtek jellemzik. Emellett leírtak Ca-oxalát lerakódást nagy eozinofil sejtes, esetenként citoplazmatikus vakuolizációt mutató tumorokban, szitaszerű lyukacsos („cribriform“) növekedést mutató tumorokat vagy „világos sejtes papilláris“ veserákot.

Az egyedi fenotipikus vonások mellett a végstádiumú vesék tumorainak genetikai összetétele is különbözhet a sporadikus esetekre ismert jellemzőtől. Molekuláris genetikai vizsgálatok alapján egyes ESRD/ACRD tumorok genetikai eltérései megfelelnek az általános populáció vesetumoraire jellegzeteseknek, mások viszont nem mutatják – részben vagy egyáltalán – a legtipikusabb kromoszómális elváltozásokat, eltérő genetikai elváltozással bírhatnak vagy nem mutatnak eltérést. Szokatlan tumormegjelenés esetén, egyes ESRD/ACRD tumor diagnózisa és biológiai viselkedése a molekuláris jellemzés ellenére is bizonytalan marad. Bár még további vizsgálatok szükségesek, az elérhető adatok alapján feltehető, hogy az ESRD/ACRD-hez kapcsolódó veserák kifejlődésének kezdeti lépése valamelyest különbözik az általános populációban kialakuló tumorétól.

Az ACRD és a vesetumorok patogenezise

Az atrófiás tubulusokban, valamint a stróma sejtjeiben talált megnövekedett arányú sejtsztódás arra utal, hogy a végstádiumú vese nem egy inaktív szerv. A hisztokémiai és molekuláris genetikai vizsgálatok ellenére a parenchymális és intersticiális sejtek biológiája éppúgy, mint a multiplex ciszták kialakulásához, a veseparenchyma átrendeződéséhez és sajátos típusú tumorok kifejlődéséhez vezető molekuláris mechanizmus továbbra is ismeretlen.

A potenciálisan toxikus urémiás anyagok felgyülemelése miatti toxikus hatásoknak patológiai következményei lehetnek, mint a fokozott genomkárosodás, melyet kimutattak urémiás betegekben,

pl. mint a testvérkromatid-kicserélődés fokozott aránya vagy mikronukleuszok formációja. A DNS-javítás hatékonysága 60% körülire csökkent urémiás betegekben, de közel normális maradt állandó művese kezelésen levőknél.

A mitokondriális DNS (mtDNS) érzékenyebb genotoxikus hatásokra és számottevően magasabb mutációs gyakoriságot mutat, mint a nukleáris DNS. Különböző humán szövetekben fellépő, ismerten leggyakoribb nagyméretű mtDNS deléció, egy 4977 bázispárnyi DNS-szakasz delécióját írták le ESRD betegek vázizomzatában, hajhagymáiban és perifériás vérésejtjeiben szignifikánsan nagyobb gyakorisággal, mint a korban megfelelő kontrollokban. A mtDNS károsodás halmozódhat, a mutációk eltéréseket okozhatnak a légzési lánc csökkent enzimaktivitású tagjaiban, ezzel az intracelluláris reaktív oxigén származékok (ROS, reactive oxygen species) fokozott képződését és felhalmozódását eredményezve. A mitokondriumokat a ROS képződés által az intracelluláris oxidatív stressz legfőbb forrásának tekintik, ezek emelkedett szintje fontos fehérjéket károsíthat, metabolikus utakkal interferálhat, hozzájárulhat a nukleáris genom károsodásához és így tumorok előidézéséhez.

A végstádiumú cisztás vesék biológiájában feltételezték már növekedési faktoroknak és receptoraiknak, úgymint hepatocita növekedési faktor (*HGF*) és receptora, a c-met (*MET*), epidermális növekedési faktor (*EGF*), inzulinszerű növekedési faktor-1 (*IGF-1*), hypoxia-indukált fehérje 2 (*HIF-2*), hypoxia indukált faktor 1 α (*HIF-1 α*), egy speciális vese növekedési faktor, továbbá mitogén anyagok vagy szignáltranszdukciós molekulák (pl. ciklikus AMP) cisztafolyadékban való aktivációjának esetleges szerepét. Proto-onkogének megváltozott expresszióját vagy a c-erbB2 amplifikációját, c-jun aktivációt és a connexin 32 gén hipermetilációját is publikálták. Feltételezték a citokinek, mint interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) és a szerzett cisztákban felhalmozódó vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) szerepét. Felmerült a vese epitheliális sejtjeiben lerakódó Ca-oxalát monohidrát kristályok lehetséges mechanikai hatása, melyek a sejtek génexpressziójának megváltoztatásával proliferációt indukálhatnak.

Az eddig említett tanulmányok csak egy vagy két gént vagy egyfajta genomeltérést vizsgáltak, viszont nem történt szisztémás elemzés a végstádiumú szerzett cisztás vesék molekuláris mikrokörnyezetét illetően.

CÉLKITŰZÉSEK

Az ESRD/ACRD-ben látott dinamikus strukturális változások alapján és mivel a végstádiumú cisztás vesékben kialakuló vesetumороk geno- és fenotípusa különbözhet az általános populációban előforduló esetektől, feltehető a tumorfejlődésnek egy, az ESRD/ACRD speciális mikrokozonyezetét tükröző, alternatív útja.

A következő kérdések merültek fel:

1. Az ESRD betegekben levő urémiás környezet genotoxikus hatásai felelősek-e a genetikai instabilitásért és következésképp tumorok kifejlődéséért?
2. Mely gének és mechanizmusok játszanak szerepet a végstádiumú vesék hiperplasztikus-cisztikus átalakulásában és/vagy a tumorketkezésre való erős hajlamában?
3. Hasonlít-e ez az átalakulás egy szervezetlen embrionális fejlődésre vagy a vesék regenerációjára, avagy egy új típusú betegségnek felel meg?
4. Létezik-e egy közös tényező, mind a veserák kialakulásának magas kockázata, mind a rákos megbetegedés kialakulásának ESRD-ben tapasztalt általánosan emelkedett rizikója tekintetében?

