

# Doktori (PhD) értekezés tézisei

Egyes genetikai és epigenetikai faktorok (miRNS-ek)  
potenciális szerepe a vesetumorok kialakulásában

Dr. Szegedi Krisztián Gábor  
Témavezető: prof. Dr. Halmos Gábor



DEBRECENI EGYETEM  
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola  
Debrecen, 2024

**Egyes genetikai és epigenetikai faktorok (miRNS-ek) potenciális szerepe a vesetumorok kialakulásában**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: dr. Szegedi Krisztián Gábor

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája  
(Farmakológiai programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Halmos Gábor

Az értekezés bírálói:

Dr. Laczkó István, PhD

Dr. Tóth György, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, MTA doktora

tagok: Dr. Tóth György, PhD

Dr. Laczkó István, PhD

Dr. Kvell Krisztián, PhD

Dr. Szatmári István, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

2025. 01. 10. 13 óra

## Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	4
Célkitűzés .....	5
Anyag és módszer .....	6
A szövettani minták előkészítése és RNS izolálás.....	6
DNS izolálás .....	7
PCR amplifikáció.....	8
VHL .....	8
PTEN .....	8
BAP1 gén szekvenálása.....	8
DNS szekvenálás .....	9
Eredmények.....	9
A BAP1 és PTEN mRNS expressziója humán vesedaganat szövetmintákban .....	10
VHL mutációk és IVS1-195 nt G/A polimorfizmus vizsgálata humán vesetumoros mintákban.....	10
PTEN mutációk és polimorfizmus a vizsgált humán vesetumoros mintákban.....	11
A BAP1 gén vad típusának megjelenése a vizsgált humán vesetumoros mintákban .....	12
A miR-21 és miR-221 expressziója ccRCC mintákban.....	12
A miR-21 és miR-221 targetjeinek azonosítása.....	12
Megbeszélés .....	13
Összefoglalás.....	20
Köszönetnyilvánítás .....	22

## Bevezetés

A vesesejtes karcinóma (RCC) egy igen agresszív betegség, amely az összes felnőttkori tumorok 2–3%-át teszi ki, és a 10. leggyakoribb daganatos megbetegedés a humán populációban. Egyben ez a harmadik leggyakoribb urológiai daganat a prosztatata- és hólyagrák után; ennek ellenére a legmagasabb a halálozási aránya, több mint 40. A betegek körülbelül 20–30%-ánál távoli áttétek alakulnak ki már a diagnózis felállításakor. Az összes szövettani típus közül a világossejtes vesekarcinóma (clear cell renal cell carcinoma: ccRCC) a leggyakoribb altípus, amely az összes RCC eset 75–80%-át teszi ki. Korai felismerés esetén a lokalizált RCC műtéti úton kezelhető, és a betegek 5 éves túlélési aránya megközelíti a 85%-ot. Az elmúlt évtizedben elért terápiás fejlesztések ellenére az mRCC kezelése még mindig nagy kihívás a szakemberek számára. A műtéti megoldás csak cytoreduktív jelleggel történhet, ezenkívül a rendelkezésre álló adjuváns terápiák hatékonysága limitált.

A szakirodalom a vesedaganatoknak jóindulatú elváltozásait is említi. Ilyen például a vese angiomiolipóma (AML) és az onkocitóma (oxifil adenoma), melyek a műtéten átesett betegek jelentős részét érintik.

A vesetumorok kialakulásának pontos háttere egyelőre nem teljesen tisztázott. A ccRCC molekuláris biológiájának genetikai és epigenetikai szinten történő feltárása során komplex kölcsönhatást figyeltek meg, amely megváltozott proteomprofil kialakulásához vezet. A ccRCC patogenezisében egyik központi genetikai esemény a Von Hippel–Lindau (VHL) gén inaktiválása, akár szomatikus mutációk, akár promoter hipermetiláció következtében.

Az RCC patogenezisének, genetikai hátterének jobb megértése hozzájárulhat a betegek egyéni genetikai sajátosságaira épülő, a személyre szabott terápiák megközelítéséhez.

A betegek korai felismerése és megfelelő nyomon követése befolyásolhatja a betegség prognózisát is. Ezért szükséges az új biomarkerek megismerése, amelyek lehetővé teszik a beteg korai felismerését, a pontos diagnózis felállítását, valamint akár a nefrektómia utáni korai metasztázisok előrejelzését, és új célzott terápiák kidolgozását.

A mikroRNS-ek (miRNS vagy miR) kicsi, nem kódoló RNS-ek, amelyek fontos szerepet játszanak a karcinogenezis szabályozásában. A tumorszövet a megfelelő normál szövetekhez képest eltérően expresszál miRNS-eket, melyek fontos célfehérjéket szabályoznak a karcinogenezis során. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy ezek összefüggésbe hozhatók számos humán daganat kialakulásával, a miRNS-ek expressziós profilja bizonyos esetekben informatívabb és pontosabb a különböző daganatok osztályozásánál. Nem véletlen az a tény,

hogy miRNS-ek egyre inkább a daganatkutatás középpontjába kerülnek. Egyes miRNS-ek már ma is, a jövőben pedig feltehetőleg még több miRNS lehet potenciális biomarker jelölt a humán daganatos megbetegedések, köztük a vesetumorok diagnosztizálásában és kezelésében egyaránt.

A miRNS-ek változása és az emberi betegségek, köztük a rák, különösen a veserák előfordulása közötti összefüggésről már a szakirodalomban beszámoltak. A miR-21 túlzottan expresszálódik számos humán daganatban, és összefüggésbe hozható a tumoros szövetben megváltozott sejtfolymatokkal. A humán daganatokban leírt miR-21-ről kimutatták, hogy onkogénként hat, mivel számos, a proliferációval, apoptózissal és invázióval kapcsolatos tumorszuppresszor gént céloz meg. *In vivo* és *in vitro* vizsgálatok azt sugallják, hogy a miR-21 diagnosztikai és prognosztikai markerként szolgálhat az emberi rosszindulatú daganatok esetén. A legújabb bizonyítékok azt mutatták, hogy a miR-21 jelentős szerepet játszik a tumorelleses gyógyszerrezisztenciában is. A miRNS-ekkel kapcsolatos szakirodalom azt is mutatja, hogy a miR-21 fokozott expressziója vesesejtes karcinómában összefüggést mutat a betegek alacsonyabb túlélésével. Egyes humán daganatok esetében érdekes módon a betegség stádiuma is korrelál a miR-21 expressziójával. A magasabb patológiai grádussal jellemzett betegek esetében jelentősen magasabb miR-21 expressziót írtak le. A humán daganatokban egy másik miRNS, a miR-221 is igen gyakran kerül említésre. A miR-221-ről kimutatták, hogy számos tumor esetében fontos onkomiR. Szignifikáns összefüggést mutattak ki a miR-221 expressziós szintje és a klinikopatológiai tumorjellemezők között, beleértve a tumor-metasztázist leíró stádiumot (TNM), a lokális inváziót, az áttéteket, a prognózist, a sugárérzékenységet és a tumorelleses gyógyszerrezisztenciát, például vastagbél- és végbélgyulladás esetén.

