

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

**A metanefrogén mesenchyma
és az uréter bimbó kölcsönhatása:
az összekötő tubulus
és Wilms tumor eredetének
új szemlélete**

Dr. Sárkány Beatrix

JEUN5M

**Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ
Urológiai Klinika**



Pécs, 2022

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Pajor László

Témavezető: Prof. Dr. Kovács Gyula

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK (ABC szerint)	5
1. BEVEZETÉS	7
1.1. A kérdés felvetése	7
1.2. A vese fejlődése	8
1.3. Az összekötő csatorna eredetének modellje egérben	12
1.4. Wilms tumor	14
1.4.1. A WT definíciója	15
1.4.2. A WT és társuló szindrómák	15
1.4.3. A WT és a nefrogén maradványok molekuláris patológiája	17
1.4.4. A WT hisztogenezise	18
2. CÉLKITŰZÉS	21
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	22
3.1. A vizsgálati anyag	22
3.2. Immunhisztológia	22
3.3. A disztális nefron különböző szakaszaiban előforduló sejtek aránya	24
4. EREDMÉNYEK	25
4.1. Összekötő tubulus (CNT) eredete	25
4.1.1. A POU3F3 és CALB1 kifejeződése humán főtális vesében	25

4.1.2. Humán főtális vesében az uréter bimbó sejtjei csatlakoznak az SSB disztális doménjéhez nem fordítva	26
4.1.3. A PC és IC sejtek és progenitor sejtjei főtális vesében	27
4.1.4. A principális és interkaláris sejtek kialakulására javasolt modell	28
4.1.5. Szegment specifikus gének kifejeződése felnőtt vesében	29
4.1.6. A PC és IC specifikus sejtek eloszlása a felnőtt vesetubulusokban	30
4.1.7. A CNT-ben előforduló sejtek immunhisztológiai vizsgálata	31
4.2. Wilms tumor	32
4.2.1. Az uréter bimbó (UB) markerek expressziója főtális vesében	32
4.2.2. Az uréter bimbó (UB) markerek expressziója nefrogén maradványokban	34
4.2.3. Az uréter bimbó (UB) markerek expressziója Wilms tumorban	36
4.2.4. Az uréter bimbó származékok differenciálódása Wilms tumorban	41
4.2.5. A WT eredetének új modellje	42
5. MEGBESZÉLÉS	44
5.1. Az összekötő tubulus eredete	44
5.1.1. Tér- és időbeli („spatiotemporal”) különbségek az MM és UB kölcsönhatásában egér és a humán vesében	45
5.1.2. A CNT az uréter bimbóvég sejtjeiből származik, humán főtális vesében az uréter bimbó sejtjei csatlakoznak az SSB disztális doménjéhez és nem fordítva	46
5.1.3. Az IC és a PC progenitor sejtek már a főtális vesében kifejezik a CA2 és AQP2 géneket	47
5.1.4. A PC és IC sejtek fejlődési útjának javasolt formája	48

5.1.5. Szegment specifikus gének vizsgálata felnőtt vesében megerősíti a CNT és CCD közös eredetét	49
5.1.6. A CNT és CD sejtek plaszticitása	50
5.2. A Wilms tumor eredete	51
5.2.1. Az uréter bimbó (UB) szerepe a főtális vese kialakulásában	51
5.2.2. Uréter bimbó (UB) származékok nefrogén maradványokban és Wilms tumorban	53
5.2.3. Az UB ampulla sejtei képesek differenciálódni a nefrogén maradványokban és Wilms tumorban	53
6. KÖVETKEZTETÉSEK	55
6.1. Az összekötő csatorna eredete	55
6.2. A Wilms tumor eredete	56
7. IRODALOMJEGYZÉK	57
8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	65
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	76

RÖVIDÍTÉSEK (ABC szerint)

AO	Aorta
AE1	Anion Exchanger 1
CCD	kortikális gyűjtőcsatorna
CD	gyűjtőcsatorna
CMM	Cap Metanephric Mesenchima
CNT	összekötő csatorna
CSB	Comma-Shaped Body
CTNNB1	Catenin (Cadherin-Associated Protein, B1)
DCT	disztális kanyarulatós csatorna
DMBT1	henzin, extracelluláris mátrix protein
FOXI1	Forkhead Transcription Factor
HGF	hepatocyta növekedési faktor
HNF	Hepatocystic Nuclear Factor
IL-NR	intralobaris nefrogén maradvány
IMCD	belső medulláris gyűjtőcsatorna
JGA	Juxtaglomerular Apparatus
MB	Metnapehric Blastema
MET	mesenchimális epitheliális tranzíció
MM	Metanephric Mesenchyme
NCC	Na ⁺ ,Cl ⁻ cotranszporter
ND	Nephric Duct
NR	nefrogén maradványok
OMCD	külső medulláris gyűjtőcsatorna

PC	Principal Cells
PL-NR	perilobaris nefrogén maradvány
PTA	Pretubularis Aggregate
Q-RT-PCR	Quantitativ-Reverse Transcription-Polymerase Chain
RCC	Renal Cell Carcinoma
Ret/GDNF	Rearranged During Transfection/Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor
RV	renális vezikulum/ renalis vesikel
SM	stromális mesenchima
SR	Surviving Rate
SSB	S-Shaped Body
UB	Ureteric Bud, uréter bimbó
WT	Wilms Tumor

1. BEVEZETÉS

1.1. A kérdés felvetése

A vese fejlődése a metanefrogén mesenchyma (MM) és az uréter bimbó (UB) jól szabályozott kétoldali kölcsönhatásán alapul (Little és McMahon, 2012). Az UB hatására a blasztémális sejtek kondenzációja majd strómális és epitheliális differenciálódása és az UB elágazódása révén kialakul a nefron, illetve a vese. A MM és UB kölcsönhatásával és az UB szerepével kapcsolatban két kérdés nem tisztázott. Az egyik a MM-ből származó nefron szakaszokat és UB-ból származó gyűjtőcsatornákat összekötő tubulus eredete. A másik kérdés a két különböző „sejtvonal” kölcsönhatásának zavarából keletkező gyermekkori tumor, a nephroblastoma pontos eredete. A tézis ezzel a két különböző, de fejlődéstanilag összefüggő kérdéssel foglalkozik, amit két fejezetben tárgyalunk.

A – Az összekötő tubulus eredete

Az irodalomban elfogadott, hogy a glomerulus, proximális tubulus, a Henle-kacs és distális tubulus a MM epitelizációja (mesenchymális epitheliális tranzíció, MET) és differenciálódása révén jön létre, míg a kivezető csatorna keletkezését az uréter bimbó (UB) szabályozott elágazódásából és differenciálódásából vezetik le. Eltérőek a vélemények a MM-ből képződött nefron szakasz és az UB-ból eredő kivezető csatorna közötti összekötő tubulus kialakulásáról. Ezzel kapcsolatos tudásunk nagyrészt a főtális egér vesék vizsgálatából származik. Egerekben jóval korábbi fejlődési szakaszban történik meg a MM-ből származó renalis vesikulum (RV) és UB fúziója (Georgas és mtsai, 2009). Immunhisztológiai vizsgálaton alapuló megfigyelések alapján az összekötő tubulust a MM-ből származtatják. Az emberi vese fejlődése azonban sok tekintetben különbözik az egér vese embrionális fejlődésétől és így az egér modell nem alkalmazható a humán vese fejlődésének megértésére (Little, 2015). Ezen kívül nehezen képzelhető el, hogy az összekötő tubulus, amely a kivezető csatorna működésében fontos szerepet játszó principális és interkaláris sejteket tartalmazza, a MM-ből származna. Nemcsak az összekötő tubulus kialakulása, hanem a principális és interkaláris sejtek differenciálódásával kapcsolatban is eltérnek a vélemények. Egyesek feltételezik, hogy az összekötő tubulus a kanyarulatos csatorna és az UB sejteinek összemosódásából származik.

B – A Wilms tumor eredete

Egy másik, még nem megfelelően tisztázott elmélet szintén a MM és UB nefrogenesisben játszott szerepével kapcsolatos. Bár a Wilms tumort (WT) az MM és UB kölcsönhatás zavarára vezetik vissza, a tumort kizárólag a MM eredetűnek vélik. Ezt tükrözi a WHO 2004-es definíciója: „Nephroblastoma is a malignant embryonal neoplasm derived from *nephrogenic blastemal cells*. It mimics developing kidney and often shows divergent pattern of differentiation” (Perlman és mtsai, 2004). Egy 2006-ban megjelent közleményben egyértelműen kimutatták, hogy WT-ban MM származékok mellett UB-szerű tubulusok is előfordulnak, amelyek főtális vese UB sejtjeihez hasonlóan ROBO1 pozitivitást mutatnak (Stupar és mtsai, 2007). Ez a megfigyelés arra utalt, hogy a WT kialakulásában keletkezésében nemcsak a MM, hanem az UB is résztvesz. Ennek ellenére a WHO nevében fellépő patológusok 2016-ban ismételten ragaszkodtak saját 2004-es definíciójukhoz (Argani és mtsai, 2016). A közelmúltban génexpressziós vizsgálattal számos átfedést találtak az embrionális vese és WT expressziós mintája között, és immunhisztokémiával trifázisos WT-ban UB-szerű képleket azonosítottak (Fukuzawa és mtsai, 2017).

A tézisben ennek a két nyitott kérdésnek a megválaszolását jelöltük meg célnak, amelyek az MM és UB kölcsönhatásból eredő normál vese-fejlődés során a CNT eredetéről, illetve az MM és UB kölcsönhatás zavarából keletkező gyermekkori tumor, a WT különböző megítéléséből adódnak. Mindkét kérdés és az eredmények jobb megértéséhez röviden összefoglaljuk a vese embrionális-főtális fejlődésének a témához kapcsolódó részét, valamint a WT általános és szövettani jellemzését.