Mindezek tisztázására, célunk volt:

1. a teljes mitokondriális genom szekvenálása ESRD/ACRD betegek, ill. végstádiumú vesékben kialakult veserákok veseparenchyma sejtjeiben.
2. a *VHL* és *MET* gének szekvenálása és genomi eltérések elemzése ESRD/ACRD vesetumороkban.
3. az ESRD/ACRD vesék globális génexpressziós profiljának meghatározása és annak embrionális és felnőtt normál vesékkal, ill. a különböző típusú sporadikus vesetumороkkal való összehasonlítása Affymetrix oligonukleotid microarray alkalmazásával
4. a szelektált gének expressziójának megerősítése az előbb említett szövetek cDNS mintáinak paneljén kvantitatív RT-PCR által
5. a gének által kódolt fehérjék sejt szintű lokalizációjának meghatározása embrionális és felnőtt normál, ill. ESRD/ACRD vesékben, valamint különböző típusú vesetumороkban immunhisztokémia által

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Minták gyűjtése és szövettani diagnózis

ESRD/ACRD betegek veséjéből és vesesejtes tumoraiból származó friss minták, valamint felnőtt normál vesék és különböző típusú sporadikus vesetumorok nagyszámú mintája került gyűjtésre urológiai részlegeken Németországban (Heidelberg, Bad-Hersfeld), az Egyesült Királyságban (Oxford Radcliffe Hospital), Magyarországon (Budapest), Ausztriában (Linz) és Szlovéniában (Ljubljana). A végstádiumú vesékben az ACRD diagnózisát akkor állítottuk fel, ha a szekunder cisztás elváltozások a veseparenchyma legalább 40%-át elfoglalták. Az ESRD és nem ESRD vesetumorok hisztopatológiai diagnózisát a Heidelbergi Klasszifikáció, valamint Tickoo és munkatársai (2006) munkája alapján határoztuk meg.

Nefrektómiát követően a friss veseparenchyma szövet és a tumorszövet egy része – a tumorszövetnek egy, sejtkultúrára és citogenetikai analízisre használt része mellett – folyékony nitrogénben hirtelen fagyasztásra, majd -80°C -on tárolásra került DNS-, RNS- és fehérjeanalízis céljából. A megmaradt tumorszövetet és maradék nefrektómiás anyagot 4%-os pufferolt formaldehidben fixáltuk szövettani vizsgálatokhoz. Rendelkezésre álltak még paraffinba ágyazott minták 21 ESRD/ACRD veséből szövettani elemzésre. A 13, 18 és 19 hetes terhességből nyert főtális vesék mintái legális abortust követően a Pécsi Tudományegyetem Nőgyógyászati Klinikájáról származtak.

Mitokondriális és genomi DNS analízise

A végstádiumú vesékből kiinduló tumorok genomi DNS-ét a standard eljárás szerinti fenol-kloroform módszerrel izoláltuk. A tumorsejteket az abban megfelelő tapasztalattal bíró patológus (Prof. Kovács) szeparálta a strómális sejtektől invert mikroszkóp alatt. A kontroll DNS-t a megegyező normál veseparenchyma anyagból vontuk ki ugyanezen módszerrel.

Huszonnégy, a teljes 16 569 bázispárnyi mtDNS-nek körülbelül 900 bázispárnyi szakaszait átfedő primer párt terveztünk. A „forward“ és „reverse“ primerek 5' végükön az UP21 (forward) és RP29 (reverse) univerzális primerek szekvenciáival voltak toldottak, mely lehetővé tette a polimeráz láncreakció (PCR, polymerase chain reaction) termékek direkt szekvenálását. A PCR termékek szekvenáló reakcióját az IRD700 festékkel jelölt UP21, valamint az IRD800 festékkel jelölt RP29 univerzális primereket használva a SequiTherm EXCEL™ II Long-Read DNA Sequencing Kit által, a gyártói előírások szerint végeztük. Egyes minták direkt szekvenálása olvashatatlan szekvenciákat adott a D-loop régió poly(C) szakaszától kezdve, mely ezen minták vektorba való klónozását tette szükségessé. A PCR fragmentumokat ligációt követően XL1-Blue szuperkompetens sejtekbe

transzformáltuk, majd a plazmid DNS-t a megfelelő IRD700- és IRD800-jelölt primerekkel szekvenáltuk.

A szekvenált DNS-szakaszok szeparációjára 66 cm-es poliakrilamid gélen elektroforézist végeztünk a LI-COR Long ReadIR² 4200 automata DNS szekvenáló által, mely az IRD700 és IRD800 festékeket detektáló kettős lézerrendszerrel dolgozik. A gyűjtött adatokat az e-SeqTM software segítségével elemeztük két független, a 700 és 800 nanométeres csatorna adatait mutató képfájlt létrehozva. A veseparenchyma sejtek és a vesetumорок olvasott mtDNS szekvenciáit összevetettük a Mitomap adatbázisban (<http://www.mitomap.org>) megadottal.

A *VHL* és *MET* gének szekvencia analízise

A *VHL* (von Hippel-Lindau) gén 3 exonját szekvenáltuk 11 ESRD/ACRD tumor (6 konvencionális és 4 papilláris veserák, 1 onkocitóma) és 128 sporadikus konvencionális veserák genomi DNS-éből. A *MET* gén proteinkináz doménje 16-19-es exonjának szekvenciáit hasonlóan elemeztük 5 (4 papilláris és egy ACRD-hez társuló eozinofil típusú) ESRD/ACRD tumorban. Mindkét esetben, az amplifikációt, majd a megfelelő UP21- és RP29-toldott primerekkel való reamplifikációt követően a mintákat direkt szekvenáltuk az IRD700 és IRD800-jelölt primerekkel a Thermo SequenaseTM Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit által a megadott útmutatást követve. A poliakrilamid gélelektroforézist 41 cm-es gélen végeztük LI-COR Long ReadIR² 4200 automata DNS szekvenálón. Az adatokat az eSeq2.0 (*VHL*), ill. a BaseImagIR (*MET*) szoftverek segítségével elemeztük, majd összevetettük a referencia szekvenciákkal.

CGH (Comparative Genomic Hybridization)

Tizenegy ESRD/ACRD beteg 20 vesetumorát vizsgáltuk a genomi DNS eltérései irányában az Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH-t alkalmazva. A nagy molekulásúlyú DNS-t rövid idejű sejt kultúrából izoláltuk, míg 5 normál veseparenchymából fenol-kloroform módszerrel nyert, nemből illesztett DNS pool-ját használtuk, mint referenciát. A DNS fragmentáció és jelölés az Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis felhasználói útmutató (versus 3.1) alapján történt. A további hibridizáció a 4x44K array-re (AMADID 014950), a mosás és szkennelő eljárások a Genomics Core Facility-nél, az EMBL-ben (European Molecular Biology Laboratory; Heidelberg, Németország) történtek a gyártói útmutató szerint.

Az Agilent Feature Extraction software (v. 9.5) által szűrt és normalizált, valamint Agilent CGH Analytics (shot time free trial v. 3.4) szoftver felhasználásával elemzett, beolvasott microarray képfájlból (.tif) további adatok kerültek kivonásra. Egy adott mintában az eltérés statisztikailag szignifikáns régiói az ADM-2 algoritmus által kerültek meghatározásra, 6.0 értékű érzékenységi

küszöb és 1 Mb-os csúszó átlagolásos ablak szerint. A kópiaszám nyeresét mint \log_2 ratio >0.3 , a kópiaszám vesztesét mint \log_2 ratio <-0.3 definiáltuk.