## Célkitűzés

Ebben a tudományos munkában egy-egy betegcsoportban sor került a bevezetés elején már említett VHL, PTEN és BAP1 mutációinak a vizsgálata alkalmával kapott eredmények bemutatására. Továbbá, egy másik, szintén vesetumorral leírt betegpopuláció ép/tumoros szövetminták párpain a miR-21 és miR-221 expresszióját vizsgáltuk. Úgy a genetikai, mint a miRNS-ekkel történő vizsgálataink során célul tűztük ki azok klinikopatológiai jelentőségének elemzését is a betegek klinikopatológiai jellemzőinek birtokában. Szintén célunk volt VHL, PTEN, BAP1 genetikai eltérések, valamint a miR-21 és miR-221 lehetséges szerepének vizsgálata az RCC tumorigenezisében.

Ahogy az irodalom, de egyben a klinikai gyakorlat is mutatja, sajnos még mindig nincs egyértelmű bizonyíték a vesedaganatok kialakulását magyarázó genetikai és epigenetikai tényezőkre. A nagyszámú diagnosztizált eset ellenére, a kutatók még nem találtak összefüggést a genetikai elváltozások, a betegek klinikopatológiai állapota, prognózisa vagy klinikai kimenetele között. Úgyszintén feltáratlanok tűnik a vesetumork kialakulását befolyásoló epigenetikai tényezők, konkrétan a miRNS-ek szerepe, valamint azok targetjeikkel kialakított interakcióinak jelentősége, melyek szereppel bírhatnak a vese tumorigenezis jelátviteli útvonalainak befolyásolásában, szabályozásában.

## Anyag és módszer

A miR – el történő vizsgálatokhoz 24 tumoros és 24 ép (több mint 3 cm távolságra a tumoros szövetből) szövetminta párt használtunk fel. A szekvenálási vizsgálatainkhoz egy másik betegcsoport, a 2022-2023-as időszakból származó mintái kerültek felhasználásra. Ebben az esetben is 24/24 ép/tumoros szövetminta párokkal dolgoztunk. A minták gyűjtése a Debreceni Egyetem Urológiai Klinikáján vesetumorról diagnosztizált betegek műtétje során történt. A vizsgálatok végzése a Debreceni Egyetem Kutatás Etikai Bizottságának jóváhagyásával végeztük (UD REC/IEC 4831-2017), melyhez minden beteg írásos beleegyezését adta. Azon betegek, akiknek korábbi vagy már meglévő másfajta daganata vagy fertőzése volt, illetve azok, akik sugárterápián, kemoterápián vagy immunterápián estek át, nem vettek részt a vizsgálatokban. A tumorok az UICC (Union for International Cancer Control) TNM osztályozási rendszere alapján lettek csoportosítva, a szövettani grádus pedig a WHO kritériumai szerint lett megadva. A helyi invázió a TNM klasszifikáció segítségével lett értékelve. Minden humán szövetminta metasztatizis nélküli primer tumorból származott. A szövetminták a műtéti eltávolítást követően azonnal folyékony nitrogénbe lettek helyezve, majd -80 °C-on voltak tárolva a további feldolgozásig.

### A szövettani minták előkészítése és RNS izolálás

A szövetek homogenizálása a fagyasztott mintákból a TissueRuptor homogenizátor (IKA GmbH, Németország) használatával történt. A homogenizálást RNS izolálás követte, amely során 20-50 mg tumoros veseszövet és ezek egészséges párjából lett teljes RNS izolálva Trizol

reagens (TR118, Molecular Research Center Inc) vagy NucleoSpin DNS/RNS/Fehérje Kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) felhasználásával a gyártó leírása alapján. Az izolált RNS a további vizsgálatokig RNáz-mentes vízben lett tárolva -80 °C-on. Az RNS minősége 230 nm és 280 nm, mennyisége pedig 260 nm hullámhosszon lett meghatározva az ND-1000 UV Spektrofotométer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) használatával. Amennyiben a fehérjétől mentes tisztaságot meghatározó 260/280 nm-en mért optikai denzitás meghaladta az 1,9 értéket a mintákról cDNS átíratot készítettünk reverz transzkripcióval.

Az izolált totál RNS-ekből a Tetro-cDNS szintézis kit (Bioline, London, Egyesült Királyság) felhasználásával cDNS átíratot készítettünk, a gyártó utasításainak megfelelően. A reakció LightCycler üveg kapillárisokban ment végbe LightCycler 2.0 thermocycler készülékben (Roche GmbH, Németország), 42 °C-on 60 percen keresztül, majd a reakció inaktiválása 95 °C-on 5 percen keresztül történt.

A miRNS prekursorok expresszióját qRT-PCR technológiával vizsgáltuk a LightCycler 480 real-time -PCR készüléket (Roche GmbH, Németország) használva. A reakció kivitelezése 96-lyukú plate-en 20 µl végtérfogatban (8 µl RT termék, 10 µl SYBR Green Master mix és 2 µl PCR primer mix) történt. A miRNS expressziós vizsgálatához szükséges stem-loop specifikus primer párok a Tibmolbiol System (Roche) által lettek megtervezve, majd szintetizálva a miRNS adatbázisban fellelhető humán-specifikus miRNS szekvenciák alapján. Kontroll miRNS-ként a miR-203-as lett választva az irodalomban már korábban leírt stabil expressziós értékek alapján.

A PTEN és a BAP1 gének expressziós szintjét gén-specifikus primerekkel vizsgáltuk 25 µl reakciós végtérfogatban. Pozitív kontrollként MCF-7 humán emlőkarcinóma sejtvonalat használtunk. Az RT-PCR reakció 35 ciklusból állt (95 °C-on 15 másodperc, 60 °C-on 30 másodperc, 72 °C-on 10 másodperc), amit 2 perces extenziós lépés követett 72 °C-on. A PCR termékek GelRed-et tartalmazó 1,5%-os agaróz gélen lettek elválasztva, melyeket UV-alatt detektáltunk az AlphaDigiDoc™ RT készülékkel (Alpha Innotech, Santa Clara, CA, USA). A DNS méretbeli meghatározásához 50 bp-onként azonosítható DNS létrát használtunk (Bioline, London, UK).

## DNS izolálás

A vizsgálatainkhoz használt tumoros veseszövetekből a NucleoSpin DNS izoláló Kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) felhasználásával genomi DNS-t extraháltunk. A DNS minősége 230 nm és 280 nm, mennyisége pedig 260 nm hullámhosszon lett meghatározva a

Nanodrop ND-1000 UV Spektrofotométer (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) használatával. Amennyiben a DNS 260/280 nm-en mért optikai denzitása meghaladta az 1,9 értéket, úgy a minták tisztaságát megfelelőnek tekintettük, és alkalmasnak találtuk a további szekvenálásos vizsgálatokhoz.

## PCR amplifikáció

A VHL, PTEN és BAP1 génmutációk vizsgálata Sanger féle szekvenálási módszerrel történt, amelyhez exon specifikus primerek lettek tervezve és alkalmazva. Az exon specifikus primerek tervezése a vizsgált gének exonok szerinti felépítésén alapult.

### VHL

A VHL gén három exonjának vizsgálatához 4 féle, intron-alapú primer pár lett alkalmazva. Az 1. – es Exon két átfedő primer párral lett amplifikálva. Minden 50 µl végtérfogatú reakcióközeg 100 ng genomi DNS-t, 0,2 mM dezoxinukleotid trifoszfátot, 1 x Green GoTaq<sup>®</sup> Reakció puffert, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 1,25 egység GoTaq<sup>®</sup> DNS Polimerázt (Promega) és 10 pmol/µl primert tartalmazott. A PCR reakció az alábbi protokoll szerint lett kivitelezve: 10 perces kezdeti denaturáció 95 °C-on, melyet 40 ciklus követett 95 °C-on 1 percig, 56 °C-on (exon 3) és 59 °C-on (exon 1A, 1B, 2) 1 percig, 72 °C-on 1 percig, majd egy végső extenziós lépés zárta a folyamatot 72 °C-on 7 percig.

