

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Szegedi Krisztián Gábor

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

DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Szegedi Krisztián Gábor

Témavezető: Dr. Halmos Gábor



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

Tartalomjegyzék:

Rövidítések jegyzéke	5
I. Bevezetés.....	10
II. Célkitűzés.....	13
III. Irodalmi áttekintés	15
III. 1. A vesetumorok	15
III. 2. A vesedaganatokat érintő mutációk típusai, kialakulásának genetikai háttere.....	29
III. 3. A vesetumorok kialakulásában szerepet játszó epigenetikai faktorok	35
IV. Anyagok és módszerek	42
IV. 1. Mintagyűjtés	42
IV. 2. A szövettani minták előkészítése és RNS izolálás	42
IV. 3. Reverz transzkripció (RT-PCR).....	43
IV. 4. A miR-21 és a miR-221 vizsgálata során alkalmazott kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR).....	44
IV. 5. A PTEN és BAP1 gének expressziós vizsgálatához alkalmazott kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR).....	46
IV. 6. DNS izolálás	46
IV. 7. PCR amplifikáció:	48
IV. 8. DNS szekvenálás	52
IV. 9. A miRNS elemzéshez használt Cp értékek elemzése és statisztikai analízise.....	53
IV. 10. <i>In silico</i> target elemzés miRNS adatbázisok segítségével.....	53
IV. 11. Statisztikai analízis:.....	53
V. Eredmények	54
V. 1. A mutációs vizsgálatokba bevont betegek klinikopatológiai jellemzői	54
V. 2. A BAP1 és PTEN mRNS expressziója humán vesedaganat szövetmintákban.....	56
V. 3. VHL mutációk és IVS1-195 nt G/A polimorfizmus vizsgálata humán vesetumoros mintákban	57
V. 4. PTEN mutációk és polimorfizmus a vizsgált humán vesetumoros mintákban.....	60
V. 5. A BAP1 gén vad típusának megjelenése a vizsgált humán vesetumoros mintákban	60
V. 6. A VHL, PTEN és BAP1 mutációk és a betegek klinikopatológiai jellemzői közötti kapcsolat.....	61
V. 7. A miRNS –es vizsgálatokkal kapcsolatos eredmények.....	62
V. 7. 1. A vesetumoros betegekből származó szövetminták patológiai jellemzői.....	62
V. 7. 2. A miR-21 és miR-221 expressziója ccRCC mintákban	64

V. 7. 3.	A miR-21 és miR-221 targetjeinek azonosítása	68
VI.	Megbeszélés	69
VII.	Összefoglalás	81
VIII.	Summary	82
IX.	Tárgyszavak.....	83
X.	A kutatást támogató pályázatok	84
XI.	Köszönetnyilvánítás.....	85
XI.	Irodalom	86
Függelék.....		95

Rövidítések jegyzéke

3' UTR region	3' untranslated region (3' nem transzlálódó régió)
Ago 2	protein Argonaut 2 (Argonauta fehérje)
AKT	protein kináz B
Ang-1	angiopoietin-1
AML	vese angiomyolipóma
BAP1	BRCA-1 associated protein-1 (BRCA-1 asszociált fehérje-1)
BHD	Birt-Hogg-Dubé szindróma
BRCA-1	breast cancer-1 (1-es típusú emlőrák)
CDK	cyclin-dependent kinase (ciklin-dependens kináz)
cDNS	komplementer DNS
ccRCC	clear cell renal cell carcinoma (világossejtes vesekarcinóma)
Cp	crossing point cycle (adott küszöbértékhez tartozó ciklusszám)
CT	computer tomográfia
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (citotoxikus T-sejt antigén 4)
DDIT4	DNA damage-inducible transcript 4 (DNS károsodással indukálható transzkript 4)
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	deoxynucleotide triphosphate (dezinukleotid trifoszfát)
FAK	focal adhesion kinase (fokális adhézis kináz)
FGF	fibroblast growth factor (fibroblaszt növekedési faktor)
FLCN	folliculin
FH	fumarate dehydrogenase (fumarát dehidrogenáz)

FHD RCC	fumarát-hidratáz deficiens RCC
GLUT1	glükóz transzporter 1
Gy	Gray (elnyelt sugárdózis)
HGMD	human genome mutation database (humán genom mutációs adatbázis)
HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor-1 α (hipoxia-indukálható faktor-1 α alegysége)
ISUP	International Society of Urologic Pathologists (Urológiai patológusok nemzetközi társasága)
IVS1	first intervening sequence (első közbeeső szekvencia)
JAK3	janus kináz 3
LOF	loss of function (funkcióvesztés)
MCF-7	michigan cancer foundation-7 human breast cancer cell line (humán emlődaganat sejtvonal)
MCNLMP	multilokuláris cisztikus vesetumor (Multilocular cystic renal neoplasm of low malignant potential)
MR	magnetorezonanciás tomográfia
MET	mesenchial-epithelial transition (mezenhiális-epitéliális átmenet)
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification (multiplex ligáció-függő proba amplifikáció)
mRCC	metastatic renal cell carcinoma (metasztatikus vesekarcinóma)
miRNS vagy miR	mikroRNS
mRNS	hírvivő ribonukleinsav (messenger RNA)
mTOR	mammalian target of rapamycin (emlős rapamicin célpont)
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NF κ B	nuclear factor kappa-B

NTC	no template control (templát mentes kontrol)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man (Mendeli öröklődés emberben- adatbázis)
PADUA	preoperative aspects and dimensions used for anatomic system (az anatómiai rendszerhez használt preoperatív szempontok és méretek)
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PD1	programmed cell death protein 1 (programozott sejthalál fehérje 1)
PDCD4	programmed cell death 4 (programozott sejthalál 4)
PDGF	platelet-derived growth factor (vérlemezske eredetű növekedési faktor)
PI3K	phosphoinositide 3-kinase (foszfoinozitol 3-kináz)
PIP3	phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (foszfatidilinozitol 3,4,5-trifoszfát)
pRCC	papillary renal cell carcinoma (papilláris vesekarcinóma)
pre-miRNS	prekurzor-miRNS
pri-miRNS	primer miRNS
PHTS	PTEN hamartoma syndrome (PTEN hamartoma szindróma)
PTEN	phosphatase and tensin homolog (foszfatáz és tenzin homológ)
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction (kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció)
RAS	onkogén, guanidin trifoszfátáz (GTPáz) család tagja (pl.: KRAS= Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)
RNáz	ribonukleáz
RNS	ribonukleinsav

RT-PCR	reverse transcription polimerase chain reaction (reverz transzkripció polimeráz lánreakció)
RCC	renal cell carcinoma (vesesejtes daganat)
RISC	RNA induced silencing complex (RNS indukálta csendesítő komplex)
RMC	renal medullary carcinoma (vese medulláris karcinóma)
RT-NTC	reverse transcriptase-no templet control (reverz transzkriptáz és templát mentes kontrol)
SDH	szukcinát-dehidrogenáz
TAD1	tRNA-specific adenosine deaminase (tRNS –specifikus adenzin deamináz)
TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (szövet metalloproteináz inhibitor 3)
TSC1	tuberous sclerosis complex 1 (sclerosis tuberosa)
TKI	tyrosin-kinase inhibitor (tirozin-kináz inhibitor)
TNM	tumor-metasztázis stádium
TP53	tumor protein p53 (p53 tumorszupresszor gén)
TRBP	TAR RNA binding protein (TAR RNS kötő fehérje)
UH	ultrahang
UCH	ubiquitin carboxyl-terminal
ULD	UCH37-like domain (UCH37-szerű domén)
UICC	Union for International Cancer Control (nemzetközi rákellenes unió)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor)
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor)

VHL

Von Hippel-Lindau tumorszupresszor gén

WHO

World Health Organization

I. 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% [1-3]. A betegek körülbelül 20-30%-ánál távoli áttétek alakulnak ki már a diagnózis felállításakor [2, 4]. 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 [1-4]. Korai felismerés esetén a lokalizált RCC műtéti úton kezelhető, és a betegek 5 éves túlélési aránya megközelíti a 85%-ot [2]. Ahogyan a szakirodalom és a klinikai tapasztalat is mutatja a betegek körülbelül 40–50%-ban kiújul a nefrektómia után, vagy akár metasztatikus vesetumor (mRCC) jelentkezik [2, 4]. 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 [2].

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 [5, 6].

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 [7-12]. A ccRCC patogenezisében egyik központi genetikai esemény a Von Hippel–Lindau (VHL) gén inaktiválása, akár szomatikus mutációk, akár promoter hipermetiláció következtében [7-10].

A VHL betegség (OMIM 193300) egy autoszomális domináns, öröklődő szindróma, amely hajlamosítja az egyént kisagyi hemangioblasztómák, retina angiómák, a világossejtes vesekarcinóma, neuroendokrin daganatok és pheochromocytómák kialakulására. A Von Hippel–Lindau betegséget a 3. kromoszóma (3p25-26) rövid karján található VHL tumorszuppresszor gén csíravonal mutációi okozzák [2]. A VHL gén inaktivációján kívül más gének is hozzájárulnak a ccRCC kialakulásához, ilyen lehet a foszfatáz és tenzin homológot (PTEN) és az 1-es típusú emlőtumorról asszociált fehérje (BRCA-1) kódoló gén, a BAP1-et foglalja magában [2, 3, 11].

Az RCC patogenezisének, genetikai hátterének jobb megértése hozzájárulhat a betegek egyéni genetikai sajátosságaira épülő, a személyre szabott terápiák megközelítéséhez [2, 4].

A betegek korai felismerése és megfelelő nyomon követése befolyásolhatja a betegség prognózisát is. Ezért szükséges az új biomarkerek megismerése, amelyek lehetővé teszik a betegség korai felismerését, a pontos diagnózis felállítását, valamint akár a nefrektómia utáni korai metasztázisok előrejelzését, és új célzott terápiák kidolgozását [13-16].

A mikroRNS-ek (miRNS vagy miR) kicsi, nem kódoló RNS-ek, amelyek fontos szerepet játszanak a karcinogenezis szabályozásában [16-18]. A tumorszövet a megfelelő normál szövetekhez képest eltérően expresszál miRNS-eket, melyek fontos célfehérjéket szabályoznak a karcinogenezis során [13, 19-21]. 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 [13, 16, 19]. 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 [17-23]. A miR-21 túlzottan expresszálódik számos humán daganatban, és összefüggésbe hozható a tumoros szövetben megváltozott sejtfolyamatokkal [23-27]. A humán daganatokban leírt miR-21-ről kimutatták, hogy onkogénként hat, mivel számos, a proliferációval, apoptózissal és invázióval kapcsolatos tumorsuppresszor gént céloz meg [19-21]. *In vivo* és *in vitro* vizsgálatok azt sugallják, hogy a miR-21 diagnosztikai és prognosztikai markerként szolgálhat az emberi rosszindulatú daganatok esetén [21]. A legújabb bizonyítékok azt mutatták, hogy a miR-21 jelentős szerepet játszik a tumorelleses gyógyszerrezisztenciában is [24-26]. A miRNS-ekkel kapcsolatos szakirodalom azt is mutatja, hogy a miR-21 fokozott expressziója vesesejtes karcinómában összefüggést mutat a betegek alacsonyabb túlélésével [24]. 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 [24-28]. 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 [18]. Ennek a miRNS-nek túlzott expresszióját számos rosszindulatú daganatban észlelték, beleértve a gyomorrákot, a hepatocelluláris karcinómát, a húgyhólyagrákot, a hasnyálmirigyrákot, a papilláris pajzsmirigykarcinómát, a hepatocelluláris karcinómát, a glioblasztómát, a bőr melanómát és a limfómát [29-31]. Szignifikáns összefüggést mutattak ki a miR-221 expressziós szintje és a klinikopatológiai tumorjellemzők között, beleértve a tumor-

metasztázist leíró stádiumot (TNM), a lokális inváziót, az áttéteket, a prognózist, a sugárérzékenységet és a tumorelles gyógyszerrezisztenciát, például vastagbél- és végbélgulladás esetén [30].

II. Célkitűzés

Amikor tudományos munkámat elkezdtem, a vesetumороkat érintően úgy a miR-21, mint a miR-221 kapcsán korlátozott információk álltak rendelkezésünkre. Nem véletlen, hogy célom volt kísérletes munkát folytatni ezen onkogén jellegű miRNS expressziós profiljának vizsgálatára vonatkozóan a Debreceni Egyetem Urológiai Klinikáján vesetumorral diagnosztizált és műtött betegek mintáin.

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 leirt betegpopuláció ép/tumoros szövetminták párjain 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 feltáratlannak tűnik a vesetumороk 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.

Ebben a tudományos munkában egy sokrétű elemzést tűztünk ki célul a vesetumороk kialakulását érintő egyes genetikai és epigenetikai tényezőket illetően. Néhány fontosabb pontban összefoglalva, a következő célkitűzésekre próbálunk választ adni:

- Sagner szekvenálási megközelítést alkalmazva célul tűztük ki a VHL, a PTEN és a BAP1 gének mutációinak elemzését vesetumoros betegekből izolált tumoros és ép szövetminta párokban. Jelen tanulmány célja a VHL gén mutációinak vizsgálata az 1-3 exonokban, valamint a PTEN és BAP1 gének mutációk vizsgálata az úgy nevezett „hot spot” régiókban.
- Szintén célunk volt, hogy a vizsgált mintáinkban általunk azonosított minden genetikai elváltozás jelenlétét összefüggésbe hozni a vizsgált betegek klinikopatológiai jellemzőivel is.

- További célunk volt olyan epigenetikai faktorok, mint a miR-21 és miR-221 vizsgálata, melyek befolyásolhatják a vesetumорок tumorigenezisét, a betegség klinikai kimenetelét és a betegek terápiára adott válaszát.
- Az irodalomból szerzett információkra alapozva ebben a tudományos munkában célunk volt a vizsgálatba bevont vesetumoros betegek ép/ tumoros szövetminta párojain a miR-21 és miR-221 expressziójának a vizsgálata.
- Szintén célul tűztük ki a miR-21 és a miR-221 lehetséges szerepének meghatározását a miRanda, PicTar és TargetScan adatbázisok segítségével, melyekben a miR-21 és a miR-221 specifikus targetek fellelhetők.
- Továbbá a klinikopatológiai ismeretek birtokában a miR-21 és a miR-221 lehetséges biomarker szerepének a megvilágítása.

III. Irodalmi áttekintés

III. 1. A vesetumorkok

A vesetumorkok epidemiológiája

A vesetumorkok az összes előforduló daganatos megbetegedések mintegy 3 %-át teszik ki. Legmagasabb incidenciájukat a nyugati társadalomban észlelik [32]. 2020-ban 431,288 vesedaganatos beteget diagnosztizáltak világszerte, ebből 138,611 beteg európai volt. Az utóbbi két évtizedben évente 2% növekedés volt megfigyelhető a vesetumorkok előfordulásában. Európában. 2022-ben világszerte 179,368 esetben vezették vissza a halál okát a vese daganatos megbetegedéseire (115,600 férfi beteg, valamint 63,768 női beteg), így incidenciája 1,8/100000-re tehető [33].

A vesetumorkokkal összefüggést mutató elhalálozások száma folyamatosan növekedett a múlt évszázad végéig, majd stagnált, köszönhetően a korai diagnosztikának és az egyre fejlettebb kezelési módszereknek, jelenleg csökkenő tendenciát mutat [34].

A világossejtes vesetumor a leggyakoribb vesét érintő szolid térfoglaló folyamat, mely több mint 90%-át jelenti az összes a vesében képződő által leírt daganatnak. A nemek aránya 1,5–2,0:1 a férfi populáció javára, és döntő többségében az idősebb generációkat érinti [35].

A vesetumorkok patológiája

A World Health Organization (WHO) által 2022-ben publikált, az Urogenitális Daganatok Osztályozása 5. kiadásában megjelent klasszifikáció alapján számos szövettani altípus kerül leírásra a vesedaganatok tekintetében [35-37]. Az új WHO besorolás a korábbi 2016-ban megjelent verzió jelentősen átdolgozott, illetve revideált változata, mely a morfológiai, immunhisztokémiai szempontok mellett genetikai és molekuláris szinten is osztályozza a vesedaganatokat. Ezen új entitások főleg a ritkábban előforduló veserák típusokat érintik, de a jelenleg elérhető adjuváns kezelések indikációinál nagy jelentőséggel bírnak. A vesedaganatok WHO szerinti besorolását röviden az 1. táblázat szemlélteti. Tekintettel arra, hogy magyar nyelvű fordítás nem elérhető az irodalomban, így ezt helyenként eredeti formájában, angol nyelven idézzük.

1.Táblázat. A vesedaganatok WHO szerinti besorolása [35, 37]

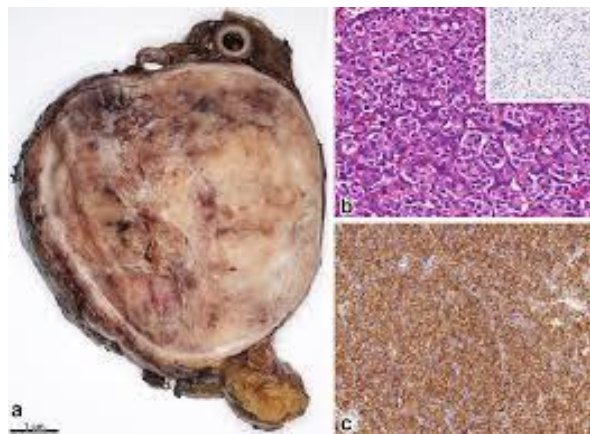
A vesetumороk WHO szerinti klasszifikációja (2022-es irányelv alapján)
Vesetumороk
Világossejtes vesetumороk (Clear cell renal tumours cRCC)
Világossejtes vesetumor (Clear cell RCC)
Alacsony malignitású multilokuláris cisztikus vese neoplázia (Multilocular cystic renal neoplasm of low malignant potential)
Papilláris vesetumороk (Papillary renal tumours)
Papilláris adenóma (Papillary adenoma)
Papilláris RCC (Papillary RCC)
Onkocytás és chromofób vesetumороk (Oncocytic and chromophobe renal tumours)
Vese oncocytoma (Oncocytoma of the kidney)
Chromophob RCC (Chromophobe RCC)
Más oncocytoma jellegű vesetumороk (Other oncocytic tumours of the kidney)
Gyűjtőcsatorna típusú tumorok (Collecting duct tumours)
Gyűjtőcsatorna típusú tumor (Collecting duct carcinoma)
Vese mesenchymális tumorok (Renal mesenchymal tumours)
Felnőttkori mesenchymális vesetumороk (Adult renal mesenchymal tumours)
Klasszikus angiomyolipoma (Classic angiomyolipoma/PEComa of the kidney)
Epitheloid angiomyolipoma (Epitheloid angiomyolipoma/epitheloid PEComa of the kidney)
Vese haemangioblastoma (Renal haemangioblastoma)
Gyerekkori vese mesenchymális tumorok (Paediatric renal mesenchymal tumours)
Embrionális vese neopláziák (Embryonal neoplasms of the kidney)
Nefroblasztikus tumorok (Nephroblastic tumours)
Nefrogenikus maradványok (Nephrogenic rests)
Gyerekkori cisztikus nefroma (Paediatric cystic nephroma)
Cisztikus, részben differenciált nefroblasztóma (Cystic partially differentiated nephroblastoma)
Nefroblasztóma (Nephroblastoma)
Kevert tumorok (Miscellaneous tumours)
Gyerekkori csírasejtes tumorok (Germ cell tumours of the kidney)

A vesedaganatok szövettani feldolgozásakor szükséges megadni a morfológián túl a pontos szövettani típust, az International Society of Urologic Pathologists (ISUP) szerinti magmorfológiát, szarkomatoid jelenség meglétét vagy hiányát, az érinvázio jelenlétét, tumor nekrosis előfordulását, a vizeletgyűjtő rendszer és a zsíros tok inváziójának meglétét vagy hiányát, pT és pN stádiumot (amennyiben a sebészi beavatkozás során nyirokcsomó eltávolítás is történt). Jelenleg a 3. fokozatú Fuhrman grádus fokozatosan kivezetésre kerül és helyette a WHO/ISUP grádus megadása kerül előtérbe [35-37].

A fontosabb szövettani típusok bemutatása

1. A klasszikus világossejtes vesetumor (clear cell renal cell carcinoma: ccRCC)

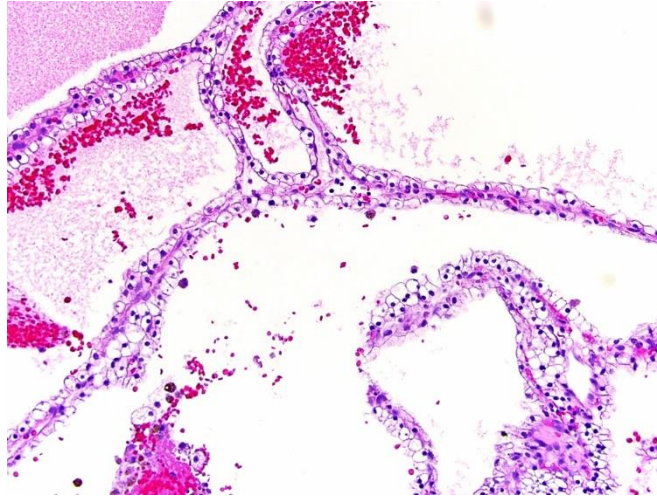
A klasszikus világossejtes vesetumor makroszkópos metszeti képen narancssárga, szabályos tokkal nem rendelkező, szoliter megjelenésű térfoglalás. A környező veseszövetet deformálja, kevésbé invazívan nő. Metszeti képen gyakran bevérzések és nekrosis is megfigyelhető [38].



1. **Ábra:** A világossejtes vesekarcinóma makroszkópos és szövettani képe

[chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://publicatio.bibl.u-szeged.hu/28078/1/0007a.pdf](https://publicatio.bibl.u-szeged.hu/28078/1/0007a.pdf)

A multilokuláris cisztikus vesetumor (Multilocular cystic renal neoplasm of low malignant potential MCNLMP) a világossejtes vesetumorok egyik alcsoportja. Lassan növvő, kizárólag cisztikus terime, szolid részek nélkül, klasszikus világossejtes veserák magmorfológiával, azonban alacsony malignitási potenciállal és ISUP grádussal [35].