1.2. A vese fejlődése

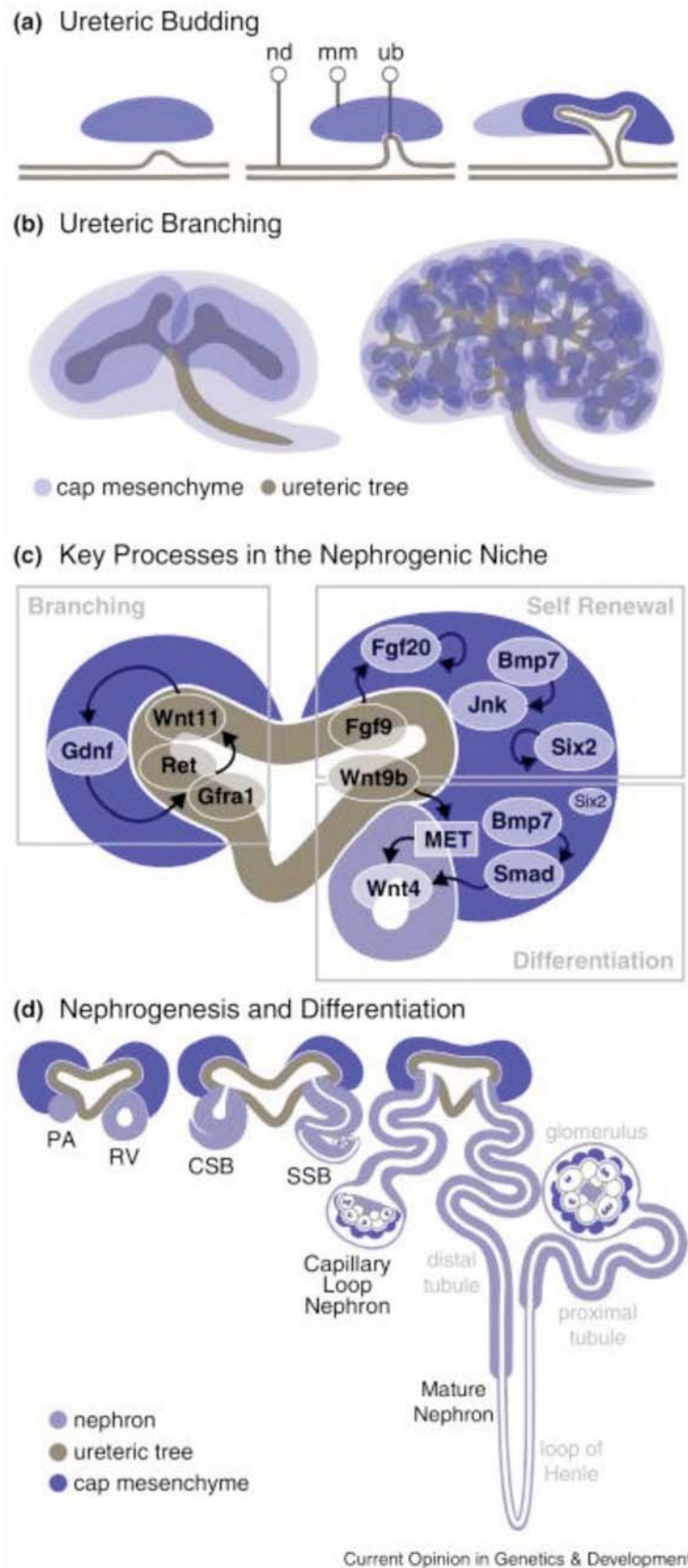
A gerinces állatok urogenitális rendszerének fejlődése a köztes (intermediate) mezodermából három fázisra bontható, úgymint pronefron, mezonefron és metanefron szakasz. Az emlősöknél az embrionális fejlődés során a pronefron fázist hamarosan követi a mezonefron, amelyik az embrionális életben végig fentmarad. A mezonefron két irányba tovább differenciálódik. A hímnemű egyedeknél megjelenik a reproduktív rendszer kezdeti fázisa is. A metanefron fázis idejét tekintve az emberi gesztáció ötödik hete körül kezdődik, amikor a Wolff csőből (nefrogén duktus, ND) egy epitheliális megvastagodás, azaz az uréter bimbó (ureteric bud UB) jön létre. Az UB meghosszabodva belenő a metanefrikus

mesenchymába (MM). Ez az UB – MM sejtszöveti kölcsönhatás vezet a vese összetett epitheliális és mesenchymális szerkezetének kialakulásához (Saxén, 1987; Costantini, 2006; Dressler, 2006; Michos, 2009). A nefron kialakulása után a különböző tubuláris szakaszok felépítésében mintegy 25 különböző működésű és szöveti megjelenésű sejt vesz részt (Little 2015).

A humán vese elég széles határok között változó számú 200 ezer és 2 millió közötti nefron egységből épül fel. (Puelles és mtsai, 2011). A glomerulosok mellett a tubulusok, az egyedi működéssel rendelkező proximális kanyarulatos és egyenes csatornák, a Henle-kacs, a juxtaglomeruláris sejtek (amelyek a renin-angiotenzin szintet szabályozzák), a disztális egyenes és kanyarulatos csatorna, valamint az összekötő és kivezető csatorna sejtei vesznek részt a vese tubuláris rendszerének felépítésében. A nefron egésze a kivezető csatorna kivételével az MM sejtekből alakul ki (Boyle és mtsai, 2008). Ez a fejlődési folyamatot egér modellben jól ismert (Little, 2015). Azonban az összekötő csatorna eredete emberi vesében mindmáig vita tárgyát képezi.

Az UB növekedésében és differenciálódásában jelentős szerepet játszik a GDNF/RET szignál átvitel. A GDNF fehérjét az MM sejteik termelik, a jelátvitelhez szükséges a nefrogén duktus sejteinek felszínén a GDNF receptor, a RET gén kifejeződése (Costantini and Shakya, 2006). Ez a kölcsönhatás vezet az elágazódó tubuláris szerkezet kialakulásához, ami a vizelet elvezetésére szolgál. A GDNF határozza meg és hosszirányú növekedésre serkenti az elágazódásokat. A *SLIT2* transzmembrán protein és a *ROBO1* receptor szabályozó rendszer gátolja az ektópiás uréter bimbó kialakulását (Grieshammer és mtsai, 2004). Később az UB és MM kölcsönhatása következtében létrejön a „cap metanephric mesenchyme” (CMM) és a laza szerkezetű stromális mesenchyma (SM).

A nefron jelentős része a CMM-ből fejlődik ki, amit őssejt rezervoárnak („stem cell niche” vagy „self-renewing nephron progenitor”) tekinthetünk (Kobayashi és mtsai, 2008). A CMM-ből kétirányú fejlődés indul meg, egyik a pluripotens sejtek szaporodására, a másik az epitheliális sejtek differenciálódása (Carroll és mtsai, 2005; Kispert és mtsai, 1998). Az „őssejt állapot” fenntartását az *SIX2* gén expresszió szabályozza (Kobayashi és mtsai, 2008). Az SM sejteiből alakul ki a vese strómája, a fibroblasztok valamint az endotheliális sejtek (1. ábra).



1.ábra

Az emlősök veséjének morfogenezise négy induktív szakaszra tagolódik.

1. az uréter bimbó megjelenése (ureter budding)
2. az uréter elágazódások képződése (ureteric branching)
3. nefrogén „fészek” létrejötte (nefrogenic Niche)
4. nefrogenesis és differenciálódás

Egerekben a PTA (pretubular aggregate) sejtjeiből alakul ki a renális vezikulum (RV), amely további differenciálódását tekintve egy disztális és egy proximális doménre bontható. A disztális régió kialakulását az *Lhx1* és *Pou3f3* gének, a proximális domént a *Wtl* gén szabályozza. A *Notch2* expressziója szabályozza a podociták és a proximális tubulusok kialakulását (Fujimura és mtsai, 2010; Kopan és Turner, 1996). A Notch szignál nélkül a PTA-ból ugyan kialakul RV, de nem alakul ki az S shaped body (SSB), és így hiányzik a proximális tubulus és a Bowman-tok.

A Bowman-tok *CD24* és *CD133* pozitív sejtjei megőrzik pluripotenciájuk egy részét, azaz képesek podocitaként való regenerációra.

A RV proliferációja a comma-shaped body (CSB), majd pedig az SSB kialakulásához vezet (1. ábra). Ebben a fázisban újabb domének működnek, a *Pou3f3* az SSB disztális és középső régiójában fejeződik ki, és részt vesz a Henle-kacs kialakításában. A nefron szegmentálódása során a mediális SSB sejtek proliferációjából az *Lgr5* gén hatására alakul ki a Henle-kacs (Georgas és mtsai, 2009). Kétélűeknél a Henle-kacs differenciálódásához az *IRX3* gén expressziójára is szükség van (Reggiani és mtsai, 2007). A BRN1 (*Pou3f3*) az SSB disztális és középső régiójában expresszionálódik, és ennek is jelentős szerepe van a Henle-kacs kifejlődésében; és a gén hiánya egerekben a Henle-kacs számának csökkenését és a sejtek apoptózisát eredményezi (Nakai és mtsai 2003).

A vese gyűjtőcsatornái az ureterogén epithelből fejlődnek ki. A gyűjtőcsatorna különböző működését, mint a víz reabszorpciót, sav-bázis egyensúly fenntartását az adott működésnek megfelelő gének expressziója szabályozza (Al Awqati és Gao, 2011). A gyűjtőcsatorna disztális régiójának differenciálódása során vesében az *AQP2* pozitív víz reabszorbáló PC sejtek valamint uroplakin pozitív víz impermeábilis urothel sejtek jönnek létre, amelyek a vesemedencét és az urétert bélelik. A PC sejteket az *AQP2* gén kifejeződése azonosítja. Részletes génexpressziós vizsgálat alapján feltételezik, hogy a *FOXI1* gén hatására a bipoláris interkaláris (IC) sejtekből alpha és béta típusú IC sejtek alakulnak ki (Blomquist és mtsai. 2004). Mások úgy vélik, hogy a PC és a b-IC sejtek NCC gént kifejező prekurzor sejtekből differenciálódhatnak (Trepiccione és mtsai, 2016.).

