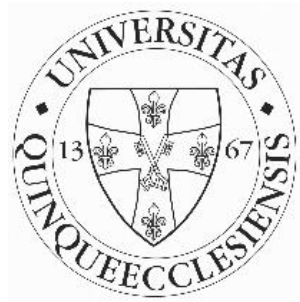


# **A gyulladássos jelátvitel szerepe a konvencionális vese rák progressziójában**

**Doktori (PhD) értekezés**

**Szerző: Dr. Péterfi Lehel**

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ  
Urológiai Klinika



**Pécs, 2019**

Doktori iskolavezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Pajor László

Témavezető: Prof. Dr. Kovács Gyula

## **1. BEVEZETÉS**

### **A gyulladós mikrokörnyezet szerepe a tumorok progressiójában**

A tumorokhoz társuló gyulladós folyamatra Rudolf Virchow már 1863-ban felhívta a figyelmet, aki a neoplasztikus szövetekben "lymphoreticularis infiltrátum"-ot írt le (Virchow, 1863). Az elmúlt két évtizedben a gyulladós mikrokörnyezet és tumor progressiójának vizsgálata számos új megfigyeléshez vezetett. Ezek alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a tumor sejtekben létrejött gén elváltozások a gyulladós mikrokörnyezet formálásával elősegítik a progressziót (Balkwill és Mantovani 2001; Mantovani és mtsai, 2008; Allavena 2010.). A tumor sejtek a különböző jelátviteli rendszereken keresztül, mint az NFkB, STAT3, HIF-1a fokozzák a gyulladást elősegítő gének, mint a citokinek, kemokinek termelését. A tumorsejtek által szekretált kemokinek és citokinek a tumor környezetében gyulladós sejtek toborzásához vezetnek, amelyek transzkripciós faktorokat termelnek, amelyek ismét a kemokinek és citokinek termeléséhez vezetnek és így a gyulladós folyamat amplifikációja jön létre. Ez a tumorhoz kapcsolódó gyulladás végül is a tumorokra jellemző korlátlan sejtproliferációhoz, a daganatsejtek fokozott túléléséhez, angiogenezishez, tumorsejt-migrációhoz, invázióhoz, metasztázishoz, az adoptív immunreakció gátlásához és a tumorsejtek hormonokra és kemoterápiás szerekre adott megváltozott válaszához vezet (Mantovani, 2008).

A kemotaktikus citokinek, kemokinek elsősorban a TNFalpha, IL-6, CSF2 fontos szerepet játszanak az immunsejtek toborzásában és így befolyásolhatják a daganat sejtek túlélését, szerepet játszhatnak az angiogenezis szabályozásában és az áttétek kialakulásában (Allavena és mtsai 2010). A tumor invazív képessége nagymértékben attól függ, hogy képes-e lebontani az extracelluláris matrixot és ezzel lehetővé tegye a terjeszkedését. A gyulladós citokinek aktiválják a TAM sejtek által termelt mátrix

metalloproteázokat (MMP), amelyek a tumort körülvevő extracelluláris mátrix emésztésével megnyitják az utat az invázióhoz.

Az utóbbi időben egyre több olyan véletlenszerűen felfedezett pT1, pT2 vagy pT3 stádiumú veserák kerül felismerésre és műtetre, amely a vesére korlátozott és a rendelkezésre álló vizsgálati módszerekkel még nem tudunk progressziót kimutatni. Ezeknek az eseteknek mintegy 15-20%-a a kedvező kiindulási paraméterek ellenére a műtét után progressziót mutat. A TNM klasszifikáció, különösen a pT1 és pT2 tumorok esetében nem ad információt az egyes tumorok várható progressziójáról.

Azok a többnyire akut fázisú gyulladós folyamatok, amelyek a daganatok invazív és metasztatikus növekedését támogatják elkülönítendő azoktól a kronikus gyulladós folyamatoktól, amelyek a daganatok kialakulását segítik elő. Az elsősorban heveny fázisú gyulladós folyamat a tumorsejtekben végbement gén elváltozások következménye, amely a gyulladás további fokozásához és a tumor növekedéséhez és terjedéséhez vezet. A munka során a gyulladós folyamatban résztvevő és a tumorsejtek proliferációjához és metasztatikus képességéhez társuló gének elváltozásával foglalkoztam.

## **2. Célkitűzés**

Egy korábban elvégzett Affymetrix vizsgálat során olyan gének kerültek felismerésre, amelyek a tumor progressziójával hozhatók összefüggésbe. Az Affymetrix array a gének kifejeződését csak az RNS szinten adta meg, amely sok esetben nem egyezik meg a biológiailag aktív fehérje kifejeződésével. Ezért az előzetes RNS adatok megerősítésére elvégeztük a tumor szövetek immunhisztológiai vizsgálatát és az eredményeket összehasonlítottuk a tumorok patológiai és klinikai jellemzőivel valamint a betegség lefolyásával.

A, A tézis témájául először egy acut fázis fehérjét, az **LBP** gént választottuk ki. A kérdésünk az volt, hogy van-e összefüggés az LBP tumorsejtekben való kifejeződése és a tumorok progressziója között?

B, A másik gén, a **RARRES1** egy karboxypeptidáze gátló, amely az **AGBL2** karboxypeptidáze génnel komplexumot képezve befolyásolja a mikrotubulusok funkcióját és így a tumorok progresszióját.

C, Az **AXL** gént a **RARRES1**-el való összefüggése, de elsősorban a legújabb **AXL** gátló therapias eljárások figyelembevételével választottuk ki.