### PTEN

A PTEN gén három különböző, a vizsgálatainkban célul vett exonok 4 intron-alapú, különböző primer párokkal lett amplifikálva. Az 5-ös exon két átfedő primer párral lett amplifikálva (Minden 50 µl végtérfogatú reakcióközeg 100 ng genomi DNS-t, 0,2 mM dezoxinukleotid trifoszfátot (dNTP), 1 x Green GoTaq<sup>®</sup> reakció puffert, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 1,25 egység GoTaq<sup>®</sup> DNS polimerázt (Promega, Bio-Science, Egyesült Királyság) és 10 pmol/µl primert tartalmazott. A PCR reakció az alábbi protokoll szerint lett kivitelezve: 10 perces kezdeti denaturáció 95 °C-on, melyet 45 ciklus követett 94 °C-on 30 másodpercig, 55 °C-on 30 másodpercig, 72 °C-on 30 másodpercig, majd egy végső extenziós lépés 72 °C-on 10 percig.

### BAP1 gén szekvenálása

A BAP1 gén négy exon-ja (exon 14-17) 6 intron-alapú primer párral lett amplifikálva, 3 primer pár használatával Minden 50 µl végtérfogatú reakcióközeg 100 ng genomi DNS-t, 0,2

mM dezoxinukleotid trifoszfátot, 1 x Green GoTaq<sup>®</sup> Reakció puffert, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 1,25 egység GoTaq<sup>®</sup> DNS Polimerázt (Promega) és 10 pmol/μl primert tartalmazott. A PCR reakció az alábbi protokoll szerint lett kivitelezve: 10 perces kezdeti denaturáció 95 °C-on, melyet 40 ciklus követett 95 °C-on 1 percig, 60 °C-on 1 percig, 72 °C-on 1 percig, majd egy végső extenziós lépés 72 °C-on 7 percig.

## DNS szekvenálás

A PCR termékek méretét 1,5 %-os agaróz gél segítségével ellenőriztük, majd a terméket tisztítottuk (DyeEx Spin Kit, Qiagen, London, Egyesült Királyság) és vákuum segítségével betöményítettük (Vacuum Concentrator 5301, Ebbendorf, Hamburg, Németország). A PCR termékek forward és reverz direkt fluoreszcens szekvenálását (hagyományos Sanger szekvenálás) az ABI PRISM 3130 DNS szekvenálóval (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA), valamint a BigDye Terminator v.1.1 Cycle Szekvenáló Kit (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, United States) használatával végeztük el. A szekvenciák a Finch TV szoftver 1.4.0 verziójával lettek elemezve (Geospiza Inc., Seattle, WA, USA), az eredményül kapott szekvenciákat pedig az NCBI referencia szekvenciáival hasonlítottuk össze: NM\_000551.3 a VHL gén, NM:004656.2 a BAP1 gén és NM\_000314.4 a PTEN gén esetében. A szekvenciákban található mutációkat a Humán Gén Mutációs Adatbázis (HGMD) alapján azonosítottuk.

## Eredmények

A vizsgált populációba 24 beteg volt bevonva, akiket a Debreceni Egyetem Urológiai Klinikáján vesetumorról diagnosztizáltak és műtéti eljárásnak vetettek alá. A kioperált szöveti részek hisztopatológiai feldolgozásnak lettek alávetve, mely vizsgálatot gyakorlott klinikai patológus végezte.

A vizsgált 24 beteg között 12 férfi - (50%) és 12 női beteg (50%) volt, átlagos életkoruk 54 évre tehető (36-72 év). A korábban másodlagos rosszindulatú daganatban, kontrollálatlan vagy súlyos fertőzésben szenvedő betegeket, valamint sugárterápián, kemoterápián vagy immunterápián átesetteket kihagytuk a tanulmányból. A vizsgálatba bevont betegek a műtét előtt neoadjuváns terápiában nem részesültek. A betegek terápiás ellátását a sebészeti beavatkozással járó jobb vagy bal nyílt, vagy laparoszkoós nephrectomia alkalmazásával végeztük.

A szövettani vizsgálatok szerint a vizsgált 24 eset közül 20 esetben egyértelműen világossejtes szövettani típust (ccRCC), 2 esetben angiomyolipomát, 1 esetben onkocitómát és 1 esetben papilláris vese carcinóma (pRCC) típust azonosítottak. A TNM klasszifikáció és az osztályozása szerint 8 eset (38,095%) került a G2-es patológiai státuszba, 13 eset (61,53%) tartozott a G3-as patológiai csoportba. A betegek előzetes szokásairól, mint például a dohányzás vagy egyéb környezeti, szociális tényezők nem álltak rendelkezésre adatok.

## A BAP1 és PTEN mRNS expressziója humán vesedaganat szövetmintákban

A BAP1 és PTEN gének mRNS expressziós mintázatának vizsgálata érdekében a humán vesedaganat mintákat RT-PCR vizsgálatnak vetettük alá. A templátmentes (NTC: no template control) és a reverz transzkriptáz mentes kontrollok (RT-NTC) kizárták a nem specifikus amplifikációt és a DNS-szennyeződést. A  $\beta$ -aktinra specifikus primerekkel végzett PCR amplifikáció minden mintában egyetlen terméket eredményezett, ami megerősítette azt, hogy a mintákban nem történt RNS degradáció. Pozitív kontrollként humán emlőcarcinóma sejtvonalat (MCF-7) használtunk. A tumoros veseszövet mintákkal végzett PCR amplifikáció a BAP1 és PTEN gének specifikus oligonukleotid primereivel a PTEN esetében 355 bp, a BAP1 gének esetében 700 bp méretű mintát eredményezett. A BAP1 és PTEN gének mRNS szintű expresszióját mind a 24 vizsgált primer vesetumoros mintában kimutattuk. A továbbiakban a veseszövet mintákból izolált DNS minták felhasználásával történt a VHL, PTEN és a BAP1 gének exon szerinti szekvenálása a Sagner-féle módszerrel. A veseeltávolításon átesett, 24 betegből nyert friss fagyasztott veseszövet mintagyűjtemény felhasználásával elemeztük a VHL gén (1-3 exon), a BAP1 gén (14-17 exon) és a PTEN gén (5-7 exon) mutációit. Ezeket az eredményeket a továbbiakban pontról pontra mutatjuk be.

## VHL mutációk és IVS1-195 nt G/A polimorfizmus vizsgálata humán vesetumoros mintákban

A vizsgálatban használt összes minta a VHL gén mutációira közvetlen szekvenálással lett analizálva. Vizsgálatunkban 6 különböző VHL mutációt (3 missense mutáció, 1 nonszensz mutáció és 2 kis inszerció) igazoltunk a 24 vizsgált beteg mintáiban. Az egyik minta IVS1-195 nt G/A polimorfizmust tartalmazott homozigóta formában, mely a GGAGGAG (54) ATGgGAGGCCGGGC mutációval írható le.