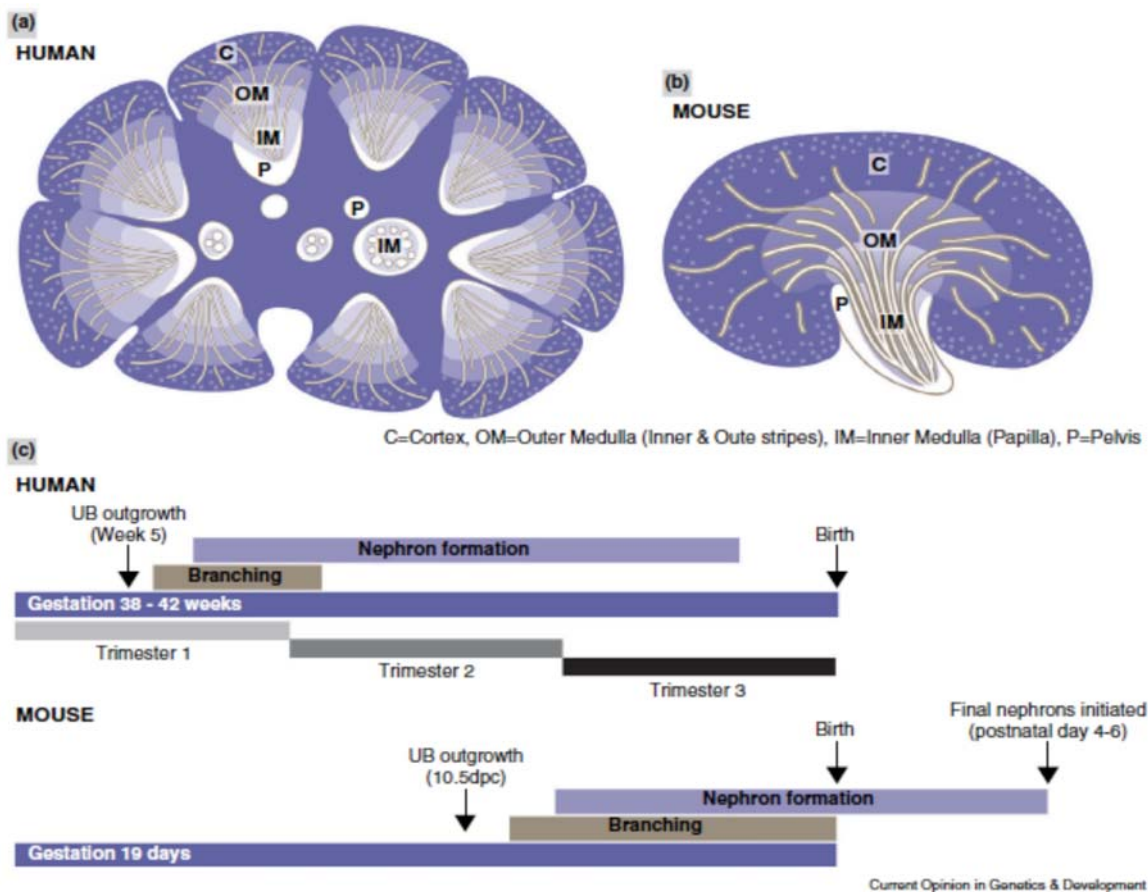
A disztális nefron bonyolult fejlődését és felépítését tükrözi a különböző sejtek mozaik marker mintázata és ezeknek a vese működéséhez kapcsolódó dinamikája (Al Awqati, 2013). Az *AQP2* kifejeződése kizárólag az PC sejtekben figyelhető meg, míg az α -IC sejtek a Cl⁻/HCO₃⁻-exchanger Solute Carrier Family 4 Member 1 (SLC4A1) bazolaterális

expresszióját, míg a β -IC sejtek a Cl-/HCO₃- exchanger Solute Carrier Family 26 Member 4 (SLC26A4) apikális kifejeződését mutatják. A non α -non β IC sejteket az apikális pendrin és a vacuolár típusú H⁺ (vH⁺) marker jellemzi. Ez a sejt felépítés az alapja a disztális tubulus bonyolult szekréciós/reabszorpciós működésének.

A stromális mesenchyma sejtekben (SM) a BF2 jelátviteli gén fejeződik ki. A stroma sejtjeinek jelentős befolyása van a kivezető csatorna kialakulásában. Még további gének, mint a *RARA*, *RARB2* is befolyásolják az UB növekedését és elágazódását. Az embrionális fázisban a stromális mesenchimális sejtek *HGF* gént fejeznek ki, míg az UB sejtek tirozin-kináz MET receptor pozitívak. A *MET/HGF* parakrin szabályozásnak jelentős szerepe van a mesenchyma/epithelium átalakulásban (MET) és a polarizált tubuláris sejtek kialakulásában (Santos és mtsai, 1994; Little, 2015). A két gén egyensúlyának eltolódása jelentős szerepet játszik az embrionális vesesejtek differenciálódási zavarában, nefrogén maradványok (NR) és később WT kialakulásában (Alami és mtsai, 2002; Vuononvirta és mtsai, 2009). A dolgozat témája szempontjából fontos adat, hogy a WT-k 54%-ban, illetve az NR-k 22%-ában fokozott *MET* receptor expresszió mutatható ki, utalva a prekursor lézió és tumor közötti okozati összefüggésre (Alami és mtsai, 2002; Vuononvirta és mtsai, 2009). *HNF1B* (vagy *TCF2*) hatással van az uréter bimbó bifurkációjára, a nefron kialakulására és differenciálódására. A *HNF1B* inaktiválása abnormál nefron kialakulását eredményezi, RV ugyan kialakul, de nem fejlődik ki a normál SSB.

1.3. Az összekötő csatorna eredetének modellje egérben

Szövetteni megfigyelések számos évtizeddel ezelőtt felhívták a figyelmet egy ún. Verbindungsstück léteire a distális kanyarulat csatornák (DCT) és a kortikális gyűjtőcsatornák (CCD) között, és kimutatták a biokémiai és fiziológiai különbséget a két nefron szakasz között (Kaissling és Kriz, 1979; Morel és mtsai, 1976; Imai, 1979). A CNT eredetéről a legtöbb adat a főtális és felnőtt egerek tanulmányozásából származik (Georgas és mtsai, 2009; Mugford és mtsai, 2009; Brunskill és mtsai, 2014). Egérben kimutatták a homeobox jelátviteli gén *Pou3f3* kifejeződését a renális vesikel (RV) distális doménjében, ami arra utalt, hogy egérben a CNT az MM-ből származó RV disztális domainjéből keletkezik (Bard és mtsai 2001; Georgas és mtsai, 2009). A ureter tip marker Calbindin 1 (*Calb1*) hiánya mind a RV distalis doménjében, mind az összekötő szegment sejtjeiben arra utalt, hogy az összekötő szegment a distal RV-ből származik (Georgas és mtsai., 2008).



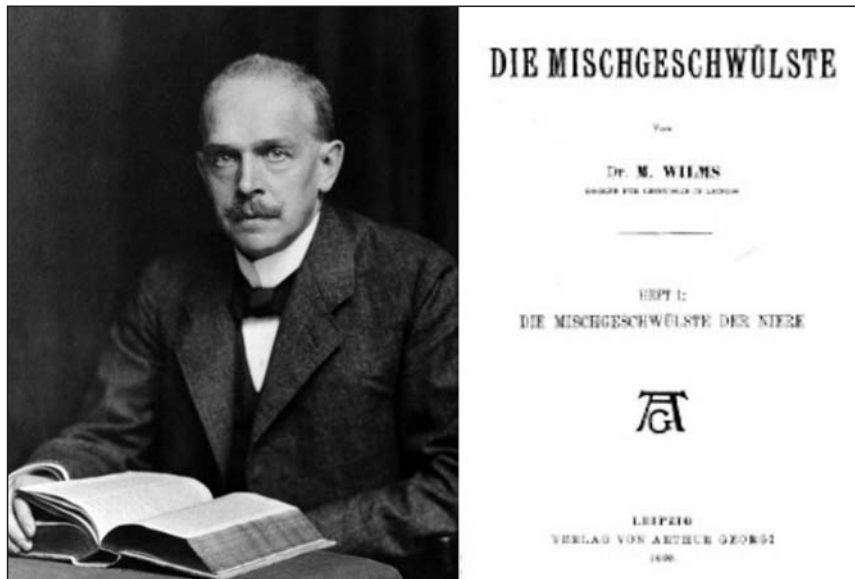
2. ábra

A humán és az egér modell vese ontogenezis időbeli dinamikájára vonatkozó adatok (Little, 2015.)

Azonban jelentős különbség van az egér- és emberi vese fejlődésében (Lindström és mtsai, 2018). A legfontosabb különbségeket a 2. ábra mutatja. Emberben az uréter bimbó elágazódása a gesztáció 14–15. hetében és a nefron kialakulása a 36. héten befejeződik. Ugyanakkor egérben az uréter elágazódása jóval később kezdődik, és a nefron kialakulása még posztnatálisan is folytatódik. A 2. ábra összefoglalja az UB elágazódásának és a nefron differenciálódásának időbeni lefolyását.

Humán vesében a nefron működési egységeit képező szegmenteit sejtjei, mint a podociták, proximális és distális tubulusok, a Henle-kacs, azonos szövettani megjelenésű és működésű sejtjeiből állnak. Azonban gyűjtő csatorna, a többi nefron szakasztól eltérően nagyfokú szövettani és működési heterogenitást mutat (Al Awqati, 2013). A distális nefron mozaik szerkezetét differenciálódni képes prekursor sejtjei, PC sejtjei, és α - és β -IC sejtjei képezik. Ezek a sejtípusok kizárólag a CNT-ben (összekötő csatorna) és CD (gyűjtő csatorna) sejtjeiben fordulnak elő, semmilyen más nefron szakaszban nem láthatók. Ez a tény a CNT és CD közös eredetére utal.

1.4. Wilms Tumor



3. ábra

In memoriam of Max Wilms (1867–1918)

1899-ben Lipszében 7 új esetet közölt, ennek alapján nevezték el róla ezt a gyermekkori vesetumort. 1918-ban halt meg différiában, amit egy általa operált francia betegétől kapott el.

Cohnheim 1882-ben feltételezte, hogy bizonyos tumorok kialakulásának hátterében az embrionális szövetek differenciálódási zavara áll: „Die Hauptsache ist und bleibt immer, dass es ein Fehler, eine Unregelmässigkeit der embryonalen Anlage ist, in der die eigentliche Ursache der späteren Geschwulst gesucht werden muss. Aber was wir als angeboren verlangen, ist ja nicht die Geschwulst, sondern lediglich die Anlage dazu, d.h. nach der von uns proponirten Formulirung die Existenz desjenigen über das physiologische Maass hinaus producirten Zellenquantum, aus dem eine Geschwulst sich entwickeln kann” (Cohnheim, 1882). Azaz embrionális sejtek, amelyek nem vesznek részt a normál szövetek képzésében, születés után tumor kialakulásához vezethetnek. Cohnheim nem azt mondta, hogy az újszülöttek tumorra jönnek a világra, hanem a normál szövetek kialakulásához fel nem használt embrionális sejtekkel (*Anlage*), amelyekből később tumor alakulhat ki.

A normál vese kialakulásában számos jelátviteli rendszer vesz részt. A gének időhöz és helyhez kötött kifejeződése, a különböző fehérjék szöveti gradiensének változása szabályozza a normál, működő nefron kialakulását (Little, 2015; Costantini 2006; Dressler, 2006; Michos 2009). Figyelembe véve a sejtek proliferációját és differenciálódását sza-

bályozó jelátviteli rendszerek finoman összehangolt működését, nem meglepetés, hogy bármelyik gén időbeni és térbeni kifejeződésének, szöveti grádiensének megváltozása felboríthatja az egyensúlyt és vagy a sejtek proliferációját támogatja vagy gátolja a differenciálódást, vagy mindkettőt. Ennek egyik következménye lehet a vese veleszületett rendellenessége, ún. CAKUT (congenital anomalies of the kidney and urinary tract) (Lu és mtsai, 2007; Schedl, 2007; Vize és mtsai, 2002; Vivante és mtsai, 2014; Woolf és Winyard, 2002).