### **3. Vizsgálati anyag és módszerek**

#### **3.1. Betegek és szövetminták**

A Pécsi Tudományegyetem Urológiai Klinikáján 2000. január és 2013. december között konvencionális veserák miatt operált betegek közül kiválasztottuk azokat az eseteket, amelyek a műtét idején még nem mutattak áttétet és jó nyomonkövetési adatokkal rendelkeztek. Staging céljából a műtét előtt minden esetben mellkas RTG, has és kismedencei CT vizsgálat történt. Agyi vagy csont metasztázis jelenlétére utaló klinikai tünetek fennállása esetén csontscintigráfia és koponya CT vizsgálatot is végeztünk. Nyirokcsomó érintettség megállapításánál a szövettani eredményt, távoli áttéteknél a képalkotó vizsgálatok eredményeit vettük alapul. A műtétet követő nyomonkövetés során hathavonta végeztünk hasi ultrahang vizsgálatot, mellkas röntgent és laborvizsgálatot, évente hasi és kismedence CT vizsgálatot. A szövettani diagnózis minden esetben a témavezetőm által került felülvizsgálatra a Heidelbergi Klasszifikációnak megfelelően [Kovacs és mtsai. 1997]. A TNM stádium megállapítását a 2016-os TNM klasszifikáció [Brierly és mtsai, 2016] szerint végeztük. A nukleáris grádus meghatározása a témavezető által több mint 30 éve használt háromfokozatú rendszer alkalmazásával történt. A

szövetminták gyűjtését és feldolgozását a PTE ÁOK Etikai Bizottság engedélyének birtokában végeztük (Etikai engedély száma: 5343/2014).

### **3.2. Tissue microarray és immunhisztokémia**

A vizsgálatokhoz főtális és felnőtt egészséges veseszövetet, valamint konvencionális veserákot tartalmazó tissue microarray (TMA) használtunk, amelyet a Manual Tissue Arrayer (MTA1, Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, Michigan, USA) készülék segítségével készítettünk el. A TMA-kból készített 4 µm vastagságú metszetekből a paraffint xilol segítségével eltávolítottuk, majd a metszeteket leszálló alkohol sorozatban rehidráltuk. Ezt követően az antigén feltárás 10 µM natrium-citrát pufferben (pH 6,0) vagy TE pufferben (pH 9,0) a 2100-Retriever (PICK-Cell Laboratories, Amsterdam, Hollandia) készülékben történt. Az endogen peroxidáz és a nem specifikus kötőhelyek blokkolása 1% normal ló szérumot tartalmazó 3%-os hidrogénperoxidban történt szobahőmérsékleten 10 percig. A lemezeket lefedtük az előre kipróbált hígítású antitesttel majd a lemezeket éjszakán át nedves kamrában 4°C-on inkubáltuk. A következő antitesteket használtuk fel: polyklonális nyúl anti-LBP antitest (HPA 001508, Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden) 1:250 hígításban; polyklonális nyúl anti- RARRES1 antitest (HPA 001508, Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden) 1:250 hígításban; polyklonális nyúl anti-CCP2 (AGBL2) antitest (PA5-22310, Thermo Fisher Scientific, Budapest, Hungary), 1:200 hígításban; polyklonális nyúl anti-AXL antitest (PA5-39124, Thermo Fisher, Budapest, Hungary) 1:200 hígításban.

Harminc percig történő HRP conjugált anti-nyúl másodlagos antitest (MACH4 Universal HRP-Polymer, Biocare Medical, Concord, USA) alkalmazását követően az előhívás AEC

szubsztrát és DAB (DAKO, Glostrup, Denmark) segítségével történt, majd a metszeteket Mayer hematoxilinnel festettük. Végül a metszetek különböző időpontban történő kétszeres kiértékelése történt a klinikai adatok ismerete nélkül.

### **3.4. Statisztikai analízis**

Az adatok statisztikai feldolgozása az SPSS Statistics szoftver 23.0 verzió (IBM,35 Armonk, NY, USA) segítségével történt. A vizsgált gének expressziója és a klinikopatológiai paraméterek közti összefüggéseket a khi-négyzet próba alkalmazásával elemeztük. A különböző változók (életkor, nem, tumor méret, TNM klasszifikáció, nukleáris grád, stádium, metasztázis jelenléte és a vizsgált gén expressziója) túlélési időre gyakorolt hatását Kaplan-Meier analízis segítségével mértük fel, a túlélési görbék összehasonlítását log-rank teszt alkalmazásával végeztük. A túlélésre gyakorolt hatás egyváltozós és többváltozós analízise a Cox regressziós modell segítségével történt. A vizsgálat lezárultakor életben lévő és tumormentes betegeket cenzoráltuk. A különbséget 0,05-nél kisebb p érték esetén tekintettük szignifikánsnak.

## **4. Eredmények**

### **4.1. LBP**

#### **4.1.1. Az LBP kifejeződése normal vesében és konvencionális veserákban**

Az Affymetrix array az LBP fokozott kifejeződését két gyermekkori daganat kivételével kizárólag a progressziót mutató konvencionális vesetumorokban jelezte. Az immunhisztológiai vizsgálat során az LBP protein kifejeződését a főtalis és felnőtt vesében kizárólag a kialakuló proximális tubulus sejtjeiben észleltük. Az immunhisztokémiai vizsgálat nem mutatott pozitív reakciót az LBP antitesttel 588 (85%)