Génexpressziós analízis

Az expressziós analízishez ESRD/ACRD vesékből, normal embrionális és felnőtt vesékből, valamint különböző típusú, embrionális is tartalmazó vesetumorokból totál RNS-t izoláltunk TRIzol[®] reagenssel a standard eljárás szerint.

Globális génexpressziós analízis Affymetrix platform használatával. A totál RNS mintákat az RNeasy Mini Kit segítségével megtisztítottuk. Hat ESRD/ACRD veséből, normál vesékből, Wilms' tumorokból, papilláris veserákokból és progresszióval vagy anélkül járó konvencionális veserákokból, valamint vese onkocitómákból való legjobb minőségű RNS-t a felsoroltak szerinti pool-okba gyűjtöttük.

A komplementer RNS szintézise és array hibridizációja az Affymetrix Screening Service által a German Resource Center for Genome Research-nél Berlinben történt. A magas minőségű komplementer RNS-ből mindegyik mintát egyszer hibridizálták az Affymetrix Human Genome U133 A és B array készletre. A leolvasott képfájlokat a GeneChip[®] Operating Software által konvertálták. Az intenzitási adatokat (44.928 próbaszett) MicroArray Suite szoftverrel (v. 5.1) az alapértelmezett beállításokat használva normalizálták és a további feldolgozás Microsoft Excel-ben történt. A génexpresszió értékét a normal felnőtt veséhez, mint alap referenciához viszonyítottuk és a pool-ozott tumormintáknak relatív expressziós értékeket kalkuláltunk.

Az expressziós adatok alacsony dimenziójú kivételében a minták közötti összefüggés felfedésére a korrespondencia analízist használtuk. Azon gének, melyek az ESRD mintákban 2-nél magasabb szignál log arányt mutattak és nulla alá estek csaknem minden más mintában a megfelelő detekciós és változási értékekkel, vagyis specifikusan up-reguláltak voltak ESRD-ben és down-reguláltak a többi szövetben, kerültek kiválasztásra qRT-PCR végzésére. Ezenkívül szintén szelektáltuk azokat a géneket, melyek az ESRD/ACRD minták mellett még fokozott expressziót mutattak egy vesetumor típusban. Az ESRD/ACRD vesékben, ill. különböző típusú vesesejt tumorokban specifikusan kifejeződő gének között a funkcionálisan kapcsolt gének meghatározására a web-alapú DAVID Gene Functional Classification Tool-t alkalmaztuk.

Kvantitatív reverz transzkripció polimeráz láncreakció (qRT-PCR). A komplementer DNS (cDNS) szintézishez totál RNS-t írtunk át SuperScript[™] II Reverse Transcriptase Kit és oligo-dT₂₃ primerek használatával. A primertervezéshez a kiválasztott Affymetrix próbák szekvenciáihoz a NetAffx[™] Analysis Centeren keresztül jutottunk. A primer párokat a képviselt humán génekre és

EST (expressed sequence tag) szekvenciákra a Primer3 primertervező szoftver segítségével terveztük, figyelembe véve az optimális paramétereket, valamint az NCBI (National Center for Biotechnology Information) Reference Sequences (RefSeq) és a Human BLAT Search információit. A primereket az MWG Biotech AG szintetizálta.

A kiválasztott humán géneket és EST szekvenciákat képviselő cDNA fragmentumokat 2 normál főtális (13 és 19 hetes) és 5 normál felnőtt vese, 8 ESRD/ACKD vese, 5 konvencionális, 5 papilláris és 5 kromofób veserák és 5 vese onkocitóma 1:8 hígítású cDNA sorozatán amplifikáltuk a Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix UDG Kit használatával DNA Engine Opticon™ Real-Time rendszerben. A mintákban párhuzamosan a β -aktin gént, mint referencia gént is amplifikáltuk. A vizsgálatokat az Opticon Monitor szoftverrel (v. 1.4) elemeztük.

Immunhisztokémia

Az eredetileg formalin-fixált, paraffinba ágyazott, archivált főtális, normál felnőtt és ESRD/ACRD veséket tartalmazó szövetblokkok, valamint TMA-k (Tissue Microarray) szövetmetszeteit vizsgáltuk immunhisztokémiával. A TMA-kat ESRD/ACRD-asszociált tumorok, valamint az általános populációból származó Wilms' tumorok, konvencionális, papilláris és kromofób veserákok és vese onkocitómák eredetileg formalin-fixált, paraffinba ágyazott anyagiból szerkesztettünk Manual Tissue Arrayer 1 használatával.

Deparaffinizációt, rehidrációt, 9-es és 6-os pH-jú antigen feltáró oldatban 2100 Antigen Retriever készülékben való kezelést, az endogén peroxidáz aktivitást és nem specifikus kötőhelyeket való blokkolást követően a metszeteket egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk a primer antiszérum megfelelő hígításával. HRP-vel (Horseradish Peroxidase) konjugált nyúl és egér ellenes szekunder antitestet alkalmaztunk (MACH 4 Universal HRP-Polymer) 30 percig és a kötött antitestet AEC (amino-ethyl-carbazol) vagy DAB (diaminobenzidine) kromogén oldatokkal tettük láthatóvá. A metszeteket Mayer's hematoxylinnal ellenfestettük majd Ultramont anyaggal vagy Pertex-szel fedtük.

EREDMÉNYEK

Az ESRD/ACRD esetekre és tumoraikra vonatkozó klinikai és szövettani adatokat az értekezés tartalmazza.

Az ESRD/ACRD vesék morfológiája

Az ESRD, valamint az ACRD vesék morfológiája megfelelt a Bevezetésben leírtaknak diffúz hialinizációval (glomerulus, tubuláris bazalmembrán, artériák), a simaizom és endotheliális sejtek

proliferációjával és eozinofil folyadékkal töltött dilatált tubulusokból álló nagy „thyroidizációs” területekkel. ACRD vesékben a ciszták többsége lapos vagy kis köbhámsejtekből álló egyrétegű laphámmal, néhány ciszta magas hengerhámmal volt bélelt. Gyakran mutatkoztak atípusos, proliferatív ciszták is, melyek lehetséges prekursor léziói az ACRD-asszociált tumoroknak.

A mikroszkopikus léziók és tumorok morfológiája

Tizenkét egész, ESRD/ACRD betegekből származó vese 393 paraffinblokkba való feldolgozása 65 kis papilláris, kis és közepes méretű sejtekből álló prekursor léziót, 42 kromofóbveserák-szerű mintázattal bíró prekursor léziót, ill. 24 kis szolid, nagy vakuolákat tartalmazó nagy eozinofil sejteket mutató léziót tárt fel. Mintegy szoros összefüggés a mikroszkopikus méretű prekursor léziók száma és típusa, valamint a tumorok között, a prekursor léziók és a kialakuló tumorok hasonló szövettant mutatnak ESRD/ACRD vesékben. Több szokatlan morfológiájú tumort detektáltunk, mint pl. a világos sejtes papilláris veserák. Néhány papilláris vesetumor citoplazmatikus vakuolákat tartalmazó nagy eozinofil sejtekből állt vagy világossejtes-szerű struktúrákkal vegyülő nagy eozinofil sejteket mutatott. Néhány tumor – akár a citoplazmában, akár a strómában – nagy oxalát kristályokat tartalmazott.