A vese fejlődési zavarának másik következménye a vese gyermekkori tumorok, mint a Wilms tumor kialakulása (Rivera és Haber, 2005, Li és mtsai, 2002). A vese leggyakoribb embrionális eredetű tumora, a Wilms tumor az egyik legjobb modell, amely igazolja Cohnheim elméletét. Az embrionális maradvány sejtek és sejtcsoportok, amelyek nem használódtak fel a normál nefronok kialakításában, az ún. nefrogén maradványok és a Wilms tumor közötti összefüggés jól dokumentált és az irodalomban már régóta egyértelműen elfogadott tény (Bove és McAdams 1976, Beckwith és mtsai, 1990; Beckwith, 1998).

1.4.1. A WT definíciója

Az irodalomban számos tanulmány megerősítette, hogy a WT az embrionális blasztémális sejtmardványokból indul ki. Ennek figyelembe vételével a WHO 2004-ben a következőképpen határozta meg a WT-t: „Nephroblastoma is a malignant embryonal neoplasm derived from *nephrogenic blastemal cells*” (Perlman és mtsai, 2004). Immunhisztológiai vizsgálattal egy rövid közleményben egyértelműen kimutatták, hogy a WT-ban UB-szerű tubulusok is előfordulnak (Stupar és mtsai, 2007). Ennek ellenére, a WHO 2016-ban megerősítette a 2004-ben kiadott meghatározást (Argani és mtsai, 2016). Bár gyakorlatilag minden patológus megegyezik abban, hogy a nefrogén maradványok és a WT kialakulása az UB és a MM kölcsönhatásának zavarán alapul, mégis megmaradtak a WT blasztémális eredetének elve mellett. Ez nem véletlen, hiszen a WHO meghatározást író patológusok és onkológusok kötve érzik magukat az általuk korábban leírt dogmához.

1.4.2. A WT és társuló szindrómák

A Wilms tumor leggyakoribb gyermekkori tumor, 8000 gyermekből 1 esetben figyelték meg. Az esetek 98%-a 10 éves kor alatt kórismézett, a gyerekek átlag életkora 3–4 év között van. A Wilms tumort ritkán felnőtt korban is megfigyelték (Davidoff 2012). Az 1971 óta működő

Magyar Gyermekek Tumor Regiszter adatai szerint Magyarországon évente körülbelül 16–18 új beteg kerül diagnosztizálásra, jellemzően kétéves kor alatt (Schuler, 1971). A Tumor Regiszter adatai megfelelnek a nemzetközi adatoknak. Az American Cancer Society összefoglaló elemzése szerint nem találtak felelős környezeti tényezőt sem az anyával, sem pedig a gyermekkel kapcsolatban. Az Egyesült Államokban a Wilms tumor valamivel gyakoribb az afroamerikai populációban, és valamivel gyakrabban fordul elő leánygyermekekben. A családi ismétlődés esetében magasabb a kétoldali WT előfordulása.

A vese fejlődése során jól szabályozott reziprok folyamatok zavara széles körű következményekkel járhat (Vize és mtsai, 2002). Ezek magukba foglalják a kongenitális vesebetegségeket, gyermekkori daganatok keletkezését és későbbi életkorban kardiovaszkuláris megbetegedéseket is (Vize és mtsai, 2002; Schedl, 2007). A vese fejlődését megzavaró minden körülmény káros befolyással lehet a normál, működő szerv kialakulására. A vese veleszületett fejlődési zavarát összefoglalóan CAKUT (congenital anomalies of the kidney and urinary tract) állapotnak nevezi az irodalom. A CAKUT a „háttérben” lévő embrionális differenciálódás zavarának következményeit foglalja össze, amelyek a vese és vizeletelvezető rendszer klinikai vonatkozását hangsúlyozza. A normál vese kifejlődésének fontosságát hangsúlyozza az a megfigyelés, hogy a gyerekkori vesebetegségek 40%-ában valamilyen fejlődési zavar is előfordul (Vivante és mtsai, 2014). Ehhez hasonlóan a különböző CAKUT szindrómákkal kapcsolatban gyakran fordul elő WT is (Woolf és Winyard, 2002). Az 1. táblázatban összefoglaltuk a legfontosabb CAKUT szindrómákat, és az ezekre jellemző klinikai tüneteket, illetve az ismert genetikai hátterüket. Ezekhez a szindrómákhoz gyakran járul a WT kialakulása.

1. táblázat. A WT-hoz kapcsolódó szindrómák

Szindróma	Komponensei, jellemzői
WAGR szindróma	WT, Aniridia, Genitourinárius traktus abnormalitása, mentális retardáció
Denys-Drash szindróma	WT1 gén mutáció, vesefunkció zavar, reproduktív szervek fejlődési zavara, ezen betegeknél mérlegelendő a korai nefrektómia a WT kifejlődésének megelőzésére
Fresier szindróma	A DDS-hez hasonló, de a vesefunkció rendszerint megtartott, a reproduktív szervekben viszont gyakoribb a kísérő második tumor előfordulása
Beckwith-Wiedemann szindróma	Átlagot meghaladó testsúly, nagyobb belsőszerv-méret, macroglossia, hemihipertrófia, a WT frekvencia ebben 5% körüli. Feltételezhető genetikai háttér a 11-es kromoszómán, a WT2 gén érintettsége.

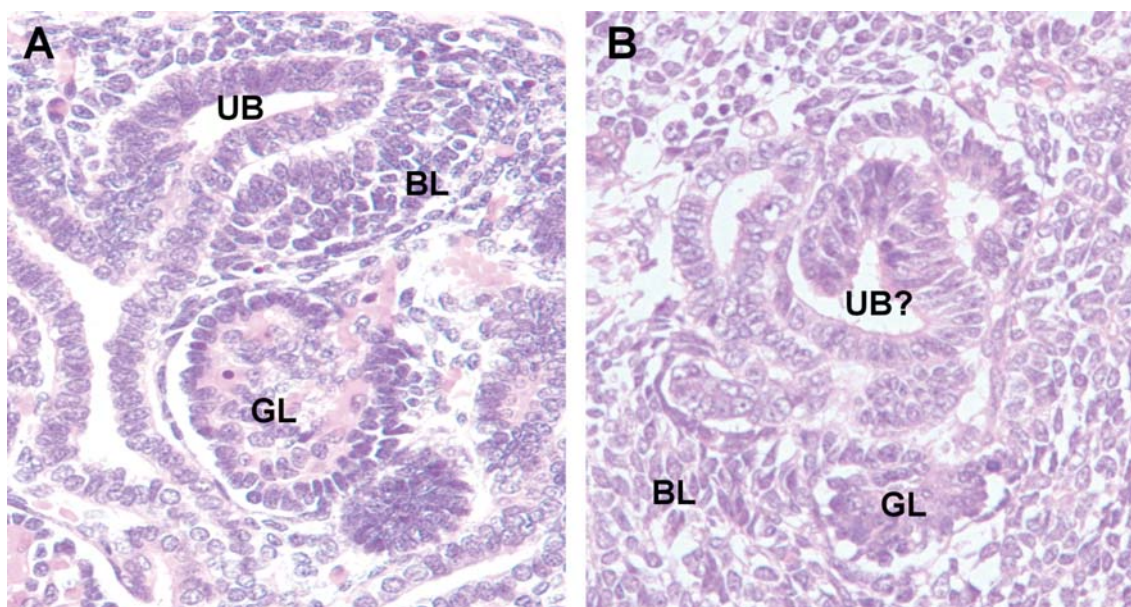
1.4.3. A WT és nefrogén maradványok molekuláris patológiája

A WT1 gén szükséges a vese és a gonádok normál fejlődéséhez, születés után már csak a glomerulusukban fejeződik ki. WT1 egy transzkripciós faktor amely speciálisan kötődik adott DNS régióhoz, így befolyásolva a differenciálódást és az apoptózist. WT1 gén mutációja az apoptózis hatás csökkenéséhez vezet, ennek következménye a kontrollálatlan sejtosztódás és a tumorképződés.

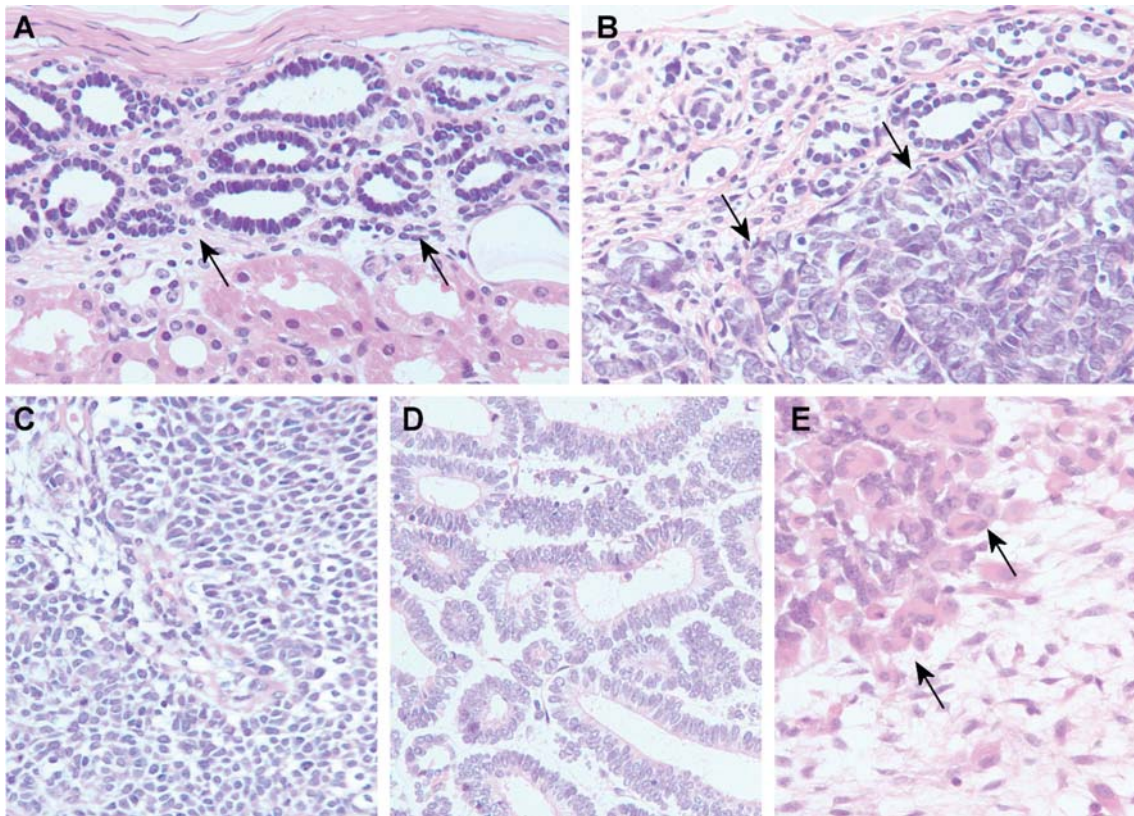
A WT differenciálatlan, vagy csak részben differenciálódott embrionális maradványokból fejlődik ki. A vesén belüli elhelyezkedésük szerint megkülönböztetünk perilobuláris (perilobular nephrogenic rest – PLNR) is intralobuláris (intralobular nephrogenic rest – ILNR) nefrogén maradványokat (Bove és McAdams 1976, Beckwith és mtsai, 1990; Beckwith, 1998). A WT1 mutációja az intralobuláris nephrogen rest-et (ILNR) érinti, mely eltér a CTNNB1 (beta-catenin) mutációtól, és ennek megfelelően eltérő hisztológiai képet is mutat (Fukuzawa és mtsai, 2004). Azokra a tumorokra, amelyek a PLNR sejtjeiből származnak, jellemző az IGF2 gén LOI (loss of imprinting). Azokban a Wilms tumoros gyerekekben, akik túlnövekedést mutatnak (Beckwith-Wiedeman szindróma) szimultán ILNR és PLNR is észlelhető, és ezek a tumorok IGF2-LOI-t mutatnak. Az IGF2-LOI típusú tumorok két formát mutatnak. Az első blastemás predominációjú hisztológiával és PLNR-rel jár, a másik pedig elsősorban miogén strómális prodominanciát és ennek megfelelően fokozott mesenchymás eredetű gén expressziót mutat és ILNR-el társul (Fukuzawa és mtsai, 2008). Az ILNR-el társult IGF2 LOI tumorok WNT pathway aktivációját mutatják: a b-catenin targetek expressziójával (MMP2, RARG, DKK1) és WNT antagonistá génekkel (DKKI, WIFI, SFRP4). Ezen tumorok egy része CTNNB1 mutációt is mutat, hasonlóan a WT1 mutáns tumorokhoz. A WT1 mutáció hiánya az IGF2-LOI tumorokban arra utal, hogy a CTNNB1 mutáció az ILNR-t érinti, függetlenül attól, hogy van-e WT1 mutáció, vagy nincs. Mindkét IGF2 LOI tumorforma mögött valószínűleg közös predisponáló epigenetikai hiba lehet. (Fukuzawa és mtsai, 2008)