konventionális veserákban, míg 103 (15%) tumorban különböző erősségű LBP pozitivitás volt megfigyelhető. Mivel az LBP kifejeződése a tumor progressiójával mutatott összefüggést, azokban az esetekben, ahol a multiplex biopsziák közül egy-vagy kettő negatív, de a harmadik biopszia pozitív volt vagy ha az azonos tumorból származó biopsziák között különböző intenzitású LBP festődést észleltünk, minden esetben a legerőteljesebb kifejeződést mutató biopsziát vettük figyelembe. Az előzetes Kaplan Meier analysis során nem találtunk jelentős különbséget a gyenge és erős immunhisztológiai szignált mutató tumorok és a betegek túlélése közt, ezért a gyenge valamint erős festődést egyaránt mint pozitív eredményt értékeltük ki. A negatív esetekben gyakran észleltünk pozitív festődést a kapillárisokat kitöltő szérumban. Egyes tumorokban, különösen a rhabdoid megjelenésű konvencionális veserákok citoplasmájában “zárványszerű” erős pozitivitás volt látható. Számos esetben az összes tumorsejt cytoplasmája erőteljes immunreakciót mutatott.

#### **4.1.2. Az LBP expresszió összehasonlítása a klinikopatológiai jellemzőkkel**

Az LBP expresszió és a klinikai-patológiai mutatók, mint a daganatspecifikus halálozás, a tumor mérete, a nukleáris grádusa és a T-stádiuma közötti viszony statisztikai elemzése során mindegyik paraméter tekintetében szignifikáns összefüggés volt kimutatható ( $p < 0,001$ ). A log-rank teszt alkalmazásával végzett Kaplan-Meier túlélési analízis az LBP antitesttel pozitívan festődő tumorok esetén lényegesen rövidebb daganatspecifikus túlélést mutatott ki. Az 5-éves tumor specifikus túlélési idő az LBP negatív tumorú betegek esetében 92.6%, míg az LBP pozitív tumorú betegek esetében csak 62.5% volt. Az átlagos túlélés pozitív esetekben  $83 (72-93) \pm 6$  hónap, negatív esetekben  $179 (169-188) \pm 5$  volt, míg a teljes túlélés  $158 (148-168) \pm 5$  volt.

Egyváltozós analízis alapján a T-stadium, tumor grade, tumor stage és a tumour mérete, valamint LBP pozitivitás szignifikáns összefüggést mutattak ( $p < 0.001$ ). Az LBP pozitív esetekben a daganatspecifikus halálozás kockázata szignifikánsan magasabb volt (RR 7.287 95% CI – 4.97-10.66;  $< 0.001$ ). Az LBP pozitivitás független prognosztikai értékének meghatározása érdekében elvégeztük a többváltozós analízist az ismert klinikopatológiai prognosztikai változókat figyelembe véve. Többváltozós analízis során az LBP expresszió - a nukleáris grádus mellett - független prognosztikai faktornak bizonyult (RR-2.37; 95% CI- 1.50-3.73;  $p > 0,001$ ).

## **4.2. RARRES1**

### **4.2.1. A RARRES1 RNS kifejeződése progresszív konvencionális veserákban**

Egy korábban a Heidelbergi Molekuláris Onkológián elvégzett 12 gyors progressziót mutató konvencionális veserák (minden beteg daganatos progresszió miatt három éven belül meghalt), valamint nyolc éven belül nem progrediáló 12 veserák összehasonlító globális gén expressziós vizsgálatából kiemeltük a RARRES1 génre vonatkozó eredményeket. Az Affymetrix génexpressziós array a RARRES1 fokozott kifejeződését mutatta a gyors progressziójú konvencionális veserákok legnagyobb részében.

### **4.2.2. A RARRES1 kifejeződésének megerősítése immunhisztológiával**

Az immunhisztológiai vizsgálat során a RARRES1 fehérje a főtalis és felnőttkori vesében kizárólag a proximális tubulus sejtjeinek lumen felületén volt kimutatható. Más nefron szakaszokban nem találtunk RARRES1 pozitivitást sem a főtalis sem a felnőttkori vesében. A konvencionális veserákok közül 454 tubuláris-trabekuláris növekedést mutató tumorban a normal proximális tubulusokhoz hasonlóan tubuláris felszínen vagy az annak megfelelő membrán területén láttunk RARRES1 pozitivitást. Az immunhisztokémiai vizsgálat nem mutatott pozitív reakciót a RARRES1 antitesttel 106 konvencionális



veserákban. A normál vese tubulusoktól és a tumorok egy részétől eltérően, 131 tumorban intenzív cytoplasmikus RARRES1 reakciót figyeltünk meg. Így a továbbiakban megkülönböztettünk membránhoz kötött és cytoplasmikus pozitivitást valamint negatív festődést. Az ennek alapján elvégzett Kaplan-Meier analysis jóval rövidebb túlélést mutatott azokban az esetekben, ahol a pozitív reakció a cytoplasmában volt látható. Ezért azokat az eseteket, ahol a multiplex biopsziák közül legalább egy cytoplasmikus reakciót mutatott, cytoplasma pozitív tumornak értékeltük ki. A különböző megjelenésű RARRES1 immunreakciót 691 konvencionális veserákban értékeltük ki. A cytoplasmikus RARRES1 pozitívitas valamint a tumorok mérete, grádusa, T klasszifikációja és staging valamint a tumor specifikus túlélés között szignifikáns összefüggést találtunk (mind  $p < 0.001$ ).