Mitokondriális DNS elváltozások ESRD/ACRD vesékben és tumorokban

A mitokondriális genomban azonosított új szekvencia variánsok. A mind a normál és mind a tumor DNS-ben talált szekvencia variációkat polimorfizmusként osztályoztuk. A hat beteg veséiben 94 polimorfizmust találtunk (személyenként 4-27 db). Ezekből 20 elváltozás új volt, melyet addig még nem rögzítettek a Mitomap adatbázisban. A polimorfizmusok közel fele (94-ből 44) A→G szubsztitúció volt. A polimorf variánsok csaknem mind homoplazmikus formában (100% variáns) mutatkoztak, de volt néhány heteroplazmikus formában is, ahol a variáns a mtDNS körülbelül 50-75%-a. A 69 különböző szekvencia variánsból csak 34 fordult elő a fehérjekódoló régióban, és ezekből 19 (56%) okozott eltérést az aminosav szekvenciában.

Eltérések a D-loop régióban. Két tumorminta egyező T deléciót és a poly (C) szakasz 9 és 11 C nukleotid között változó méretét mutatta heteroplazmikus formában a mtDNS kontroll régiójában. Két esetben találtunk egy C deléciót egy másik poly (C) helynél a 303-309 nukleotid pozíciókban. A 6 normál veséből egy normálisan 5 haplotípussal bíró (CA)*n* ismétlődési szakaszban, az 514-es nukleotid pozícióban volt két, egyenként egy, ill. két CA inszerciót mutató vese, de a megfelelő tumorsejtekből nem volt allélikus eltérés.

Szomatikus mtDNS mutációk ESRD/ACRD-asszociált tumorokban. A hét tumorban 9, kizárólag a tumorsejtekből előforduló szomatikus nukleotid elváltozást azonosítottunk, melyekből 8

homoplazmikus formában volt (részletezve az Értekezésben). A mutációk nukleotid szubsztitúciók voltak 6 tumorban (4 G→A, 1 A→G és 1 T→C szubsztitúció). Emellett 3 esetben detektáltunk egy-egy C és egy T inszerciót, ill. egy A deléció. Az egyik, a *MT-ND2* (mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2) gén kódoló régiójában előforduló G→A szubsztitúció az aminosav szekvenciában egy alanin-threonin (Ala–Thr) cseréhez vezetett, míg a C inszerció és az A deléció kereltolódásos „frameshift” mutációt okozott a *MT-ND4* és *MT-ND5* génekben.

A *VHL* és *MET* gének mutációi ESRD/ACRD tumorokban

A 3 *VHL* exon kódoló régiójában, a 128 általános populációból származó konvencionális veserákból 71-ben (55.5%) összesen 82 mutációt detektáltunk: 45 pontmutációt (54.9%), 30 deléció (36.6%) és 7 inszerciót (8.5%). Hét esetben kettős és 2 esetben hármas (két kodonban) mutáció volt. A 11 ESRD/ACRD vesetumort vizsgálva csak konvencionális veserákokban igazolódott mutáció. A hatból 5 konvencionális veserákban (83%) összesen 5 mutáció fordult elő: 3 pontmutáció, mely az aminosav szekvencia megváltozásával járó missense (másértelmű) mutációt okozott, ill. 2 deléció, mely az olvasási keret korai terminációt okozó eltolódásával járt. A *VHL* gén mutációja nagyobb gyakoriságúnak mutatkozik végstádiumú vesékben (83%) kialakuló konvencionális veserákokban az általános populációban (55%) előfordulókhöz képest. Az öt vizsgált ESRD/ACRD tumor *MET* proto-onkogénjének 16-19-es exonjaiban nem fordult elő mutáció.

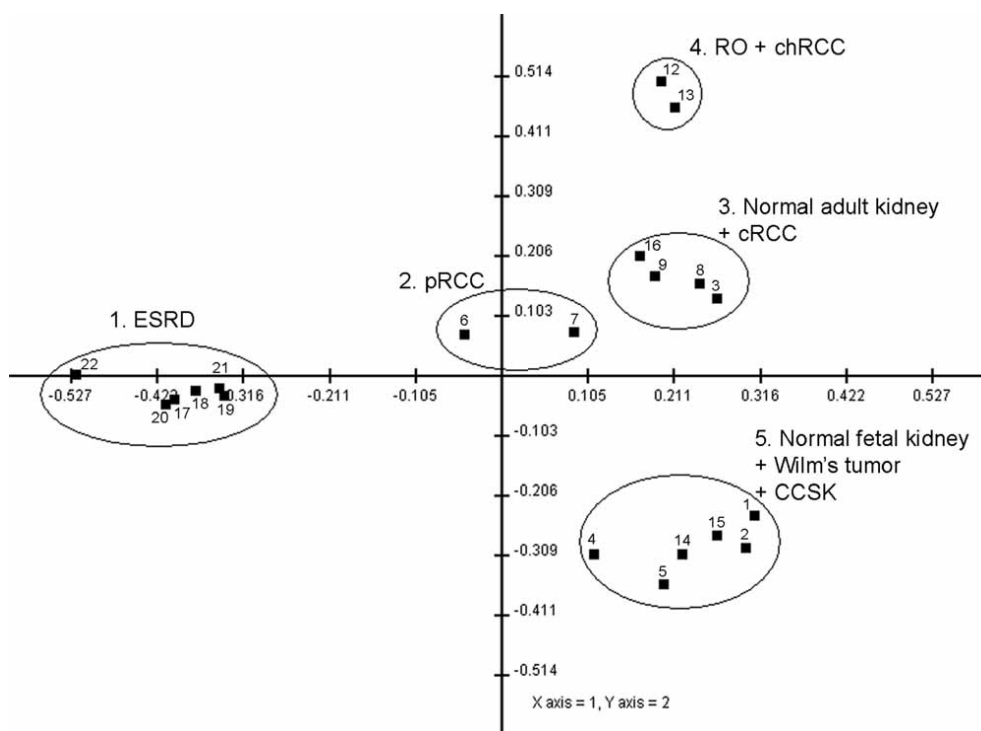
Genomikus eltérések ESRD/ACRD tumorokban

A 7 konvencionális veserákból mindegyik mutatta a jellegzetes kópiaszám veszteséget a 3p kromoszómakaron. Ugyanakkor az ötből csak 2 papilláris vesetumor mutatta a karakterisztikus kromoszómális nyerést, míg 2 közülük csak a 3-as vagy a 7-es és 16-os kromoszómán mutatott kópiaszám nyerést. Az ACRD-asszociált eozinofil tumor hasonló elváltozásokkal bírt az utóbbi 2 papilláris vesetumorhoz. A 17p kromoszómakar vesztese gyakran fordult elő kromofóbveserák-szerű tumorban. Nem volt eltérés a vese oncocitómában és a világos sejtes papilláris veserákban.