A Human Gene Mutation Database (HGMD) alapján mind a 6 mutáció patogén és von Hippel-Lindau szindrómát okoz. A 6 féle azonosított VHL mutáció közül három az 1. exonban, kettő a 2. exonban és egy a 3. exonban található.

Az 1. exonban azonosított VHL mutációk részletesen megadva a következők voltak:

1. GGAGGAG (54) ATGgGAGGCCGGGC heterozigóta formában: ez egy guanin inszerció az 54. pozícióban;
2. Ser68Term heterozigóta formában: ez egy nonszensz pontmutáció, ahol a szerin-68 aminosav stopkodonná változott;
3. Asn90Ile heterozigóta forma: ez egy missense mutáció aminosavcserével (aszparaginból izoleucinba) a 90. pozícióban;
4. A 2. exonba azonosítva volt a Gly114Arg heterozigóta forma: ez egy misszensz mutáció aminosavcserével (glicinből argininné) a 114. pozícióban;
5. Leu153Pro heterozigóta forma: ez egy aminosav változással járó missense mutáció (leucin prolinná) a 153. pozícióban;
6. A 3. exonban AGTGTAT (157) ACTtCTGAAAGAGC heterozigóta forma: ez egy timin inszerciója a 157. pozícióban.

Az IVS1-195 nt G/A polimorfizmust heterozigóta formában 9 esetben, homozigóta formában 13 esetben igazoltunk. Ez a VHL polimorfizmus (rs779805) egy G/A variáció az 1. exon előtti – 195 nukleotid pozícióban, a VHL gén intron régiójában fordult elő.

## PTEN mutációk és polimorfizmus a vizsgált humán vesetumoros mintákban

Vizsgálatunkban egy PTEN mutációt és egy polimorfizmust igazoltunk 24 egymástól független betegnél. A PTEN mutációt (p.His93Arg) az 5. exonban homozigóta formában detektáltuk. Ez egy pontmutáció, aminosavcserével (hisztidinből argininné) a 93. pozícióban. A HGMD adatbázis szerint a His93Arg mutáció patogén, autizmust és makrocefáliát okozhat. Az IVS5 + 217 nt C/T polimorfizmust az 5. exon után, a + 217. pozícióban detektáltuk. Ez egy heterozigóta formájú C/T variáció.

## A BAP1 gén vad típusának megjelenése a vizsgált humán vesetumoros mintákban

Mintáinkat az irodalmi háttér birtokában a BAP1 gén hot spot exonjaira (14-17. exon) szekvenáltuk. A BAP1 gén hot spot exonjain (14-17) belül egyik elemzett mintában sem volt megfigyelhető mutáció.

Ezen betegek csoportjában hat nő és két férfi tartozott. A betegek közül hat viszonylag fiatalok voltak, életkoruk 36-57 évre tehető, két beteg pedig 72 éves volt. Ezeknél a betegeknél már az első képalkotó vizsgálat alkalmával a tumor viszonylag nagyméretű volt (3-10 cm). Mindezen túl, a VHL mutációban szenvedő betegeknél a korábbi klinikai kórelőzményt is figyelembe véve 2 esetben irtható más tumorokkal történő asszociáltság (méhnyakrák és hólyagrák). A VHL mutációt leírt betegek esetében a vesetumorsejt típusa 3 esetben a világossejtes vese karcinóma szövettani típust mutatta, 2-es és 3-as Grádus fokozattal. Egy VHL mutációval rendelkező betegnél angiomyolipomát, egy másik betegnél pedig onkocitómát (oxifil adenoma) írtak le. Az egyik VHL-mutációban szenvedő betegnél hasnyálmirigy áttétet alakult ki 7 évvel az elsődleges vesetumor megjelenését követően. Ez a beteg tirozin-kináz gátló (Sutent) terápiában részesült.

Egy PTEN mutációval jellemezhető betegnél kis papilláris architektúrájú góccokkal leírható vesetumor, azaz a papilláris forma volt jelen (pRCC). A BAP1 gén (14-17. exon) mutációja egyik betegnél sem volt megfigyelhető. A BAP1 gén (14-17. exon) minden vizsgált esetben vad típust mutatott.

## A miR-21 és miR-221 expressziója ccRCC mintákban

A miR-21 és miR-221 expressziója mind a 24 vizsgált tumorszövetben szignifikánsan magasabb expressziót mutatott a szomszédos normál szövetekhez képest (a miR-21 és miR-221 esetében  $p \leq 0,001$  és  $p \leq 0,05$ ) (21. Ábra, 16. Táblázat). Páros mintákra végzett t-teszt, amely p-értékeket és 95%-os konfidencia intervallumot mutat be minden vizsgált miRNS-re (miR-21 és miR-221), tumoros szövetben a szomszédos normál szövethez képest.

## A miR-21 és miR-221 targetjeinek azonosítása

Összességében 3 adatbázist (miRanda, PicTar és TargetScan) használtunk a miR-21 és miR-221 mRNS targetjeinek keresésére. Eredményeink és adatbázis-elemzéseink alapján a

miR-21 esetén a PTEN-t, a p53-at, a PDCD4-et, a PIK3R1-et, a miR-221-al kapcsolatosan pedig a PTEN-t és a PDCD4-et adták meg.

## Megbeszélés

A humán vesesejtes karcinóma genetikai érintettségét tekintve egy igen heterogén betegség, ugyanazon hisztotípuson belül is nagy morfológiai és molekuláris, genetikai heterogenitás fordulhat elő. Ezenkívül ugyanazon beteg primer és metasztatikus elváltozásaiban intratumor heterogenitás is kimutatható. Egyes gének esetén, mint például a VHL, a PTEN, a janusz kináz-3 (Janus kinase 3: JAK3) és a p53-as tumor protein (Tumor protein P53 :TP53) már több mutációt is leírtak, azonban az ilyen típusú genetikai elváltozások esetében is előfordulhatnak egyedi speciális esetek, melyek jelentősen hozzájárulhatnak a betegség kialakulásához és annak klinikai kimeneteléhez. A Cancer Genome Atlas adatbázis szerint az RCC-ben a leggyakoribb szomatikus mutációk közül főként a VHL gén változásait említik meg, melyek a megszokott PI3K/AKT/mTOR útvonalban eredményeznek eltéréseket, ami egyben befolyásolja a beteg terápiára adott válaszát is. A dolgozat irodalmi áttekintésében már említésre került, hogy a familiáris RCC-ben, valamint a sporadikus RCC-ben a VHL allél deléciója igen gyakori mutáció mellett jelentős számban fordul elő a VHL allél aberrációja is, ami egyben a funkcionális fehérje teljes elvesztését is eredményezi.

A PTEN gén exonokat érintő különböző mutációi mindenképpen prognosztikai jelentőséggel bírnak a vesetumороkat illetően. Egyértelmű, kifejezetten a különböző exonokat érintő PTEN mutációk prognosztikai jelentőségét az RCC-vel kapcsolatban egyetlen korábbi tanulmányban sem írtak le. Úgy szintén, csupán korlátozott számú tanulmány olvasható a vesekarcinómákkal összefüggésbe hozható PTEN mutációkról. Éppen ezért nagyon értékesnek véljük, hogy jelen tudományos értekezésben a BAP1 és PTEN gének mRNS szinten történő expresszióját vizsgáltuk 24 vesetumoros mintában, egyben a sebészi úton nyert tumoros és ennek megfelelő ép szövetminta párokat vizsgálva. Ebben az esetben a szövetminták 50 % férfiatól, a másik 50% pedig nőtől származott. Igen fontosnak tartottuk, hogy igazoljuk a BAP1 és PTEN gének jelenlétét, éppen ezért történt meg ezen gének vizsgálata elsősorban mRNS szinten PCR technikával. Ily módon a BAP1 és PTEN mRNS expresszióját minden vizsgált mintában sikeresen azonosítottuk. Ezek az eredmények arra utalhatnak, hogy mindkét génnek lehet tumorszuppresszor funkciója a vesekarcinóma kialakulásában.