#### **4.2.3. RARRES1 lokalizációja és magas recidiva kockázat közötti összefüggés.**

Egyváltozós analízis alapján a tumor mérete, tumor grádus, T-stadium és tumor stage valamint RARRES1 különböző sejtstruktúrákon észlelt pozitívitas között szignifikáns összefüggés volt (RR 10.391, 95% CI – 5.466-19.753;  $< 0.001$  ill. RR 20.688, 95% CI – 11.607-36.871;  $< 0.001$ ). A RARRES1 negatív ill. cytoplasmikus pozitív esetekben a postoperatív tumor progresszió és így a daganatspecifikus halálozás kockázata szignifikánsan magasabb volt. A RARRES1 kifejeződés független prognosztikai értékének meghatározására elvégeztük a többváltozós analízist az ismert klinikopatológiai prognosztikai változókat figyelembe véve. Többváltozós analízis során a RARRES1 expresszió hiánya ill cytoplasmikus expressziója - a nukleáris grádus mellett - független prognosztikai faktornak bizonyult (RR-8.402; 95% CI- 4.245-16.631;  $p > 0,001$ , ill. RR-7.570; 95% CI- 3.880-14.772;  $p > 0,001$ ).

#### **4.3. Az AGBL2 kifejeződése konvencionális veserákban**

Az immunhisztológiai vizsgálat során az AGBL2 expressziója csak a citoplasmában volt megfigyelhető vagy nem kaptunk pozitív reakciót. Pozitív reakció esetén az összes tumor sejt pozitív volt. A 691 tumor közül 215-ben figyeltünk meg a tumorsejtek cytoplasmájában pozitív reakciót, míg 572 tumor még a multiplex biopsziákban sem mutatott AGBL2 immunreakciót. A klinikai és patológiai paraméterek és AGBL2 pozitivitás összehasonlítása során csak a tumor gradussal ( $p=0.007$ ) és a tumor stadiummal ( $p=0.033$ ) találtunk szignifikáns összefüggést. A konvencionális veserákok mérete és az AGBL2 kifejeződése között nem volt szignifikáns összefüggés ( $p=0.082$ ).

Kaplan-Meier vizsgálat (Log rank (Mantel-Cox)) nem mutatott szignifikáns összefüggést a betegség progressziója és AGBL2 pozitív immunhisztológia között. Az 5 éves túlélés az AGBL2 negatív tumorok esetén  $153 (139-167) \pm 7$  hónap, míg az AGBL2 pozitív tumorok esetén  $147 (136-157) \pm 6$  hónap volt. A többváltozós vizsgálat szerint csak a tumor gradus mutatott szignifikáns összefüggést ( $p<0.001$ ) az AGBL2 pozitivitással. Az AGBL2 pozitív tumorok és postoperative progresszió között nem találtunk szignifikáns összefüggést (RR=1.081 (0.700-1.669)  $p=0.726$ ).

#### **4.4. A RARRES1 és AGBL2 ko-expressziója**

Meghatároztuk a RARRES1 expresszió különböző formái valamint az AGBL2 kifejeződése közötti összefüggést. A 691 tumorból 454 (66%) mutatott RARRES1 membrán pozitivitást, ezek közül 110 tumorban az AGBL2 is pozitív volt ami az AGBL2 pozitív esetek 61%-át teszi ki. A 106 RARRES1 negatív tumorból csak 7 tumor mutatott AGBL2 immunreakciót, míg a 132 RARRES1 cytoplamatikus pozitív esetből 63 tumorban találtunk AGBL2 pozitivitást is (1. Táblázat).

		Eset szám (691)	RARRES1 expresszió			p-value
			membrán (454)	negatív (106)	cytoplasma (132)	
AGBL2	negatív	512	344	99	69	<0.001
	pozitív	180	<b>110</b>	7	63	

**1. Táblázat.** A RARRES1 és az AGBL2 expresszió közötti összefüggés. (Pearson Chi-Square test (p<0.001))

Meghatároztuk a RARRES1 és AGBL2 kifejeződésének különböző megjelenési formája és a tumorok progressziója közötti összefüggést Kaplan-Meier analízis segítségével. Talán a legfontosabb megfigyelés, amit a Kaplan-Meier mutat, hogy a 110 RARRES1 membrán pozitív és egyúttal AGBL2 pozitív eset közül mindössze egyetlen betegben fordult elő posztoperatív tumor progresszió az átlagosan 60 hónapos utánkövetés során.

#### **4.5. Az AXL**

##### **4.5.1. Az AXL kifejeződése konvencionális veserákban**

Az AXL gén immunhisztológiai vizsgálata 4 különböző korú főtalis vesében (11-23 hét) és 4 felnőttkori vesében sem adott pozitív reakciót. Membránhoz kötött immunreakció fordult elő 327 (41%) konvencionális veserákban, míg 218 (27.4%) tumorban a cytoplasmában figyeltünk meg RARRES1 pozitív reakciót. A konvencionális veserákok közül 252-ben (31.6%) nem találtunk pozitív festődést egyetlen biopsziás anyagban sem.

#### **4.5.2. Az AXL expresszió összehasonlítása a klinikopatológiai jellemzőkkel**

A különböző sejtkomponensekben észlelt illetve negatív AXL expresszió és a daganatspecifikus halálozás, a tumor mérete, a nukleáris grádusa és a T-stádiuma közötti viszony statisztikai elemzése során mindegyik paraméter tekintetében szignifikáns összefüggés volt kimutatható ( $p < 0,001$ ). A log-rank teszt alkalmazásával végzett Kaplan-Meier túlélési analízis az AXL antitesttel pozitívan festődő tumorok esetén lényegesen rövidebb daganatspecifikus túlélést mutatott ki. A számított median túlélési idő az AXL pozitív tumorú betegeknél 74 hónap (33-82, 95% CI), míg az általános túlélési idő 142 hónap volt.