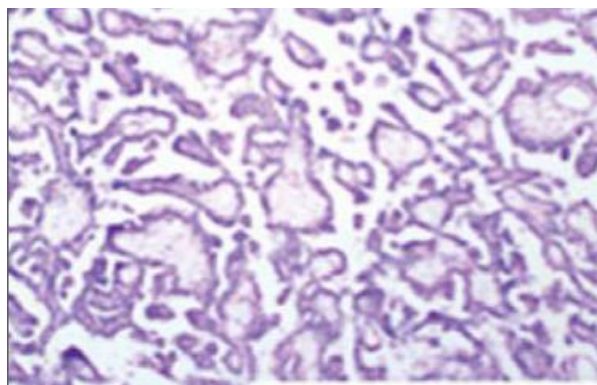


2. Ábra: Multilokuláris cisztikus neoplázia szövettani képe
[Microsoft Word - PhD-végső.andrás-03.08..doc \(pte.hu\)](#)

Az összes vesetumor 0,5 -2,5 % -át teszi ki, nem képez áttéteket, kórlefolyása benignusnak mondható. Kezelése általában részleges, szervmegtartó műtét, amennyiben technikailag kivitelezhető [39].

2. Papilláris vesekarcinóma (pRCC)

A papilláris alvariáns a második leggyakrabban előforduló malignus vese térfoglalás, mintegy 13- 20%-ban észlelhető. Szövettani képén papilláris és tubulopapilláris elrendeződés figyelhető meg [35-37].



3. Ábra: Papilláris 1-es típusú vesekarcinóma szövettani képe [40]

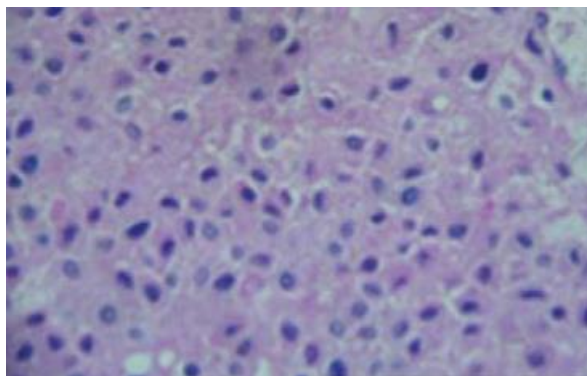
Korábban két alvariánsa volt ismert, I. és II. altípus [35]. A jelenleg bevezetés alatt álló WHO besorolás a korábbi I. altípust „klasszikus mintázatú” papilláris vesekarcinómaként definiálja. Ezen kívül három újabb morfológiai alvariáns került meghatározásra. Az első a „bi-

phasic” (alveolo-squamoid), többnyire szolid megjelenésű és növekedésű. A második altípus a „reverz nuclear polarity” melyet korábban onkocyta jellegű pRCC -ként ismertünk. A harmadik altípus a Warthin- szerű variáns, mely a habszerű szövettani képe alapján a nyálmirigyekben előforduló Warthin tumorra jellegzetes kép miatt került elnevezésre [35-37].

A pRCC szövettani képe (keskeny papilláris elrendeződés, összeköttetések nélkül, mikro kapillárisok jelenlétével) magyarázza szokatlan klinikai megjelenését is. A tumor általában pszeudokapszulával rendelkezik, emiatt szabályos kerek formát vesz fel (Pascal törvénye), valamint törékeny (vagdalthús jellegű). A tumornövekedés papillanekrózist okoz, emiatt hiperozmotikus fehérje lerakódás figyelhető meg, ami további tumor méret növekedéshez, illetve daganaton belüli folyadék felhalmozódáshoz vezet. Ennek következtében a posztkontrasztos CT felvételeken csak a széli részeken figyelhető meg kevés halmozás, és a CT kép alapján a tumor összetéveszthető a Bosniak II. F, vagy Bosniak III. besorolású vesecisztákkal. Metszeti képen okkersárga megjelenésű, exofitikus, alacsony ISUP grádusú. Biopsziát követően meglehetősen magas a szóródási ráta (13%) melyet a tumor törékeny szerkezete magyaráz [41].

3. Kromofób vesesejtes rák (chRCC -chromophobe renal cell carcinoma)

A chRCC jelenleg, mint onkocitoid és kromofób sejtes vesekarcinóma lett definiálva. Többnyire véletlenszerűen kerül felfedezésre, tünetmentes egyéneknél. Makroszkóposan világosbarna metszeti képet mutat, viszonylag homogén, tömör, jól körülírt és nem rendelkezik tokkal. Előfordulása sporadikus, de bizonyos genetikailag örökletes betegségekben, mint a Birt-Hogg-Dubé (BHD) szindróma, illetve a Cowden szindróma felismerhető családi halmozódás. Előbbiben a follikulint szabályozó gén, utóbbiban a PTEN szabályozó gén mutációját ismerjük [35-37].



4. Ábra: A kromofób vesekarcinóma szövettani képe [40]

A chRCC esetében nem adható meg ISUP, vagy Fuhrman grádus a sajátos mag atípiá miatt. Genetikai vizsgálat során gyakran megfigyelhető az Y, 1, 2, 6, 10, 13, 17 és 21 kromoszómák deléciója [35].

Prognózisa nagyon jónak mondható, az 5 és a 10 éves túlélés 94.3 % és 89.2 %. A betegek 5,7 %-nál figyeltek meg recidívát, ezen betegek 76,5%-a metasztatikus volt. Ezen esetek több mint felében szoliter áttét volt megfigyelhető, mely leggyakrabban csont áttétnek bizonyult. Korai sebészi kezelést követő áttétek képződése vagy kiújulás viszonylag ritka, így a pT2a stádium alatti tumorok prognózisa kifejezetten kedvező [42].

Egyéb vesetumorok

Az alábbiakban szót ejtünk néhány ritka, sporadikusan előforduló vesetumorról, melyek örökletesek is lehetnek.

a. Vesevelő karcinóma (SMARCB1-deficient renal medullary carcinoma RMC)

A vesevelő állomány karcinóma a vesekarcinómák kevesebb, mint 0,5 %-át teszik ki. Többnyire afrikai felmenőkkel rendelkező fiatal betegeket érint (átlagosan 28 év körül), gyakran megfigyelhető sarlósejtes anémia a kórtörténetben, valamint férfiak esetében kétszer gyakrabban fordul elő, mint nőknél. Többnyire centrálisan kialakuló és infiltratív módon terjedő tumor. A diagnózis felállításkor a betegek kétharmada már klinikai értelemben előrehaladott stádiumú. A még idejében felfedezett eseteknél is gyakran heteken belül áttétek alakulhatnak ki [43, 44].

A haemoglobinopátia nélkül előforduló vesevelő karcinómákat a WHO „nem osztályozható medullaris fenotípusú” veserákként definiálja [35-37].

b. Policisztás vesebetegség talaján létrejött végstádiumú veseelégtelenséggel társuló veserák

A végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegeknél gyakran lehet a kiváltó ok a policisztás vesebetegség, illetve gyakrabban társuló vesekarcinóma is megfigyelhető. A veseelégtelen betegek 4%-ában figyelhető meg veserák kialakulása, valamint a normál populációhoz képest tízszeres az esélyük a betegség kialakulására. A klasszikus világossejtes veserákkal ellentétben ezen rizikó csoportban előforduló daganatok többgócúak, kétoldaliak, és

kevésbé agresszívok. Többnyire világossejtes variáns fordul elő, de gyakran megfigyelhetünk papilláris variánst is [36, 45].

Jóindulatú vesedaganatok

Papilláris adenoma

A papilláris adenoma egy viszonylag kisméretű, szövettani elrendeződése papilláris vagy tubuláris, alacsony ISUP mag morfológiájú daganat. Kórlefolyása alapján jóindulatúnak mondható [35-37].

Onkocytoma

Az összes vese térfoglalás mintegy 3-7% -át teszik ki. A 4 cm-nél nagyobb vesetumrok esetében arányuk jelentősen nő, mintegy 20 %-ban fordul elő. Dignitása alapján jóindulatú térfoglalásként jellemezhető [46].

Habár a képalkotó vizsgáló módszerek egyre fejlettebbek, mégis elkülönítése a vesekarcinómától még mindig kihívást jelent. Emiatt egyre nagyobb számban nő a vesetumor biopsziák száma és jelentősége, azonban a mintavétel nem jelent egyértelmű és megbízható diagnózist. Szövettani mintavétel esetében a végleges szövettani eredmény ritkán mutat malignitást [47]. Mivel általában lassan progrediál, így a sebészi kezelés mellett az aktív utánkövetés is javasolható válogatott esetekben [48].

Cisztikus vesetumorok

A veseciszták besorolását a CT megjelenésük alapján Bosniak szerint végezzük, mely figyelembe veszi a szeptumok, meszesedések, valamint cisztafal kontrasztanyag felvételét. A Bosniak I. és II. elváltozások jóindulatúnak mondhatók, rendszeres követésük javasolt. A Bosniak IV. típusú veseciszták, vesetumornak minősülnek, melyek egyértelműen sebészi beavatkozást igényelnek [49]. A Bosniak II.F (Follow-up), és III. besorolású képletek azonban mind diagnosztikai, mind terápiás szempontból kihívást jelentenek. A pontos diagnózis felállításához ezen csoport kivizsgálásakor kontrasztanyagot ultrahang, illetve MR vizsgálat elvégzése megfontolandó. A kiegészítő képalkotó vizsgálatok elvégzése alapján a fenti betegek 12 %-a későbbi utánkövetés során Bosniak III. /IV. csoportba osztályozható, majd az elvégzett műtét után végzett szövettani feldolgozás alapján az esetek 83 %-a malignitást mutat [50].

A Bosniak III. veseciszták műtét utáni szövettani feldolgozása során, amennyiben rosszindulatú elváltozás igazolódik, az leggyakrabban ccRCC-nak bizonyul. Emellett egyéb alacsony malignitású cisztikus elváltozások, illetve pRCC-k dominálnak. Mivel ezen csoport sebészi kezelése során nyert szövettani eredmény az esetek mintegy felében jóindulatú elváltozást igazol, így választható alternatíva az aktív utánpótlás [50, 51].

Örökletes vesetumorok

Mindaddig tíz olyan genetikai szindrómát ismerünk, mely vesetumor kialakulásával jár. Az összes ismert vesetumorok 5-8 %-a vezethető vissza genetikai megbetegedésre. Többnyire az ismert családi anamnézis, valamint szindrómákra jellemző egyéb tünetek és a korai kialakulás hívja fel a figyelmet a jelenségre. Jellemzően a betegség 46. életév előtt alakul ki a betegek több mint 70 %-ában [43].

A fenti kategóriába sorolandók a von Hippel-Lindau szindróma, az örökletes pRCC szindróma, a Birt-Hogg-Dubé szindróma, fumarát hidratáz-deficiens RCC (FHD RCC), sclerosis tuberosa, SDH mutáció (germline succinate dehydrogenase mutation), nem-polipózus colorectalis daganat szindróma, hyperparathyroidizmus-álcapocs tumor szindróma, PTEN hamartóma szindróma (PHTS), szisztémás 3 kromoszóma transzlokáció, familiáris nem szindróma szerű ccRCC valamint a BAP1-variánsú RCC és a vesevelőből kiinduló medulláris vesekarcinóma [35].

Kezelésük többnyire sebészi úton történik, ezen belül is szervmegtartó műtét. Kivételt képez a FHD RCC és az SDH mutáció, melyek agresszív mivoltuk miatt korai és gyors veseeltávolítást igényelnek. A VHL szindróma esetében választható alternatíva az aktív utánpótlás és a nagyobb térfoglalások szervmegtartó műtete [52, 53].

Angiomyolipóma

Mezenchimális eredetű jóindulatú térfoglalás, mely ultrahang és CT képe alapján könnyen diagnosztizálható és követhető. Sporadikusan vagy a sclerosis tuberosa részeként jelentkezik, ez utóbbi esetben multiplex és kétoldali. Klinikai jelentőségét a spontán bevérzések és az ezzel járó életveszélyes állapotok adják (Wunderlich szindróma). Kezelése főleg sebészi, lehetőleg szervmegtartó, de indokolt esetben szelektív embolizáció és radiofrekvenciás abláció is szóba jöhet. Korábban 4 cm feletti méret esetében javasolták a beavatkozást, jelenleg ezt a klinikai kép, és a panaszok alapján kell meghatározni [54]. Sclerosis tuberosa esetében

gyógyszeres kezelésként” mammalian target of rapamycin” (mTOR) gátló (everolimus) terápia megkísérelhető [55].

A vesetumorok etilógiája

A látszólagos magas incidencia mögött feltehetően a széles körben elérhető diagnosztikai lehetőségek és a megfelelő szűrővizsgálatok népszerűsítése áll. Emellett szól az a tény is, hogy bár ezekben az országokban a leggyakoribb az előfordulás, azonban ezen esetek többnyire kezdeti stádiumú megbetegedések [56].

A vesetumorok kialakulásának fő rizikófaktorai a dohányzás, elhízás és a magasvérnyomás. A diagnosztizált vesetumoros betegek 52%-a dohányzik, vagy korábban dohányzott. A szövettanilag igazolt kromofób sejtes vesedaganatos betegek 38 %-a, míg a papilláris vese karcinómában szenvedő páciensek 61,9 %-a dohányzik, vagy dohányzott [57].

Míg a cukorbetegség súlyosbító tényező a beteg kórtörténetében csakúgy, mint egyenesági felmenőknél előforduló vesedaganat, ezzel szemben a mérsékelt alkoholfogyasztás és a testmozgás protektív hatással bírhat [58, 59]. Több, egyéb káros tényező is felmerült a vesedaganatok kialakulásban, mint például egyes ételek fogyasztása, bizonyos karcinogén anyagokkal való érintkezés, radioaktív sugárzásnak való kitettség, azonban egyértelmű összefüggést az irodalom nem talált [33, 60].

A betegség kialakulásának a kockázatát leginkább a dohányzás elhagyásával, valamint a testsúly csökkentésével lehet minimalizálni [33, 56].

A vesedaganatok szűrése egyelőre nem megoldott, valamint nincs egyértelmű evidencia az általános széleskörű szűrőkampányok bevezetésére. Jelenleg nincs megbízható tumormarker, mely prognosztizálná a betegséget, sem vizeletvizsgálat, sem az általánosan használt labor vizsgálatok nem alkalmasak a korai észlelésre. Az évente elvégzett hasi ultrahang vizsgálat a legelfogadottabb és leggyakoribb szűrési módszer, azonban ennek hatékonysága függ a vizsgáló tapasztaltságától, illetve a tumor méretétől [61, 62]. A magas rizikócsoporthoz tartozó betegek szűrése (például végstádiumú veseelégtelenségben szenvedők) megfontolandó és magasabb eredmény rátával bír, ezen rizikócsoporthoz a vesekarcinóma előfordulásának tízszer nagyobb esélye van, mint az átlag populációban [63]. A fentiek alapján kijelenthető, hogy jelenleg nincs egyértelmű evidencia mely alátámasztaná a népesség általános szűrését, fenntartva azon kivételt, mely a fokozott rizikójú alcsoportokat érinti.

A vesetumorok stádiumai és diagnosztikája

A vesetumorok stádiumait a 2. táblázat foglalja össze

2. Táblázat: A vesetumorok stádiumai [37]

T -Tumor stádium
Tx primer tumor nem beazonosítható
T0 nincs feltételezett primer tumor
T1 ≤ 7 cm, szervre lokalizált
T1a ≤ 4 cm
T1b ≥ 4 cm, de ≤ 7 cm
T2 > 7 cm, de a vesére lokalizált
T2a > 7 cm de ≤ 10 cm
T2b > 10 cm, de a vesére lokalizált.
T3 a tumor betör a vesevénákba és /vagy a perinefrikus zsírszövetet involválja, de a Gerota fasciát nem töri át
T3a A tumor betör a vesevénákba, és vagy a peripelvikus zsírszövetbe és/vagy betör a perinefrikus zsírszövetbe a de a Gerota fasciát nem haladja meg
T3b A tumor betör a vena cava inferiorba de a rekeszt nem haladja meg
T3c A tumor betör a vena cava inferiorba és meghaladja a rekesz szintjét, vagy beszűri a vena cava inferior falát
T4 A tumor áttöri a Gerota fascia szintjét és /vagy beszűri a mellékvesét.
N- Nyirokcsomó stádium
N X Nincs észlelt nyirokcsomó áttét
N 0 Patológiai feldolgozás során nem igazolódott nyirokcsomó áttét
N 1 Regionális nyirokcsomó áttét igazolható
M távoli áttét
M0 nem észlelhető távoli áttét
M1 távoli áttét észlelhető

A vesetumorok diagnosztikája

A vesetumorok egy része sajnos előrehaladott stádiumban kerül felfedezésre, azonban köszönhetően a széles körben elterjed képalkotó vizsgálatoknak (UH, CT) egyre gyakrabban

derül fény a betegségre korai stádiumban. Egyes tanulmányok szerint az összes vesetumorok 60 % -a, illetve a I. stádiumú vesetumorok 87 %-a, ezenfelül a III. és IV. stádiumú betegek 36 % -a kerül felfedezésre incidentálisan [64, 65].

A klasszikus vesetumorra utaló tüneteket csak az esetek mintegy 5-6 % -ában észleljük (haematuria, tapintható hasi terime, deréktáji fájdalom). Paraneopláziás tüneteket is egyre ritkábban észlelünk, azonban az így felfedezett esetek rosszabb prognózissal, gyorsabb kórlefojással és agresszívabb szövettani eredménnyel jellemezhetők [65].

Ezek alapján könnyen belátható, hogy a fizikális vizsgálatnak, illetve a rutin labor vizsgálatoknak csekély szerepe van a korai stádiumú vesedaganatok diagnosztikájában.

A képalkotó vizsgálatok, mint ultrahang, CT, illetve MR jelentik a gyakorlatban a vesetumorok diagnosztikájának az alapját.

A vesetumorok kezelése

A szervre lokalizált vesetumor kezelése

A szervre lokalizált vesetumorok kezelése elsősorban sebészi úton történik. A T1 stádiumú vesekarcinóma „gold standard” kezelése a szervmegtartó műtét, vagy más néven veserezekció. Minden esetben törekedni kell a minél nagyobb mennyiségű ép veseállomány megtartására amennyiben ez technikailag kivitelezhető. A beavatkozás egyértelmű előnye, hogy a betegek műtét utáni vesefunkciója jobb, mint a radikális veseeltávolításon átesett betegek esetében, miközben onkológia hatékonysága megegyezik [66].

Függetlenül a beavatkozás módjától (nyílt, laparoskopos, vagy robot asszisztált) sem a terápiás hatékonyságban, sem a műtét utáni vesefunkciós értékben nincs szignifikáns különbség. A minimál invazív eljárások egyértelmű előnye a kisebb postoperatív fájdalomcsillapító igény, a kedvezőbb kozmetológiai eredmény, hátrányuk azonban a hosszabb melegiszkémiás idő, valamint a hosszabb műtéti idő és altatási idő [67]. Habár a parciális nefrektómiák esetében magasabb a szövődmény ráta, valamint a vérveszteség, mégis T1 stádiumban hosszútávon előnyt jelenhet a sikeres beavatkozás a beteg szempontjából [68].

A tumor mérete és elhelyezkedése, valamint egyéb szempontok alapján különböző predikív modellek állnak rendelkezésre melyek segítenek a szervmegtartó műtét eldöntésében. A PADUA, Renal score illetve C-index esetében nincs szignifikáns különbség, mindegyik egyaránt elfogadott és a napi rutinban használatos [69].

A T2 stádiumú vesetumorok esetében a „gold standard” eljárás a radikális veseeltávolítás (nefrektómia), illetve kivételes esetekben a szervmegtartó műtét. Ahogy a veserezekciók

esetében itt sincs szignifikáns onkológiai különbség a különböző eljárások között, mégis a gyakorlatban a laparoszkópos radikális nefrektómia, valamint a robot asszisztált radikális nefrektómia az elfogadott eljárás [68].

A lokálisan előrehaladott (T3) esetekben a radikális nefrektómia mint alap beavatkozás a választandó eljárás. A stádiumtól függően kiegészítő beavatkozásokra is szükség lehet egy ülésben, melyek lehetnek mellékveseeltávolítás, retroperitoneális nyirokcsomó disszekció, vena cava inferior rezekció és tumor thrombus eltávolítás. Kivételes esetekben, amennyiben a tumor a vena cava inferioron keresztül a jobb pitvarfélbe propagál, szívsebészeti háttérrel megoldott, nyílt tumor eltávolítás (jobb pitvar megnyitással) mesterséges extrakorporális keringéssel (szívmotor) válik szükségessé [56, 70].

Alternatív kezelési eljárások

Azon betegek esetében, akik műtetre nem alkalmasak, vagy valamilyen okból ez a megoldás nem választható, léteznek alternatív beavatkozások, mely közül több még kísérleti stádiumban van, biztató kezdeti eredményekkel, azonban kevés irodalmi adat áll rendelkezésre ezek hosszútávú onkológiai hatékonyságáról.

Idős rossz általános állapotú betegeknél kisméretű vesetumorok esetében választható alternatíva az „aktív megfigyelés” (active surveillance), illetve az „éber várakozás” (watchful waiting). Mindkét esetben ajánlott a tumor biopszia elvégzése a döntés meghozatala előtt. A két módszer gyökeresen eltér egymástól abban a tekintetben, hogy míg az előbbi fenntartja annak a lehetőségét, hogy a beteg megfelelő időintervallumon belül kuratív kezelésben részesülhet, utóbbi viszont csak klinikailag szignifikáns, a beteg általános állapotát befolyásoló esetben indokol beavatkozást, mely többnyire szupportív vagy palliatív [71].

A kisméretű vesetumorok esetében választható alternatív kezelés a tumor abláció. Ez történhet radiofrekvenciás, illetve mikrohullámú eljárással, valamint biztató eredményekkel szolgálhat a kriobláció is. Mindhárom módszer elvégezhető perkután, illetve laparoszkóppal asszisztált módon is. Minden esetben kötelező a szövettani mintavétel, [72, 73].

A sztereotaxiás ablatív sugárkezelés klinikailag nem operábilis T1a és T1b esetekben alkalmazható. Több dózis eszkaláció létezik, az egyszeri 26 Gray (Gy) illetve a több frakcióban leadott dózisok (3x14 Gy, vagy 5x 6 Gy) mind megfelelő alternatívák [74].

Inoperábilis T3 vagy T4 daganatok esetében a szelektív vagy teljes artéria renalis embolizáció, mint palliatív eljárás jöhet szóba, ennek fő indikációja a vérvezelés, vagy a tumor okozta fájdalom [54].