Egyik célkitűzésünk a tanulmányban 3 tumorszuppresszor funkciót betöltő gént (VHL, BAP1, PTEN) érintő mutációk vizsgálata volt, a leginkább érintett exonokban. Kísérleteink

során a VHL gént az 1–3. exonokban, a BAP1-et a 14–17. exonokban, valamint a PTEN gén mutációanalízisét az 5–7. exonokban végeztük el a vizsgálatba vont vesetumoros mintákkal a Sanger szekvenáló platform segítségével. A BAP1 és a PTEN gén esetében az irodalmi háttérrel összhangban elsősorban a mutációval leggyakrabban érintett, úgynevezett „hot spot” exonokban előforduló mutációkat, illetve ezen mutációk esetleges prognosztikai szerepét vizsgáltuk az RCC esetekben, melyre a vizsgálatba bevont betegek klinikopatológiai adatainak és az előforduló mutációk típusainak összevetése enged következtetni.

A VHL mutáció a vizsgált minták 25%-ában fordult elő. Mutációkat találtunk a VHL gén 1-3. exonjában. A hat VHL-mutációból három missense mutáció, egy nonszensz mutáció, kettő pedig kisméretű inszercióként volt felismerhető. A HGMD adatai alapján, korábbi betegségek leírását megvizsgálva, mind a 6, általunk azonosított VHL mutáció Von Hippel–Lindau szindrómát okoz. Az IVS1-195 nt G/A polimorfizmust heterozigóta formában 9 esetben, homozigóta formában 13 esetben igazoltuk. A VHL mutációval azonosított betegek közül három a ccRCC hisztotípusba tartozott, kettőt angiomiolipomának, egyet pedig oxifil adenómának írtak le a patológiai értékelés során. Ezek az eredmények ellentétben állnak azzal a korábbi vélekedéssel, hogy a VHL mutációk kizárólag a ccRCC-re korlátozódnak, és hasonlóak a korábbi tanulmányokban leírt eredményekkel. Teh és mtsai (1998) egy olyan esetről számoltak be, amikor egy beteg kétoldali többszörös onkocitómájában és cisztájában fordult elő, transzlokációval és ritka missense szubsztitúcióval járó VHL mutáció.

A HGMD adatbázis elemzéseit követve, valamint a szakirodalomra támaszkodva kijelenthetjük, hogy az általunk vizsgált mintákban azonosított összes VHL mutáció, típustól függetlenül, a fehérje funkcionális változásait vonja maga után.

Részletesebben elemezve, egy esetben azonosított VHL Ser68Term mutáció mechanizmusát tekintve megállapítható, hogy ez a mutáció egy olyan stopkodónak felel meg, melynek eredménye egy csonka, funkcióvesztett VHL fehérje. A VHL Asn90Ile mutáció szintén funkcióvesztését okozza a VHL fehérjének, amint azt a HIF-1 $\alpha$  ubikvitinációjának és degradációjának hiánya is bizonyít. A VHL esetében egy-egy mintában a Gly114Arg és a Leu153Pro helyeken is lettek azonosítva mutációk. Az HGMD adatbázis szerint a Gly114Arg pontmutáció okozta funkcióvesztését a VHL fehérjének a strukturális változása is jelzi, melyet elsősorban a CCT komplexhez való kötődés hiánya jelez. A Leu153Pro-t még biokémiai szempontból nem jellemezték a HGMD adatbázisban; így a VHL fehérje működésére gyakorolt hatása nem ismert. Vizsgálatunkban két inszerció típusú mutációt is azonosítottunk, konkrétan egy guanin és egy timin megjelenésével járó VHL-mutánst az 54. és 157. pozíciókban. Ez

kereteltolódást (frame shiftet) eredményezhet, amely megváltoztatja a következő kodonok leolvasását, és egyben a mutáció helyét követő teljes aminosavszekvenciát is.

Az irodalomban leírt funkcionális elemzések arra utalnak, hogy az általunk vizsgált klinikai esetekben mind a hat VHL-mutáció nagy valószínűséggel pVHL-vesztéshez vezet. A VHL tumorszuppresszor génmutációs inaktiválása pedig a HIF nem megfelelő felhalmozódását okozza, ami elősegíti a vesetumorok kialakulásával kapcsolatba hozható tumorigenezist. Így elmondható, hogy ezekben a mintákban a jelen tudományos munkában elemezett mutációk, azaz genetikai eltérések beindíthatnak vagy akár hozzájárulhatnak a más tényezők folytán kialakult tumoros folyamatokhoz. A tumorméreteket is figyelembe véve arra is következtethetünk, hogy a mintáinkban azonosított típusú VHL mutációk a daganat növekedését kedvezően befolyásolják, ezáltal úgyszintén előmozdítva a tumorigenezist. Mindenképpen figyelmet érdemel az a VHL mutációval összefüggésbe hozható eset, amit egy 72 éves nőbetegben írtunk le, akinél a vesetumornak a jóindulatú formája, egy 10 cm-es onkocitoma lett diagnosztizálva.

A továbbiakban rátérnék a BAP1 génnel kapcsolatos vizsgálatokra. Elmondható, hogy az általunk hot spot-nak kiválasztott (14-17) exonokban a vizsgálatunkhoz használt valamennyi minta vad típusúnak mutatkozott, BAP1 mutáció nem volt megfigyelhető egyetlen általunk vizsgált vesetumoros mintában sem a vizsgált exonokban. A szakirodalomban ezen exonokban vesetumorok esetén mutációt még nem írtak le, sőt ezen exonok mutációt érintő vizsgálatokkal még nem is foglalkoztak a vesetumorokat érintően, így összehasonlítást más kutatók eredményeivel ebben az értelemben nem tudunk végezni. A szakirodalom szerint az általunk vizsgálati módszerként használt Sanger szekvenálás nagyon megbízható és reprodukálható a BAP1 pontmutációk és kis deléciók kimutatására. Ez a technika azonban valószínűleg nem alkalmas a nagy deléciók észlelésére. Az általunk vizsgált BAP1 14-17-es exonok pedig az átlagos exonnál nagyobb méretűek. Ez lehet az egyik oka annak, hogy az általunk vizsgált vesetumoros szövetmintáinkban nem találtunk mutációt a vizsgált 14-17. hot spot exonokon belül. A BAP1 génmutációs vizsgálataival kapcsolatban arra a következtetésre jutottunk, hogy az exonok nagy mérete miatt ennek a génnek a vizsgálata valószínűleg egy sokkal érzékenyebb módszert igényel. A nagy exonok delécióinak pontos kimutatásához leginkább a Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) módszer lenne alkalmas, mely jelen az általunk vizsgált VHL és PTEN gének rövidebb exonjainak együttes vizsgálata miatt ez esetben nem volt kivitelezhető.