A végstádiumú vesék génexpressziós mintázata

Korrespondencia elemzés. A normal főtális és felnőtt vesék, valamint ESRD/ACRD vesék és különböző típusú sporadikus vesetumorkorrespondencia elemzése a minták 5 halmazát rajzolta ki. Az ESRD/ACRD-nek megfelelő 1-es csoport mintái (17-22) messze esnek a centrális résztől és jól szeparáltak a vese többi, normál és tumoros kondícióit képviselő halmazoktól. Mindez egy sajátos expresszió mintázatot jelez (1. ábra).

Kiválasztottunk 69 gént, mely a normál felnőtt vese ellenében specifikusan fokozott kifejeződést mutatott. Ezek közül a normál és ESRD/ACRD vesék, valamint különféle sporadikus vesetumorok cDNA paneljén végzett kvantitatív RT-PCR vizsgálatok 47 gén kiemelkedő expresszióját erősítették meg, melyekből 21 kizárólag a végstádiumú vesékben, és 9 kizárólag a végstádiumú vesékben és a papilláris veserákokban expresszáldott, feltételezve a két betegség közötti összefüggést. A legmagasabb mértékű kifejeződést végstádiumú vesékben a *LINC00973* mutatta, ezt követték a *CSF2*, *SCEL* and *GPR87* gének (lásd alább), melyek közül a *SCEL* a papilláris vesetumorokban is fokozottan expresszáldott.



1 ábra. A microarray vizsgálat korrespondencia elemzése.

cRCC: konvencionális, pRCC: papilláris, chRCC: kromofób veserák; RO: vese onkocitóma; CCSK: clear cell sarcoma of the kidney

Független hierarhikus csoportba rendezés (clustering). Az adatoknak a normál vese kifejeződési szintjére való normalizálását követően a független analysis az ESRD/ACRD vesék és papilláris veserákok, a kromofób veserákok és vese onkocitómák, a konvencionális veserákok, valamint a gyermekkori tumorokkal együttesen a főtális vesék, mint nagyban elkülönülő csoportok (cluster) különböző globális génexpressziós mintázatát tárta fel. SAM (Significance Analysis of Microarrays) elemzés történt az elérhető permutációs számokkal és fold-change 2.0 változóval a manuálisan kiválasztott próbakészletek, mint az ESRD/ACRD vesékkal, ill. az ESRD/ACRD vesékkal és papilláris veserákokkal társított transzkriptek statisztikai szignifikanciájának becslésére.

Eredményképpen, 54 (ESRD/ACRD vese), ill. 42 (ESRD/ACRD vese és papilláris veserák) transzkript mutatott fokozott kifejeződést a többi mintához viszonyítva.

A legmagasabb expressziót mutató gének elemzése

LINC00973 (Hs.307772). A *LINC00973* a 3-as kromoszóma pozitív szálán a 98699902-98701940 bázispárokra terjedő szakasz (Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 973), mely egy RNS gén és a fehérjét nem kódoló RNS-ekhez tartozik. Funkciója még nem ismert, biológiai folyamatban való részvételéről adatot meg nem publikáltak. Kizárólag a végstádiumú vesékben detektáltuk az expresszióját, emellett magas kifejeződést mutatott a tízből 5 ESRD/ACRD-asszociált vesetumorban.

Kolónia stimuláló faktor 2 (CSF2). A granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor 2 (*GM-CSF* vagy *CSF2*) a granulociták és makrofágok differenciálódását és funkcióját kontrolláló citokin. A kvantitatív RT-PCR vizsgálat csak az ESRD/ACRD vesékben igazolta a *CSF2* kifejeződését az általános populációból származó tumormintákban való expresszió nélkül. Immunhisztokémiával a *CSF2* fehérje diffúz kifejeződését figyeltük meg az atrófiás, átépült és cisztikusan dilatált tubulusokban.

Sciellin (SCEL)

A sciellin kifejeződése ESRD/ACRD vesékben és tumorokban. A *SCEL* gén által kódolt fehérje a terminálisan differenciált keratinociták elszarusodó sejtborítékának („cornified envelope”) egy prekursor fehérjéje és ezen sejtborítékban a fehérjék összeállításában vagy szabályozásában van funkciója. Csak a bőr, a vagina és nyelőcső elszarusodó epitheliális sejtjeiben, ill. ezen sejtekből kialakuló tumorokban fejeződik ki, de nem várható parenchymás szervekben. Ennek ellenére ez volt a harmadik legkifejezettebben expresszálandó gén ESRD/ACRD vesékben és egy konzekvens *SCEL* kifejeződés volt látható a papilláris vesetumorokban, míg az általános populációból származó többi típusú vesetumorban nem.

A normál (fötális és felnőtt) vesék extrém alacsony expressziójához viszonyítva a *SCEL* molekulák magas kópiaszámát detektáltuk a 12-ből 10 ESRD/ACRD vesében és a 11-ből 5, ezen vesékben kialakuló tumorban, beleértve az ACRD-asszociált papilláris világos sejtes tumort és a nagy vakuolizált eozinofil sejtekkel bíró tumort is. Ezen adatok alapján a sciellinnek szerepe lehet az ESRD/ACRD vesék és az abban kialakuló vesetumorok kifejlődésében szerepet játszó proliferatív folyamatokban.

Vizsgáltuk a *SCEL* gén két splice variánsának expresszióját is RT-PCR és azt követő agaróz gélen való vizualizálás által. Mindegyik ESRD/ACRD vesében és sporadikus papilláris vesetumorban

mindkét splice variáns kifejeződött a hosszabb, 2-es transzkript variáns (12-es exon beékelődésével) kifejezett túlsúlyával, de nem volt látható expresszió a normál vesékben, Wilms' tumorokban, ill. a sporadikus konvencionális és kromofób veserákokban és vese onkocitómákban.

A sciellin fehérje expressziója ESRD/ACRD vesékben és vesetumorokban. A felnőtt vesékben pozitív festődés csak a disztális kanyarulatot csatornában volt látható. A hegesedő végstádiumú vesében egyes vagy csoportokba rendeződő epitheloid sejtek, kis tubulusok és a papillaris sejt-növekedést tartalmazó dilatált tubulusok is pozitívan festődtek. Pozitivitást találtunk a sporadikus papillaris veserákokban és a végstádiumú vesében kialakult kis papillaris prekursor léziókban. Az általános populációból származó konvencionális és kromofób veserákok, vese onkocitómák és Wilms' tumorok negatívak voltak az SC4 antitestre.