A metasztatikus vesetumorok lokális kezelése

Metasztatikus vesetumorok esetében a kezelés multidiszciplináris és minden esetben a beteg tüneti kezelésére, valamint életminőségének javítására törekszik, mivel kevés esettől eltekintve, teljes remissziót nem remélhetünk. Oligometasztatikus esetekben, valamint, ha a beteg általános állapota megengedi citoreduktív nefrektómia javasolt. Egyértelmű evidencia szól a beavatkozás elvégzése mellett, mind a progresszió mentes idő, mind az átlagos túlélés tekintetében [75].

A távoli, jellemzően tüdő, máj vagy csont áttétek kezelése, eltávolítása egyértelműen javítja a beteg életkilátásait. Mind a sebészi úton végzett metasztázisok eltávolítása, mind az alternatív megoldások (abláció, vagy sugárkezelés) növelik a teljes túlélés esélyét [76, 77].

A metasztatikus vesetumorok szisztémás kezelése

A metasztatikus vesetumorok kezelésében a klasszikus kemoterápiának nincs szerepe és ellenjavallt. Kivételes esetekben (papilláris vesekarcinóma, illetve medulláris vesekarcinóma) megajánlható a beteg kezelésében, de eredményessége kérdéses [78, 79].

A VHL gén inaktivitása miatt felhalmozódó hipoxia indukálható faktor (Hypoxia-Inducible Factor: HIF) tulajdonképpen a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) és a trombocita eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor: PDGF) hiperexpresszióval jár, mely neoangiogenezishez vezet, így tumor kialakulását indukálja [80].

Ezen folyamatok megismerése vezetett az úgynevezett target terápiák kifejlesztéséhez, melyek széles körben elterjedtek a metasztatikus vesetumorok és egyéb daganatok (pl. melanoma) terápiájában.

A target terápiák között megemlítendő a tirozin-kináz inhibitorok (TKI) csoportja, (sunitinib, pazopanib, axitinib, cabozantinib, lenvatinib, livozanib), a monoclonalis VEGF gátló antitest terápia és az mTOR gátlók (Temsirolimus, Everolimus) alkalmazása [81].

A sunitinib orálisan adagolandó tirozin-kináz inhibitor, mely anti-tumor és anti-angiogenezis hatással bír. A korábban alkalmazott interferon kezelésekhöz képest javítja a teljes, illetve a progresszió mentes túlélést. Toxicitása miatt intermittálóan alkalmazható [81].

A pazopanib orális angiogenezis gátló. Hatásossága megegyezik a sunitinibével, viszont alacsonyabb mellékhatás profilja miatt a betegek jobban tolerálják [82].

Az axitinib második generációs orálisan adagolandó szelektív VEGFR-1, -2 és -3 gátló. Tekintettel arra, hogy sorafenibbel összehasonlítva nem nyújt előnyt sem progresszió, sem a túlélés tekintetében, így másodvonalban javasolt alkalmazása [83].

A cabozantinib másodvonalban adható orális tirozin-kináz inhibitor. Mind az mTOR gátlókhöz mind a VEGF gátlókhöz és a sunitinibhez képest is javítja a teljes túlélést és késlelteti a progressziót [84].

A lenvatinib multitarget TKI, mely gátolja a VEGFR1, VEGFR2, és VEGFR3 utakat, valamint inhibitorként hat a fibroblaszt receptorokra, a PDGFR α receptorokra. Egyelőre bevezetés alatt áll, hatásosságát még II. klinikai fázisú study keretében tesztelik [85].

A tivozanib első vonalban adandó szelektív TKI, mely egyértelműen előnyt nyújt a progresszió mentes időszakot illetően [86].

A monoklonális VEGF antitest terápia, (bevacizumab) jelenleg kivezetés alatt álló terápia, korábban intreferonnal társították, jelenleg atezolizumabbal társítva folyik klinikai vizsgálat hatásosságát illetően [87].

Az mTOR gátlók közül a temsirolimus jelenleg kivezetés alatt áll, az everolimus viszont VEGF rezisztens esetekben adható, végstádiumú betegeknél [85].

A másik vonal, mely metasztatikus vesetumорок esetén alkalmazható az immuntherápiás kezelési mód. Az immun checkpoint inhibitorok forradalmasították a metasztatikus vesetumорок kezelését, mind monoterápiában mind kombináltan jelentősen növelik a teljes túlélést, valamint a progresszió mentes túlélést. Másod és harmadvonalban alkalmazható terápiás készítmények, melyek blokkolják a gátló T sejtek PD-1 receptorát, vagy a cytotoxikus T sejt antigén (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 CTLA-4) útvonalát gátolják. Több klinikai összehasonlító tanulmány is igazolta a nivolumab hatásosságát más készítményekkel szemben végstádiumú vesetumoros betegek esetében [88].

Az immuntherápiák valódi létjogosultságukat a gyakorlatban kombinált terápiaként nyerték el.

A nivolumab és ipilimumab kombinációja a sunitinibbel szemben szignifikánsan jobb hatékonyságot mutat. Habár számos tanulmány támasztja alá a kombináció hatásosságát, azonban a mellékhatás profil, valamint szteroid adagolás következtében kialakuló szövődmények lehetősége miatt adása csak erre felkészült centrumokban, közepes vagy alacsony rizikócsoporthoz javasolt [89].

A tirozin-kináz és immun checkpoint inhibitorok kombinációban történő alkalmazása (axitinib és pembrolizumab, nivolumab és cabozantinib) több jelenleg is futó klinikai vizsgálat

tárgyát képezi. Jelen tudásunk alapján szignifikánsan javítja mind a teljes túlélést mind a progresszió mentes időintervallumot hosszabbíthatja [87, 90].

Összegezve a fentieket, jelenleg első vonalban metasztatikus vesetumor esetében naív betegeknél pembrolizumab és axitinib vagy nivolumab és cabozantinib vagy lenvatinib és pembrolizumab kezdő kombinációja javasolt a nemzetközi irányelv alapján. A hazai terápiás protokoll ettől némileg eltér ugyan, hiszen első vonalban tirozin-kináz inhibitor kezelés javasolt, majd erre építhetők fel másod és harmadvonalban a további kezelési lehetőségek [91].

III. 2. A vesedaganatokat érintő mutációk típusai, kialakulásának genetikai háttere

A humán daganatok patogenezise igen bonyolult és progresszív folyamat, több genetikai és epigenetikai változása összessége, mely a karcinogenezis megindulásához, a daganat növekedéséhez, fejlődéséhez és az áttétek kialakulásához vezetnek. Ahogyan már korábban említésre került, a vesetumorkok különböző szövettani típusai eltérő klinikai képpel és genetikai háttérrel rendelkeznek, melyek a prognózis és a célzott terápia szempontjából nagy jelentőséggel bírnak. Nagyon gyakran megfigyelhető a VHL gén deléciója, mely elsősorban a világossejtes vesekarcinóma kialakulására hajlamosít. A VHL deléció gyakran jár együtt tumorigenezissel, fokozott angiogenezissel (tumor méret növekedés) és metasztázis képződéssel [35, 36].

A vesetumorkok kialakulására hajlamosító mutációk további géneket is érinthetnek. Igen gyakoriak a triszómia és tetraszómia jellegű genetikai eltérések, valamint az Y kromoszóma deléciója is. Genetikai eltérések érinthetik a fumarate hydratase (FH), a tuberous sclerosis complex 1 (TSC1), a tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) és a PTEN géneket is. A mezenchimális epitheliális (Mesenchymal-epithelial Transition: MET) jellegű génmutációkat elsősorban alacsony malignitással jellemezhető papilláris szövettani típusú vesekarcinómában írták le, melyben 13%-os gyakorisággal jelentkezik [43, 92]. A MET protoonkogén, hibás működése révén a PI3K/AKT (Phosphoinositide 3-kinases/ Protein Kinase B) jelátviteli út aktiválása történik meg, mely sejtproliferációt és angiogenezist indít be [43, 92].

Az FH a mitokondriális Krebs-ciklus egyik enzimét kódoló génje, mutációs eltéréseit eddig leiomyomatosisban és vesekarcinómában azonosították [92, 93].

Noha a BHD gén szomatikus mutációja ritka sporadikus RCC-ben, hipermetilációja szinte minden RCC altípusban megfigyelhető [92-94]. Örökletes és sporadikus vesetumorkban gyakoribb lehet még a TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis complex) mutációja is, ami leginkább veseciszták kialakulásával hozható összefüggésbe. Említendő a FLCN (folliculin), és az SDH

(succinate dehydrogenase) gének mutációi is. Az SDH gén mutációja a HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 α) felhalmozódását okozza [95].

Röviden 3. táblázat foglalja össze a vesetumороkat érintő leggyakoribb génmutációkat és ezen genetikai eltérésselhez társuló betegségeket.

3. Táblázat: Az RCC kialakulásáért felelős gének és ehhez társult vesetumороk [92-94, 95]

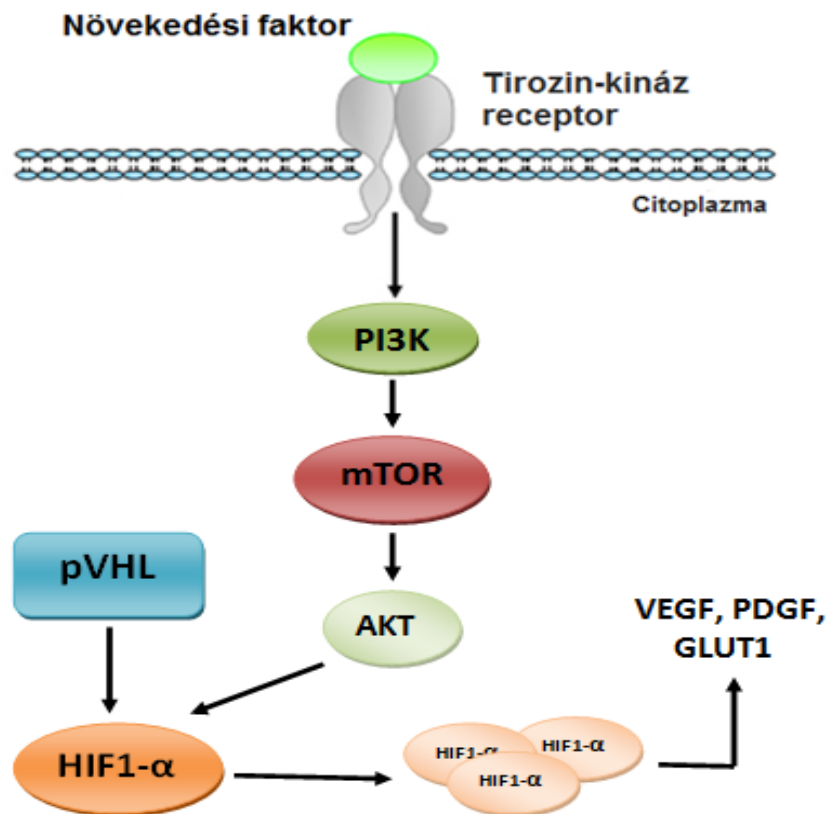
Gén	Kromoszóma lokalizáció	Megjelenő vesetumороk
VHL	3p25	ccRCC, veseciszták
PTEN	10q23	Metasztatikus RCC
BAP1	3p21.1	Metasztatikus RCC
MET	7q31	Papilláris RCC
FH	1q42-43	Papilláris RCC
FLCN	17p11.2	Kromofób RCC, veseciszták
TSC1/TSC2	9q34, 16p13	Angiolipoma, lymphangio-fibroma
SDH	3q29	Agresszív RCC

A továbbiakban röviden szeretnék említést tenni azokról a génekről, melyek vizsgálatát jelen tudományos munkában is fontosnak tartottuk. A VHL, a PTEN, valamint a BAP1 génekkel összefüggésbe hozható genetikai eltérések és ezek különböző tumoros folyamatokra kifejtett hatására szeretnék valamelyest kitérni.

A Von Hippel-Lindau betegség

A VHL gén inaktivációja a leggyakoribb mutáció, mely elsősorban egy autoszómális domináns öröklődésű betegség, a von Hippel-Lindau (VHL) szindróma és ehhez társult rosszindulatú tumorok kialakulásával jár. Sporadikus RCC-ben a VHL gén inaktivációja a betegek több mint 90%-ánál kimutatható [95-98]. Mind a belső, mind a családon belüli fenotípusos heterogenitás megfigyelhető a VHL-szindrómás betegekben. A VHL-betegségben szenvedők túlélési kockázati tényezői között szerepel a korai születési év, női nem, pozitív családi anamnézis, a korai betegség kezdete és a 3 cm-nél nagyobb tumorok. Az irodalommal összhangban a VHL gén (3p259) mutált, deletált, vagy hipermetilált lehet a sporadikus világossejtes RCC-k 40-70%-ában. A VHL tumorszupresszor gén vesztese megakadályozza a

HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 alpha) degradációját, így annak akkumulálódásához vezetve angiogenezis folyamat indukálásával mozdítja elő a vese tumorigenezisét [94, 99, 100]. A HIF-1 α egy heterodimer transzkripciós faktor, amely közvetíti a sejtek válaszát a hipoxiára. Hipoxiás körülmények között a HIF1- α felhalmozódik, ami először olyan angiogén faktorok szintjének növekedéséhez vezet, mint a PDGF, VEGF és a 1-es glükóz transzporter (Glucose transporter 1: GLUT-1). Mutáció esetén a pVHL inaktivációjának hatására a HIF-1 α nem bomlik le, ezért hipoxiára adott válaszreakciók játszódnak le. A VHL mutáció egyben a PI3K/AKT útvonalban idéz elő gátlást, ami elsősorban a vesetumorok tirozin-kináz gátlók hatására adott válaszreakcióiban mutatkozik meg (5. ábra). Ez adja a VHL mutáció vesetumorok terápiáját befolyásoló hatását [94, 99, 100].



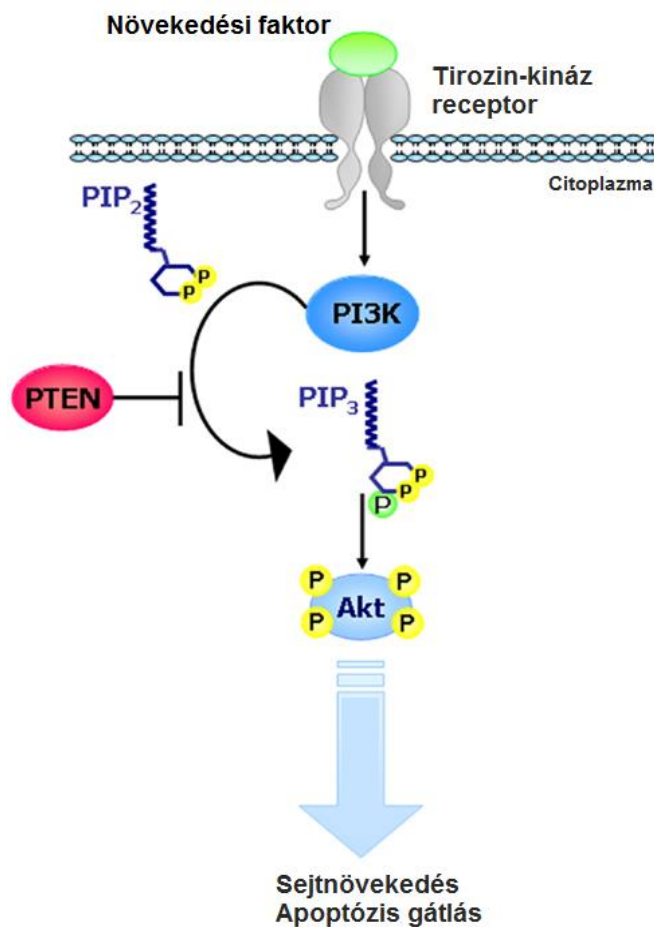
5. Ábra: A VHL gén által befolyásolt jelátviteli út

https://www.researchgate.net/figure/Targeting-the-VHL-gene-pathway-in-clear-cell-kidney-cancer_fig1_40897184

Phosphatase and tensin homologue (PTEN)

A PTEN gén az egyik leggyakrabban mutált tumorszuppresszor gén a daganatokban. A 10-es kromoszómán helyezkedik el és 9 exonból áll. A PTEN lipid-foszfataz aktivitással

rendelkezik, mellyel antagonizálja a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K)/AKT/mTOR útvonalat (6. ábra). A gén által kódolt fehérje egy foszfatáz, amely katalizálja a PIP3 defoszforilezését. Ez a jelátviteli út lehet felelős a tumorsejtek növekedéséért és proliferációjáért. A PTEN gént érintő mutációk típusa lehet missense, nonsense és inzerció, és ezek kombinációi is egyben. A PTEN gén felelős a kromoszóma stabilitásáért és a DNS helyreállításáért. A gén inaktivációjának következtében megnövekszik a genomiális instabilitás és a sejtproliferáció. Csökkent expresszióját számos tumor típusban megtalálhatjuk pl. tüdő-, prosztata-, vese-, emlőrák [101].



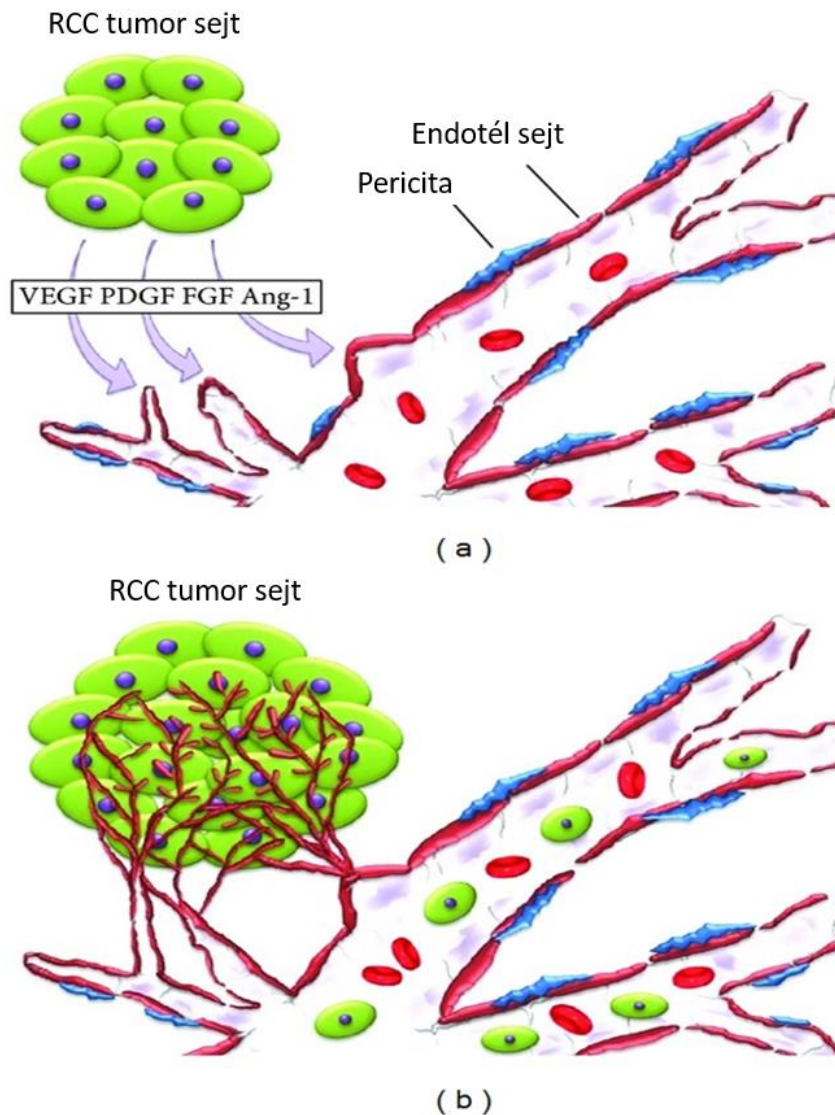
6. Ábra: A PTEN gén által szabályozott jelátviteli út

<https://www.mdpi.com/2072-6694/13/13/3120>

Az angiogenesis szerepe az RCC-ben, ezt befolyásoló genetikai eltérések

Az RCC egy erősen vascularizált tumor, amely a nefronok proximális tubulusaiban található hámsejtekből ered. Az angiogenesis folyamata döntő szerepet játszik az RCC

iniciálásában és progressziójában. Az RCC sejtekben a VHL gén gyakori inaktiválódása és a PI3K/AKT/mTOR jelátviteli út megváltozott aktivitása hozzájárul a HIF-1 α expressziójához. A HIF-1 α felgyorsítja az angiogenezist. A VEGF és PDGF faktorok megnövekedett expressziója új vaszkuláris érképződéshez vezet. Az új erek oxigénnel és tápanyagokkal lehetővé teszik a tumorok növekedését, és behatolását a környező szövetekbe, ezáltal metasztázisok létrehozását is (7. ábra). A legújabb vizsgálatok alapján bizonyos immunsejtek (makrofágok, hízósejtek, limfociták) is behatolnak az RCC-be, jelezve a tumort körülvevő mikrokörnyezet létfontosságú szerepét az RCC progressziójában. Mivel a tumorok növekedésének és terjedésének feltétele a megfelelő vérellátottság, angiogenezis inhibitorok alkalmazása eredményes lehet ezen tumorok kezelésében. Angiogenezis gátlókkal megakadályozhatjuk, vagy lassíthatjuk a tumorok növekedésének folyamatát, lehetővé téve a lassabb progressziót és a sebészeti terápiát [96, 100, 102].



7. Ábra: RCC tumor angiogenesis. a) A tumor angiogenesisének elősegítését befolyásoló tényezők. b) Daganatos ér és áttét képződése. Ang-1; angiopoietin-1; FGF; fibroblaszt növekedési faktor; PDGF; trombocita eredetű növekedési faktor; RCC; vesesejtes karcinóma;

A BAP1 gén mutációja

A BAP1 gén a VHL génhez hasonlóan a 3. kromoszómán lokalizálódik, így nem véletlen, hogy ezt a gént érintő mutációk a 2. leggyakrabban előforduló mutációk a VHL mutációt követően. Az úgy nevezett "BAP1 rák szindróma" által érintett esetekben szinte minden BAP1 mutáns allélt öröklő egyénnél egy vagy több rosszindulatú daganat alakulhat ki az élete során. BAP1 mutációt többnyire uveális és cután melanoma, mesothelioma és a világossesejtes

vesekarcinóma esetén irtak le. Ezek a daganat típusok hordoznak a legnagyobb valószínűséggel szomatikus biallélos BAP1 mutációkat. Molekuláris biológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a BAP1 tumorszuppresszor funkcióját elsősorban a sejtmagban fejt ki, ahol számos folyamatban vesz részt, beleértve a DNS-javítást és a transzkripciót. A BAP1 gén a citoplazmában mitokondriális anyagcserére hat [103].