Egyváltozós analízis alapján a T-stadium, tumor gradus, tumor stage és a tumor mérete, valamint a cytoplasmatis AXL pozitivitás szignifikáns összefüggést mutattak (mind  $p < 0,001$ ). Az AXL cytoplasma pozitív esetekben a daganatspecifikus halálozás kockázata szignifikánsan magasabb volt (RR 7,8 95% CI – 4.90-12.42;  $< 0,001$ ). A különböző cellularis AXL kifejeződés független prognosztikai értékének meghatározása érdekében elvégeztük a többváltozós analízist az ismert klinikai patológiai prognosztikai változókat figyelembe véve. Többváltozós analízis során a cytoplasmatis AXL expresszió - a T-stádium és a tumor grádus mellett - független negatív prognosztikai faktornak bizonyult, az AXL pozitív tumorok esetében a betegeknél közel négyszeres rizikója volt a daganat specifikus elhalálozásra (RR=3.60; 95% CI=2.64-4.92;  $p < 0,001$ ). Az átlagosan 60 hónapos követési idő alatt membrán pozitív esetekben a betegek 96,6% volt életben, az AXL negatív tumorok esetén a betegek 77,4%-a míg az cytoplasmatis AXL kifejeződés esetén a betegeknél csak 38.1%-a volt életben.

## **5.Megbeszélés**

### **5.1. LBP**

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy az LBP gén expressiója szignifikáns összefüggést mutat a konvencionális veserák postoperatív progressziójával. Az LBP az akut-fázis fehérjék csoportjába tartozik és fontos szerepe van az endotoxinokra adott immunválasz szabályozásában (Schumann és mtsai, 1990). Normál körülmények közt az LBP a májsejtekben fiziológias szinten képződik, de akut-fázis reakciókban, mint a tumorok gyulladási mikrokörnyezete, a makrofágok és monocyták által szekretált IL-1 és IL-6 jelentős mértékben fokozhatja az LBP szintézisét (Schumann és mtsai, 1996). Normál konstitutív koncentrációban az LBP megkötö a különböző bakteriális komponenseket mint lipopolyszacharidokat (LPS) és peptidoglykánokat és a CD14 valamint TLR4 receptor komplexen keresztül a pro-inflammációs cytokinek, mint az IL-6 fokozott kifejeződéséhez vezet, amely viszont az LBP szintézisét fokozza (Faure és mtsai, 2000; Kitchens és mtsai 2005). A TLR4 az exogén bakteriális komponenseken kívül endogen ligandokat is felismer, mint pl. heat-shock proteinek, valamint szövetsérülés során megjelenő extracelluláris matrix (ECM) komponenseket, mint fibronectin és heparinszulfát (Akira és Takeda, 2000).

Mai tudásunk szerint a konvencionális veserák a proximális tubulus sejteiből indul ki. Az LBP fehérje kizárólag a főtális és felnőttkori vesék proximális tubulus sejteiben fejeződik ki. A proximális tubulus sejtejei különösen érzékenyek hypoxiás és toxicus ártalmakra és acut tubuláris sérülés esetén gyulladáskeltő cytokinek és kemokinek szekreciónak, így jelentős szerepük van a vese bármilyen jellegű hypoxemiás, metabolikus, toxicus sérülését kísérő gyulladások kialakulásában (Daha és van Kooten, 2000).

Az LPS-LBP-CD14-TLR4 jelátvivő rendszer fontos szerepet játszik a beteg immunszisztémájának és a konvencionális veserák mikrokörnyezetének megváltoztatásában. A TLR aktiválás által a tumor sejtek citokineket szekernének, ezáltal újabb immunsejteket toboroznak amelyek képesek citokineket, pro-angiogén és növekedési faktorokat kibocsátani és így tovább erősítik a megváltoztatott mikrokörnyezetben a tumor sejtek proliferációját (Sato és mtsai, 2009). A TLR4 stimulációja az LBP-CD14 komplex által az NF-kB-függő metalloproteináz-2 és beta-integrin fokozott kifejeződését és ezáltal a tumor sejtek invazív növekedését is elősegíti (Harmey és mtsai, 2002). A tumor mikrokörnyezetének megváltozott immunreakciója hozzájárul a tumorsejtek proliferációjához, a fokozott angiogenezishez, áttétképződéshez és terápia rezisztenciához is (Huang és mtsai, 2005; Mantovani és mtsai 2008).

Korábban összefüggést találtak több acute fázis protein (APP) szekréciónak és a tumor progresszió közt (Orr és mtsai, 2011). A C-reaktív fehérje és az SAA1 gén fokozott expressziója és a tumoros betegek túlélése közötti megfigyelést több közleményben leírták (Wood és mtsai, 2010; Engwegen és mtsai, 2007; Jagdev és mtsai, 2010). Azonban az APP serum koncentrációja nem specifikus egy adott tumor típusra és bakteriális infekció vagy bármilyen más gyulladás esetében is emelkedett lehet. Leírták veserák progresszióját előre jelző emelkedett neutrophil-lymfocita arányt, de a neutrofilia mögött bármilyen gyulladásos folyamat is előfordulhat (Fox és mtsai, 2013). Viszont egy korábbi közlemény csak úgy mint a jelen munka egyértelműen azonosította a konvencionális veserákok egy csoportját, ahol maguk a tumorsejtek fejeznek ki APP-t, azaz SAA1 és LBP proteineket (Paret és mtsai, 2010). Mind az SAA1 és LBP fokozott kifejeződése a konvencionális veserákok postoperative progressziójának magas rizikójával áll összefüggésben.