A SCEL és VDUP1 (Vitamin D upregulated protein 1) gének expressziója ESRD/ACRD vesékben. A sciellin és VDUP1 fehérjék interakciójából és az ESRD betegek alacsony $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ (aktív D-vitamin) szérumból kiindulva, a sciellinhez hasonlóan megvizsgáltuk a VDUP1 kifejeződését is kvantitatív RT-PCR által ugyanazon a normál és végstádiumú vesékből, ill. különböző típusú sporadikus vesetumorokból álló panelen. A normál veséken és a különböző típusú vesetumorokon a VDUP1 általánosan kifejeződött, de a végstádiumú vesék és Wilms' tumorok nem vagy csak nagyon alacsony expressziót mutattak.

G Protein-Coupled Receptor 87 (GPR87). A GPR87 volt az egyik legfokozottabban kifejeződő gén az ESRD/ACRD vesékben a normál és a különféle tumoros vesékhez viszonyítva a panelünkben. A végstádiumú vesék mellett csak a gyűjtőcsatorna karcinómája mutatott hasonló, ill. néhány onkocitóma gyenge expressziót. Immunhisztokémiával a kéregbeli glomerulusok vas afferense mutatott határozott reakciót felnőtt, ill. a gyűjtőcsatorna külső medullaris sejtjeiben látszott egy enyhe reakció főtális és felnőtt normál vesében. Az ESRD/ACRD vesékben és hasonlóan a kromofóbveserák-szerű prekursor léziókban és tumorokban egy erős pozitivitás mutatkozott a külső medullaris régióknak megfelelő kis proliferáló arteriolákban.

A kiválasztott gének funkcionális klasszifikációja

Az ESRD/ACRD vesékben specifikusan kifejeződött 47, kvantitatív RT-PCR által megerősített gén között a web-alapú DAVID Gene Functional Classification Tool használatával a funkcionálisan kapcsolódó gének két csoportját azonosítottuk.

1. csoport: A gyulladás folyamatával kapcsolatos gének. Öt kemokin gén, a CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6 a C-X-C típusú és a CCL20 a C-C típusú kemokinek kerültek egy csoportba, magas dúsítási pontszámokkal, amikor az osztályozási szigorúságot a „legmagasabb”-ra állítottuk.

Emellett a *CXCL8 (IL8)* is e csoportban határozható meg „magas” szigorúsági szinten. Kettő a végstádiumú vesékben qRT-PCR alapján fokozottan expresszált 47 génből, *CSF2* és *IL6* is ide rendelhető, melyek szintén a citokinek nagy csoportjához tartozó fehérjéket kódolnak. Nem vagy csak minimális expressziót detektáltunk normál, nem-ESRD vesékben. Ezen adatok arra utalnak, hogy a gyulladásos citokinek központi szerepet játszhatnak a végstádiumú vesékben zajló remodelling folyamatokban és az ACRD kialakulásában.

A *CXCL8* és a *CXCR2* expressziója és sejtszintű lokalizációja. A *CXCR2 (IL-8R2)* receptor-fehérje és egyik ligandja, a *CXCL8* citokin kifejeződését immunhisztokémiával, ugyanazon metszeteken tanulmányoztuk végstádiumú vesékben és a kapcsolódó tumorokban. A szklerotikus területek kis atrófiás tubulusainak döntő többsége, kis tubuláris és tubulopapilláris léziók, ESRD/ACRD-asszociált prekursor léziók, éppúgy mint a kromofób veserákkal hasonlatos kis tumorok mindkét antitestre pozitív festődést mutattak. Az egy- vagy többretegű epithéllal bélelt kisebb vagy nagyobb ciszták az ACRD vesékben erősen pozitívak voltak. A felnőtt és főtális normál vesék negatívak voltak *CXCL8*-ra. Összefoglalva, hasonló struktúrák mindkét antitesttel festődést mutattak, mely általánosan gyengébb intenzitású volt a *CXCR2*, mint annak ligandja, a *CXCL8* esetében.

Az *SAA1* és az *LBP* akut fázis proteinek expressziója. Mivel az akut fázis válasz génjei szintén fontos átvivői lehetnek a gyulladásos szignáloknak, megvizsgáltuk az *SAA1* (serum amyloid A1, a fenti SAM analízisben szintén azonosított gén) és az *LBP* (lipopolysaccharide binding protein, kifejeződik invazív konvencionális veserákokban) fehérje expresszióját. Mindkét fehérje kifejezett expressziót mutatott a végstádiumú vesék kis vagy dilatált tubuláris sejtjeinek nagy többségében. Az *LBP* fehérje magasan kifejeződött a végstádiumú vese fibrotikus strómájában, míg az *SAA1* expresszió itt kevésbé volt intenzív. Egy gyenge citoplazmatikus reakció volt látható gyengült sejtmembrán *SAA1* festődéssel számos ESRD/ACRD-asszociált tumorban. Az ESRD/ACRD vesékben kialakult konvencionális veserákok, éppúgy mint a kromofóbveserák-szerű karcinómák középestől erősig terjedő *LBP* festődést mutattak.

2. csoport. Megváltozott citokeratin összetétel: Egy másik csoportot a keratinok alkottak, a *KRT7*, *KRT19*, *KRT81 (KRTHB1)* és a *KRT23* a „legmagasabb”-ra és a *KRTAP2-2* a „magas”-ra állított szigorúsági szinten. A *KRTAP2-2*, *KRT81* és a *KRT23* csak a végstádiumú vesékben, míg a *KRT19* és a *KRT7* a papilláris vestumorokban is fokozottan kifejeződött. A kódolt fehérjéknek az epidermális fejlődésben és fenntartásban játszott szerepe alapján a *SCEL*, ill. a *C15orf48 (NMES1)*, normal mucosa of oesophagus specific 1) is ehhez a funkcionális csoporthoz rendelhető. Az *AREG* gén egy, a normál epithelsejtek növekedését elősegítő autokrin növekedési faktort kódol. Az

egyrétegű epithelsejtek normálisan egy pár, egy-egy I-es és II-es típushoz tartozó keratint expresszálnak, mint a *KRT8* és *KRT18*, melyek heterodimert alkotnak. A specifikusan kifejeződött gének funkcionális analízise azt jelzi, hogy az ESRD/ACRD vesékben a proliferáló sejtek a *KRT7*, *KRT19* és *KRT23* expresszáásával megváltoztatják keratin profiljukat. Normál vesékben a *KRT7* és a *KRT19* fehérjék a gyűjtőcsatorna sejteiben és a Henle-kacs vékony felszálló szárában fejeződnek ki.