A BAP1 mutált ccRCC a szokványos morfológiától eltérést mutat, inkább papilláris, tubulopapilláris architektúrát fest, szemcsés vagy diffúz citoplazmával, kiemelkedő eozinofil lebenyekkel és intenzív sejtmaggal. A BAP1 mutált ccRCC eseteknél a BAP1 génnek a sejtmagban történő elvesztését mutatták ki, elsősorban immunhisztokémiával. Amennyiben a BAP1 gén 2/3 részben mutált, ez a betegség klinikai státuszában is megmutatkozik. Ilyen BAP1 mutációval jellemzett ccRCC esetek G3-as patológiai státusszal és metasztázissal irhatók le. Az is nagyon érdekes, hogy a BAP1 gén mutációival azonosított esetek nagyban mutatnak összefüggést a betegek terápiára adott válaszával is, így módon befolyásolva a személyre szabott terápia eredményességét [103].

III. 3. A vesetumorok kialakulásában szerepet játszó epigenetikai faktorok

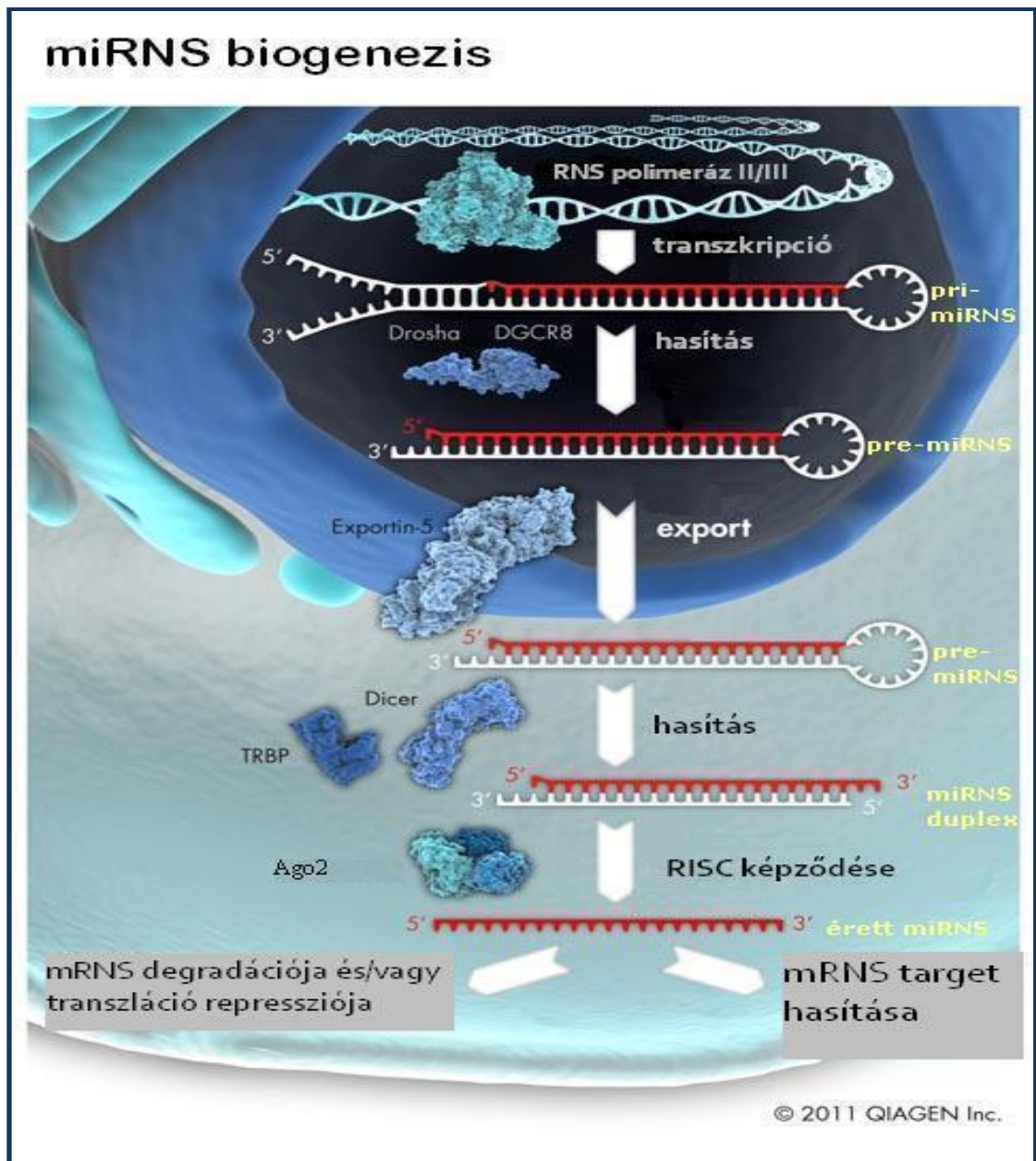
A miRNS-ekről általában

A miRNS-ek rövid, körülbelül 20-22 nukleotid hosszúságú, egy szálú, fehérjét nem kódoló RNS-ek, melyek szinte minden eukarióta sejtben előfordulnak [24, 104, 105]. Közvetlen úton a sejtekben található géneknek legalább a 30%-át szabályozzák. Jelenleg több adatbázis is ismert, mely egy specifikus miRNS targetjeinek számát hordozza, mely akár több ezer is lehet. A miRNS-ek targetjeik révén kapnak szerepet különböző olyan biológiai folyamatokban, mint a sejtek apoptózisa, proliferációja, sejt- és szöveti differenciáció, immunfolyamatok, valamint a különböző tumorokat érintő patológiai folyamatok [22, 24, 104, 106].

Az első miRNS-t, a lin-4-et 1993-ban Victor Ambros és mtsai azonosították *Caenorhabditis elegans*-ban, mely szerepet játszik a lárva fejlődésében [104, 107].

A miRNS-ek fejlődése és annak szabályozása

Az érett miRNS-ek képződése a nukleuszban kezdődik, ahol génjeikről RNS polimeráz enzim segítségével íródnak át egy „hajtúkanyar” szerkezetű, kettős szálú primer miRNS-t képezve. A prekursor miRNS (70 nukleotid hosszú) képzésben az RNáz III aktivitású Drosha enzimből és DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) fehérjéből álló komplex vesz részt [104, 105, 107, 108]. Az Exportin 5 transzport fehérje a prekursor miRNS-eket a sejtplazmába szállítja, ahol az RNáz-III enzim, a Dicer és ennek kofaktora TRBP (TAR RNA binding protein) a prekursor miRNS-t tovább alakítja 19-25 nukleotid nagyságú miRNS-duplexekké, mely közül az egyik miRNS szál degradálódik és létrejön az érett miRNS. Az érett miRNS az Ago 2 (Argonauta fehérje 2) proteinhez kötődve egy miR-RISC komplexben (RISC=RNS indukálta csendesítő komplex) stabilizálódik, mellyel kötődni tud a célba vett (target) mRNS-hez (8. ábra), [104, 108, 109].



8. Ábra: miRNS biogenezisének folyamata

chromeextension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://teo.elte.hu/minosites/ertekezes2013/schamberger_a.pdf

A miRNS-ek karcinogenezisben betöltött szerepe

A miRNS-ek nagy szerepet kapnak a sejtek növekedésében és fejlődésében, differenciációjában, így mindenképpen hozzájárulnak a tumorok kialakulásához [24, 105, 106]. Targetjeik révén a miRNS-ek onkogénként vagy tumorszuppresszorként funkcionálnak, mely alapján egy specifikus miRNS expressziója sejtburjánzáshoz vagy adott esetben akár fokozott

apoptózishoz vezet [104, 105, 107, 110]. Számos daganat esetén mutattak ki egy adott tumorra jellemző miRNS expressziós mintázatot, mely sok esetben segíthet a daganat osztályzásában, prognózis előrejelzésében is [24, 104, 111]. Az érett miRNS 5' végén található 2-8 nukleotid hosszúságú szakasz az úgynevezett 'seed-szekvenciának' felel meg, melyek bázis komplementaritás révén kötődnek a target gének mRNS 3'-UTR részéhez [104]. Ily módon egy specifikus miRNS több száz különböző célgénre is hatással lehet [105, 107, 109].

A miRNS-ek gátolni képesek a tumorképződésben szerepet játszó gének működését [109, 111]. A target gén mRNS-ének 3' UTR régiójához kötődve egy adott miRNS gátolhatja annak átíródását fehérjévé, így gátolva annak a működését is. A miRNS-ek képesek megakadályozni a már kész fehérje elvándorlását a szintézis helyéről, ami szintén jelentősen blokkolja a target gén működését. [109, 111].

miRNS-ek, mint tumorszuppresszorok

A daganatszövetben csökkent expressziót mutató miRNS-ek tumorszuppresszorként funkcionálhatnak. Ezek a miRNS-ek tumorszuppresszorként a daganatsejtek proliferációját és apoptózisát kontrolláló onkogének működését szabályozva gátolhatják a tumoros sejtek növekedését [105]. Tumorszuppresszorként említhetők a let-7, a miR-15, miR-143 és a miR-199a [108, 112].

A let-7 miRNS-t tumorszuppresszorként irták le tüdő-, petefészek tumorokban, illetve világossejtes vesekarcinómában, melynek expressziós szintje összefüggést mutatott a betegség kimenetelével és a túléléssel. A let-7 csökkent expressziója esetén jelentős összefüggést találtak az expressziós szint és a posztoperatív túlélési idő lerövidülése között. A let-7 miRNS túlműködése A-549 tüdő adenokarcinóma sejtvonalban sejtproliferáció gátlást okoz. Tumorszuppresszor hatását a RAS és MYC onkogének gátlása révén is kifejti [112].

miRNS-ek mint onkogének

Az onkogénként vagy „oncomiR”-ként ismert miRNS-ek negatívan befolyásolják a tumorszuppresszor gének működését. Az irodalom elsősorban a miR-21-, miR-221-et emlegeti ebben a szerepben. Ezen onkogén miRNS-ek jelenlétét máj-, emlő-, húgyhólyag-, tüdő-, pancreász-, papilláris pajzsmirigykarcinóma, prosztatata karcinóma és vesetumorok kapcsán is leírták. A tumoros folyamatban betöltött szerepüket a leggyakoribb targetjeik révén érik el. Ezek közé tartozik például a PTEN, PDCD4, TIMP3 és ritkábban a DDIT4. *In vitro* kísérletek alapján

a miR-221 expressziójának gátlása révén kedvezőbb terápiás hatás érhető el egyes daganatellenes szerekkel [18].

Onkogén miRNS-ként szerepel még a szakirodalomban a miR-210, miR-185, miR-106 és miR-155. A miR-155 overexpressziót mutatott emlő-, vastagbél-, tüdő-, pancreász- és haematológiai eredetű daganatokban [21, 26, 108, 112].

Néhány, már leirt fontosabb miRNS előfordulása vesetumороkban

A miRNS-ek szerepét alapvető fontosságúnak találták a vese működésének és homeosztázisának tekintetében is [104]. Teljes miRNS panel mintázata alapján a tumoros szövet elkülöníthető a normál veseszövetől, így a miRNS-ek a vesetumороk potenciális diagnosztikai eszközeivé válhatnak. Azonban egy adott miRNS biomarker szerepének megállapításához megfelelő számú szövettani vagy szérum mintára van szükség [18]. A **4. táblázat** az irodalomban már korábban leirt miRNS-t, annak targetjét és esetleges funkcióját foglalja össze a vesetumороkat illetően.

4. Táblázat: A vesetumороkban azonosított up- vagy downregulált miRNS-ek [18]

Upregulált miR-ek	Target	Funkció
miR-155	PTEN,	Sejtosztódást gátol
miR-21, miR-221	PTEN, PDCD4	Apoptózis gátlás, sejtproliferációt indukál, metasztázis képzés
miR-210	VHL-gén	Angiogenezist indukál
miR-34a	TCF21, PTPN13, SFRP1	Sejtproliferáció indukál
Downregulált miR-ek	Target	Funkció
miR-149 miR-141 miR-200 c miR-143	KCNMA1, LOX, VEGFA, SEMA6A	Sejtproliferációt indukál
Let-7 csoport	K-RAS, c-MYC	Sejtproliferációt gátok

A vesetumorok kapcsán kimelenedő a miR-21 és a miR-221, melyek szerepet játszhatnak a vesedaganatok kialakulásában és annak daganatos elváltozásaiban [106]. A miR-21 emelkedett expressziós szintjét főleg a vese proximális tubulusában mutatták ki, mely összefüggésbe hozható vesedaganatos betegekben észlelt tumor méretével. A miRNS-ek targetjeit azonosító adatbázisok alapján a vesetumorok kialakulását érintő jelátviteli útvonalakban az NF κ B lehet a miR-21 egyik legjelentősebb közvetlen targetje, mely révén a miR-21 hatással van a sejtek proliferációjára, valamint a metasztázis kialakulására [20, 22, 26, 113].

A miR-221 emelkedett szintje volt megfigyelhető hasnyálmirigy-, prosztatata-, papilláris pajzsmirigykarcinóma, glioblasztóma esetében [18, 26, 105]. A miR-221-nek a vesedaganatok kialakulásának folyamatában való részvételét tárgyaló irodalom egyelőre elenyésző, azonban számos daganattípus esetén emelkedett expressziós szintjét igazolták. Éppen ezért gondoljuk azt, hogy a miR-21 és miR-221 –ről szerzett információk pontosabb megismerése fontos lehet a vesetumorok patomechanizmusának megértésében.

A miR-21 és miR-221 humán daganatokban

A miR-21 expresszióját számos humán daganatban hozták összefüggésbe azoknak kialakulásával [23-25, 27]. A miR-21-ről onkogén szerepét több tanulmány igazolta, mely szerep révén ez a miRNS tumorszuppresszorként olyan target géneket céloz meg, mely jelentősen befolyásolja a sejtek proliferációját, apoptózisát és differenciálódását [19-21]. *In vivo* és *in vitro* vizsgálatok már bizonyítják a miR-21 diagnosztikai és prognosztikai szerepét különböző humán rosszindulatú daganatokban. Az irodalom alapján a miR-21 vesesejtes karcinómában mutatott upregulációja összefüggést mutat a betegek alacsonyabb túlélésével [24]. Érdekes módon a jelentősen magas miR-21 expressziója a magasabb patológiai grádussal társul [24, 25]. Legújabb *in vitro* bizonyítékok alapján a miR-21 jelentős szerepet játszik a rákellenes gyógyszerrezisztenciában is [24-26]. A miR-221-ről szintén kimutatták, hogy számos humán tumorban jelenik meg mint onkomiR [30]. A miR-221 upregulációját szintén számos rosszindulatú daganatban észlelték, beleértve a gasztrointenzstinális tumorokat, a hepatocelluláris karcinómát, a húgyhólyagrákot, a hasnyálmirigy-rákot, a papilláris pajzsmirigykarcinómát, a glioblasztómát, a bőr melanómát és a limfómát [23, 29, 31]. Úgy

szintén szignifikáns összefüggést mutattak ki a miR-221 expressziós szintje és a klinikopatológiai tumorjellemzők között, beleértve a TNM stádiumot, a lokális inváziót, az áttéteket, a prognózist, a sugárérzékenységet és egyben a tumorelleses gyógyszerrezisztenciát [30].

Minden elérhető információ ellenére a miR-21 és a miR-221 ccRCC-ben mutatott expresszióját illetően a vizsgálataink megkezdésekor még igen korlátozott adatok álltak rendelkezésünkre [24, 25].

Mindezen háttér információra alapozva ebben a tudományos munkában célul tűzük ki a vesetumoros betegek ép/ tumoros szövetminta párojain a miR-21 és miR-221 expressziójának vizsgálatát. Szintén fontosnak tartottuk a miR-ek klinikopatológiai jelentőségének elemzését, valamint a miR-21 és miR-221 lehetséges szerepének vizsgálatát a RCC kialakulásában.

IV. Anyagok és módszerek

IV. 1. Mintagyűjtés

A miR – el történő vizsgálatokhoz 24 tumoros és 24 ép (több mint 3 cm távolságra a tumoros szövettől) szövetszövetminta 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 szövetszövetminta párokkal dolgoztunk. A minták gyűjtése a Debreceni Egyetem Urológiai Klinikáján vesetumorral 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 [35, 37]. A helyi invázió a TNM klasszifikáció segítségével lett értékelve. Minden humán szövetszövetminta metasztatizálás nélküli primer tumorból származott. A szövetszövetminták a műtéti eltávolítást követően azonnal folyékony nitrogénbe lettek helyezve, majd $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on voltak tárolva a további feldolgozásig.

IV. 2. 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -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 (9. Ábra). 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.



9. Ábra: Nanodrop 1000 spektrofotométer (<https://www.gmi-inc.com/product/thermo-scientific-nanodrop-1000/>)

IV. 3. Reverz transzkripció (RT-PCR)

Az izolált totál RNS-ekből a Tetro-cDNS szintézis kit (Bioline, London, Egyesült Királyság) felhasználásával cDNS átíratot készítettünk, a gyártó utasításainak megfelelően (5. táblázat). 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 (10. ábra).

5. Táblázat: A reverz transzkripcióhoz szükséges reagensek összemérése:

Bemért reagens	Mennyiség
Totál RNS	n μ l
Primer Random Hexamer	1 μ l
10mM-os dNTP mix	1 μ l
5x RT puffer	4 μ l
RNáz inhibitor	1 μ l
Tetro reverz transzkriptáz (200 U/ μ L)	1 μ l
DECEP kezelt víz	(20-8-n) μ l
Az összes bemért reagens RNS-sel együtt	20 μl



10. Ábra: LightCycler 2.0 thermocycler készülék (<https://www.geminibv.com/labware/roche-lc-carousel-centrifuge-lightcycler-2-0-pcr-fluorescence-meter/>)

IV. 4. A miR-21 és a miR-221 vizsgálata során alkalmazott kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

A miRNS prekursorok expresszióját qRT-PCR technológiával vizsgáltuk a LightCycler 480 real-time -PCR készüléket (Roche GmbH, Németország) használva (11. ábra), A reakció kivitelezése 96-lyukú plate-en 20 μ l végtérfogatban (8 μ l RT termék, 10 μ l SYBR Green Master mix és 2 μ l 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 leirt stabil expressziós értékek alapján. A miRNS-ek azonosításához használt specifikus primer párok a 6. táblázat-ban találhatóak.

6. Táblázat: A miRNS specifikus primer párok szekvenciái

miRNS	Forward	Reverz
miRNS-203	(5'-3') TCCAGTGGTTCTTAACAGTTCA	(5'-3') GGTCTAGTGGTCCTAAACATTTC
miRNS-21	(5'-3')GCTTATCAGACTGATGTTGACTG	(5'-3') CAGCCCATCGACTGGTG
miRNS-221	(5'-3')CCTGGCATAACAATGTAGATTCTG	(5'-3')AAACCCAGCAGACAATGTAGCT



11. Ábra: LightCycler 480 RT-PCR készülék

(<https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/lightcycler-480-ins-445.html>)

A PCR termék amplifikációja a SYBR Green által kibocsátott fluoreszcencia intenzitás alapján lett mérve. A fluoreszcens festék az extenziós fázis során a duplaszálú DNS-hez interkalálódik, ennek megfelelő intenzitás jelet ad minden lefutott ciklus végén. Minden ciklus végén így meghatározhatjuk a jelen lévő duplaszálú DNS mennyiségét. Az összes mintával triplikátumban lett futtatva a reakció, mely 45 cikusból állt, és a következő paraméterek mellett lett végrehajtva: 95 °C-on 10 perc, majd 95 °C-on 10 másodperc, 60 °C-on 1 perc és 72 °C-on 5 másodperc.

IV. 5. A PTEN és BAP1 gének expressziós vizsgálatához alkalmazott kvantitatív valós-idejű polimeráz lánreakció (qRT-PCR)

A PTEN és a BAP1 gének expressziós szintjét gén-specifikus primerekkel vizsgáltuk 25 µl reakciós végtérfogatban (7. táblázat). 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).












7. Táblázat: A szekvenáláshoz használt gén-specifikus primer párok szekvenciái

Gén	Forward	Reverz
PTEN	(5'-3') TGGATTCGACTTAGACTTGACCT	(5'-3') GGTGGGTTATGGTCTTCAAAAGG
BAP1	(5'-3') CCCGCGGGAAGATGAATAA	(5'-3') ACCCCCTTGACACCGAAATC

IV. 6. 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 szekvenálós vizsgálatokhoz. A DNS izolálás az alábbi lépésekből állt:

1. Megközelítőleg 30 mg humán veseszövetet homogenizáltunk TissueRuptor kés-homogenizátor segítségével, majd a homogenizátumot mikrocentrifuga csövekbe helyeztük.
 2. A mintát 180 µl Lizis puffer T1 és 25 µl Proteináz K hozzáadásával 1-3 órán keresztül 56 °C-on elő-inkubáltuk.
 3. A mintákhoz ezt követően 200 µl Lizis puffert 3-at adtunk, az elegyet erőteljes vortexeléssel kevertük, majd 10 percen keresztül inkubáltuk 70 °C-on.
 4. Az inkubálást követően 210 µl 96%-os etil-alkoholt adtunk a mintákhoz, mellyel elősegítettük a DNS szilika-membránhoz való kötődését.
 5. A lizált mintákat egy gyűjtőcsőbe helyezett szilika-membránt tartalmazó oszlopra pipettáztuk, melyet 1 percig 11000 g-n történő centrifugálás követett. A centrifugálás során a DNS az oszlophoz kötődött.
 6. A membránhoz kötött DNS-t 500 µl mosó pufferrel mostuk 1 percig, amit egy újabb mosás követett koncentráltabb mosó pufferrel, a B5-tel, majd 1 percig centrifugáltuk 11000 g-n.
 7. A membránt puffer nélkül szárítottuk 1 perces centrifugálással 11000 g-n.
 8. Végezetül a DNS-t 100 µl eluáló pufferrel oldottuk le az oszlopról.
- A folyamat a 12. sematikus ábrán látható.