## 5.2. RARRES1 és AGL2

Annak ellenére, hogy a vizsgálatokba bevont 691 vesére lokalizált konventionális veserákok közül 511 a pT1a ill. pT1b stádiumhoz tartozott, 107 tumor progressziót mutatott a postoperative követési idő alatt és így a target terápás kezelés ellenére a beteg halálához vezetett ill. fog vezetni. A Kaplan-Meier vizsgálat szerint a RARRES1 fehérje kifejeződése tumor sejtek felszínén meghatározott egy alacsony risikójú csoportot a betegség rendkívül kedvező lefolyásával. A RARRES1 cytoplasmikus kifejeződése valamint a protein teljes hiánya viszont egy rossz prognózisú betegcsoportot azonosított. A RARRES1 (retinoic acid receptor responder 1) gént először Tazarotene kezelt sejtekben irták le, innen a másik szokásos neve TIG1 (Tazarotene-induced gene 1) (Nagpal et al. 1996). RARRES1 6 exonból áll, és két alternatív splice variánsa ismert amelyek a 3' regioban különböznek. Az aminosav szekvencia alapján a RARRES1 gént transzmembrán fehérjének tartják amely egy nagy extraelluláris régióból, "single pass" transzmembrán régióból és egy rövid N-terminális intracelluláris régióból áll. Összehasonlító kristályszerkezete alapján feltételezik, hogy a TIG1 membránhoz kötött (Aagaard és mtsai, 2005). Ezenkívül feltételezik, hogy a RARRES1 más membránon is lokalizálódik, mint pl. a Golgi-apparátus vagy az endoplasmás reticulum felszínén, amely magyarázatot adhat a konvencionális veserákok egy részében megfigyelt citoplasmikus expresszióra. RARRES1-el transzfektált PC3 sejtek frakcionálása során a RARRES1 proteint csak a cytoplasmikus de nem a sejtmembrán frakcióban találták meg (Oldridge és mtsai, 2013). Egy másik frakcionálási kísérlet a teljes hosszúságu 38 kDa RARRES1 izoformát a sejtmembránhoz lokalizálta (Shahab és mtsai, 2011). Ugyanezek a szerzők a sejt-mag-cytosol debris poolban egy kb 50 kDa RARRES1 proteint azonosítottak. Shahab és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a RARRES1 C-terminális régiója a

glykolizációs szignállal cytoplasmikus elhelyezkedésű és így a RARRES1 egy III típusú transzmembrán protein.

RARRES1 különböző normál szövetekben, mint prosztata, tüdő, máj, szív és vastagbél is kifejeződik. Mi immunhisztologiai vizsgálattal mind a főtális mind a felnőttkori vesében a sejtek lumenáris membránján figyeltünk meg pozitív RARRES1 immunreakciót. A RARRES1 csökkent kifejeződését vagy hiányát a promotor régió hypermetilációja miatt nemcsak különböző sejtvonalakban, hanem a prosztata, endometrium, fej-nyaki régió, vastagbél és gyomor tumor szövetben is leírták (Jing et al. 2002; Zhang et al. 2004; Takai et al., 2005; Tokumaru et al. 2005; Kwong et al. 2005; Kwok et al. 2009; Peng et al. 2013; Son et al. 2009). Ennek alapján a RARRES1 génnek tumor szuppresszor funkciót tulajdonítottak (Jing és mtsai, 2002; Takai és mtsai 2005). Másrészt, a gyulladással emlőrákban a RARRES1 kifejezett expressziója a betegek rövidebb tumormentes túlélésével társult. In vitro körülmények között a RARRES1 gén deplációja csökkent sejtproliferációval, migrációs és invazív képességgel társult és in vivo csökkentette a xenograft tumorok növekedést (Wang és mtsai, 2013).

RARRES1 annak a protein komplexnek az egyik tagja, amely a tubulus tyrozinációs ciklust szabályozza és ebben a komplexben a RARRES1-nek gátló hatása van. Yeast two-hybrid technika alkalmazásával kimutatták, hogy a RARRES1 kötődik a transzmembrán fehérje 192-vel (TMEM192) és a RARRES1 expressziója a TMEM192 kötődés útján a sejtek autofágiájához vezet (Shyu és mtsai, 2014). A TMEM192 számos szövetben köztük a vesében is kifejeződik. In vitro kísérlet során a RARRES1 fokozott kifejeződése prostata karcinóma sejtekben a beclin és ATG3 genekhez kötődő autofágiát okoz (Roy és mtsai 2017)

A RARRES1 funkciója a különböző típusú tumorokban csakúgy mint a konvencionális veserákban nem ismert. A RARRES1 C-terminális régiója 30% hasonlóságot mutat a



latexinnel, amely ismert karboxypeptidáz inhibitor. A RARRES1 szintén karboxypeptidáz inhibitor, amelyik kötődik az ATP/GTP binding protein-like 2 (AGBL2)-höz (Sahab és mtsai, 2015). Az AGBL2 gén az  $\alpha$ -tubulin detyrozinációjában vesz részt és ilyen módon segíti a tumor kialakulását és progresszióját. Májrákban az AGBL2 fokozott expressziója a tumorok méretével, és az előrehaladott klinikai stádiummal mutatott szignifikáns korrelációt. Az AGBL2 szabályozza az autofágiát, a TPX2 és az Aurora A aktivitását és így elősegíti a májrák progresszióját.