Diffúz *KRT7* festődést találtunk az ESRD/ACRD vesék közel minden területén, a kis atrófikus és a dilatált tubulusokban, utóbbiakban egyértelműen a lumenükben lévő papilláris növekedéssel, valamint az ESRD/ACRD-asszociált papilláris vesetumorokban. *KRT7* immunopozitivitás igazolódott a papilláris és a kromofóbszerű prekursor léziókban és az ESRD/ACRD-asszociált kromofóbszerű veserákban. Mint a *KRT7* esetében, diffúz *KRT19* pozitivitás volt detektálható az ESRD/ACRD vesék kis atrófiás, a normál kinézetű vagy dilatált tubulusainak túlnyomó többségében. A tubuláris vagy papilláris növekedéssel bíró tumorok minden sejte erős pozitív *KRT19* immunfestődést mutatott. A konvencionális veserákok konzekvensen negatívak voltak *KRT7*-re, de elszórt pozitivitást mutattak a *KRT19* antitestre.

MEGBESZÉLÉS

A toxikus hatások felelősek a tumorfejlődés megnövekedett kockázatáért?

A mitokondriális DNS mutációja. Vizsgálataink a mtDNS magasabb mutációs arányát mutatták a végstádiumú vesék tumoraiban (9 vesetumorból hétben összesen 9 szomatikus mutáció), melyet általában más típusú malignitásokban (23-70%) találtak. Ez megfelelhet a vese parenchymális sejtekben emelkedett ROS szintnek ESRD-ben, melyet az urémiás állapot vagy fenntartott dialízis következményének gondolnak. A mitokondriális genomban leírt legtöbb szomatikus mutáció nukleotid tranzíció, mely megfelel a ROS-indukálta nukleotid változásoknak, és homoplazmikus, mely a mutáns mtDNS szelektív replikációs előnyét feltételezi. Úgy gondoljuk, hogy a szomatikus nukleotid elváltozás az ESRD tumorokban a tumorigenezis nagyon korai fázisában történik, valószínűleg a progenitor sejtekben, és a tumorprogresszió alatt szelektálódik, mint homoplazmikus mutáció.

A magas arányú sejtosztódással járó cisztikus átépülés alatt a sejtek különböző stimulusok által aktiválódnak, ROS-t termelnek, mely mint szekunder messenger más sejtes jelátviteli utakat stimulál. Van egyfajta kommunikáció a sejt redox státusza és a jelátviteli utak között, mely a programozott sejthalálhoz vagy sejtproliferációhoz vezethet, a cisztikus átépülési folyamatokhoz mindkettő szükséges. Feltehető, hogy endogén vagy exogén toxikus hatások a megnövekedett ROS

szinten keresztül elősegítik a sejtproliferációt és ezen összetett úton hozzájárulnak a tumorok kialakulásához, melyeknek magas arányban lehetnek ROS-specifikus mtDNS mutációik.

Genomikus instabilitás, a VHL gén mutációja. Bár csak kevés ESRD/ARCD tumort tudtunk alávetni a *VHL* gén mutációs analízisének, a nagy mutációs gyakoriság (83%) szemben az általános populáció konvencionális veserákjaiban megfigyelttel (55%) az urémiás toxikus állapot és a *VHL* gén mutációjának okozati összefüggésére utalhat. Az ESRD/ARCD-ben megnövekedett ROS szint és a hipoxiás mikrokörnyezet szintén felelős lehet a magasabb mutációs rátáért, a sejtek fokozott proliferációja pedig fixálhatja a mutációkat a tumorigén sejtek kiindulási populációjában.

A Virchows-féle hipotézis felidézése: a gyulladós mikrokörnyezet

Szisztémás elemzésünk a jellegzetes gének egy, a kemokin családnhoz tartozó funkcionális csoportját azonosította, melyek specifikusan kifejeződnek ESRD/ACRD-ben. Ezek a kemokinek egy sejtfelszíni jelátviteli egységet alkotnak a *CXCL8 (IL8)* receptoraival, a *CXCR1* és *CXCR2* receptorokkal. Korábbi megfigyelések alapján, ezen résztvevők kemotaktikus és angiogén aktivitást közvetítenek különböző sejtípusokon vagy stimulátor hatásuk van a növekedésre vagy differenciációra (pl. *CCL20*, *IL6* vagy *CSF2*), neoplasztikus sejtranszformációt idézhetnek elő (pl. *CXCR2* aktiváció) és szignifikáns szerepet játszhatnak a tumorsejtek proliferációjában vagy inváziójában (mint az *IL8*).

A gyulladós mikrokörnyezetet a végstádiumú vesében a strómális és az infiltráló immunsejtek alakítják, és ezek a változások aktiválják a gazdaszervezet immunrendszerét, beleértve az akut fázis választ. Másrészt, a ráksejtek kialakítják saját mikrokörnyezetüket gyulladós mediátorok és akut fázis proteinek de novo termelésével. A végstádiumú vesékben és társuló tumoraikban mindkét akut fázis válasz protein, az *SAA1* és az *LBP* kifejeződik. Az *LBP* egy CD14 által felerősített mechanizmuson keresztül katalizál egy jelet egy TLR4-et (Toll-like receptor 4) tartalmazó receptorkomplexhez, mely proinflammatorikus citokinek (mint az *IL6*) felszabadulásához vezet. Egyes citokinek, mint a *TNF-alpha* és *IL6* szintén lényeges szerepet játszhatnak. Mind a *TNF-alpha*, mind az *IL6* szabad gyököket indukál vagy szinergisztikusan beindítja a *TGF-béta* szignalizációs utat és így előmozdítja az epitheliális-mesenchymális átalakulást és tumor invazivitást.

Eredményeink visszaidézik Virchow megfigyeléseit, hogy a rákos megbetegedések nagyobb eshetőséggel fordulnak elő a krónikus gyulladás helyein. Annak megállapítása, hogy számos gén kizárólag ESRD/ACRD-ben és a társuló tumorokban expresszálódik, arra utal, hogy a gyulladós mikrokörnyezet ESRD/ACRD-ben kapcsolatba hozható a tumorfejlődéssel. Ezen megfigyelés

tovább erősíti feltevésünket a specifikus molekuláris mikrokörnyezet szerepéről az ESRD/ACRD-ben látott szokatlan típusú tumorok kialakulásában, mely felülírja az általános populációban kialakuló vesetumorokban előforduló specifikus genomi eltéréseket.

A vesesejtek megnövekedett képlékenysége a vese átépülése alatt

Krónikus vesebetegségben a nefron sejtjei fokozatosan elvesztik normál funkciójukat és felfüggesztik a terminális differenciálódás programját. A vese proximális tubuláris sejtjei, mint magasan specializált parenchymatózus epitheliális sejtek normál állapotukban csak *KRT8*-at és *KRT18*-at expresszálnak, mely drámaian változhat reaktív állapotokban, mint a gyulladás vagy atrófia. A homeosztatiszikus választ a keratin gének expressziójában való jelentős változások jellemzik. A sejtek *KRT7*-re és *KRT19*-re - néha *KRT17*-re is – átválthatnak és így kettő helyett négy- vagy ötféle keratint expresszálnak. A megnövekedett keratin kifejeződés párhuzamosnak mutatkozik a differenciáció mértékének a csökkenésével.