NucleoSpin® Tissue			
1	Minta előkészítés	Minta darabolása 25 mg-os darabokra	
2	Minta elő-lizálása		180 µl T1 25 µl Pteoináz K 56 °C, 1-3 óra
3	Minta lizálása		200 µl B3 70 °C, 10 perc
4	DNS kötés előkészítése		210 µl 96-100 % etanol
5	DNS kötés	 	Lízátum átmérése 11.000 x g, 1 perc
6	Szilika membrán mosása	  1. és 2. 	1.Mosás 500 µl BW 2.Mosás 600 µl B5 11.000 x g, 1 perc
7	Szilika membrán szárítása		11.000 x g, 1 perc
8	DNS eluálása	 	100 µl BE szobahőmérséklet, 1 perc 11.000 x g, 1 perc

12. Ábra: A NucleoSpin DNS izoláló kit sematikus protokollja

(<https://www.mn-net.com/media/pdf/5b/d0/d9/Instruction-NucleoSpin-Tissue.pdf>)

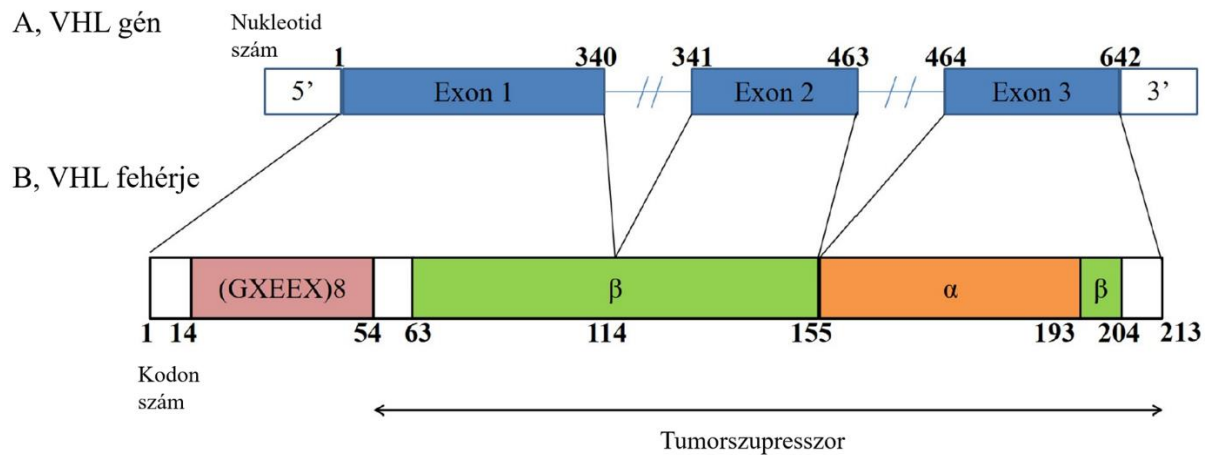
IV. 7. PCR amplifikáció:

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. A VHL gén exont lefedő primerek az 13. ábra alapján készültek.

A. 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 (8. táblázat). Minden 50

μl végtérfogatú reakcióközeg 100 ng genomi DNS-t, 0,2 mM dezoxinukleotid trifoszfátot, 1 x Green GoTaq® Reakció puffert, 2,5 mM MgCl₂-ot, 1,25 egység GoTaq® 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.



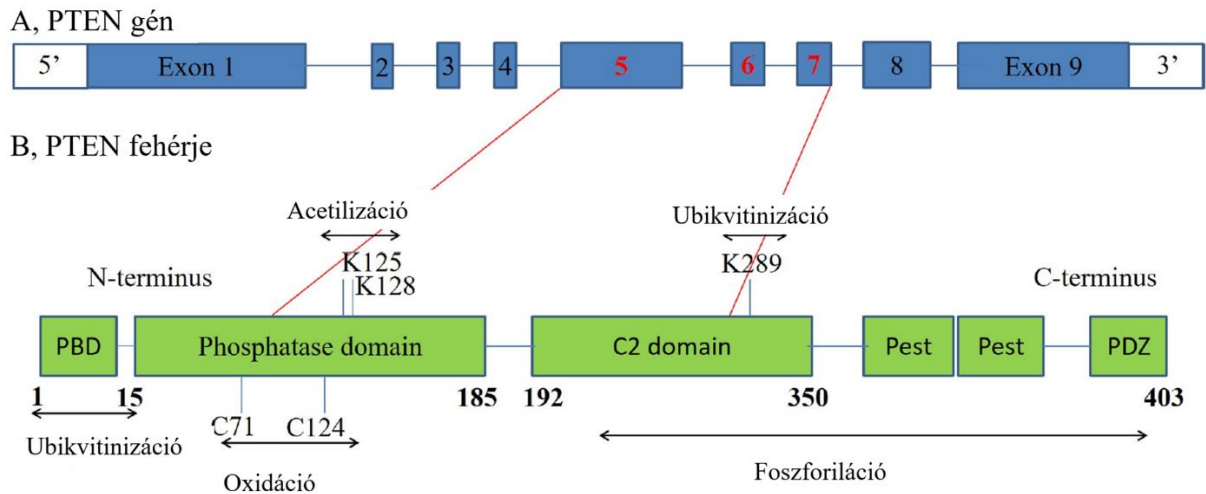
13. Ábra: A VHL gén a 3. kromoszómán lokalizálódik. A VHL gén (A) és a VHL fehérje (B) szerkezeti felépítése: A gén 10 kb-ból épül fel, mely három exont tartalmaz. A VHL fehérje egy 18 kDa-os és egy 30 kDa-os formában termelődik. A gén által kódolt fehérje az elongin B-t, elongin C-t és cullin-2-t indukáló fehérjekomplex komponense, mely ubiquitin ligáz E3 aktivitással rendelkezik. Ez a VHL fehérje fő funkciója. A VHL fehérje 214 aminosavat, két strukturális domént tartalmaz, egy α-doménnel és egy β-doménnel rendelkezik [1-6] .

8. Táblázat: VHL gén esetén az 1-3 exonokra tervezett primer szekvenciák

Exon	Forward	Reverz
Exon 1A	5'-TAT AGT GGA AAT ACA GTA ACG AG-3'	5'-GAA GTT GAG CCA TAC GG-3'
Exon 1B	5'-AGA GTA CGG CCC TGA AGA A-3'	5'-GCT TAC GAG CAG CGT ACA-3'
Exon 2	5'-ATC TCC TGA CCT CAT GAT CC-3'	5'-GGG CTT AAT TTT TCA AGT GG-3'
Exon 3	5'-TGA GAT CCA TCA GTA GTA CAG G-3'	5'-CTA AGG AAG GAA CCA GTC C-3'

B. 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 (14. ábra, 9. táblázat).



14. Ábra: A PTEN gén (A) és PTEN fehérje (B) szerkezeti felépítése: A PTEN tumorszuppresszor gén, amely a 10q23.31-hez illeszkedik, egy 403 aminosavból álló fehérjét kódol. A fehérjének két fő funkcionális doménje van, az N-terminális (az 1-5 exon által kódolt) és a C-terminális domén (a 6-9 exon által kódolt). A fehérje egy foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfát 3-foszfataz. A foszfataz domén (5-ös exon által kódolt) tartalmazza az aktív helyet, amely a fehérje enzimatikus funkciójáért felelős, a C2 domén pedig a foszfolipid membránhoz kötődik [114-118].

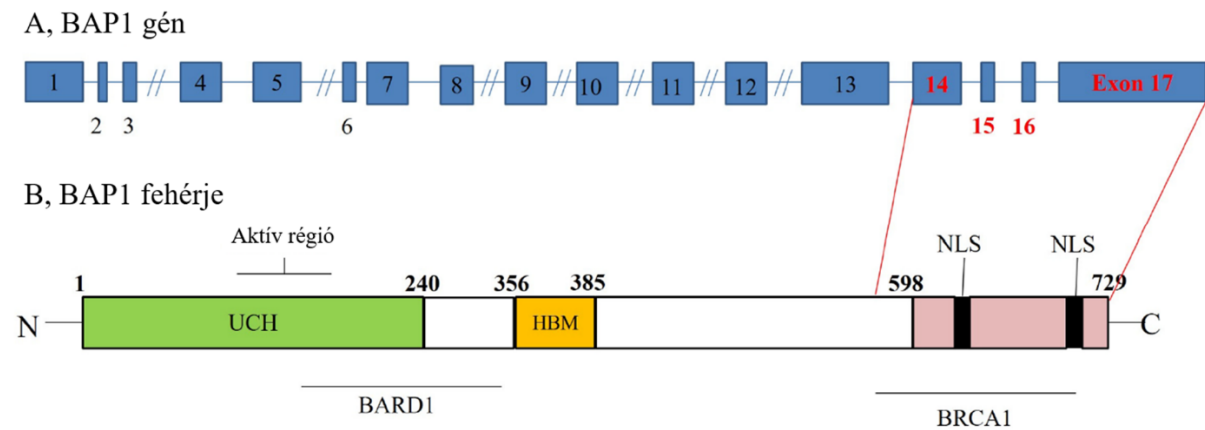
9. Táblázat: PTEN primer szekvenciák

Exon	Forward	Reverz
Exon 5 (első pár)	5'-AGT TTG TAT GCA ACA TTT CTA A-3'	5'-TTC CAG CTT TAC AGT GAA TTG-3'
Exon 5 (második pár)	5'-GAC CAA TGG CTA AGT GAA GAT-3'	5'-AGC AAC TAT CTT TAA AAC CTG T-3'
Exon 6	5'-TTG GCT TCT CTT TTT TTT CTG-3'	5'-ACA TGG AAG GAT GAG AAT TTC-3'
Exon 7	5'-ACA GAA TCC ATA TTT CGT GTA-3'	5'-TAA TGT CTC ACC AAT GCC A-3'

Minden 50 µl végtérfogatú reakcióközeg 100 ng genomi DNS-t, 0,2 mM dezoxinukleotid trifoszfátot (dNTP), 1 x Green GoTaq® reakció puffert, 2,5 mM MgCl₂-ot, 1,25 egység GoTaq® 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.

C. BAP1 gén szekvenálása

A BAP1 gén négy exon-ja (exon 14-17) 6 intron-alapú primer párral lett amplifikálva, 3 primer pár használatával (15. ábra, 10. táblázat).



15. Ábra: a BAP1 gén (A) és BAP1 fehérje (B) szerkezeti felépítése: A humán BRCA-1 fehérje asszociált (BAP1), a 3-as kromoszóma rövid karján található (3p21.2) a BAP1 gén által kódolt fehérje. A BAP1 gén 17 exonból áll. A BAP1 egy magi ubiquitin carboxy-terminál hidrolázt kódol (UCH), amely a számos deubiquitináló enzimek egyike. A humán BAP1 fehérje (80,4 kDa) 729 aminosav hosszú és három doménből áll: A, egy ubiquitin carboxyl-terminál hidroláz (UCH) N-terminális katalitikus domén amely az ubiquitinált szubsztátokról távolítja el az ubiquitint; B, egy egyedi linker régió, amely tartalmaz egy C1, sejt-kötő domént a 365-385 oldalláncoknál; C, egy C-terminális domént a 598-729 oldalláncokkal, melyek tartalmaznak egy UCH37-szerű domént (ULD) a 675-693 oldalláncokon valamint két maglokalizációs szekvenciát a 656-661 és a 717-722 oldalláncoknál [119].

10. Táblázat: A vizsgálatainkban tanulmányozott BAP1 exonokra tervezett primerek szekvenciái

Exon	Forward	Reverz
Exon 14	5'-CCTTGGACTGGCTCACTGG-3'	5'-CAGCCACCAATCTTCACACC-3'
Exon 15-16	5'-CTCGTGGGGCTTTGTTGC-3'	5'-AGGGGAGGGGAGCTGAAG-3'
Exon 17	5'-ATGCGCTGCTGTCTTAAGT-3'	5'-ACTGGGAAAAGGGGAAGTGG-3'

Minden 50 µl végtérfogatú reakcióközeg 100 ng genomi DNS-t, 0,2 mM dezoxinukleotid trifoszfátot, 1 x Green GoTaq[®] Reakció puffert, 2,5 mM MgCl₂-ot, 1,25 egység GoTaq[®] 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.

IV. 8. 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.

IV. 9. A miRNS elemzéshez használt C_p értékek elemzése és statisztikai analízise

A miRNS expressziók kiértékelése relatív kvantifikációs módszerrel történt. A vizsgált miRNS-ek expressziós szintje a különböző minták közötti eltérések korrigálása miatt egy referencia miRNS-hez lett normalizálva. A normalizáláshoz a miRNS-203-at választottuk, mely az irodalom szerint is, de az általunk vizsgált tumoros és ép vese szövetmintákban is egyaránt stabil expressziót mutatott. A crossing point cycle (C_p) értékek meghatározásához az Exon 4 LightCycler 480 szoftvert (LightCycler 480 Software 1.5, Roche, Bazel, Svájc) használtuk. A miRNS expressziós értékeket a normalizált triplikátumok átlagával, majd a 2^{-dC_p} módszerrel határoztuk meg.

IV. 10. *In silico* target elemzés miRNS adatbázisok segítségével

A miR-21 és miR-221 azon lehetséges célpontjainak azonosításához, melyek szerepet játszhatnak a világossejtes vesekarcinóma kialakulásának szabályozásában, három adatbázist használtunk: miRanda, PicTar és TargetScan.

IV. 11. Statisztikai analízis:

Az expressziós értékek közötti szignifikancia meghatározásához páros t-probát végeztünk az SPSS 21.0 verziójú szoftware használatával (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.), amely során a $P < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

V. Eredmények

V. 1. A mutációs vizsgálatokba bevont betegek klinikopatológiai jellemzői

A vizsgált populációba 24 beteg volt bevonva, akiket a Debreceni Egyetem Urológiai Klinikáján vesetumorral diagnosztizáltak és műtéti eljárásnak vetettek alá. A kioperált szöveti részek hisztopatológiai feldolgozásnak lettek alávetve, mely vizsgálatot gyakorlott klinikai patológus végezte. Az elemzésből származó klinikai adatok összesítése az 11. táblázatban látható.

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 vese nyílt eltávolítása, vagy a laparoszkópos 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 vesekarcinóma (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 (11. táblázat). A betegek előzetes szokásairól, mint például a dohányzás vagy egyéb környezeti, szociális tényezők nem álltak rendelkezésre adatok.

11. Táblázat: A mutációs vizsgálatokhoz használt humán vesetumoros betegek klinikopatológiai adatai

Mintaszám	Kor/Nem	Szövettani típus	Patológiai Grádus	Patológiai státusz	TNM klasszifikáció
1.	40/nő	ccRCC	2	pT1a	T0, N0,M0
2.	68/nő	ccRCC	2	p T4	T0, N0,M0
3.	62/ffi	ccRCC	3	p T4	T0, N0,M0
4.	64/nő	ccRCC	3	p T4	T0, N0,M0

5.	72/nó	ccRCC	3	p T3a	T0, N0,M0
6.	55/fñ	ccRCC	2	p T1a	T0, N0,M0
7.	57/nó	ccRCC	2	p T1a	T0, N0,M0
8.	36/fñ	ccRCC	3	p T4	T0, N0,M0
9.	39/nó	ccRCC	3	pT1a	T0, N0,M0
10.	72/nó	AML	—	—	—
11.	60/nó	oncocytoma	—	—	—
12.	47/nó	ccRCC	3	pT1a	T0, N0,M0
13.	69/fñ	ccRCC	3	pT4	T0, N0,M0
14.	53/nó	ccRCC	3	pT4	T0, N0,M0
15.	49/fñ	ccRCC	3	pT1a	T0, N0,M0
16.	52/nú	ccRCC	3	pT1b	T0, N0,M0
17.	56/fñ	ccRCC	3	pT1b	pNx, pMx
18.	69/fñ	ccRCC	3	pT1a	T0, N0,M0
19.	37/nó	ccRCC	3	pT1a	T0, N0,M0
20.	49/fñ	ccRCC	2	pT1a	T0, N0,M0
21.	72/nó	ccRCC	2	p T1a	T0, N0,M0
22.	36/nó	AML	—	—	—
23.	41/fñ	ccRCC	2	pT1b	T0, N0,M0
24.	46/fñ	pRCC	2	pT1b	T0, N0,M0

pT1a: a tumor méret kisebb mint 4 cm és szervspecifikus, **pT1b:** a tumor mérete nagyobb mint 4 cm, de kevesebb mint 7 cm és a tumor szervre lokalizált; **pT3a:** a tumor kiterjed a vese vénákra vagy annak a szegmentális ágaira, behatolhat a medence rendszerbe, vagy a perirenális vagy renális sinusok körüli zsírszövetbe, de ezenkívül más részt nem érint, nem halad túl a Gerota fascián, **pT4:** a tumor az adrenális mirigyig terjed, **pN0/pM0:** a beteg nyirokcsomó státusza negatív, **ccRCC:** clear cell renal cell carcinoma (világossejtes vesekarcinóma), **pRCC:** papilláris típusú vesekarcinóma, **AML:** angiomyolipoma;

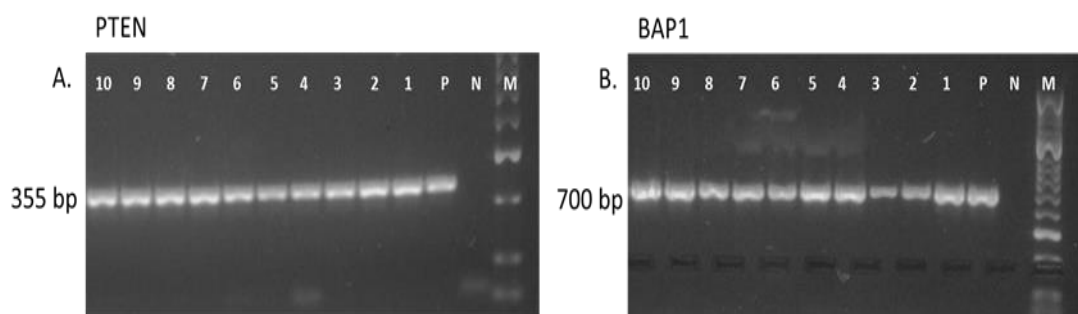
Patológiai vizsgálat szerint az összes vizsgált 24 minta közül 21 beteganyagot lehetett grádussal ellátni, mivel az AML és az oncocyoma patológiai grádussal nem jellemezhető. A 21 betegre vonatkozó patológiai grádus szerinti megoszlást a 12. táblázat foglalja össze.

12. Táblázat: A vizsgálatba bevont 21 beteg vesetumoros mintáinak szövettani grádusa és a nemek szerinti megoszlása

Szövettani Grádusok	Grádus %	Férfi betegek száma %	Nőbetegek száma %
2-es Grádus	8 eset (38,095 %)	4 50,0	4 50,00
3-as Grádus	13 eset (61,09 %)	8 61,53	5 48,46

V. 2. 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 β -aktinra specifikus primerekkel végzett PCR amplifikáció minden mintában egyetlen terméket eredményezett, ami megerősítette azt, hogy a mintákban nem történt RNS degradáció. Pozitív kontrollként humán emlőkarcinóma 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 (16/A, B ábra). A BAP1 és PTEN gének mRNS szintű expresszióját mind a 24 vizsgált primer vesetumoros mintában kimutattuk. A PTEN és BAP1 gének expressziójának reprezentatív képe a 16/A, B ábrán látható.

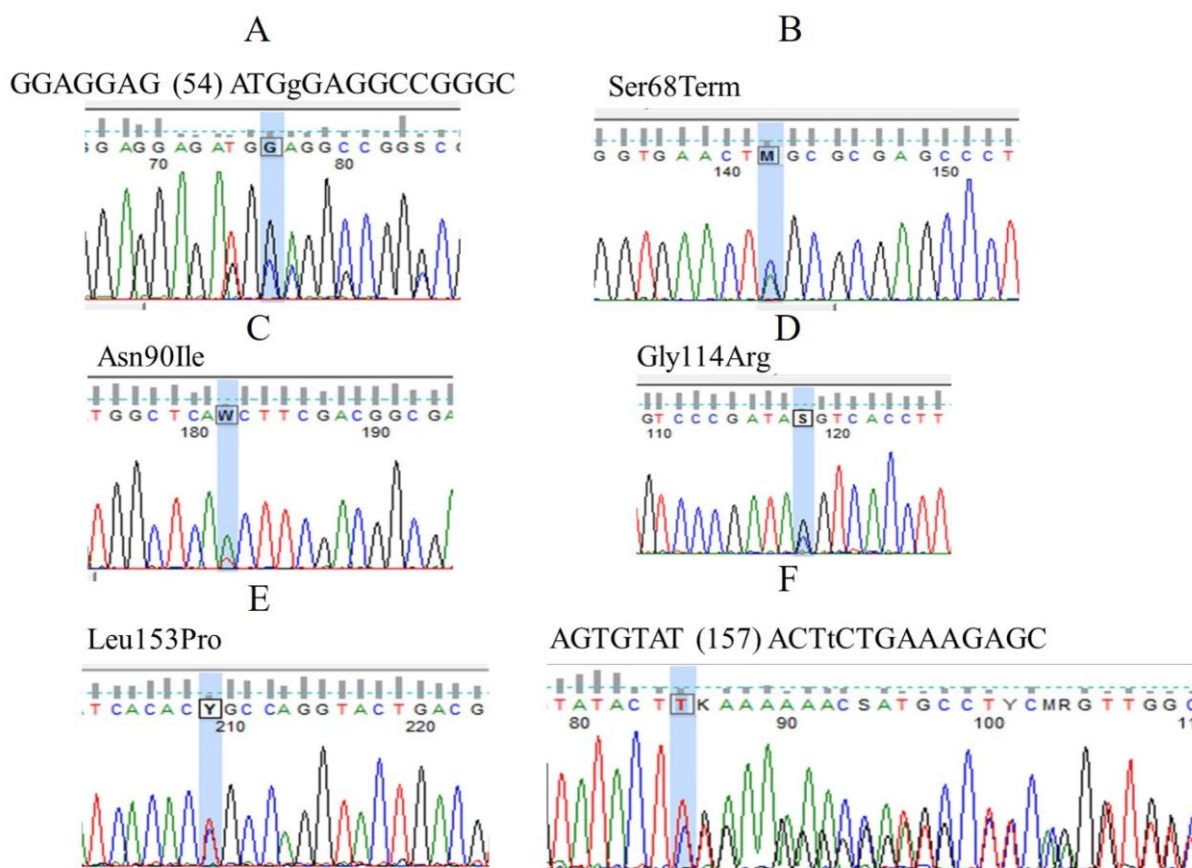


16. Ábra: A PTEN és BAP1 gének mRNS szintű expressziójának reprezentatív RT-PCR elemzése 10 humán vesetumoros mintában és MCF-7 emlőkarcinóma sejtvonalon (A, B). A PCR-termékek a PTEN esetében várt 350 bp méretűek voltak (A) a BAP1 esetében pedig a 700 bp-nak feleltek meg (B). Az M sáv, molekuláris marker (50 bp DNS-létra); a P sáv, pozitív kontroll (MCF-7 sejtvonal); az N sáv, negatív kontroll; az 1–10 sávok (A, B) reprezentatív humán vesetumoros minták;

A továbbiakban a veseszövet mintákból izolálalt DNS minták felhasználásával történt a VHL, PTEN és a BAP1 gének exon szerinti szekvenálása a Sanger-féle módszerrel. A veserezekción 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.