1.4.4. A WT hisztogenezise

A Wilms tumor rekapitulálja a fejlődő, differenciálódó vese kortikális növekedési területének összetett szövettani megjelenését (4. ábra). A nefrogén maradványok (nephrogenic rest, NR) és WT kialakulásában feltételezett patológiás fázis tulajdonképpen az, hogy a MM nem válaszol megfelelően az UB szignáljára, vagy nem a megfelelő módon differenciálódik és struktúráldik, így az egyébként a terhesség 36. hete után már teljesen kialakult normál vese szerkezetén belül visszamaradnak olyan sejtcsoportok, amelyek megfelelnek a történelmi elnevezés szerinti „Anlage” állapotnak (Cohnheim, 1882). Bizonyos feltételektől függően az UBT körüli metanephric blastema a megfelelő szignál kimaradása miatt nem vagy csak részben differenciálódik (Rivera és Haber, 2005). Ezek a „maradványok” néha makroszkopikusan is láthatók a vesetok alatt, nagyobb részüket azonban csak mikroszkópos vizsgálattal lehet kimutatni. Ezek később gyakran „degenerálódnak”, visszajelődnek és csak kis fibrotikus gócként maradnak meg a vese tokja alatt (Bove és McAdams 1976, Beckwith és mtsai, 1990; Beckwith, 1998).



Wilms tumor rekapitulálja az embryonális vese fejlődési szakaszait. A: 12 terhességi hétből származó főtális vese nefrogén zóna szövettani képe. Az uréter bimbó (UBT) kapcsolatba kerül a CMM blastémális sejtekkel. Egy még differenciálatlan glomerulus (GL). B: részlet egy Wilms tumorból. Tubuláris epithéliális struktúra, amely a főtális vese UB vagy SSB sejtjeire hasonlít (UB? –SSB?), amely tumoros blastémális sejtekbe van beágyazva (BL). A tubulusok alatt egy abortív glomerulus (GL).



5. ábra

Nefrogén maradványok és trifázisú Wilms tumor szövettani képe

A: a vese tokja alatt elhelyezkedő PLNR a jellemző éretlen sejtekkel bélelt tubulusokkal. **B:** hasonló PLNR, azonban a tubuláris struktúrák már regresszív, fibrotikus átlakulást mutatnak. Közvetlen a PLNR mellett egy meglehetősen hyperplastikus nefrogén maradvány (HPNR). **C–D:** trifázisú WT-ra jellemző szövettani képek. **C:** a WT egyik részében a vaszkuláris stróma mellett kizárólag blasztémális sejtek láthatók. **D:** a tumor más területén differenciálatlan tubulusok figyelhetők meg. **E:** a WT strómális részében a fellazult fibroblastok mellett differenciálatlan sima izom sejtek (myoblasztok) láthatók.

WT-hoz leggyakrabban a vesetok alatt elhelyezkedő és legtöbbször tubulárisan rendeződött epiteliális sejtstruktúrát mutató perilobuláris NR (PLNR) társul (5. ábra A és B). NR kisebb számban előfordul a vese lobulusokban is, amelyek intralobuláris NR néven ismertek (ILNR). Az ILNR a vesefejlődés korábbi szakaszában bekövetkezett zavara miatt alakul ki, amikor a MM sejtjei képesek epiteliális és mesenchimális sejtekké differenciálódni, és ezért az ILNR mind blasztémális, strómális és epiteliális képleteket tartalmaz. A PLNR a vese differenciálódásának későbbi fázisában bekövetkezett zavarra vezethető vissza, amikor a MM sejtjei már elköteleződtek az epiteliális differenciálódásra. A PLNR és ILNR valamint a WT közötti összefüggésről az irodalomban már az elmúlt 30 évben számos közlemény jelent meg (Bove és McAdams 1976, Beckwith és mtsai, 1990; Beckwith, 1993; Beckwith, 1998; Rivera és Haber, 2005; Davidoff, 2012; Fukuzawa és mtsai, 2017).

Wilms tumor a legtöbb esetben az úgynevezett „trifázisos” hisztológiai képet mutat, amelyet sokszor szerpentinszerűen szervezett blastémás sejtfészkek, és egyidejűleg tumoros epitheliális tubulusok és különböző strómális elemek jellemeznek (5. ábra C–E). Egyes esetekben a Wilms tumoron belül a blastémális, az epitheliális vagy akár strómális elemek dominálhatnak (Vujanic és mtsai, 2010). A különböző differenciáltságú epitheliális sejtek mellett glomerulusszerű képleteket, fibroblasztra emlékeztető strómális sejteket, valamint sima és harántcsíkolt izomra jellemző sejteket figyelhetünk meg (5. ábra E). A blastémális, illetve az epitheliális és strómális sejtek jelenléte a trifázisú WT-ban arra utal, hogy a WT alapvetően pluripotens sejtekből indul ki. Az epitheliális sejtek eredetét a blastémális sejtek MET során nem teljesen befejezett tubuláris differenciálódás különböző fázisainak, mint a RV, CSB, SSB zavarára vezetik vissza.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. A CNT eredetének megállapítására először számos, különböző gesztációs hétből származó főtális vese hematoxinin és eosin festett szövettani metszeteit néztük át. A szövettani vizsgálat során a figyelmünket az uréter bimbó és az SSB közötti kapcsolatok felismerésére összpontosítottuk.

2. Miután az egyszerű szövettani megfigyeléssel valószínűsítettük a CNT kialakulását az UBT-ből, a következő lépésben immunhisztológiai vizsgálatok segítségével kívántuk tisztázni az UBT és kivezető csatornák sejtes összetételét főtális és felnőtt vesékben. Ettől a vizsgálattól azt vártuk el, hogy amennyiben a CNT és a CD azonos jellemző sejtstruktúrát mutat, azaz PC és IC sejtekből áll, akkor ez valószínűsíti a CNT eredetét az UBT-ből.

3. Előző vizsgálatok felvetették annak a lehetőségét, hogy a WT nemcsak a blastémális sejtekből indul ki, hanem valószínűleg az UBT sejtjei is részt vesznek a WT kifejlődésében. Ennek megerősítésére terveztük, hogy megvizsgáljuk az UBT kialakulásában szerepet játszó gének (KRT17, RET, ROBO1 és SLIT2) kifejeződését főtális vesében, NR-ben és WT-ban.

4. A vese fejlődése során a kivezető és összekötő csatorna (amelyek a vese működéséhez fontos PC és IC sejteket tartalmaznak) az UBT-ből fejlődik ki. Megvizsgáltuk, hogy az UBT sejtjei képesek-e differenciálódni tumoros környezetben, azaz NR-ben és WT-ban. Ezt a kérdést a még nem differenciált IC sejtek jelenlétét igazoló (CA2, ATP6V1B1 és ATP6V0D2), valamint a működő α - és β - IC sejtekre jellemző markerek (SLC4A1 és SLC26A4), és a PC sejteket azonosító marker (AQP2) immunhisztológiai azonosításával terveztük megválaszolni.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Vizsgálati anyag

Mindkét téma kidolgozásához főtális és adult vesék szövettani metszeteit használtuk fel. A főtális veséket 10 hetes (2), 12 hetes (2), 15 hetes (2), 17 hetes (5) és 21 hetes (5) terhességből származó boncolási anyagból választottuk ki. A felnőtt veséket a vese tumorok eltávolítása és szövettani diagnózisa után fennmaradó normál veserészletek metszeteiben vizsgáltuk meg. Ezen anyagok tudományos célokra való felhasználását a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottsága engedélyezte (8466 – PTE 2020). A WT metszeteket a Wilms Tumor Regiszterből (Szegedi Tudományegyetem, Patológiai Intézet) választottuk ki. Az ebben a munkában felhasznált WT minden esetben a sebészi eltávolítás előtt az UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 protocol szerint citosztatikus kezelésben részesült (Vujanic és mtsai, 2018). A magyar Wilms Tumor Regiszterből kiválasztottunk 12 reprezentatív tumort immunhisztológiai vizsgálatra, amelyekben korábbi tapasztalatunkra alapozva feltételeztük az UB-ra emlékeztető tubuláris képletek jelenlétét. A vizsgálati anyagba beválasztottunk 8 „mixed” típusú WT-t, amelyekben a kezelés ellenére még jelentős tubuláris struktúrák maradtak meg. Emellett még 2 regresszív típusú WT, egy kizárólag blasztémás sejteket tartalmazó, valamint egy fókális anapláziát mutató WT került vizsgálatra. A WT prekursor léziókban előforduló UB származékok megítélésére 6 PLNR és 3 ILNR, valamint egy 6 mm átmérőjű hyperplastikus NR került vizsgálatra. A WT-ok és prekursor léziók immunhisztológiai vizsgálatát az Ethics Commission of the Hungarian Medical Research Council (IV/8956-3/2020/EKU) engedélyezte.