Talán ez lehet az oka annak is, hogy az RCC-t érintő BAP1 mutációt leíró közlemények száma is szinte elenyésző. Egyetlen és talán az első ezzel a témával kapcsolatos publikáció

Minardi nevéhez fűződik, aki az ccRCC-t érintő BAP1 kapcsán elsősorban a gént érintő mutációk és a betegek klinikopatológiai státuszával kereste az összefüggést. Vizsgálati eredményeiről tett jelentésében arról olvashatunk, hogy a BAP1 igen erős összefüggést mutatott a betegek pT1es klinikai státuszával ccRCC-ben. A pT1 ccRCC-ben szenvedő betegektől származó minták egyike sem mutatta a magban lokalizálódó BAP1 festődés teljes elvesztését. Szignifikáns negatív korrelációt mutattak ki a nukleáris BAP1 expresszió a tumor mérete, valamint a magi BAP1 expresszió és a patológiai grádusok között. Viszont a magi BAP1 festődés nem volt összefüggésben a betegség-specifikus 5 éves túléléssel. Az immunhisztokémia magfestés úgy tűnik a legmegbízhatóbb módszere a sejtmagvesztéssel járó BAP1 kimutatására ccRCC-ben. Úgy véljük, hogy a mutáció exon szerint történő azonosítására viszont ez a módszer sem alkalmas.

A továbbiakban rá szeretnék térni a PTEN gént érintő vizsgálatainkra az RCC mintákban. Vizsgálatunk során PTEN mutációt mindössze egy mintában észleltünk, míg egy másik betegből származó minta genetikai polimorfizmussal volt jellemezhető. A HGMD adatbázis szerint a vizsgálatunkban megfigyelt mutáció (His93Arg) az eddig leírt betegségek közül elsősorban autizmust és makrocefáliát okoz. Ilyen pontmutáció esetén egy aminosavcsere történik, amikor a hisztidin argininre cserélődik a PTEN fehérje 93. pozíciójában. Itt fontos megemlíteni, hogy a reziduális hisztidin erősen konzervált, és van egy kis, fehérje szinten funkcionális eltérést okozó különbség is a hisztidin és az arginin között. Humán daganatok kapcsán tőlünk függetlenül, ezt a típusú mutációt hamartoma tumor szindrómában szenvedő egyéneknél írták le. A PTEN polimorfizmussal jellemezhető általunk azonosított eset egy, ccRCC-vel diagnosztizált, G3-as patológiás stádiumban levő beteget érintett, a His/Arg cserével leírt PTEN mutáció pedig egy G2-vel papillaris RCC-nek minősült.

A PTEN p.His93Arg mutációt (az 5. exonban) egy 46 éves férfi betegnél volt jellemző, akinek a papillaris RCC-je 2-es fokozatú patológiai Grádusú volt, és T1, N0, M0 klinikai stádiummal volt azonosítható. A daganat mintavételkor már elérte az 5 cm-t. Ezt a mutációt a gén foszfatáz doménjében, annak a helynek közelében volt kimutatva, amely a fehérje enzimatis funkcióját végzi. Valószínűleg a PTEN gén ezen mutációja a PTEN foszfatáz aktivitásának csökkenését eredményezi. A fokális adhézios kináz (FAK) defoszforilációja és inaktiválása magában foglalja a PTEN protein foszfatáz aktivitását is. Ez a mechanizmus kapcsolja össze az extracelluláris mátrix és a citoskeleton működését. A PTEN az integrin által közvetített invázió negatív szabályozója. Azt is feltételezzük, hogy az ilyen típusú PTEN mutáció a PI3K/AKT útvonal inaktiválásához vezet, és elősegítheti a daganatképződést.

Továbbá elemezve az eredményeket, a PTEN IVS5 + 217 nt C/T polimorfizmusát az 5. exon után, a + 217. pozícióban detektáltuk. A HGMD adatbázis szerint ez egy jóindulatú C/T variáció (rs35560700) heterozigóta formában; így feltételezzük, hogy az érintett betegben a betegség kialakulása és prognózisa nem kizárólag az ilyen típusú genetikai elváltozásokhoz köthető. A jelen tanulmányban azonban nem volt szignifikáns összefüggés a PTEN expresszió és a szövettani klasszifikáció között. Mindazonáltal adataink arra utalhatnak, hogy a tumorszuppresszor PTEN elvesztése valószínűleg az RCC karcinogenezisének korai eseménye.

A tény, hogy primer daganatként diagnosztizált esetek száma viszonylag alacsony volt, valamint az, hogy a vizsgált minták között nem szerepelt egyetlen metasztatikus eset sem, végleges következtetéseket nem enged levonni a VHL, PTEN és BAP1 mutációk vese karcinogenezisben betöltött szerepéről. Eredményeink alapján azonban arra a következtetésre juthatunk, hogy ezek a mutációk nem zárják ki egymást, és változó számú lókuszt érinthetnek. Ezen túlmenően mutációs analízisünkéből kimaradtak a nem „hot spot” - nak vélt helyek is, melyek leginkább a „hot spot” mutációk által érintett gének vizsgált exonokon kívüli részeire esnek. Azt gondolhatjuk, hogy az RCC-vel azonosított genetikai aberrációval érintett esetek kimenetele valószínűleg a 3. és 10. kromoszóma elvesztésével jár; azonban az összesített mutációs ráta alacsony volta miatt az elemzésbe bevont minták esetében, és ezen kis mintaszámmal kaott eredmények alapján a betegség kialakulása és prognózisa önmagában nem ezeknek a típusú genetikai rendellenességeknek lehet az eredménye. A tumoron belül, más genetikai eltérések által okozott intratumor heterogenitás, valamint epigenetikai tényezők sokkal jelentősebben hozzájárulhatnak a betegség kialakulásához. Az RCC genetikai elváltozásainak tumoron belüli heterogenitásának tisztázása érdekében azonban mindenképpen nagyobb mintaszámú vizsgálatra van szükség, amely az összes RCC histotípust nagyobb számmal lefedi, egyben a primer tumorok, valamint a metasztázisos esetek lehetséges mintáival.

Összefoglalva, ez a tanulmány azt jelzi, hogy a VHL, PTEN és BAP1 génváltozások nem kapcsolódnak szignifikánsan az RCC-ben szenvedő betegek kóros jellemzőihez vagy túléléséhez. Nagyszabású vizsgálatokra van szükség ezen gének mutációs altípusainak prediktív vagy prognosztikai szerepének feltárásához RCC-ben szenvedő betegekben.

A megbeszélés további részében a miRNS vizsgálatokkal kapcsolatos eredményeimet szeretném értelmezni.

Az irodalmi áttekintésben már sor került a miRNS-ek bemutatására, azok tumorszuppresszor, onkogén szerepének ismertetésére. Ebben a részben az általános részen túl inkább szeretnék kitérni a miR-21 és miR-221-gyel kapcsolatos eredmények értelmezésére, annak esetleges klinikai jelentőségére.