V. 3. 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 (17. ábra).



17. Ábra: Elektroferogrammok, amelyek VHL mutációkat reprezentálnak 1, GGAGGAG (54) ATGgGAGGCCGGGC heterozigóta; 2, Ser68Term heterozigóta (TCG-TAG); 3, Asn90Ile heterozigóta (AAC-ATC); 4, Gly114Arg heterozigóta (GGT-CGT); 5, Leu153Pro heterozigóta (CTG-CCG); 6, AGTGTAT (157) ACTtCTGAAAGAGC heterozigóta;

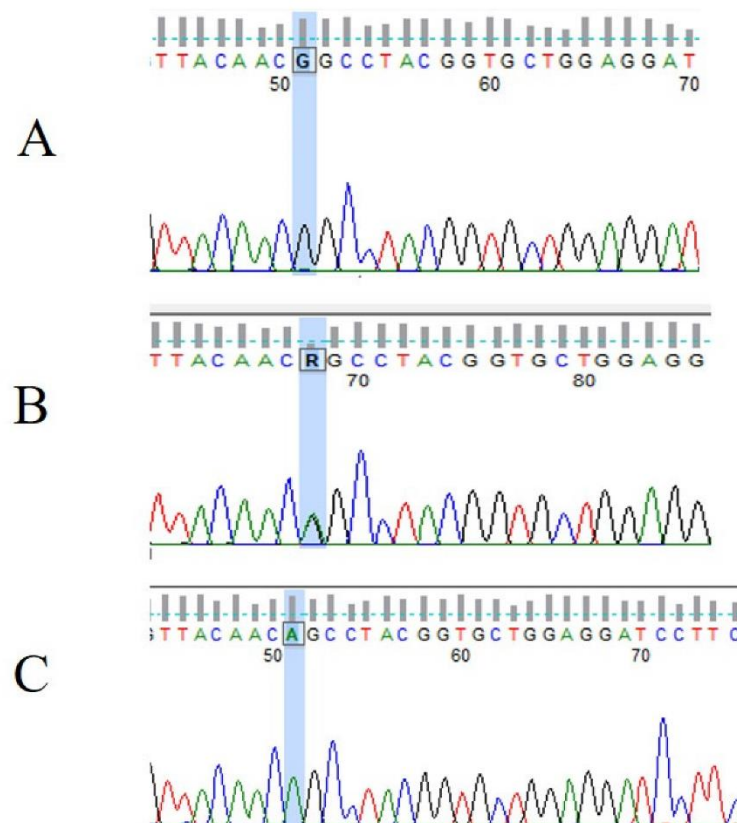
A Human Gene Mutation Database (HGMD) alapján mind a 6 mutáció patogén és von Hippel-Lindau szindrómát okoz. A 6 féle azonosított VHL mutáció közül három az 1. exonban, kettő a 2. exonban és egy a 3. exonban található.

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 aminosavcserevel (aszparaginból izoleucinba) a 90. pozícióban [120, 121];

4. A 2. exonba azonosítva volt a Gly114Arg heterozigóta forma: ez egy misszensz mutáció aminosavcserevel (glicinből argininné) a 114. pozícióban [122];
5. Leu153Pro heterozigóta forma: ez egy aminosav változással járó missense mutáció (leucin prolinná) a 153. pozícióban [123];
6. A 3. exonban AGTGTAT (157) ACTtCTGAAAGAGC heterozigóta forma: ez egy timin inszerciója a 157. pozícióban [124].

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 [17]. A VHL IVS1-195 nt G/A polimorfizmus vad típusú, heterozigóta és homozigóta típusú elektroferogramjait a 18. ábra mutatja be.



18. Ábra: A VHL IVS1-195 nt G/A polimorfizmus vad típusú (n=2), heterozigóta (n=9) és homozigóta (n=13) típusú elektroferogramja.

V. 6. A VHL, PTEN és BAP1 mutációk és a betegek klinikopatológiai jellemzői közötti kapcsolat

A VHL vagy PTEN mutációban szenvedő betegek legfontosabb klinikai adatait a 13. táblázat foglalja össze.

13. Táblázat: A VHL, PTEN mutációval azonosított humán mintákhoz tartozó betegek klinikopatológiai adatai

Minta szám	Kor/ Nem	Szövet-tani típus	Grádus	Patológiai állapot	TNM klinikai állapot	Tumor méret	Műtét típusa	Mutáció	Egyéb tumor
1.	72 / Nő	Onkocytóma	-	-	-	10 cm	jobb oldali radikális nefrektómia	VHL mutáció	nem volt megfigyelhető
2.	57 / Nő	ccRCC	2	pT1a	T1, N0, M0,	3,3-4 cm	jobb oldali vese nefrektómia	VHL mutáció és VHL polimorfizmus	nem volt megfigyelhető
3.	36 / Férfi	ccRCC	3	pT4	T4, N0, M0,	4 cm	jobb oldali vese rezekció	PTEN polimorfizmus	nem volt megfigyelhető
4.	39 / Nő	AML	-	-	-	3,3 cm	jobb oldali vese laparoszkoپیás nefrektómia	VHL mutáció	nem volt megfigyelhető
5.	37 / Nő	ccRCC	3	pT1b	T1, N0, M0,	6 cm	bal oldali vese rezekció	VHL mutáció	nem volt megfigyelhető
*6.	72 / Nő	ccRCC	2	pT1a	T1, N0, M0,	2 x 1,5 cm	jobb oldali vese laparoszkoپیás nefrektómia	VHL mutáció	méhnyak karcinóma
7.	36 / Nő	AML	-	-	-	3,3 cm	jobb oldali vese rezekció	VHL mutáció	hújyhólyag rák
8.	46 / Férfi	pRCC	2	pT1b	T1, N0, M0,	5 cm	jobb oldali vese rezekció, nyitott műtét	PTEN mutáció	nem volt megfigyelhető

pT1a: a tumor mérete kisebb, mint 4 cm és a szerve lokalizált; **pT1b:** a tumor mérete nagyobb, mint 4 cm, de kisebb, mint 7 cm és a tumor szervben lokalizált; **pT4:** a tumor kiterjedt a mellékvesére, pRCC: papilláris típusú vesesejtes karcinóma, AML: angiomiolipóma.

*: ennél a betegnél 1,3 cm-es mellékvese adenoma és metasztázis volt megfigyelhető az axon alapon, méhnyak karcinóma volt leírva asszociált tumorként;

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 nagy méretű volt (3-10 cm). Mindezen-túl, a VHL mutációban szenvedő betegeknél a korábbi klinikai kórelőzményt is figyelembe véve 2 esetben írható más tumorokkal történő asszociáltság (méhnyakrák és hólyagrák). A VHL mutációt leírt betegek esetében a vesetumorok szövettani típusa 3 esetben a világossejtes vesekarcinoma szövettani típust mutatta, 2-es és 3-as grádus fokozattal. Egy VHL mutációval rendelkező betegnél angiomyolipomát, egy másik betegnél pedig onkocytómát (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.

V. 7. A miRNS –es vizsgálatokkal kapcsolatos eredmények

V. 7. 1. A vesetumoros betegekből származó szövetminták patológiai jellemzői

A miR-21 és a miR-221 szövettani expressziójának elemzéséhez további 24 tumoros és 24 ép szövetminta pár került felhasználásra. A műtéti eljárást követő patológiai elemzés megerősítette, hogy az összes betegből származó minta szövettanilag a világossejtes vesekarcinóma típusba (ccRCC) volt sorolható. Férfi betegtől összesen 13 minta (52 éves átlagéletkor), 11 minta pedig nőbetegekből származott (56 éves átlagéletkor). A ccRCC minták ebben a tanulmányban is a TNM terminológia alapján lettek osztályozva. A betegminták osztályozása során kiderült, hogy a minták esetén a patológiai grádust tekintve a betegek közel fele a 2. szövettani Grádusba (5 férfi, 6 nő, 45,8%), a minták 50%-a pedig a 3. szövettani Grádusba (8 férfi és 4 nő) volt sorolható. A minták grádusonként, nem és életkor szerinti megoszlása a 14. és 15. táblázatban található. Ahol a klinikai státuszt jellemző TNM adatok elérhetők, a táblázatban ezt is jelöltük.

14. Táblázat: A miRNS-es vizsgálatba bevont ccRCC betegek klinikopatológiai adatai

Mintaszám	Kor/Nem	Grádus	Patológiai státusz	TNM
1.	40/Nő	3	pT1b	-
2.	68/Nő	2	pT3a	-
3.	62/Férfi	3	p T3a	-
4.	64/Nő	3	p T3a	pNx, pMx
5.	70/Nő	2	p T1a	pNX, pMx
6.	55/Férfi	2	p T1a	pNX, pMx
7.	57/Nő	2	p T1a	-
8.	36/Férfi	3	p T3a	-
9.	29/Férfi	3	p T3a	-
10.	72/Nő	3	pT1b	-
11.	60/Nő	3	pT1b	-
12.	47/Nő	3	p T1a	pNx, pMx
13.	69/Férfi	3	p T3a	pN ₀
14.	53/Férfi	3	p T3a	-
15.	49/Férfi	3	p T1a	pNx
16.	52/Férfi	2	p T1a	pNx, pMx
17.	56/Férfi	-	-	-
18.	69/Férfi	3	p T1a	-
19.	37/Nő	2	p T1a	-
20.	49/Férfi	2	p T1a	-
21.	72/Nő	2	p T1a	pNx
22.	36/Nő	2	p T1a	-
23.	41/Férfi	2	pT1b	-
24.	43/Férfi	2	pT1b	-

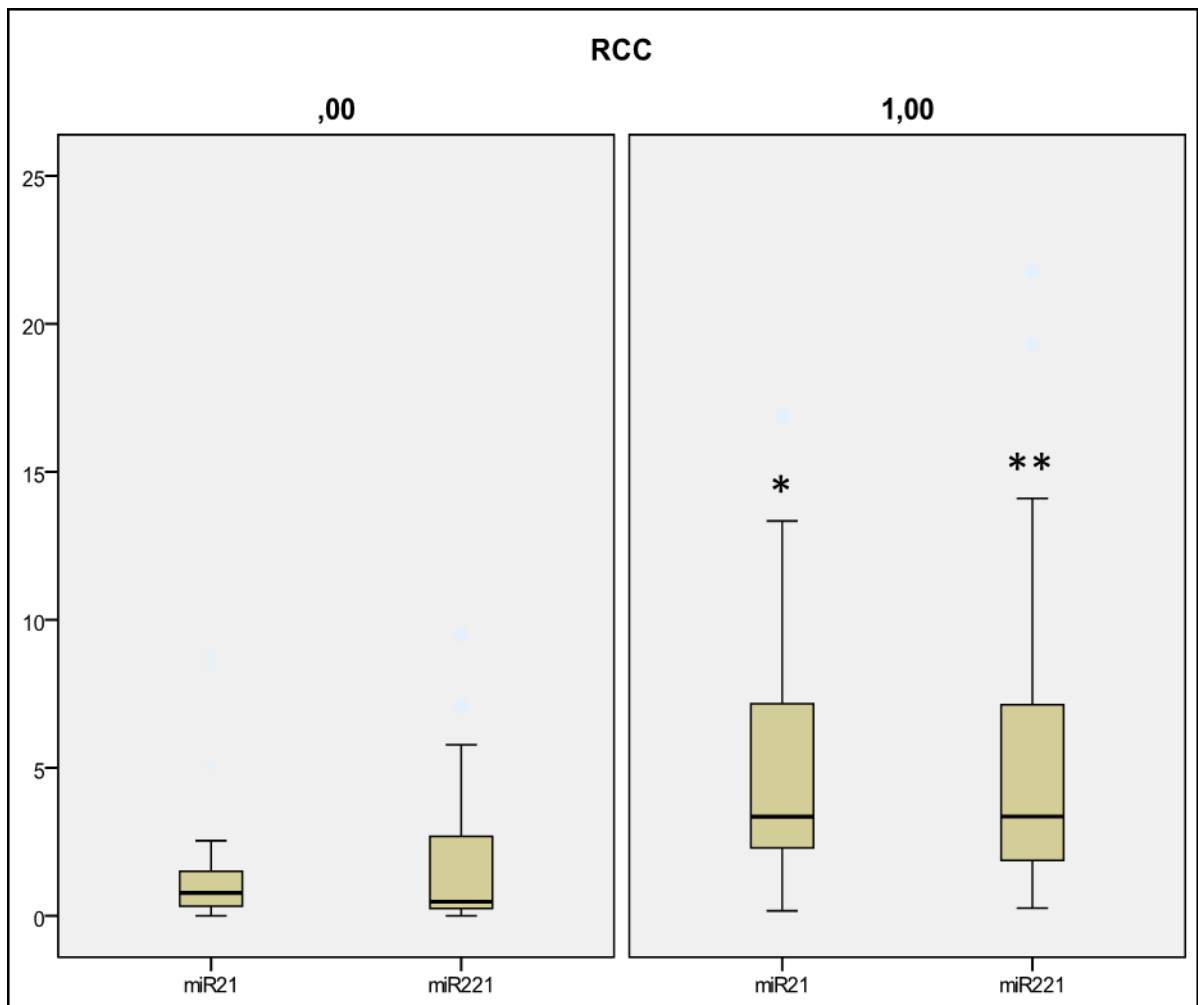
Rövidítések: **pT1a:** a tumor mérete kisebb, mint 4 cm, és a szervre lokalizált; **pT1b:** a tumor mérete nagyobb, mint 4 cm, de kisebb, mint 7 cm, és a daganat szervben lokalizált; **pT4:** a daganat kiterjed a mellékvesére; **pNx:** nyirokcsomók nem értékelhetők; **pMx:** disztális metasztázis nem értékelhető; „- ”: nem ismertek a klinikopatológiai adatok. # Az egyik minta a TNM terminológiával nem lett osztályozva.

15. Táblázat: A szövettani grádusok, a miRNS-21 és miRNS-221 expressziós szintek és klinikopatológiai adatok elemzése ccRCC mintákban (ΔC_p módszerrel számolt átlag $dC_p \pm SD$ értékek).

Tumor státusz	Grádus %	miR-21		miR-221		Férfi		Nő	
		Normál	Tumor	Normál	Tumor	Mintaszám	%	Mintaszám	%
Grádus 2	11 eset (45.8%)	3,2 \pm 0,12	4,2 \pm 0,18	0,89 \pm 0,12	2,4 \pm 0,34	5	45,4	6	54,5
Grádus 3	12 eset (50%)	4,5 \pm 0,38	5,3 \pm 0,21	0,75 \pm 0,12	2,6 \pm 0,35	8	66,7	4	33,3

V. 7. 2. 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 $p \leq 0,05$) (20. ábra, 16. táblázat).



20. Ábra: A miR-21 és miR-221 vesesejtes karcinóma és a megfelelő normál szövetminta párban mutatott expressziója. Az expressziót az Y tengelyen a 2. derivált maximum módszer szerint számított relatív kvantifikációs értékeként mutatjuk be, és belső kontrollként a miR-203-at használtuk, erre normalizáltunk. A vesetumoros szöveteket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a miR-21 és a miR-221 a minták 79,2%-ában (19 esetben), míg a normál veseszövetmintáknak csak 33,3%-a (8 eset) mutatott koexpressziót (17. táblázat).

16. Táblázat: A miR-21 és miR-221 esetében a párosított 2 mintás t-teszt-tel kapott statisztikai eredmények

miRNS	Signifikancia	Átlag	Standard Deviancia	95% Konfidencia Intervallum	
				Alsó érték	Felső érték
miR-21	0,001	-4,5696	1,17102	-6,52755	-1,78636
miR-221	0,019	-3,74113	1,52543	-6,82920	-0,65306

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.

Minta	miR-21	miR-221	Minta	miR-21	miR-221
1-tu	+	+	1-normál	-	-
2-tu	+	+	2-normál	-	-
3-tu	+	+	3-normál	-	-
4-tu	+	+	4-normál	+	+
5-tu	+	+	5-normál	+	+
6-tumoros	+	+	6-normál	-	-
7-tumoros	-	-	7-normál	+	+
8-tumoros	+	+	8-normál	-	-
9-tumoros	+	+	9-normál	+	+
10-tumoros	-	-	10-normál	-	-
11-tumoros	+	+	11-normál	+	+
12-tumoros	+	+	12-normál	+	+
13-tumoros	+	+	13-normál	+	+
14-tumoros	-	-	14-normál	-	-
15-tumoros	+	+	15-normál	-	-
16-tumoros	-	-	16-normál	-	-
17-tumoros	-	-	17-normál	-	-
18-tumoros	+	+	18-normál	+	+
19-tumoros	+	+	19-normál	-	-
20-tumoros	+	+	20-normál	-	-
21-tumoros	+	+	21-normál	-	-
22-tumoros	+	+	22-normál	-	-
23-tumoros	+	+	23-normál	-	-
24-tumoros	+	+	24-normál	-	-

17. Táblázat: miR-21 és miR-221 koexpressziója a vizsgált tumoros és a szomszédos normál veseszövet mintákban

Rövidítések: tu-tumoros, no-normál, „-“: nincs megfigyelhető koexpresszió

V. 7. 3. 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 (18. táblázat).

18. Táblázat: A miR-21 és a miR-221 lehetséges targetjei

Target Adatbázisok	miR-21				miR-221			
	PDCD4	PTEN	PIK3R1	p53	PDCD4	PTEN	PIK3R1	p53
miRanda	+	-	-	-	-	-	+	-
PicTar	+	+			-	+	-	-
TargetScan	+	+	+	+	+	+	+	+

VI. 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 [1, 3, 4, 126, 127]. 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 [7, 8, 10]. 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 [7, 8, 10].

A VHL tumorszuppresszor génmutáció révén történő inaktiválása a HIF nem megfelelő felhalmozódását okozza, ami a vese tumorigenezisét eredményezi [9]. Külön említést érdemel a genetikai mutációk tekintetében az angiomyolipoma szövettani típusú jóindulatú vesedaganat. A vese angiomyolipóma a vesetumorok egyik leggyakoribb formája leginkább azoknál a betegeknél fordul elő, akiket a tuberósus sclerosis komplex (TSC) gén mutációja érint [128]. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a tRNS-specifikus adenzin-deamináz 1-et (TAD1) kódoló 1-es tuberósus sclerosis komplex (TSC1) missense mutációja és a tRNS-specifikus adenzin-deamináz 1-et (TAD1) kódoló 2-es tuberósus sclerosis komplex (TSC2) mutációja korrelációt mutatott a magas kockázatú AML előfordulásával [128]. Noha a VHL-mutáció nem jellemzően gyakori az AML-ben, az igen érdekes, hogy egy kasmíri populáción végzett tanulmány meglepő módon a VHL gént érintő mutációkat írt le a vizsgált populáción belül nem ccRCC-nek, hanem inkább AML szövettani típusnak azonosított betegmintában [129]. Egy másik tanulmány alapján kétoldali és multifokális vese onkocitómával diagnosztizált 63 éves férfi esetében részleges VHL gén deléciót mutattak ki, melyhez az onkocitóma megjelenése köthető. Ez az eset azért is figyelemreméltó, mert klinikai tekintetben a részleges VHL gén deléció a magasabb kockázattal járó vesesejtes karcinóma megjelenésére utal, mintha a VHL gén teljes deléciója történne meg [130].

A szomatikus VHL-mutációk vagy a promoter-metiláció klinikopatológiai hatásait számos, RCC-vel kapcsolatos esetben tanulmányozták [10]. A szakirodalom alapján a VHL gént érintő változások szignifikáns összefüggést mutatnak a betegek patológiai stádiumával. Továbbá, az is megfigyelhető, hogy a VHL gént érintő bármilyen változás jelenléte szignifikánsan korrelál a betegség prognózisával, így mindenképpen befolyásolva az RCC-ben szenvedő betegek klinikai állapotának kimenetelét [10].

Azonos kromoszómán lokalizálódó tumorszuppresszor gének egymás működését is befolyásolhatják. Ahogyan már az irodalmi áttekintésben említésre került a BAP1 gén, mely deubiquitináló enzimként működik és a vesesejtes karcinómák daganatképződéséhez kapcsolódó több jelátviteli útvonal szabályozásában vesz részt [131]. A BAP1 génben történő mutációk, legyen az akár deléció is, a 3. kromoszómán való elhelyezkedéséből adódóan befolyásolja a tumorszuppresszor szerepet is betöltő VHL gén változásait, mely ugyanazon a kromoszómán lokalizálódik. Ez a genetikai esemény igen gyakori RCC-ben és más daganatokban egyaránt [132]. Kimutatták, hogy a BAP1 (3p21.31 –as lokalizáció) mutációi a vesekarcinóma rossz prognózisával és betegek alacsony túlélési rátájával hozhatók összefüggésbe [133, 134]. A közelmúltban a ccRCC-k 14%-ában jelentettek BAP1 génmutációt [12, 131, 132, 135].

A PTEN az egyik leggyakrabban mutált tumorszuppresszor gén a különböző humán daganatokban. Részletesebb bemutatása már az irodalmi áttekintésben megtörtént. A PTEN gén lokalizációját a 10q23.3 kromoszómán azonosították, amelynek sok humán rosszindulatú daganatban homozigóta formában történő delécióját írták le. Példaként említhetők a PTEN mutációval/delécióval összefüggésbe hozható glioblasztómák 27–44%-a, a prosztata karcinómák 43–50%-a, valamint az endometrium karcinómák 34–50%-a. [132]. Genetikai polimorfizmus analízis és DNS-szekvenálás segítségével a PTEN gén 5-7. exonjain kívüli mutációt írtak le endometrium karcinómában. Az 5–7. exon mutációit hordozó, endometrium karcinómában szenvedő betegek rossz prognózist mutattak, viszont az 5-7. exonon kívüli PTEN mutációk és a betegek klinikopatológiai adatai között korreláció nem volt felfedezhető, ami esetlegesen arra is utalhat, hogy a PTEN 5–7. exonjain kívüli mutációk kedvező túléléssel járó molekuláris biológiai indikátorai is lehetnek az endometrium karcinómának, de akár más tumorok esetében is [119]. Más, nem az 5-7. exonban előforduló mutációk, akár magas kockázattal járó tumor kialakulását is jelenthetik [119].