3.2. Immunhisztológia

4%-os formaldehiddel fixált paraffinba ágyazott szövetekből 4 µm vastag metszeteket használtunk fel immunhisztokémiai vizsgálatra. A metszeteket a paraffin leolvasztására xilolban tartottuk három órán keresztül 42°C-os termosztátban. A fedő paraffinréteg eltávolítása után kétszer 5 percig tiszta xilolban, kétszer 5 percig 100% isopropyl alkoholban tartottuk, majd 96% és 70%-os alkoholban kétszer 5–5 percig rehidráltuk. Ezután a metszetekről desztillált vízzel leöblítettük a megmaradt alkoholt, majd Envision FLEX Wash Bufferben (DAKO, Glostrup, Denmark) kétszer 5 percig tartottuk. Az antigén feltárása

citrát pufferben (pH 6.0), illetve EnVision FLEX Target Retrieval Solution, high pH (DAKO) oldatban történt a 2100-as Retrieverben (Pick-Cell Laboratories, Amsterdam, Hollandia). Feltárás után a lemezeket szobahőmérsékletig lehűtöttük, majd kétszer az Envision FLEX Wash Bufferben leöblítettük. Az endogén peroxidáz blokkolására a metszeteket lefedtük az Envision FLEX Peroxydase Blocking Reagens-sel (DAKO) 10 percig, majd az Envision FLEX Wash Bufferben kétszer öblítettük.

Ezután a metszeteket befedtük megfelelő hígítású primér antitestekkel és nedves kamrában 60 percig inkubáltuk (2. táblázat). Primér antitest után a lemezeket kétszer leöblítettük az Envision FLEX Wash Bufferrel, majd lefedtük szekunder antitesttel (EnVision FLEX horse-radish-peroxydase conjugated secondary antibody, DAKO) és 20 percig nedves kamrában tartottuk. Ismételt öblítés után az immunreakciót DAB (3,3'-

2. táblázat – A munka során felhasznált antitestek fontosabb adatai

Identi- fication	Antibody	Reference	Species	Clona	Dilution	Source
PCT	Anti-TMEM27	Anti-TMEM27- EPR17748	Rabbit	Poly	1:1000	Abcam
LOH,DCT	Anti-POU3F3	Anti-POU3F3-18999- 1-AP	Rabbit	Poly	1:200	Proteintech
DCT	Anti-SCEL	Anti-SCEL-HPA040154	Rabbit	Poly	1:250	Sigma Aldrich
PC	Anti-AQP2	Anti-AQP2-PA5-38004	Rabbit	Poly	1:500	Thermo Fisher
PC	Anti-CALB1	Anti-CALB1- HPA023099	Rabbit	Poly	1:5000	Sigma Aldrich
IC	Anti-CA2	Anti-CA2-PA5-28267	Rabbit	Poly	1:1000	Invitrogen
β -IC	Anti-SLC26A4	Anti-SLC26A4-NBP1- 60106	Rabbit	Poly	1:20 ⁰	Novus Biologicals
α -IC	Anti-SLC4A1	Anti-SLC4A1- HPA015584	Rabbit	Poly	1:200	Sigma Aldrich
α -IC	Anti-ATP6 V1B1	Anti-ATP6V1B1- EPR16401	Rabbit	Mono	1:2000	Abcam
α -IC	Anti-ATP6 V0D2	Anti-ATP6V0D2- NDBP2-31600	Rabbit	Poly	1:100	Novus Biologicals
α -IC	Anti-TMEM213	Anti-TMEM213-PA5- 62905	Rabbit	Poly	1:100	Invitrogen
RET	Anti-RET	Anti-RET-HPA008356	Rabbit	Poly	1:200	Atlas Antibodies
SLIT2	Anti-SLIT2	Anti-SLIT2-PA5-31133	Rabbit	Poly	1:500	Thermo Fischer
ROBO1	Anti-ROBO1	Anti-ROBO1-PA5-34822	Rabbit	Poly	1:500	Thermo Fischer
KRT17	Anti-KRT1	Anti-KRT17-HPA 000452	Rabbit	Poly	1:500	Sigma Aldrich

PCT- proximális kanyarulatós csatorna, LOH-Henle-kacs, MD-macula densa, DCT-disztális kanyarulatós csatorna, PC- principális sejtek, IC-interkaláris sejtek

Diaminobenzidin, DAKO) szubsztráttal mikroszkópos ellenőrzés mellett előhívtuk, majd a reakciót desztillált vízzel gátoltuk. A magfestést Mayer's haematoxylin (Lillie's modification, DAKO) végeztük és a magfestést körülbelül 10 másodpercig ammonium-hydroxide oldatban kékítettük, majd Glycergel-lel (DAKO) lefedtük. A fotódokumentációt egy Leitz DMRBE mikroszkóppal, HC PLAN APO 20x0.70 objektívvel és ProgRes C14 kamerával készítettük.

3.3. A distális nefron különböző szakaszaiban előforduló sejtek aránya

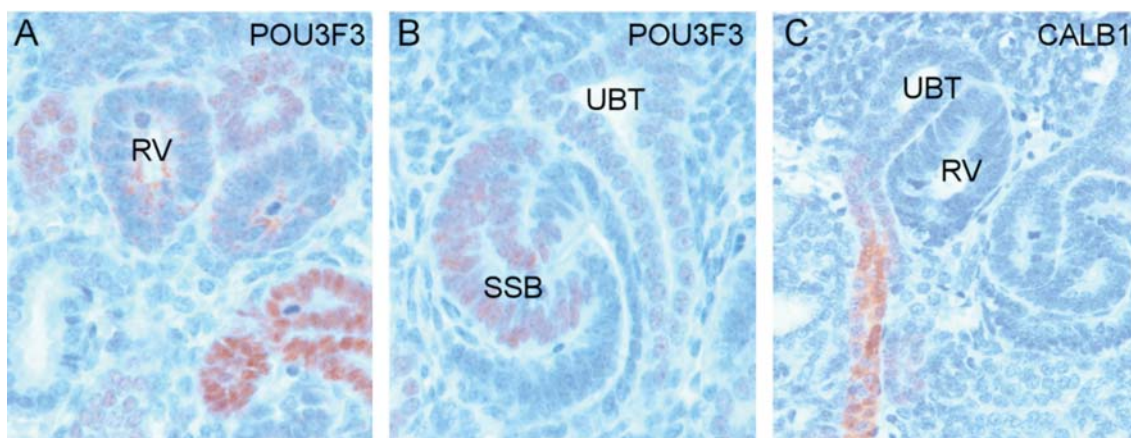
A distális nefron doméneiben előforduló sejtek számának megítélésére megvizsgáltunk három felnőtt vesét, amelyeket a sejtekre jellemző antitesttel festettünk meg. A következő nefron szakaszokat értékeltük ki: CNT, CCD, OMCD, és IMCD. A sejtek számolását a Leitz LaborLux S mikroszkóppal végeztük el. Először a 10x objektív felhasználásával azonosítottunk olyan területeket, amelyek a distális tubulus megfelelő szakaszait tartalmazza. A 25x objektív segítségével megszámláltuk azokat a sejteket, amelyek pozitívan festődtek a kiválasztott antitesttel. Mivel a jellemző sejtek száma tubulusonként változott, ezért egy átlagot adtunk meg. A sejtek aránya vesénként is változott, ezért a legalacsonyabb és legmagasabb számot tüntettük fel.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Összekötő tubulus (CNT) eredete

4.1.1. A POU3F3 és CALB1 kifejeződése humán főtális vesében

Human főtális vesében nem találtunk POU3F3 transzkripció faktor pozitív immunreakciót a vese vezikulumok sejtmagjaiban (6. ábra, A). Míg egér vesében már a vese vezikulumokban felismerhető a szegmentálódás, ez a humán főtális vesében csak az SSB szakaszban figyelhető meg. Az SSB fázisban lehet először disztális, mediális és proximális domént megkülönböztetni. Kizárólag az SSB distális doménje mutat először pozitív festődést a POU3F3 antitesttel (6. ábra B). A CALB1 kifejeződése is lényegesen különbözik az egér vesétől. A humán főtális vesében az UBT sejtjei negatívak, míg az differenciálódó gyűjtő csatorna sejtjei pozitív reakciót mutatnak (6. ábra C). Egyetlen MM-ból származó struktúra sem adott pozitív reakciót a POU3F3 vagy a CALB1 antitesttel.



6. ábra

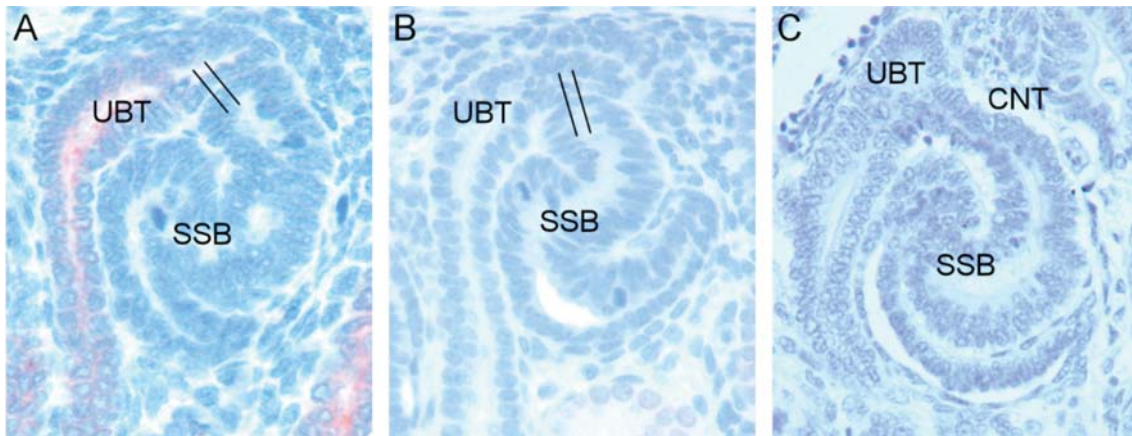
POU3F3 és CALB1 kifejeződése humán főtális vesében

A: a renal vezikulumban (RV) nincs POU3F3 immunreakció. **B:** POU3F3 kifejeződése az SSB disztális doménjében, az uréter bimbó (UBT) negatív. **C:** CALB1 nem fejeződik ki az UB ampullában (UBT) illetve RV-ban, csak az UB törzsben. (Scale bar 25 μ m)

4.1.2. Human főtális vesében az uréter bimbó sejtjei csatlakoznak az SSB disztális doménjéhez és nem fordítva

A MM eredetű sejtek epiteliális tranzíciója (MET) után az epiteliális sejtek először a RV-t és CSB-t majd az S-shape body-t (SSB) képezik. Az SSB különböző doménjének kialakulása után a disztális domén kapcsolódik az elágazódó uréter bimbóhoz, amely folyamat a működő nefron kialakulásának a feltétele. Immunhisztológiai vizsgálattal megfigyeltük, hogy ezek a tubulárisan rendeződött sejtszoptok az UBT-ből nőnek ki (7. ábra, A)

A főtális vesék hematoxylin és eosin festett metszeteinek szövettani vizsgálata során megfigyeltük, hogy kedvező metszési síkokban az uréter bimbóból valóban olyan sejtszoptok nőnek ki, amelyek időnként szűk lumennel rendelkeznek. Ezek a sejtszoptok az SSB disztális domainjéhez közeledve ellapulnak, hasonlóan az SSB velük szemben álló sejtekhez (7. ábra, A és B). Ritkán sikerült olyan síkban elkészíteni a metszeteket, hogy az CNT prekursor és az SSB disztális része már közös lument képezett, azaz létrejött a CNT primitív főtális formája, amely összeköti az UBT-t és SSB-t (7. ábra, C).