Ahogy már korábban említésre került a mikroRNS-ek a kisméretű, nem kódoló RNS-ek egy csoportja, melyek a fehérjét kódoló gének mRNS-ét megcélozva szabályozzák a fehérjeexpressziót, így számos biológiai funkcióban játszanak szerepet. A miRNS-ek feltételezett tumorszuppresszorként vagy onkogénként is működnek. Mivel a becslések szerint a miRNS-ek szinte az összes gén átírást szabályozzák, nagyon valószínű, hogy legtöbb esetben az aberráns expressziójuk mindenképpen hozzájárulhat a ccRCC kialakulásához azáltal, hogy az egyensúlyt az onkogén funkció megjelenése felé tolják inkább el, közben gátolva a tumorszuppresszor gének működését. Ilyen esetben, a tumorokban az onkogén miRNS-ek túlzottan upregulálódhatnak, míg a tumorszuppresszor gének downregulálódnak. Az irodalomban eddig a legtöbbszor a miR-21 írták le, mint a leginkább upregulált miRNS-t a különböző humán daganatos megbetegedéseket illetően, beleértve a vesetumorokat is. Részben ez az, ami felkeltette az érdeklődésünket a miR-21 - el történő vizsgálódás kapcsán, az irodalom alapján a miR-21 egy ígéretes biomarker és terápiás célpont lehet az RCC, de akár maga a ccRCC esetében is. A miRNS-21 több tumorszuppresszorral is kölcsönhatásba lép, így például, a 10-es kromozómán lokalizált PTEN tumorszuppresszor génnel, majd ezt követheti a p53 és a PDCD4 tumorszuppresszorokkal és egyben apoptotikus génekkel való kölcsönhatása is. A Ras (PI-3K)/PTEN/AKT apoptózis kaszkád az egyik legfontosabb jelátviteli útvonal, amely akadályozott lehet a ccRCC tumorigenezisben. A miR-21 ezt az útvonalat célozza meg, ami arra utal, hogy elnyomhatja az apoptózisban szerepet játszó tumorszuppresszor géneket, ezáltal elősegítve a tumorigenezis folyamatát. Feltehetőleg más onkogén miRNS-el közreműködve teszi ezt az általunk is érdekeltnek vélt miR-21, de az is lehet, hogy az RCC tumorigenezisben szerepet játszó miRNS-ek egymás hatását erősítve érik el azt az erős onkogén hatást, ami akár a teljes apoptotikus útvonal gátlásához is vezethet.

A másik igen gyakori onkogén miRNS, a miR-221, melynek túlzott expresszióját már számos rosszindulatú daganatban leírták, beleértve itt az ccRCC-t is. Hasonlóan a miR-21-hez szoros összefüggés van a miR-221 expressziós szintje és a betegség klinikopatológiai jellemzői között, beleértve a TNM stádiumot, a lokális inváziót, a metasztázisokat, a prognózist, a sugárérzékenységet és a tumor ellenes gyógyszerrezisztenciát. A miR-221 a miR-21-hez hasonlóan olyan tumorszuppresszor géneket céloz meg, mint a PTEN és a PDCD4. A miR-221-ről kimutatták, hogy szintén hatással van a PIK3-ra, konkrétan annak a szabályozó alegységére,

a PIK3R1-re. Szintén befolyásolja a tumorszuppresszor szerepet betöltő p53-at, valamint az olyan sejtciklus-fehérjéket, mint a p27 és a p57, amelyek bizonyítottan részt vesznek a ccRCC tumorigenezisében.

Az általunk végzett miRNS vizsgálatokban használt vesetumoros betegek mintáiban mutatott magas upreguláltság úgy a miR-21 mint a miR-221 esetében, ezen onkogén miRNS-ek vese tumorigenezisében betöltött szerepére utal. A miR-21 és a miR-221 mintánként mutatott koexpressziója pedig arra enged következtetni, hogy ezen onkogének valószínűleg egymás expresszióját indukálják, és egyben erősítik az tumorigenezisre kifejtett onkogén hatást. Ez azt is sejteti, hogy a miRNS adatbázisban fellelhető targetek egységes képet mutatnak mindkét miRNS-re nézve. Ahogyan már korábban említésre került, úgy a miR-21 mint a miR-221 az apoptotikus útvonal fehérjékkel mutatnak interakciót, ezáltal gátolva az apoptózis folyamatát és elősegítve a tumorigenezist.

Ahogyan az már többször is említésre került az RCC megjelenése gyakran összefüggésbe hozható a VHL gén inaktiválásával is, ami egyben a hipoxia-indukálható transzkripciós HIF-1 $\alpha$  emelkedett szintjét eredményezi. Irodalmi adatok alapján a VHL/HIF tengely és az epigenetikai szabályozásban részt vevő miR-21 szerepe lehet az RCC tumorigenezisében. Egy közlemény szerint a teljesen funkcióképes VHL-val leírt RCC esetekben a miR-21 és miR-221 upregulálnak mutatkozott. Ugyanakkor az is fontos tényező, hogy VHL/HIF tengely és a PTEN együttes deregulációja még nagyobb súllyal járulhat hozzá az RCC kialakulásához. A miR-221 szabályozása és a VHL/HIF útvonal közötti interakcióról egyelőre korlátozott információ áll rendelkezésre. A mi eredményeink viszont mindenképpen arra is utalhatnak, hogy a miR-21 és a miR-221 expressziója a VHL/HIF útvonalon keresztül szabályozható. Azt is sejtethetjük, hogy ez a miR-target interakció kölcsönösen, fordítva is működik, így a VHL/HIF útvonalat maguk az általunk vizsgált miR-21 és miR-221 indukálják. Úgy véljük, hogy mindenképpen további vizsgálatok szükségesek a miR-21 és miR-221 ebben a szabályozásban betöltött szerepének tisztázásához. Eredményeink alapján viszont feltételezhetjük, hogy a miR-21 és a miR-221 fontos szerepet játszhat a rosszindulatú daganatok, így az ccRCC kialakulásában is. A vizsgált tumoros mintákban emelkedett miR-21 és miR-221 szint pozitív korrelációt mutatott a vizsgálatba vont betegek patológiai stádiumával. Az is feltételezhető, hogy mindkét miRNS a daganatképződés korai szakaszában jelenik meg, és ezek közül az egyik (vagy miR-21 vagy a miR-221) onkogén miRNS expresszálódik először a sejtfejlődés során, ezzel indukálva további miR-ek expresszióját. Erősen feltételezhető, hogy a miR-21 és a miR-221 a sejtciklus közel azonos szakaszában expresszálódnak, így részt vesznek a ccRCC tumorigenezisében.

Összefoglalva, az általunk vizsgált onkogén miRNS-eknek (miR-21 és miR-221) humán ccRCC tumorszövetmintáiban a szomszédos, nem daganatos szövetekhez viszonyított upregulációja arra utalhat, hogy mindkét általunk vizsgált miRNS részt vesz az RCC, illetve a ccRCC kialakulásában. Klinikai szempontból történő értelmezésükhöz mindenképpen további *in vitro* vizsgálatokra van szükség. Az is elmondható, hogy feltételezett biomarker szerepük igazolásához vesetumoros betegekből származó humán szérum mintákkal történő vizsgálatokra lenne szükség.