Említésre méltó, hogy a vesékben a PTEN tumorszuppresszor gén jelenléte a hámsejtek citoplazmájában expresszálandó foszfatáz megjelenését eredményezi. A PTEN tumorszuppresszor fehérje elvesztése volt megfigyelhető a vese karcinogenezisben, ami

magának a génnek, mint tumorszuppresszornak a ccRCC-k karcinogenezise során betöltött szerepére utal. A szakirodalom alapján a PTEN tumor progressziója révén történő veszteség leginkább a sejtmembránt érintheti, ami egyben a PIP3/AKT jelátviteli útvonal zavarához vezethet, akár egy agresszív fenotípusként leírható vese carcinóma megjelenését vonva maga után [136].

A PTEN gén exonokat érintő különböző mutációi mindenképpen prognosztikai jelentőséggel bírnak a vesetumorokat 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 vese carcinómákkal 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 vese carcinóma kialakulásában [136, 137].

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 [130]. 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 [122, 138].

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 stopkodonnak felel meg, melynek eredménye egy csonka, funkcióvesztett VHL fehérje [122]. A VHL Asn90Ile mutáció szintén funkcióvesztését okozza a VHL fehérjének, amint azt a HIF-1 α ubikvitinációjának és degradációjának hiánya is bizonyít [123]. 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 [124]. A Leu153Pro-t még biokémiai szempontból nem jellemezték a HGMD adatbázisban; így a VHL fehérje működésére gyakorolt hatása nem ismert [17]. 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 [122-124].

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 gén mutációs inaktiválása pedig a HIF nem megfelelő felhalmozódását okozza, ami elősegíti a vesetumorok kialakulásával kapcsolatba hozható tumorigenezist [6]. 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 onkocitóma lett diagnosztizálva.

Egy beteg esetén pankreász áttétet írtak le a patológiai vizsgálat során, a betegek közül kettő 5-6 évvel a műtétet követően meghalt. Összességében véve a nyomonkövetése a betegeknek nem történt meg, mivel a műtétet követően a betegek többsége nem mindig jelenik meg a kontroll vizsgálatokon, primer vesetumor esetén többségük gyógyul, nincs relapszus. Talán ezzel magyarázható az is, hogy a különböző az általunk vizsgált mintákban azonosított VHL mutációk nem mutatnak különösebb összefüggést a szövettani típusokkal, vagy a betegek klinikopatológiai státuszával.

A szakirodalomban barangolva az olvasható, hogy az esetek 60%-ban inkább a VHL gén pontmutációja fordul elő RCC-ben; a VHL gént érintő, 3-as kromoszómához kötődő nagyobb deléciók a RCC-ben szenvedő betegeknek mindössze 40%-át jellemzik [10, 137, 139, 140]. A szövettani típust tekintve a VHL gén mutációja inkább bizonyult gyakorinak a világossejtes, granuláris és szarkomatoid szövettani típusú vesekarcinomákban, míg kevésbé jellemző a papilláris vesetumorok esetében. Igen érdekes a VHL gén genetikai változásait illetően a polimorfizmus jelensége, ami ritkán hozható összefüggésbe a betegség kialakulásával. Cai Lv és mtsai (2015) egy ritka, rs779805 VHL típusú polimorfizmust azonosítottak, az eredményeik azt mutatták, hogy a G allél kismértékben növelheti az RCC kockázatát [127].

Korábbi tanulmányok szerint a VHL génmutációk mindenképpen magának a VHL génnek az inaktiválásához vezetnek, és ez leginkább a klasszikus, leggyakoribb szövettani típust, az RCC-t jellemzik [137]. Eredményeinket korábbi megfigyelésekkel összevetve arra a következtetésre juthatunk, hogy az összes mutáció közül valószínűleg a missense mutációk a leggyakoribb típusok, amelyek a VHL gén inaktiválódását és a fehérjefunkció vesztesét okozhatják [10]. Mindazonáltal számos tanulmány beszámolt arról, hogy elsősorban a funkcióvesztéssel járó mutációk (loss of function: LOF), és nem pedig más típusú VHL-eltváltozások mutathatnak jelentős összefüggést a betegek túlélésével [10]. Ugyanakkor olyan tanulmányt is olvastunk, mely nem ír le különösebb összefüggést a LOF-mutációk és a túlélés között. Érdekes módon a LOF mutációk jó prediktív markerekként működtek a VEGF-célzott terápia során az RCC-ben szenvedő betegeknél. A LOF-mutációval rendelkező betegek VEGF-terápiaként alkalmazott szerekre adott válaszként szignifikánsan magasabb arányt értek el, mint a VHL vad típust hordozó daganatos betegek esetében [10]. Igen érdekes megfigyelés nemcsak a vesetumorok, de más tumorok megjelenésekor is, hogy a VHL asszociált tumorok vagy ciszták kialakulása leggyakrabban a VHL szomatikus inaktivációjához vagy a fennmaradó vad típusú VHL allél elvesztéséhez kapcsolódik [141].

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 vesetumорок esetén mutációt még nem írtak le, sőt ezen exonok mutációt érintő vizsgálatokkal még nem is foglalkoztak a vesetumороkat 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 [141]. 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 exonjaink együttes vizsgálata miatt ez esetben nem volt kivitelezhető [119, 131].

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 pT1-es klinikai státuszával ccRCC-ben [119, 131]. A pT1 ccRCC-ben szenvedő betegektől származó minták egyike sem mutatta a magban lokalizálódó BAP1 festődés teljes elvesztését [131]. 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 [119, 131, 132]. 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 [133, 136]. Ilyen pontmutáció esetén egy

aminosavcsere történik, amikor is 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 hamaroma tumor szindrómában szenvedő egyéneknél írták le [136]. 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 papilláris RCC-nek minősült.

A PTEN p.His93Arg mutációt (az 5. exonban) egy 46 éves férfi betegnél volt jellemző, akinek a papilláris 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 enzimikus funkcióját végzi. Valószínűleg a PTEN gén ezen mutációja a PTEN foszfatáz aktivitásának csökkenését eredményezi. A fokális adhézios kináz (FAK) defoszforilációja és inaktíválása magában foglalja a PTEN protein foszfatáz aktivitását is. Ez a mechanizmus kapcsolja össze az extracelluláris mátrix és a citoszkeleton működését. A PTEN az integrin által közvetített invázió negatív szabályozója [126, 136]. Azt is feltételezzük, hogy az ilyen típusú PTEN mutáció a PI3K/AKT útvonal inaktíválásához vezet, és elősegítheti a daganatképződést [120].

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 tumorsuppresszor PTEN elvesztése valószínűleg az RCC karcinogenezisének korai eseménye [136].

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 kapott 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 hisztotípust 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-el 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 [14-16, 107]. 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 [14, 15]. Ilyen esetben, a tumorokban az onkogén miRNS-ek túlzottan upregulálódhatnak, míg a tumorszuppresszor gének downregulálódnak [13, 18, 23, 24]. 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 [21, 22]. A miRNS-21 több tumorszuppresszorral is kölcsönhatásba lép, így például, a 10-es kromoszómán lokalizált PTEN tumorszuppresszor génnel, majd ezt követheti a p53 és a PDCD4 tumorszuppresszorokkal és egyben apoptotikus génekkel való kölcsönhatása is [26, 28, 29]. 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 [25, 26]. 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.

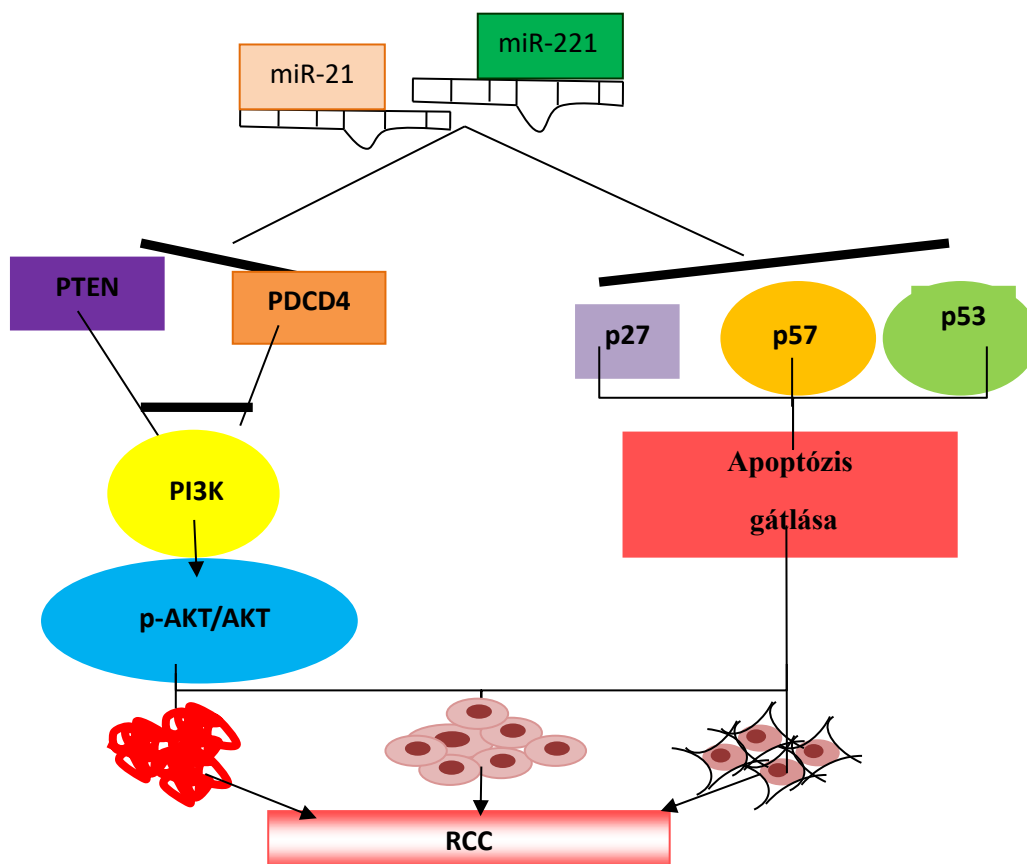
Érdemes kiemelni a miR-21 prognosztikai szerepét is, amit humán gliomát és melanomát vizsgáló tanulmányok már egyértelműen igazoltak, ugyanis ezeknél a tumoroknál a miR-21 fokozott expressziója erősen korrelált a metasztázis előrehaladásával a sejthalált szabályozó PDCD4 3' UTR downregulációja révén [27, 28]. A bizonyítékok azt is alátámasztják, hogy a miRNS-21 onkogén miRNS szerepét tölti be a különböző daganatokban [30, 31].

A másik igen gyakori onkogén miRNS, a miR-221, melynek túlzott expresszióját már számos rosszindulatú daganatban leírták, beleértve itt az ccRCC-t is [30, 31, 142-145]. 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 [30, 142, 143]. A miR-221 a miR-21-hez hasonlóan olyan tumorszuppresszor géneket céloz meg, mint a PTEN és a PDCD4 [14]. 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 [146].

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. Egy elméleti fejtegetést is bemutató, általunk készített összefoglaló ábra (21. ábra) jól prezentálja a miR-21 és a miR-221 feltételezett hatását az általunk vizsgált vesetumzorokban.

Az ábra bemutatja, hogy mind a miR-21, mind a miR-221 elősegíti a sejtciklus progresszióját a daganatos sejtekben (G0/G1-től S-fázisig), valamint befolyásolja a sejtproliferációt a p53, p27 és p57 downregulációja révén. Feltehetőleg a miR-21 és a miR-221 gátolja a ciklin-dependens kináz-t (CDK) gátló fehérjéket, a p27Kip1-et és a p57-et is, ami sejtproliferációhoz és túléléshez, valamint a sejt differenciálódás gátlásához vezet. A miR-21/-221 fokozott expressziója a PTEN-t és a PDCD4-et célozza meg, melyek a miR-21/221 onkogén hatásának közvetítői. A PTEN és a PDCD4 target fehérjék, és egyben tumorszuppresszorok gátlásán keresztül a miR-21 és a miR-221 részt vesz a PI3K/AKT jelátviteli útvonalban, amely sejtproliferációhoz, migrációhoz, invázióhoz, angiogenezishez és az apoptózis gátlásához vezetnek. Mindezek a folyamatok végső soron a daganat kialakulását eredményezik [146, 147].



21. Ábra. A miRNS-21 és a miRNS-221 feltételezett szerepe a RCC kialakulásában.

Ahogy 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 α emelkedett szintjét eredményezi [148]. 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 upreguláltak mutatkoztak [148]. Ugyanakkor az is fontos tényező, hogy VHL/HIF tengely és a PTEN együttes deregulációja még nagyobb súllyal járulhat hozzá az RCC kialakulásához [148, 149]. 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 sejthetjük, 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 [14, 147, 150].

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. Mindettől 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 érintettség az általunk vizsgált tumorszuppresszor géneknek (VHL, PTEN, BAP1) mintaszámra nézve alacsonyabb volt, mint a vizsgált miR-21 és miR-221-el 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 háttérében álló genetikai, epigenetikai tényezőket, valamint a jövőbeli kutatások számára információként szolgálhat ezen tényezők klinikai és terápiás szerepének feltárásában.

VII. Összefoglalás

Ebben a tudományos munkában a vesetumороk kialakulásában szerepet játszó egyes genetikai és epigenetikai faktorok (miRNS-ek) jelenlétét vizsgálatuk a Debreceni Egyetem Urológiai Klinikáján vesetumorral 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 polimorfizmusa (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 vesetumorral 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.

VIII. Summary

In this scientific work, certain genetic and epigenetic factors (miRNAs) that might play a role in the development of kidney tumors were examined in samples of patients diagnosed with renal carcinoma at the Department of Urology, University of Debrecen. Based on our studies of VHL, PTEN and BAP1 mutations, we assume that changes in VHL and PTEN genes are not significantly related to the pathological characteristics or survival of patients with renal tumors. All the detected VHL mutations examined lead to the loss of pVHL, thus affecting further processes in tumorigenesis. The described genetic polymorphism (rs779805) of VHL is also considered to be pathogenic and may contribute to the development of renal tumors. VHL mutation is rare in AML; however, in our study, two young female patients with AML harbored alterations of the VHL gene. VHL mutation was also observed in a 72-year-old woman diagnosed with oncocytoma. In our study, we report, for the first time, a PTEN His93Arg mutation in a patient with papillary RCC. Overall, we assume that the loss of VHL and PTEN may cooperatively contribute to the accelerated progress of renal cancer. However, BAP1 seems to be uninvolved in the reported tumorigenesis. In conclusion, we assume that the outcome of the patients with renal tumor-identified genetic aberrations can be associated with losses at chromosomes 3 and 10. As the overall mutation rate of the VHL, PTEN, and BAP1 genes was low in all samples investigated, the development and prognosis of the disease in the examined patients were not exclusively associated with these types of genetic alterations.

We also performed experiments to study some epigenetic background of the renal tumorigenesis. Specifically we studied the expression of two oncogenic miRNAs, miR-21 and miR-221 in human kidney cancer tissues and paired adjacent healthy tissues of the patients diagnosed with RCC at the Department of Urology, University of Debrecen. As a result we could observe significantly higher expression of both studied miRNAs in tumorous kidney tissues compared to healthy pairs. In conclusion of this study, the up-regulation of these oncogenic miRNAs (miRNA-21 and miRNA-221) in human ccRCC tumor tissue samples compared with adjacent nontumorous tissues might suggest that both of them are involved in the development of ccRCC. To prove their clinical utility further *in vitro* studies are needed to demonstrate that such overexpression can be associated with augmented proliferation and cell migration. Hopefully, with this scientific work, we have partially contributed to the knowledge of the genetic and epigenetic factors behind kidney tumors, which information can help future researchers in exploring the clinical and therapeutic roles of these factors.

IX. Tárgyszavak

humán vesekarcinoma, human renal cancer

világossejtes vesekacinóma, clear cell renal cell carcinoma

genetikai rendellenességek, genetic disorders

VHL szindróma, VHL syndrome

VHL mutáció, VHL mutation

PTEN mutáció, PTEN mutation

BAP1 mutáció, BAP1 mutation

genetikai polimorfizmus, genetic polymorphism

epigenetikai faktorok, epigenetic factors

miRNS, miRNA

onkogén, oncogene

tumorsuppresszor, tumorsuppressor

miR-21, miR-221, miR-21, miR-221

a vese tumorigenezisét érintő jelátviteli útvonalak, signaling pathways of renal cancer

tumorigenesis

X. A kutatást támogató pályázatok

Köszönettel tartozunk pályázati támogatóinknak a munka anyagi támogatásáért:

- TAMOP 4.2.2.A- 11/1/KONV-2012-0025 (H.G.), Molekuláris Onkológia
- TAMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 (H.G.) Kutató Egyetemi Projekt
- GINOP-2.3.2-15-2016-00043 (H.G.), Szív és érkeutatósi kiválóságközpont (IRONHEART)
- EFOP-3.6.1-16-2016-00022 (H.G.)
- NKFIH-1150-6/219 (H.G.) Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program, Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja
- TKP2020-IKA-04 (H.G.), Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program, Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja
- TKP2021-EGA20

A projektek az Európai Unió támogatásával, a Magyar Állam és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.

XI. 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.

Köszönetemet fejezem meg med. habil. Dr. Flaskó Tibornak, az Urológia 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.

XI. Irodalom

1. Schmidt, L.S. and W.M. Linehan, *Genetic predisposition to kidney cancer*. Semin Oncol, 2016. **43**(5): p. 566-574.
2. Bukowski, R.M., *Prognostic factors for survival in metastatic renal cell carcinoma: update 2008*. Cancer, 2009. **115**(10 Suppl): p. 2273-2281.
3. Wang, J., et al., *Somatic mutations in renal cell carcinomas from Chinese patients revealed by whole exome sequencing*. Cancer Cell Int, 2018. **18**: p. 159.
4. Kumar, A., et al., *Renal Cell Carcinoma: Molecular Aspects*. Indian J Clin Biochem, 2018. **33**(3): p. 246-254.
5. Prasad, S.R., et al., *Benign renal neoplasms in adults: cross-sectional imaging findings*. AJR Am J Roentgenol, 2008. **190**(1): p. 158-164.
6. Shamam, Y.M. and S.W. Leslie, *Renal Angiomyolipoma*, in *StatPearls*. 2024, StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Stephen Leslie declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
7. Muscarella, L.A., et al., *VHL gene alterations in Italian patients with isolated renal cell carcinomas*. Int J Biol Markers, 2013. **28**(2): p. 208-215.
8. Dandanell, M., et al., *Identification of 3 novel VHL germ-line mutations in Danish VHL patients*. BMC Med Genet, 2012. **13**: p. 54.
9. Gao, W., et al., *Inactivation of the PBRM1 tumor suppressor gene amplifies the HIF-response in VHL-/- clear cell renal carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(5): p. 1027-1032.
10. Kim, H.S., et al., *Clinicopathologic Significance of VHL Gene Alteration in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma: An Updated Meta-Analysis and Review*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).
11. Ge, Y.Z., et al., *A BAP1 Mutation-specific MicroRNA Signature Predicts Clinical Outcomes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients with Wild-type BAP1*. J Cancer, 2017. **8**(13): p. 2643-2652.
12. Richard, S., et al., *Von Hippel-Lindau: how a rare disease illuminates cancer biology*. Semin Cancer Biol, 2013. **23**(1): p. 26-37.
13. Catto, J.W., et al., *MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review*. Eur Urol, 2011. **59**(5): p. 671-81.
14. Yang, Z., et al., *dbDEMOC: a database of differentially expressed miRNAs in human cancers*. BMC Genomics, 2010. **11 Suppl 4**(Suppl 4): p. S5.
15. Schaefer, A., et al., *Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of microRNAs in urologic tumors*. Nat Rev Urol, 2010. **7**(5): p. 286-297.
16. Schaefer, A., et al., *MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology*. Urol Oncol, 2010. **28**(1): p. 4-13.
17. Leonardi, E., et al., *Identification and in silico analysis of novel von Hippel-Lindau (VHL) gene variants from a large population*. Ann Hum Genet, 2011. **75**(4): p. 483-496.
18. Fridman, E., et al., *Accurate molecular classification of renal tumors using microRNA expression*. J Mol Diagn, 2010. **12**(5): p. 687-696.