Az AGBL2 szerepe a konventionális veserákban még nem ismert, a legtöbb klinikai és patológiai paraméterrel gyakorlatilag nem lehetett összefüggést kimutatni, az AGBL2 kifejeződése csak a tumor gradussal mutatott korrelációt. Az AGBL2 pozitív esetek viszonylagos rizikója a postoperative progresszióra rendkívül alacsonynak bizonyult (RR=1.081 (0.700-1.669) p=0.726). Viszont érdekes megfigyelést tettünk a RARRES1 és az AGBL2 ko-expressió közötti összefüggésről, amelynek a molekuláris hátterét még nem ismerjük. A RARRES1 membránhoz kötött kifejeződése az AGBL2 egyidejű kifejeződésével a konvencionális veserákok rendkívül kedvező lefolyásával társult, amennyiben ebben a tumorcsoportban csak egyetlen tumor progrediált.

### **5.3. AXL**

Wang és mtsai (2013) experimentális vizsgálatuk alapján utaltak arra, hogy RARRES1 valószínűleg szerepet játszik a tumor sejtek invazív növekedésében az AXL szignálátvivő rendszerén keresztül. Ezért döntöttünk úgy, hogy megvizsgáljuk az AXL gén expressziója és a konvencionális veserák progressziója közötti összefüggést.

Az AXL, a Tyro3-Axl-Mer (TAM) receptor tyrozin kináz (RTK) enzim csoport tagja. Az AXL kifejeződését számos tumorban, mint myeloid leukemia, glioblastoma, prosztatata, tüdő, vastagbél, gyomor, pankreász és emlő rákban, leírták. Az AXL

kifejeződése a leírt esetekben a tumorok invazív növekedésével és metasztázis képzésével mutatott összefüggést. Az AXL expresszió jelentősége konvencionális veserákokban még nem ismert. Vizsgálataink során az AXL protein kifejeződése és tumorsejten belüli lokalizációja alapján megkülönböztettünk három tumor csoportot: membránhoz kötött és citoplazmatikus AXL pozitív és AXL negatív tumorok. A Kaplan-Meier vizsgálat szerint az AXL membránhoz kötött kifejeződése kedvező prognosztikai jelnek tekinthető. Azok a betegek, amelyek tumorában az AXL protein a citoplasmában jelenik meg, közel négyszeres a rizikója a postoperatív tumor progresszióra.

Az AXL gen által kódolt fehérje az N-terminális végén két immunoglobulin-szerű, két fibronectin III-típusú motivumból, egy single pass transzmembrán doménből és citoplazmatikus tyrosin kináz doménből áll [Lemke, 2013]. A TAM proteinek számos biológiai folyamatban játszanak szerepet. Az AXL aktiválása különböző onkogén jelátvivő rendszerek útján elősegíti a sejtek proliferációját, túlélését, migrációját és invázióját (Corno és mtsai, 2016). Az AXL protein extracelluláris immunoglobulin és fibronectin motivuma az immunoglobulin és cadherin adhéziós molekulák integrált motivuma, ami arra utal, hogy az AXL a sejtadhéziót is szabályozhatja (Xe és mtsai, 2010). Az AXL a tumort infiltráló makrofágok és dendritikus sejtek felszínén is kifejeződik és akadályozza az immunválaszt (Rothlin 2007).

Az AXL aktiválásában számos mechanizmus vesz részt. A “growth arrest-specific 6” (Gas6) kötődése az AXL-hez a receptor AXL dimerizációjához, tyrosin-foszforilációjához vezet és így a jelátvitel útján aktiválja az AXL alá rendelt gének expresszióját (Lemke, 2013). Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) kötődése az AXL-hez aktiválja az AKT kinázt (protein B kináz) amely központi helyet foglal el a növekedési faktorok, gyulladást előidéző cytokinek és egyéb sejt folyamatok szabályozásában (Wu és mtsai, 2018). A Fra-1 (Fos-szerű antigén 1) húgyhólyag tumor sejtekben az AXL direkt

transzkripcionális aktivátora (Konishi és mtsai, 2004). A 786-O konvencionális veserák sejtvonal túlélése az AXL protein expressziójához kötött, de a sejtvonal nem fejezi ki az AXL ligand Gas6-ot (Yu és mtsai, 2015). Ez a megfigyelés arra utal, hogy az AXL a ligand hiányában is közvetíti a jelátvitelt. A ligandtól független AXL aktiválást vagy Mer vagy Tyro3 vagy nem-TAM fehérjék heterofil aktiválást is leírtak (Lemke és Rothlin, 2008; Ruan és Kazlauskas, 2012; Bellosta és mtsai, 1995). Az AXL protein felépítéséből adódóan előfordul a ligandtól független AXL aktiválás homofil sejtadhézió útján, amely magasfokú AXL kináz aktivitáshoz vezet (Zhang és mtsai, 2008; Rankin és mtsai, 2010).

Figyelembe véve az AXL aktiválás szerepét a különböző tumorok biológiájában, különösen a rezisztencia kialakulásában, számos terápiás lehetőséget dolgoztak ki az AXL jelátvités gátlására. Az új módszerek megpróbálják az AXL aktivitást az AXL ellenes antitestekkel, szolubilis AXL ektodomén molekulákkal, és inhibitorokkal akadályozni (Yu és mtsai, 2015; Ye és mtsai, 2010; Zhang és mtsai, 2008; Holland és mtsai, 2010; Rankin és mtsai, 2010). Legújabban kináz gátlók már klinikai kipróbálásra kerültek (Sheridan, 2013). A METEOR nevű klinikai vizsgálat szerint a Cabozantinib, egy AXL, MET és VEGFR2 gátló az áttétes veserák progressziójának lassulásához vezetett és összehasonlítva az everolimussal jobb eredményt adott (Ye és mtsai, 2010). Ennek alapján bevezették a cabozantinib therapiát az áttétes vesetumorok kezelésébe. Itt érdemes megemlíteni, hogy METEOR vizsgálatban nem találtak összefüggést egy másik tirozin kináz, a MET expressziója és a klinikai eredmények közt. Az AXL tumorszefikus kifejeződését nem vizsgálták meg.