7. ábra

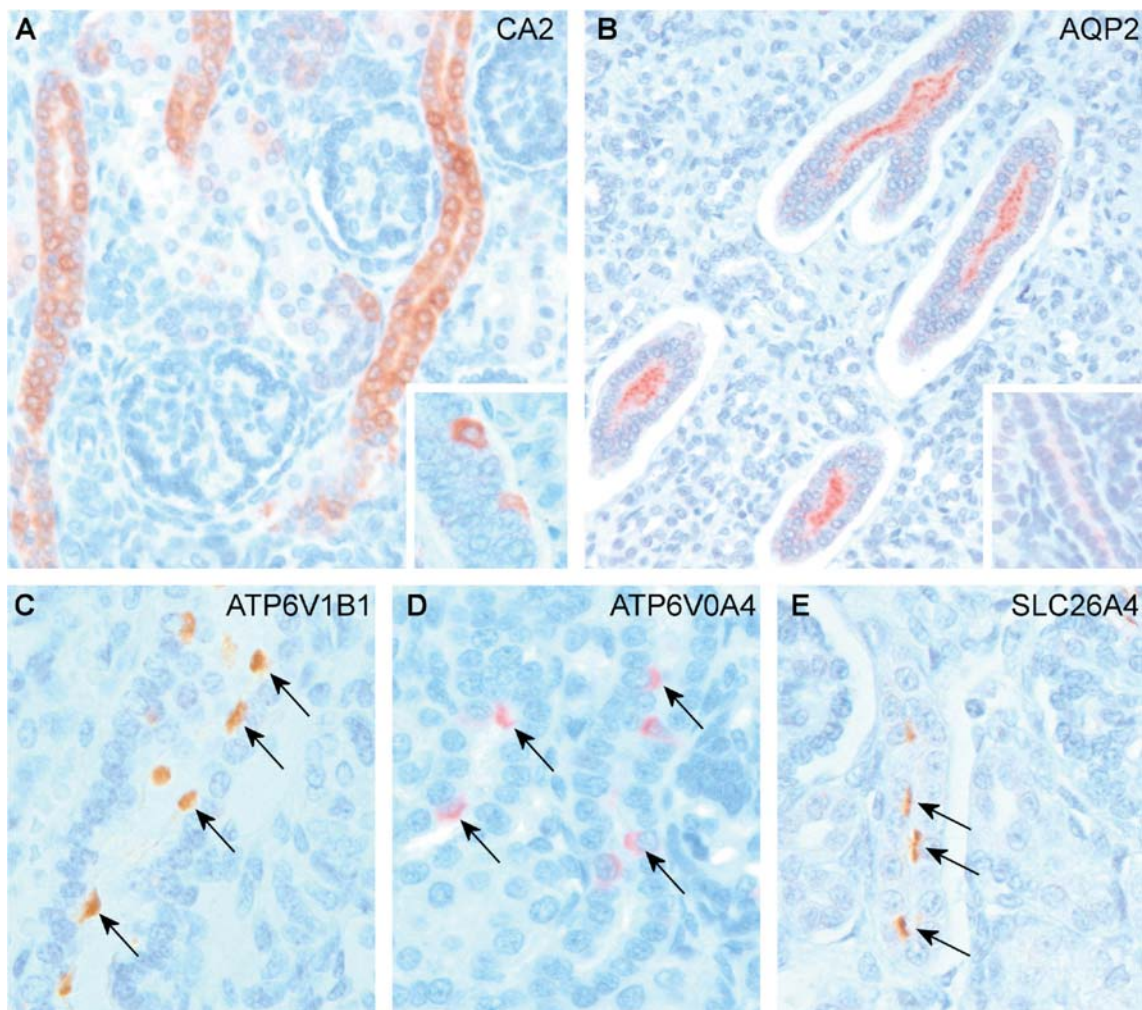
A CNT kialakulása humán vesében

- A:** UB specifikus marker KRT17 kifejeződése az UBT-ben és a kezdődő CNT-ben (vertikális vonalak jelzik az SSB distalis doménhez való kapcsolódás helyét).
B: A folyamat előrehaladásával mind a primitív CNT és az SSB disztális domén ellapult sejtjei jelzik a lumen képződését (vertikális vonalak). **C:** Ezen az ábrán egyértelműen felismerhető az UBT-t és SSB **disztális** doménjét összekötő lumen

4.1.3. A PC és IC sejtek és progenitor sejtjei főtális vesében

PC és IC sejtek kizárólag a CNT-ben és kivezető csatornában fordulnak elő. Ezért megvizsgáltuk a PC specifikus AQP2 valamint az IC sejtek prekursor sejtjeit jelző CA2 kifejeződését főtális vesében immunhisztológiával. A CA2 elsősorban a fejlődéstanilag fiatalabb kortikális UB trunk doménban fejeződött ki (8. ábra, A). A medulláris UB trunk sejtjei csak elvétve mutattak pozitív CA2 immunreakciót. A PC-t jelző AQP2 fordított erősségű reakciót mutatott. Elsősorban a medulláris UB törzs, azaz a medulláris kivezető csatorna sejtjeiben mutatott erős festődést, míg a kortikális UB sejtjei csak gyenge AQP2 festődést mutattak (8. ábra, B). Az AQP2 immunreakció fokozatosan erősödött a kortikális doméntól a medulláris kivezető csatornáig. Egyetlen más sejt sem mutatott pozitív immunreakciót az AQP2 és CA2 antitesttel főtális vesében.

Differenciált, működő IC sejteket a transzportáló fehérjék kifejezéséről lehet felismerni, mint a vATPase-k. Ezért megvizsgáltuk az SLC4A1, SLC26A4, ATP6V0D2, ATP6V1B1 fehérjéket főtális vesében, amelyek az α - és β -IC sejteket jellemzik. Az ATP6V1B1 kifejeződését már 10. hetes terhességből származó vesében is észleltük. Valamivel idősebb, már 12–15. hetes terhességből származó vesében a tubuláris sejtek felszínén látható diffúz, vonalszerű ATP6V0D2 immunreakció mellett megjelentek a felnőttes vesében látható „Cap”-szerű immunreakciók. Erőteljes immunreakciót figyeltünk meg az ATP6V1B1 antitesttel, valamint a β -IC marker SLC26A4 antitesttel. Az immunhisztológiai vizsgálatok eredménye arra utal, hogy az IC sejtek a korai terhességi fázisban éretlen fenotípust mutatnak. Az SLC26A4 és ATP6V1B1 kifejeződése főtális vesében arra utal, hogy ezek a sejtek a végső differenciálódásra még nem elkötelezett non α -non β -IC sejteknek felelnek meg.



8. ábra

A principális sejtek és interkalaris sejtek kialakulása főtális vesében

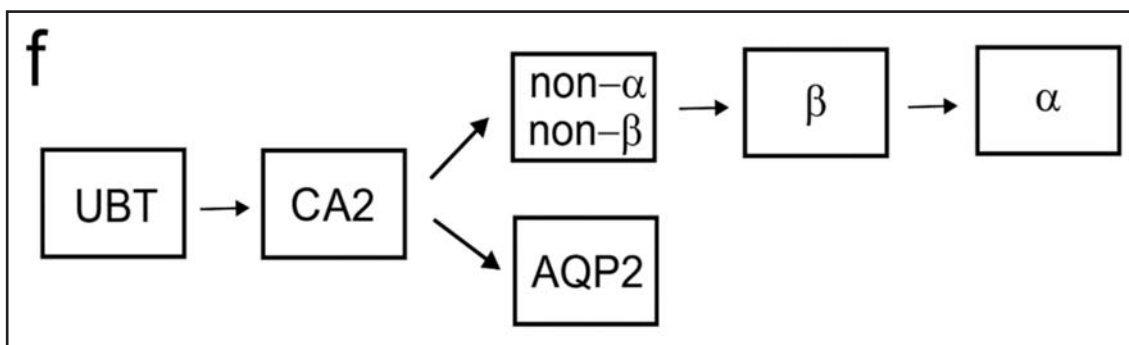
A: a CA2 gyakorlatilag a kezdeti kortikális uréterszakasz minden sejtjében kifejeződik, viszont a medulláris uréterszakaszban csak néhány sejt festődik pozitívan a CA2 antitesttel (insert). **B:** az AQP2 a medulláris kivezető csatorna sejtjeinek lumenáris felszínén kifejezett pozitívítást mutat, azonban a kortikális szakaszban csak enyhe festődés látható (insert).

C: erős immunreakció a kortikális kivezetőcsatorna sejtjeinek felszínén az ATP6V1B1 antitesttel 15 hetes főtális vesében (nyilak). **D:** pozitív festődés az ATP6V0A4 antitesttel egy 17 hetes vese kivezető csatorna sejtjeinek felszínén (nyilak). **E:** 17 hetes terhességből származó vese egyértelműen mutatja az érett interkalaris sejtre jellemző SLC26A4 fehérje kifejeződését (nyilak).

4.1.4. A principális és interkalaris sejtek kialakulására javasolt modell

Vizsgálataink alapján a következő sejtjes fejlődési folyamatot találtuk a PC és IC sejtek kifejlődésére. Az UBT-ből kialakuló kortikális UB csatorna, amely a prekursor sejtekre jellemző CA2 kifejeződést mutat, elkötelezett két irányba. A kortikális nefrogén zóna a vese tokja alatt folyamatosan képezi az újabb UB csatornákat, amelyek korábbi, már

medullárisnak számító szakasza kifejez az AQP2-t, amely a PC sejteket jellemzi. A másik irányba, azaz az IC sejtek képzésére elkötelezett CA2 pozitív sejtek először non α /non β IC sejtekre, majd ezt követően β -IC sejtekre, amelyek végső soron α -IC sejtek kialakulását eredményezik (9. ábra).