19. Spector, Y., et al., *Development and validation of a microRNA-based diagnostic assay for classification of renal cell carcinomas*. Mol Oncol, 2013. **7**(3): p. 732-738.
20. Liu, H., et al., *Identifying mRNA targets of microRNA dysregulated in cancer: with application to clear cell Renal Cell Carcinoma*. BMC Syst Biol, 2010. **4**: p. 51.
21. Juan, D., et al., *Identification of a microRNA panel for clear-cell kidney cancer*. Urology, 2010. **75**(4): p. 835-841.
22. Chow, T.F., et al., *Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis*. Clin Biochem, 2010. **43**(1-2): p. 150-158.
23. Wu, K., L. Li, and S. Li, *Circulating microRNA-21 as a biomarker for the detection of various carcinomas: an updated meta-analysis based on 36 studies*. Tumour Biol, 2015. **36**(3): p. 1973-1981.
24. Zaman, M.S., et al., *Up-regulation of microRNA-21 correlates with lower kidney cancer survival*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31060.
25. Vergho, D.C., et al., *Impact of miR-21, miR-126 and miR-221 as prognostic factors of clear cell renal cell carcinoma with tumor thrombus of the inferior vena cava*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109877.
26. Liu, Z.L., et al., *MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN*. Mol Cell Biochem, 2013. **372**(1-2): p. 35-45.
27. Hermansen, S.K., et al., *MiR-21 expression in the tumor cell compartment holds unfavorable prognostic value in gliomas*. J Neurooncol, 2013. **111**(1): p. 71-81.
28. Jiao, J., Y. Fan, and Y. Zhang, *Expression and clinicopathological significance of microRNA-21 and programmed cell death 4 in malignant melanoma*. J Int Med Res, 2015. **43**(5): p. 672-678.
29. Ma, X., et al., *Interaction of the oncogenic miR-21 microRNA and the p53 tumor suppressor pathway*. Carcinogenesis, 2013. **34**(6): p. 1216-1223.
30. Garofalo, M., et al., *miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy*. Curr Mol Med, 2012. **12**(1): p. 27-33.
31. Park, J.K., et al., *miR-221 silencing blocks hepatocellular carcinoma and promotes survival*. Cancer Res, 2011. **71**(24): p. 7608-7616.
32. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018*. Eur J Cancer, 2018. **103**: p. 356-387.
33. Bukavina, L., et al., *Epidemiology of Renal Cell Carcinoma: 2022 Update*. Eur Urol, 2022. **82**(5): p. 529-542.
34. Levi, F., et al., *The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe*. BJU Int, 2008. **101**(8): p. 949-958.
35. Moch, H., et al., *The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours*. Eur Urol, 2022. **82**(5): p. 458-468.
36. Trpkov, K., et al., *New developments in existing WHO entities and evolving molecular concepts: The Genitourinary Pathology Society (GUPS) update on renal neoplasia*. Mod Pathol, 2021. **34**(7): p. 1392-1424.
37. Greene, F.L. and L.H. Sobin, *A worldwide approach to the TNM staging system: collaborative efforts of the AJCC and UICC*. J Surg Oncol, 2009. **99**(5): p. 269-272.
38. Keegan, K.A., et al., *Histopathology of surgically treated renal cell carcinoma: survival differences by subtype and stage*. J Urol, 2012. **188**(2): p. 391-397.
39. Pitra, T., et al., *A Comprehensive Commentary on the Multilocular Cystic Renal Neoplasm of Low Malignant Potential: A Urologist's Perspective*. Cancers (Basel), 2022. **14**(3).
40. Muglia, V.F. and A. Prando, *Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings*. Radiol Bras, 2015. **48**(3): p. 166-174.
41. Hora, M., et al. *Tumour Seeding in the Tract of Percutaneous Renal Tumour Biopsy: A Report on Seven Cases from a UK Tertiary Referral Centre*. Eur Urol 2019;75:861-7. Eur Urol, 2019. **76**(4): p. e96.

42. Neves, J.B., et al., *Pattern, timing and predictors of recurrence after surgical resection of chromophobe renal cell carcinoma*. World J Urol, 2021. **39**(10): p. 3823-3831.
43. Shuch, B., et al., *Defining early-onset kidney cancer: implications for germline and somatic mutation testing and clinical management*. J Clin Oncol, 2014. **32**(5): p. 431-437.
44. Iacovelli, R., et al., *Clinical outcome and prognostic factors in renal medullary carcinoma: A pooled analysis from 18 years of medical literature*. Can Urol Assoc J, 2015. **9**(3-4): p. E172-177.
45. Breda, A., et al., *Clinical and pathological outcomes of renal cell carcinoma (RCC) in native kidneys of patients with end-stage renal disease: a long-term comparative retrospective study with RCC diagnosed in the general population*. World J Urol, 2015. **33**(1): p. 1-7.
46. Bhatt, N.R., et al., *Dilemmas in diagnosis and natural history of renal oncocytoma and implications for management*. Can Urol Assoc J, 2015. **9**(9-10): p. E709-712.
47. Patel, H.D., et al., *Surgical histopathology for suspected oncocytoma on renal mass biopsy: a systematic review and meta-analysis*. BJU Int, 2017. **119**(5): p. 661-666.
48. Abdessater, M., et al., *Renal Oncocytoma: An Algorithm for Diagnosis and Management*. Urology, 2020. **143**: p. 173-180.
49. Tse, J.R., et al., *Prevalence of Malignancy and Histopathological Association of Bosniak Classification, Version 2019 Class III and IV Cystic Renal Masses*. J Urol, 2021. **205**(4): p. 1031-1038.
50. Schoots, I.G., et al., *Bosniak Classification for Complex Renal Cysts Reevaluated: A Systematic Review*. J Urol, 2017. **198**(1): p. 12-21.
51. Park, J.J., et al., *Postoperative Outcome of Cystic Renal Cell Carcinoma Defined on Preoperative Imaging: A Retrospective Study*. J Urol, 2017. **197**(4): p. 991-997.
52. Coco, D. and S. Leanza, *Von Hippel-Lindau Syndrome: Medical Syndrome or Surgical Syndrome? A Surgical Perspective*. J Kidney Cancer VHL, 2022. **9**(1): p. 27-32.
53. Haas, N.B. and K.L. Nathanson, *Hereditary kidney cancer syndromes*. Adv Chronic Kidney Dis, 2014. **21**(1): p. 81-90.
54. Hallscheidt, P., et al., *Preoperative and palliative embolization of renal cell carcinomas: follow-up of 49 patients*. Rofo, 2006. **178**(4): p. 391-399.
55. Geynisman, D.M., et al., *Sporadic Angiomyolipomas Growth Kinetics While on Everolimus: Results of a Phase II Trial*. J Urol, 2020. **204**(3): p. 531-537.
56. Capitanio, U., et al., *Epidemiology of Renal Cell Carcinoma*. Eur Urol, 2019. **75**(1): p. 74-84.
57. Gansler, T., et al., *Prevalence of Cigarette Smoking among Patients with Different Histologic Types of Kidney Cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2020. **29**(7): p. 1406-1412.
58. Wozniak, M.B., et al., *Alcohol consumption and the risk of renal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)*. Int J Cancer, 2015. **137**(8): p. 1953-1966.
59. Antwi, S.O., et al., *Alcohol consumption, variability in alcohol dehydrogenase genes and risk of renal cell carcinoma*. Int J Cancer, 2018. **142**(4): p. 747-756.
60. Tahbaz, R., M. Schmid, and A.S. Merseburger, *Prevention of kidney cancer incidence and recurrence: lifestyle, medication and nutrition*. Curr Opin Urol, 2018. **28**(1): p. 62-79.
61. Diana, P., et al., *Screening programs for renal cell carcinoma: a systematic review by the EAU young academic urologists renal cancer working group*. World J Urol, 2023. **41**(4): p. 929-940.
62. Rossi, S.H., et al., *Epidemiology and screening for renal cancer*. World J Urol, 2018. **36**(9): p. 1341-1353.
63. Åkerlund, J., et al., *Increased risk for renal cell carcinoma in end stage renal disease - a population-based case-control study*. Scand J Urol, 2021. **55**(3): p. 209-214.
64. Vasudev, N.S., et al., *Challenges of early renal cancer detection: symptom patterns and incidental diagnosis rate in a multicentre prospective UK cohort of patients presenting with suspected renal cancer*. BMJ Open, 2020. **10**(5): p. e035938.
65. Kim, H.L., et al., *Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis*. J Urol, 2003. **170**(5): p. 1742-1746.

66. Van Poppel, H., et al., *A prospective, randomised EORTC intergroup phase 3 study comparing the oncologic outcome of elective nephron-sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma*. *Eur Urol*, 2011. **59**(4): p. 543-552.
67. Poulakis, V., et al., *Quality of life after surgery for localized renal cell carcinoma: comparison between radical nephrectomy and nephron-sparing surgery*. *Urology*, 2003. **62**(5): p. 814-820.
68. Mir, M.C., et al., *Partial Nephrectomy Versus Radical Nephrectomy for Clinical T1b and T2 Renal Tumors: A Systematic Review and Meta-analysis of Comparative Studies*. *Eur Urol*, 2017. **71**(4): p. 606-617.
69. Sharma, A.P., et al., *Comparison of RENAL, PADUA, and C-index scoring systems in predicting perioperative outcomes after nephron sparing surgery*. *Indian J Urol*, 2018. **34**(1): p. 51-55.
70. Wagner, B., et al., *Prognostic value of renal vein and inferior vena cava involvement in renal cell carcinoma*. *Eur Urol*, 2009. **55**(2): p. 452-459.
71. Zini, L., et al., *A population-based comparison of survival after nephrectomy vs nonsurgical management for small renal masses*. *BJU Int*, 2009. **103**(7): p. 899-904; discussion 904.
72. Kim, E.H., et al., *Comparison of laparoscopic and percutaneous cryoablation for treatment of renal masses*. *Urology*, 2014. **83**(5): p. 1081-1087.
73. Lay, A.H., et al., *Oncologic Efficacy of Radio Frequency Ablation for Small Renal Masses: Clear Cell vs Papillary Subtype*. *J Urol*, 2015. **194**(3): p. 653-657.
74. Ali, M., et al., *The Role of Stereotactic Ablative Body Radiotherapy in Renal Cell Carcinoma*. *Eur Urol*, 2022. **82**(6): p. 613-622.
75. Flanigan, R.C., et al., *Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis*. *J Urol*, 2004. **171**(3): p. 1071-1076.
76. Alt, A.L., et al., *Survival after complete surgical resection of multiple metastases from renal cell carcinoma*. *Cancer*, 2011. **117**(13): p. 2873-2882.
77. Chanez, B., et al., *Endoscopic Ultrasound-Guided Radiofrequency Ablation as an Future Alternative to Pancreatectomy for Pancreatic Metastases from Renal Cell Carcinoma: A Prospective Study*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(21).
78. Amato, R.J., *Chemotherapy for renal cell carcinoma*. *Semin Oncol*, 2000. **27**(2): p. 177-186.
79. Shah, A.Y., et al., *Management and outcomes of patients with renal medullary carcinoma: a multicentre collaborative study*. *BJU Int*, 2017. **120**(6): p. 782-792.
80. Patel, P.H., et al., *Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(24): p. 7215-7220.
81. Bracarda, S., et al., *Sunitinib administered on 2/1 schedule in patients with metastatic renal cell carcinoma: the RAINBOW analysis*. *Ann Oncol*, 2016. **27**(2): p. 366.
82. Escudier, B., et al., *Randomized, controlled, double-blind, cross-over trial assessing treatment preference for pazopanib versus sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: PISCES Study*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(14): p. 1412-1418.
83. Hutson, T.E., et al., *Axitinib versus sorafenib as first-line therapy in patients with metastatic renal-cell carcinoma: a randomised open-label phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2013. **14**(13): p. 1287-1294.
84. Choueiri, T.K., et al., *Cabozantinib versus sunitinib as initial therapy for metastatic renal cell carcinoma of intermediate or poor risk (Alliance A031203 CABOSUN randomised trial): Progression-free survival by independent review and overall survival update*. *Eur J Cancer*, 2018. **94**: p. 115-125.
85. Motzer, R.J., et al., *Lenvatinib, everolimus, and the combination in patients with metastatic renal cell carcinoma: a randomised, phase 2, open-label, multicentre trial*. *Lancet Oncol*, 2015. **16**(15): p. 1473-1482.
86. Molina, A.M., et al., *Efficacy of tivozanib treatment after sorafenib in patients with advanced renal cell carcinoma: crossover of a phase 3 study*. *Eur J Cancer*, 2018. **94**: p. 87-94.
87. Rini, B.I., et al., *Atezolizumab plus bevacizumab versus sunitinib in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma (IMmotion151): a multicentre, open-label, phase 3, randomised controlled trial*. *Lancet*, 2019. **393**(10189): p. 2404-2415.

88. Atkins, M.B., et al., *Phase II Study of Nivolumab and Salvage Nivolumab/Ipilimumab in Treatment-Naive Patients With Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma (HCRN GU16-260-Cohort A)*. J Clin Oncol, 2022. **40**(25): p. 2913-2923.
89. Choueiri, T.K., et al., *Cabozantinib plus Nivolumab and Ipilimumab in Renal-Cell Carcinoma*. N Engl J Med, 2023. **388**(19): p. 1767-1778.
90. Choueiri, T.K., et al., *Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma*. N Engl J Med, 2021. **384**(9): p. 829-841.
91. Nagyványi, K. and L. Géczi, *Second and further lines treatment options for locally advanced or metastatic renal cell carcinoma*. Magy Onkol, 2023. **67**(1): p. 61-72.
92. Cowey, C.L. and W.K. Rathmell, *VHL gene mutations in renal cell carcinoma: role as a biomarker of disease outcome and drug efficacy*. Curr Oncol Rep, 2009. **11**(2): p. 94-101.
93. Macher-Goeppinger, S., et al., *MET expression and copy number status in clear-cell renal cell carcinoma: prognostic value and potential predictive marker*. Oncotarget, 2017. **8**(1): p. 1046-1057.
94. Na, X., et al., *Overproduction of vascular endothelial growth factor related to von Hippel-Lindau tumor suppressor gene mutations and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in renal cell carcinomas*. J Urol, 2003. **170**(2 Pt 1): p. 588-592.
95. Ho, T.H. and E. Jonasch, *Genetic kidney cancer syndromes*. J Natl Compr Canc Netw, 2014. **12**(9): p. 1347-1355.
96. Maynard, M.A. and M. Ohh, *The role of hypoxia-inducible factors in cancer*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(16): p. 2170-2180.
97. Chou, A., et al., *von Hippel-Lindau syndrome*. Front Horm Res, 2013. **41**: p. 30-49.
98. Kumar, P.S., et al., *Novel three missense mutations observed in Von Hippel-Lindau gene in a patient reported with renal cell carcinoma*. Indian J Hum Genet, 2013. **19**(3): p. 373-376.
99. Schuhmacher, P., et al., *Growth characteristics and therapeutic decision markers in von Hippel-Lindau disease patients with renal cell carcinoma*. Orphanet J Rare Dis, 2019. **14**(1): p. 235.
100. Zhou, B., et al., *Hemangioblastoma Instead of Renal Cell Carcinoma Plays a Major Role in the Unfavorable Overall Survival of Von Hippel-Lindau Disease Patients*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 1037.
101. Song, M.S., L. Salmena, and P.P. Pandolfi, *The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(5): p. 283-296.
102. Hu, S.L., et al., *The Nephrologist's Tumor: Basic Biology and Management of Renal Cell Carcinoma*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(8): p. 2227-2237.
103. Carbone, M., et al., *Biological Mechanisms and Clinical Significance of BAP1 Mutations in Human Cancer*. Cancer Discov, 2020. **10**(8): p. 1103-1120.
104. Patel, V. and L. Noureddine, *MicroRNAs and fibrosis*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2012. **21**(4): p. 410-416.
105. Lu, Q., et al., *MicroRNA-221 silencing predisposed human bladder cancer cells to undergo apoptosis induced by TRAIL*. Urol Oncol, 2010. **28**(6): p. 635-641.
106. Ribas, J. and S.E. Lupold, *The transcriptional regulation of miR-21, its multiple transcripts, and their implication in prostate cancer*. Cell Cycle, 2010. **9**(5): p. 923-929.
107. Reis, L.O., et al., *MicroRNAs: a new paradigm on molecular urological oncology*. Urology, 2010. **76**(3): p. 521-527.
108. Zhang, A., et al., *miR-21 modulates cell apoptosis by targeting multiple genes in renal cell carcinoma*. Urology, 2011. **78**(2): p. 474.e13-9.
109. Zhang, H., et al., *miR-21 downregulated TCF21 to inhibit KISS1 in renal cancer*. Urology, 2012. **80**(6): p. 1298-1302.e1.
110. Gottardo, F., et al., *Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers*. Urol Oncol, 2007. **25**(5): p. 387-392.
111. Zarjou, A., et al., *Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: role of miR-21*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **301**(4): p. F793-801.

112. Jin, C., et al., *MicroRNA-21 mediates the rapamycin-induced suppression of endothelial proliferation and migration*. FEBS Lett, 2013. **587**(4): p. 378-385.
113. Dey, N., et al., *microRNA-21 governs TORC1 activation in renal cancer cell proliferation and invasion*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e37366.
114. Xu, W., et al., *Posttranslational regulation of phosphatase and tensin homolog (PTEN) and its functional impact on cancer behaviors*. Drug Des Devel Ther, 2014. **8**: p. 1745-1751.
115. Dillon, L.M. and T.W. Miller, *Therapeutic targeting of cancers with loss of PTEN function*. Curr Drug Targets, 2014. **15**(1): p. 65-79.
116. Giudice, F.S. and C.H. Squarize, *The determinants of head and neck cancer: Unmasking the PI3K pathway mutations*. J Carcinog Mutagen, 2013. **Suppl 5**.
117. Leslie, N.R. and M. Longy, *Inherited PTEN mutations and the prediction of phenotype*. Semin Cell Dev Biol, 2016. **52**: p. 30-38.
118. Jin, G., et al., *PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers*. Lung Cancer, 2010. **69**(3): p. 279-283.
119. Nasu, M., et al., *High Incidence of Somatic BAP1 alterations in sporadic malignant mesothelioma*. J Thorac Oncol, 2015. **10**(4): p. 565-576.
120. Wen, Y.G., et al., *Mutation analysis of tumor suppressor gene PTEN in patients with gastric carcinomas and its impact on PI3K/AKT pathway*. Oncol Rep, 2010. **24**(1): p. 89-95.
121. Yin, L., et al., *Mutational analysis of p53 and PTEN in soft tissue sarcoma*. Mol Med Rep, 2012. **5**(2): p. 457-461.
122. Mattocks, C., et al., *Comparative sequence analysis (CSA): a new sequence-based method for the identification and characterization of mutations in DNA*. Hum Mutat, 2000. **16**(5): p. 437-443.
123. Yoshida, M., et al., *Germ-line mutation analysis in patients with von Hippel-Lindau disease in Japan: an extended study of 77 families*. Jpn J Cancer Res, 2000. **91**(2): p. 204-212.
124. Chen, F., et al., *Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype*. Hum Mutat, 1995. **5**(1): p. 66-75.
125. Whaley, J.M., et al., *Germ-line mutations in the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene are similar to somatic von Hippel-Lindau aberrations in sporadic renal cell carcinoma*. Am J Hum Genet, 1994. **55**(6): p. 1092-1102.
126. Butler, M.G., et al., *Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations*. J Med Genet, 2005. **42**(4): p. 318-321.
127. Lv, C., et al., *Renal cell carcinoma risk is associated with the interactions of APOE, VHL and MTHFR gene polymorphisms*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(5): p. 5781-5786.
128. Zhang, N., et al., *The Correlation Between Tuberous Sclerosis Complex Genotype and Renal Angiomyolipoma Phenotype*. Front Genet, 2020. **11**: p. 575750.
129. Song, X., et al., *Incidence, Survival, and Risk Factors for Adults with Acute Myeloid Leukemia Not Otherwise Specified and Acute Myeloid Leukemia with Recurrent Genetic Abnormalities: Analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Database, 2001-2013*. Acta Haematol, 2018. **139**(2): p. 115-127.
130. Fiske, J., et al., *Multifocal renal oncocytoma in a patient with Von Hippel-Lindau mutation*. Urology, 2005. **66**(6): p. 1320.
131. Minardi, D., et al., *Prognostic role of BAP1 in pT1 clear cell carcinoma in partial nephrectomy specimens*. Virchows Arch, 2017. **471**(1): p. 99-105.
132. Testa, J.R., et al., *Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma*. Nat Genet, 2011. **43**(10): p. 1022-1025.
133. Eckel-Passow, J.E., et al., *BAP1 and PBRM1 in metastatic clear cell renal cell carcinoma: tumor heterogeneity and concordance with paired primary tumor*. BMC Urol, 2017. **17**(1): p. 19.
134. Farley, M.N., et al., *A novel germline mutation in BAP1 predisposes to familial clear-cell renal cell carcinoma*. Mol Cancer Res, 2013. **11**(9): p. 1061-1071.

135. Sun, C., et al., *EZH2 Expression is increased in BAP1-mutant renal clear cell carcinoma and is related to poor prognosis*. J Cancer, 2018. **9**(20): p. 3787-3796.
136. Brenner, W., et al., *Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis*. Int J Cancer, 2002. **99**(1): p. 53-57.
137. Wang, S.S., et al., *Bap1 is essential for kidney function and cooperates with Vhl in renal tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(46): p. 16538-16543.
138. Teh, B.T., et al., *Bilateral multiple renal oncocytomas and cysts associated with a constitutional translocation (8;9)(q24.1;q34.3) and a rare constitutional VHL missense substitution*. Genes Chromosomes Cancer, 1998. **21**(3): p. 260-264.
139. Chrabańska, M., N. Szweda-Gandor, and B. Drozdowska, *Two Single Nucleotide Polymorphisms in the Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(4).
140. Webster, B.R., N. Gopal, and M.W. Ball, *Tumorigenesis Mechanisms Found in Hereditary Renal Cell Carcinoma: A Review*. Genes (Basel), 2022. **13**(11).
141. Chrabańska, M., N. Szweda-Gandor, and B. Drozdowska, *Does the VHL polymorphisms rs779805 and rs1642742 affect renal cell carcinoma susceptibility, prognosis and survival in Central European population?* Medicine (Baltimore), 2023. **102**(50): p. e36540.
142. Teixeira, A.L., et al., *Higher circulating expression levels of miR-221 associated with poor overall survival in renal cell carcinoma patients*. Tumour Biol, 2014. **35**(5): p. 4057-4066.
143. Liu, K., et al., *Increased Expression of MicroRNA-221 in gastric cancer and its clinical significance*. J Int Med Res, 2012. **40**(2): p. 467-474.
144. Liu, X., et al., *Cell-specific effects of miR-221/222 in vessels: molecular mechanism and therapeutic application*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(1): p. 245-255.
145. Gramantieri, L., et al., *MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(16): p. 5073-5081.
146. Sarkar, S., et al., *Down-regulation of miR-221 inhibits proliferation of pancreatic cancer cells through up-regulation of PTEN, p27(kip1), p57(kip2), and PUMA*. Am J Cancer Res, 2013. **3**(5): p. 465-477.
147. Bao, L., et al., *MicroRNA-21 suppresses PTEN and hSulf-1 expression and promotes hepatocellular carcinoma progression through AKT/ERK pathways*. Cancer Lett, 2013. **337**(2): p. 226-236.
148. Neal, C.S., et al., *The VHL-dependent regulation of microRNAs in renal cancer*. BMC Med, 2010. **8**: p. 64.
149. von Teichman, A., et al., *VHL mutations and dysregulation of pVHL- and PTEN-controlled pathways in multilocular cystic renal cell carcinoma*. Mod Pathol, 2011. **24**(4): p. 571-578.
150. Wotschovsky, Z., et al., *Identification of metastamirs as metastasis-associated microRNAs in clear cell renal cell carcinomas*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(10): p. 1363-1374.



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.





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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.05.29.