Normális vesében, a *KRT19* a *KRT7*-hez hasonlóan immunchisztokémiával a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben fejeződik ki. Megfigyelésünk, hogy a *KRT7*, és különösen a *KRT19* ESRD/ACRD-ben közel minden tubuláris struktúrában kifejeződik, nem magyarázható a gyűjtőcsatorna principális sejtjeinek kizárólagos proliferációjával, sokkal inkább tükrözi az összes típusú tubuláris sejt keratinmintázatának váltását *KRT8*-ról és *KRT18*-ról *KRT7*-re és *KRT19*-re. Ez a váltás a keratin expressziós profilban lehetővé teszi új citoskeletális fehérjék formálását, az átépülési folyamathoz és tumorfejlődéshez szükséges megváltozott alakzatot és megnövekedett plaszticitást eredményezve.

Számos más fokozottan expresszált és szelektált gén játszhat lényeges szerepet a remodellingben és a tumorfejlődésben. A *LAMA3*, *LAMB3* és a *LAMC2* a 3 komponense a laminin332-nek, mely – interakcióba lépve más extracelluláris matrix összetevőkkel – a sejttapadás és migráció folyamatában bír szereppel regeneráció, tumorigenezis és metasztázis során. A sejtek proliferációja és migrációja szükséges végstádiumú vesében a normál szerkezet átszervezéséhez és az ESRD/ACRD-asszociált tumorok kifejlődéséhez. A *DCBLD2* (*ESDN*, endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin-like protein) által kódolt fehérje a vaszkuláris simaizomsejtek növekedését szabályozza és a vaszkuláris remodelling egyik markere.

***VDUPI/TXNIP*, szöveti remodelling és megnövekedett tumorrizikó**

A *VDUPI/TXNIP*, mely normál körülmények között számos szövetben kifejeződik, egy multifunkcionális fehérje, melynek része van a celluláris homeosztázis fenntartásában. Növekvő számú adat utal arra, hogy a *VDUPI/TXNIP* a sejtproliferációt és valószínű a sejtek migrációját is

kontrollálja tumorsejtekben. A *VDUPI* alacsony szintje és a scielinnel való felfüggesztett interakciója hozzájárulhat a remodelling folyamathoz és a disztális kanyarulatot tubulusok intenzív proliferációjához. Ezenfelül kapcsolatba hozható azon megfigyeléssel, hogy az ESRD betegek általánosságban emelkedett kockázatot mutatnak rákbetegségre nem minden, de számos szervet illetően.

A legtöbb végstádiumú vesével élő betegnek csökkent szérum $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ szintje és – ahogy mi is kimutattuk – csökkent *CYP27B1* expressziós szintje, valamint lényegesen csökkent *VDUPI/TXNIP* expressziós szintje van, mely ezen faktoroknak az ESRD/ARCD-ben előforduló kiterjedt remodelling folyamatban és valószínűleg a vesetumorok kialakulásának magas gyakoriságában való részvétele mellett szól.

KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk először szolgál bizonyítékkal arra, hogy:

1. A veseparenchyma átépülése ESRD/ACRD-ben egy egyedi génexpressziós mintázattal társul. A specifikus gyulladáson mikrokörnyezet, a megváltozott plaszticitás és sejtproliferációs ráta lehet felelős a nem funkcionáló vesében bekövetkező szerkezeti változásokért és az egyedi fenotípus- és genotípussal bíró vesesejtes tumorok kifejlődésének magas gyakoriságáért.
2. A gyulladáson citokineknek a szabadgyökök magas szintjét eredményező folytonos expressziója a mitokondriális és genomi DNS károsodását és mutációit okozhatja, mely tumorképződéshez vezethet.
3. A multifunkcionális *VDUPI/TXNIP* fehérje végstádiumú veseelégtelen betegek veséiben és más szerveiben való csökkent expressziója, valamint számos molekuláris útvonallal való interakciójának elakadása a celluláris homeosztázis romlásához vezethet és sejtproliferációt, valamint tumorfejlődést indíthat be.

Az ESRD/ACRD vesék szokatlan morfológiájának jellemzésére Heptinstall a „trans-Stygian pathology” (sötétségen túli/pokoli patológia) kifejezést használta a mitikus folyón túli életre utalva. Tanulmányunk rámutat, hogy a krónikus vesebetegek hosszabb túlélésével a vesék egy, az előzőtől különböző „új molekuláris életbe” lépnek. Figyelembe véve, hogy a vesepótló eljárások fejlődésével az említett betegek száma növekszik, s mind több ilyen betegben alakulhat ki malignitás, az ESRD/ACRD és a kapcsolódó tumorok biológiájában közreműködő jelátviteli utak további vizsgálatokat érdemelnek.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni köszönetemet Dr. Kakuk György professzor úrnak a Debreceni Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika és a Nephrologiai Tanszék korábbi, ill. Dr. Balla József professzor úrnak, a Nephrologiai Tanszék jelenlegi vezetőjének nagylelkű szakmai támogatásukért, mellyel tudományos munkámat és külföldi tanulmányutamat lehetővé tették és segítségemre voltak az ösztöndíjak tekintetében is. A tanszék nagyszerű nephrologiai munkacsapatából őszinte és hálás köszönettel tartozom Dr. Mátyus János tanár úrnak, akinek jelentős szerepe volt abban, hogy kapcsolatba léphettem későbbi témavezetőmmel és megvalósíthattam heidelbergi tanulmányutamat. Az ő korábbi szakmai támogatása, példamutatása és barátsága sokat jelent nekem.

Őszinte és mély köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Kovács Gyula professzor úrnak, aki lehetőséget adott az első lépésektől tudományos munkám megvalósításához és ehhez minden szükséges dolgot biztosított a korábbi molekuláris onkológiai laboratóriumban, a heidelbergi Ruprecht-Karls Egyetemen és lehetővé tette a munka befejezését Pécsen. Megtisztelő számomra, hogy számíthattam tudományos útmutatására, kitartó támogatására és motiválására, és hálás vagyok, hogy értékelte erőfeszítéseimet. Köszönettel tartozom minden korábbi laboratóriumi munkatársamnak, akik segítettek a technikai tudás elsajátításában és megosztották velem tapasztalataikat.

Tisztelettel köszönöm Dr. Kovács L. Gábor és Dr. Wittmann István professzor uraknak, hogy az általuk vezetett Doktori Iskolában, ill. Doktori Programban fejezhettem be munkámat a Pécsi Tudományegyetemen. Hálás köszönettel tartozom Dr. Beöthe Tamásnak az egyetem Urológiai Klinikájáról a segítségéért.

Őszinte és mély hálával tartozom családomnak, különösen szüleimnek és hugomnak, hogy mindent megtettek értem és mindig mellettem álltak, ha szükség volt rá. Az értekezést ajánlom szüleimnek, akik folyamatosan szerető gondoskodással támogatják kis családom életét, éppúgy, mint tanulmányaimat.