Dolgozatom témájaként a genetikai és epigenetikai faktorok lehetséges szerepét jelöltem meg a vesetumorokat érintően. A genetikai vizsgálatainkhoz használt vesetumoros mintapárok egy adott beteg populációból származtak. A miRNS vizsgálatainkat egy másik beteg populáció mintáival végeztük el. Két különböző tanulmány, két különböző mintacsoport. Mindtől függetlenül szeretnék kapcsolatot teremteni az általunk kapott eredmények között. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a vesetumorok kialakulásában úgy genetikai, mint epigenetikai faktoroknak, azaz a miR-eknek is szerepe lehet. Mindkét faktor már önmagában is elegendő lehet a tumoros folyamat indukálásához, ugyanakkor egymással való kölcsönhatásuk révén fokozzák ezt a hatást. A genetikai érintettsége az általunk vizsgált tumorsuppresszor géneknek (VHL, PTEN, BAP1) mintaszámra nézve alacsonyabb volt, mint a vizsgált miR-21 és miR-221-gyel pozitív expressziós eredményt mutató minták esete, igaz eltérő beteg populációban vizsgálódva. Ehhez természetesen a vesetszöveten belüli intratumor heterogenitás is mindenképpen hozzájárul, valamint az exonokra korlátozott szekvenálási vizsgálataink is. Mindezeket figyelembe véve úgy véljük, hogy az epigenetikai faktorok genetikai eltérések nélkül jelentős befolyással lehetnek a tumor kialakulására, amit egyidejűleg jelenlévő genetikai eltérés még csak megerősít vagy differenciál. Ezen fejtegetéssel összhangban azt próbálnám érzékeltetni, hogy a genetikai és epigenetikai faktorok, azaz miRNS-ek együttes vizsgálata jelentős szereppel bírhat az RCC diagnosztikában, valamint annak személyre szabott terápiájában egyaránt.

Összességében úgy gondolom, hogy jelen tudományos értekezés segíthet megismerni a vesetumorok hátterében álló genetikai, epigenetikai tényezőket, valamint a jövőbeli kutatások számára információként szolgálhat ezen tényezők klinikai és terápiás szerepének feltárásában.

## Összefoglalás

Ebben a tudományos munkában a vesetumороk kialakulásában szerepet játszó egyes genetikai és epigenetikai faktorok (miRNS-ek) jelenlétét vizsgáltuk a Debreceni Egyetem Urológiai Klinikáján vesetumорral diagnosztizált betegek mintáin. A VHL, PTEN és BAP1 gének mutációs vizsgálatai alapján feltételezzük, hogy a VHL és PTEN gének változásai szignifikánsan nem függenek össze a vesedaganatos betegek kóros jellemzőivel vagy túléléssel. Az összes általunk azonosított VHL-mutáció a pVHL elvesztéséhez vezethet, ami további tumorigenezist indukál. A leírt VHL genetikai polimorfizmus (rs779805) szintén patogénnek tekinthető, és hozzájárulhat a vesedaganatok kialakulásához. Noha a VHL mutáció ritka az AML-ben, vizsgálatunkban két fiatal, AML-ben szenvedő nőbetegnél a VHL gén mutáltnak mutatkozott. VHL mutációt figyeltünk meg egy 72 éves nőnél, akinél onkocitómát diagnosztizáltak. Tanulmányunkban először számolunk be PTEN His93Arg mutációról papilláris RCC-ben szenvedő betegben. Feltételezzük, hogy a VHL és a PTEN elvesztése együttesen járulhat hozzá a vesetumороk felgyorsult progressziójához. A BAP1 gén hot spot régióiban végzett mutációanalízis alapján úgy tűnik, hogy ez a gén nem vesz részt a tumorigenezisben az általunk vizsgált betegminták esetében. Összefoglalva, feltételezzük, hogy a genetikai aberrációval azonosított vesetumoros betegek klinikai prognózisa a 3. és 10. kromoszóma elvesztésével is összefüggést mutat. Mivel a VHL, PTEN és BAP1 gének összesített mutációs rátája a vizsgált mintákban alacsony volt, így a betegség kialakulása és prognózisa a vizsgált beteg csoportban nem kizárólag az ilyen típusú genetikai elváltozásokkal hozható összefüggésbe.

Az epigenetikai, az a miRNS-eket érintő vizsgálataink során két onkogén miRNS-t, a miR-21 és a miR-221 tanulmányoztuk a vesetumорral diagnosztizált betegekből származó tumoros és ép szövetminta párokon. Vizsgálataink eredményeként az onkogén miR-21 és miR-221 szignifikánsan magasabb expressziót mutatott a tumoros veseszövetekben, mint az egészséges minta párokban. Ezeknek az onkogén miRNS-eknek (miR-21 és miR-221) a humán ccRCC esetekben mutatott upregulációja arra utalhat, hogy mindkettő miR részt vesz a ccRCC kialakulásában. További *in vitro* vizsgálatokra van szükség annak bizonyítására, hogy a túlzott miR-21 és miR-221 expresszió összefüggésbe hozható a fokozott proliferációval és sejtmigrációval.

Remélhetőleg jelen tudományos munkával részben hozzájárultunk a vesetumороk hátterében álló genetikai, epigenetikai tényezőinek megismeréséhez, mely információ segítségül szolgálhat a jövő kutatóinak ezen tényezők klinikai és terápiás szerepének feltárásában.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőimnek Dr. Halmos Gábor Professzor Úrnak, a Biofarmácia Tanszék vezetőjének, fáradhatatlan, odaadó gondoskodásért és kitartó segítőkészségért, valamint, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy munkámat a Tanszéken végezhettem. Köszönetemet fejezem ki Dr. Szabó Zsuzsannának, hogy kutatásomat végig irányította és tudásával nélkülözhetetlen segítséget nyújtott dolgozatom elkészítésében.

Köszönöm szerzőtársaimnak, hogy önzetlen szellemi támogatásukkal elősegítették munkámat.

Köszönetemet fejezem meg habil Dr. Flaskó Tibornak, az Urológiai Klinika igazgatójának, és egyben mentoromnak azért, hogy lehetővé tette számomra a napi sebészeti rutin munka mellett a kutatást is, úgy szakmailag, mint emberileg támogatott. Köszönet jár neki azért is, hogy a kutatáshoz szükséges minták begyűjtését és annak kísérletes vizsgálatát lehetővé tette számomra.

Külön köszönöm Családomnak, hogy minden körülmények között segítették munkámat szeretetükkel, türelmükkel.



Nyilvántartási szám: DEENK/316/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szegedi Krisztián  
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szegedi, K.**, Szabó, Z., Kállai, J., Király, J., Szabó, E., Bereczky, Z., Juhász, É., Dezső, B., Szász, C., Zsebik, B., Flaskó, T., Halmos, G.: Potential Role of VHL, PTEN, and BAP1 Mutations in Renal Tumors.  
*J Clin Med.* 12 (13), 1-18, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm12134538>  
IF: 3.9 (2022)
2. Szabó, Z., **Szegedi, K.**, Gombos, K., Mahua, C., Flaskó, T., Harda, K. M., Halmos, G.: Expression of miRNA-21 and miRNA-221 in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and their possible role in the development of ccRCC.  
*Urol. Oncol.-Semin. Orig. Investig.* 34 (12), 533, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2016.06.011>.  
IF: 3.767

### További közlemények

3. Szabó, Z., Dezső, B., Molnár-Fodor, K., **Szegedi, K.**, Flaskó, T., Szabó, E., Oláh, G., Sipos, É., Dobos, N., Gardi, J., Schally, A. V., Halmos, G.: Expression of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) and Type-I LHRH Receptor in Transitional Cell Carcinoma Type of Human Bladder Cancer.  
*Molecules.* 26 (5), 1-14, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26051253>  
IF: 4.927
4. **Szegedi, K.**, Szabó, Z., Flaskó, T., Halmos, G.: A mikroRNS-ek jelenléte vesetumороkban és lehetséges diagnosztikai-prognosztikai szerepük.  
*Magyar Urol.* 18 (4), 183-188, 2016.





**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,594**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
7,667**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.05.29.