## 6. Következtetések

Az általunk vizsgált a műtét során csak a vesére korlátozott 691 konvencionális veserák jelentős része a pT1a és pT1b stádiumba tartozott, de 107 tumor progressziót mutatott, áttétet adott az átlagosan 60 hónap postoperatív követés alatt. Bár a TNM osztályozás az általunk használt hármás grádusú beosztás segítségével jól konvencionális veserákot meghatározott rizikócsoporthoz osztja, egy-egy csoporton belül szükség van a tumor progresszió rizikójának pontosításához a tumor biológiai viselkedését előrejelző biomarkerekre. Ennek érdekében, az Urológiai Klinikán már elkezdett prognosztika marker kutatás folytatásával három újabb gén kifejeződését és a tumoros betegség lefolyását vizsgáltuk meg.

Az *LBP protein* cytoplasmikus kifejeződése szignifikáns összefüggést mutatott ezen tumorok postoperatív progressziójával és így meghatározott egy rizikó csoportot. Az LBP immunhisztológia alkalmas egy magas és alacsony rizikójú betegcsoport elkülönítésére.

A *RARRES1* gén sejtmembránhoz kötött kifejeződése a konvencionális veserákok rendkívül jó prognózisával függ össze. Azoknak a betegeknek, amelyeknek a tumorából hiányzik a RARRES1 expresszió vagy citoplazmatikus expresszió figyelhető meg, a postoperative progresszió rizikója 7-8-szor magasabb, mint azoknak, akiknek a tumorában a RARRES1 a sejtmembránon fejeződik ki. A membránhoz kötött RARRES1 expresszió és AGBL2 ko-expresszió a 691 tumorból egy olyan 110 fős betegcsoportot jelölt meg, amelyek az átlag 60 hónapos postoperatív megfigyelés során nem mutattak progressziót.

Az *AXL* gén a RARRES1 génhez hasonlóan, membránhoz kötött, negatív és citoplazmatikus expressziót mutatott. A progresszió megítélés szempontjából a cytoplasmikus AXL expresszióknak van jelentősége, amennyiben a postoperatív tumor

áttét risikója közel négyszeres ebben a betegcsoportban. Az AXL pozitivitás sejten belüli elhelyezkedésének a megállapítása a tumoros betegek AXL kináz gátló kezelésének meghatározásában is jelentősége lehet.

Összefoglalva, három olyan biomarkert sikerült azonosítani, amelyek immunhisztológiai vizsgálatával egy magas illetve alacsony rizikójú betegcsoport elkülönítésére van lehetőség.

## 7. Közlemények

### 7.1. A értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke

1. Gyula Kovacs, **Lehel Peterfi**, Nelli Farkas, Andras Javorhazy, Csaba Pusztai, Arpad Szanto. Inflammatory lipopolysaccharide binding protein (LBP) is an independent predictor of conventional renal cell carcinoma progression. Cell Oncol 2017; 40:651-656. doi: 10.1007/s13402-017-0346-4 **IF:4.77**
2. Donat P. Sarlos, **Lehel Peterfi**, Arpad Szanto, Gyula Kovacs: Shift of keratin expression profile in end stage kidney increases the risk of tumor development. Anticancer Res 2018;38:5217-5222. doi: 10.21873/anticancerres.12845. **IF: 1.97**
3. **Lehel Peterfi**, Maria Yussenko, Gyula Kovacs: IL6 shapes an inflammatory microenvironment and triggers the development of unique types of cancer in end stage kidney. Anticancer Res 2019;39:1869-1874. doi: 10.21873/anticancerres.13294. **IF: 1.85**
4. **Lehel Peterfi**, Thea Bjercke, Maria Yussenko, Donat Peter Sarlos, Daniel Banyai, Arpad Szanto, Gyula Kovacs: Cytoplasmic expression of AXL and its prognostic significance conventional RCC. BMC Cancer (submitted)
5. Donat Peter Sarlos, Maria V Yussenko, **Lehel Peterfi**, Anna Csenge Horvath, Arpad Szanto, Gyula Kovacs. Multiple roles of KRT17 indicate distinct natural history of renal cell tumours. J of Cancer (submitted)

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: **8.59**

Kumulatív impakt faktor (idézhető absztraktok nélkül): **8.59**

## **8. Köszönetnyilvánítás**

Ez úton is szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Kovács Gyulának, témavezetőmnek, hogy egy új szintre emelte érdeklődésemet és elmélyülésemet a tudományos kutatás világába, és mivel a tudomány az élet megismerése, nem feledkezhetek meg arról, hogy beszélgetéseim és vitáink során nem csak a tudomány, de az élet minden területén új észrevételekre és megfigyelésekre hívta fel a figyelmemet, ezzel minden téren tárgítva érdeklődési körömet és tudásomat. Köszönet illeti a Heidelbergi Molekuláris Biológiai Labor munkatársait, kiknek munkái ezen dolgozat kiindulópontját képezik.

Szeretnék köszönetet mondani Doc. Dr. Szántó Árpádnak, munkahelyi vezetőmnek, hogy megteremtete a lehetőséget a tudományos kutatáshoz, illetve támogatta is annak kiteljesedését. Köszönettel tartozom Adj. Dr. Pytel Ákosnak, aki elindított a tudományos kutatás útján.

Nem utolsó sorban köszönettel tartozom feleségemnek és családomnak türelmükért, mivel gyakran tőlük vettem el azt az időt, melyet jelen eredményes tevékenység végzésébe fojtottam.