9. ábra

A principális és interkaláris sejtek valószínű kialakulása (Sárkány és Kovács, 2021)

4.1.5 Szegment specifikus gének kifejeződése felnőtt vesében

A humán vese minden egyes szegmentje, a CNT és CD kivételével azonos citológiai megjelenésű és működésű sejtekből áll (Roy 2016). Ezt a szegment specifikus gének expressziójának vizsgálatával igazoltuk. Az eredményeket az 3. táblázatban tüntettük fel. A proximális tubulusok azonosítására a TMEM27 antitestet használtuk. A TMEM27 gén egy transzmembrán fehérjét kódol, amelynek fontos szerepe van az aminosavat transzportáló SLC6A19 működésében. A POU3F3 embrionális vesében a SSB disztális és középső doménjében fejeződik ki, és fontos szerepe van a nefron középső szakaszának, a Henle-kacsának és a makula densa kialakulásában és működésében. A POU3F3 ezenkívül a distális tubulusok néhány sejtjében is pozitív reakciót adott. A SCEL kizárólag a distális kanyarulat csatornák sejtjeiben fejeződik ki, míg a makula densa és CNT sejtjei nem mutattak pozitív immunreakciót.

Az AQP2, amely a PC jellemző markere, a CNT és CCD sejtjeiben kevésbé fejeződött ki, azonban mind a külső és belső gyűjtőcsatorna sejtjeiben erőteljes és diffúz immunreakciót adott, amely megfelel a PC működésének. CA2, amely az PC és IC sejtek prekursor sejtjeit jelzi, pozitív festődést mutatott a CNT sejtjeiben, de leginkább a CCD és OMCD sejtjeiben talátunk erős reakciót. A distális nefron működésének megfelelően mozaik felépítést mutat. Mind a PC és IC sejtek olyan géneket fejeznek ki, amelyeknek fontos szerepe van a víz- és elektrolit háztartás szabályozásában. Az AQP2 kifejeződése

kizárólag az PC sejtekben figyelhető meg, míg az α -IC sejtek a Cl-/HCO₃-exchanger Solute Carrier Family 4 Member 1 (SLC4A1) bazolaterális expresszióját, míg a β -IC sejtek a Cl-/HCO₃- exchanger Solute Carrier Family 26 Member 4 (SLC26A4) apikális kifejeződését mutatják. Ezek a sejtípusok kizárólag a CNT-ben és CCD sejtjeiben fordulnak elő, bár az OMCD sejtjei is mutathatnak néhány pozitív sejtet. Ezeknek a markereknek a kifejeződését semmilyen más nefron szakaszban sem figyeltük meg. A CALB1 a CCD-ben erős immunreakciót mutatott, míg a CNT-ben csak enyhe CALB1 kifejeződésre találtunk. A CALB1 nem fejeződött ki az OMCD és IMCD sejtjeiben.

3. táblázat – A szegment és sejt-specifikus gének kifejeződése humán felnőtt vesében

Gene	PCT	LH	MD	DCT	CNT	CCD	OMCD	IMCD
TMEM27	++	–	–	–	–	–	–	–
POU3F3	–	++	+++	+	–	–	–	–
SCEL	–	–	–	++	–	–	–	–
AQP2	–	–	–	–	+	++	+++	+++
CA2–	–	–	–	+	+++	++	–	–
SLC4A1	–	–	–	–	++	++	+	–
ATP6V1B1	–	–	–	–	++	++	+	–
ATP6V0A4	–	–	–	–	+++	++	+	–
ATP6V0D2	–	–	–	–	++	++	+	–
TMEM213	–	–	–	–	++	++	+	–
SLC26A4	–	–	–	–	+	++	–	–
CALB1	–	–	–	–	+	+++	–	–

PCT: proximal kanyarulat csatorna, LH: Henle-kacs, MD: macula densa, DCT: distalis tubulus, CNT: összekötő csatorna, CCD: kortikális gyűjtőcsatorna, OMCD: külső medulláris gyűjtőcsatorna, IMCD – belső kortikális gyűjtőcsatorna, –: negatív, +, ++, +++ pozitív növekvő intenzitás és sejt szám

4.1.6. A PC és IC specifikus sejtek eloszlása a felnőtt vese tubulusokban

Meghatároztuk a PC és IC sejtek eloszlását felnőtt vese disztális csatornáiban. Az immunhisztológiai vizsgálat kizárólag az összekötő csatorna és gyűjtő csatorna sejtjeiben mutatott ki PC és IC sejteket. Amint azt a 3. táblázatban már kimutattuk, CA2 pozitív prekursor sejtek nagyobb számmal fordultak elő a CCD és OMCD-ben és kevésbé a CNT-ben. Az AQP2 pozitív sejtek száma a legmagasabb az OMCD-ben, IMCD-ben és kevesebb a CCD-ben és CNT-ben. Az IC sejteket jelző markerek leggyakrabban a CNT-ben és CCD-ben

adtak pozitív reakciót. Az egyes disztális tubulus szakaszokban előforduló sejtek száma veséenként változó, amely a sejtek „plaszticitására”, azaz a mindenkori szükségletnek megfelelő sejtes összetétel kialakulására utal.

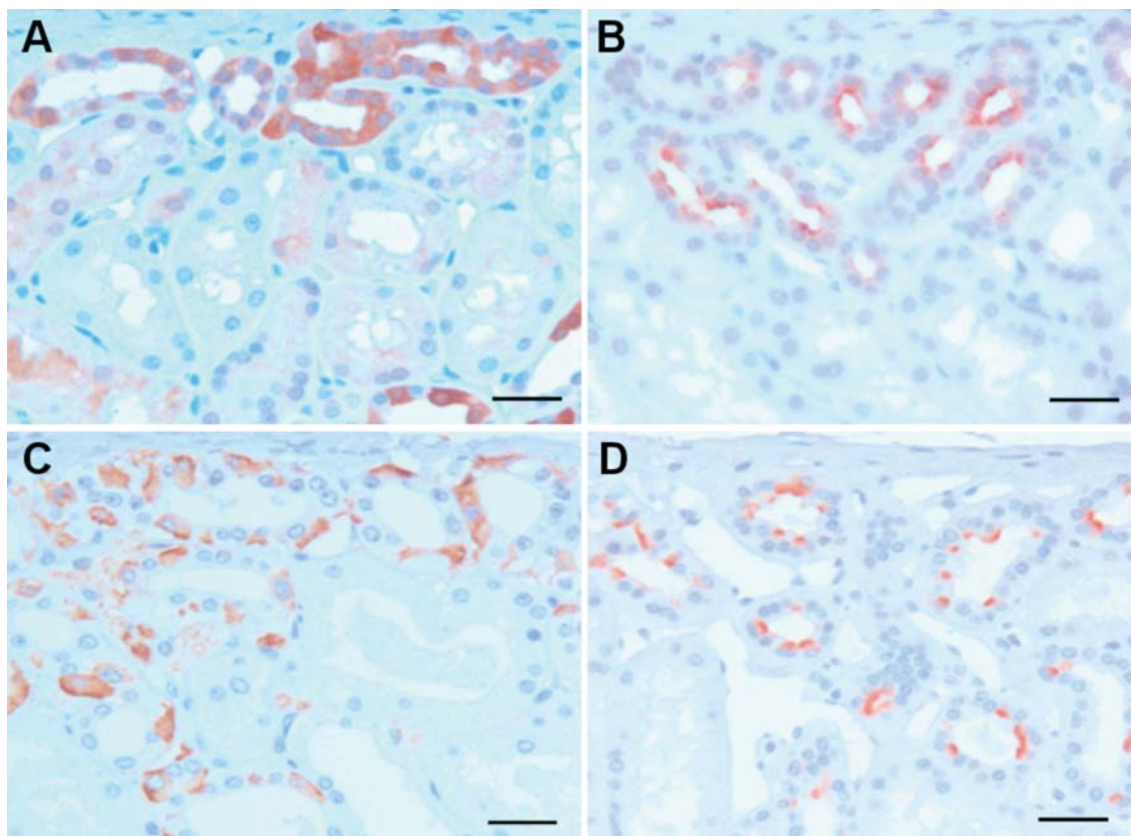
4. táblázat – A felnőtt vese nefron különböző doménjében előforduló pozitív immunreakciót mutató sejtek száma

Gene	PT	LOH	MD	DCT	CNT	CCD	OMCD	IMCD
TMEM27	95-100	0	0	0	0	0	0	0
POU3F3	0	90-100	100	20-40	0	0	0	0
AQP2	0	0	0	0	30-50	60-80	100	95-100
CALB1	0	0	0	0	20-40	30-70	0	0
CA2	0	0	0	0	30-50	10	80-90	0
SLC26A4	0	0	0	0	10-30	40-60	0	0
SLC4A1	0	0	0	0	20-60	40-70	0-20	0
ATP6V1B1	0	0	0	0	40-60	40-60	0-10	0
ATP6V0D2	0	0	0	0	20-40	40-70	20-40	0
TMEM213	0	0	0	0	30-50	30-60	10-20	0

PT-proximalis tubulus, LOH-Henle kacs, MD-makula denza, DCT-distális tubulus, CNT-összekötő csatorna, CCD-kortikális gyűjtőcsatorna, OMCD-külső medulláris gyűjtőcsatorna, IMCD-belső medulláris gyűjtőcsatorna.

4.1.7. A CNT-ben előforduló sejtek immunhisztológiai vizsgálata

Amint a 3. és 4. táblázatban feltüntettük, a PC és IC sejtek és prekursor sejtek az AQP2 pozitív PC sejtek kivételével elsősorban a CNT-ban és CCD-ben vannak jelen. Ez a közös sejtes felépítés a CCD és CNT közös eredetére utal. A CNT viszonylag könnyen felismerhető a vese tokja alatt, és így könnyű a CNT sejtes összetételének megítélése. Mind a CA2 pozitív prekursor sejtek, mind az AQP2 pozitív PC sejtek mind az SLC4A1 és SLC26A4 IC sejtek is jelentős számban fordulnak elő (10. ábra).



10. ábra

A PC és IC sejtekre jellemző markerek kifejeződése felnőtt vese összekötő csatornában (CNT)
A: a CNT sejtek egy része pozitív festődést mutat a CA2 antitesttel. **B:** AQP2 pozitivitás a principális sejtek lumen felőli felszínén. **C:** az SLC4A1 gén az összekötő csatorna sejteinek bazális és laterális felszínén fejeződik ki. **D:** apikális membrán pozitív festődés az összekötő csatorna lumináris felszínén az SLC26A4 antitesttel.
 (Skála mérték: 30 μ m).

4.2. Wilms Tumor

4.2.1. Az uréter bimbó (UB) markerek expressziója főtális vesében

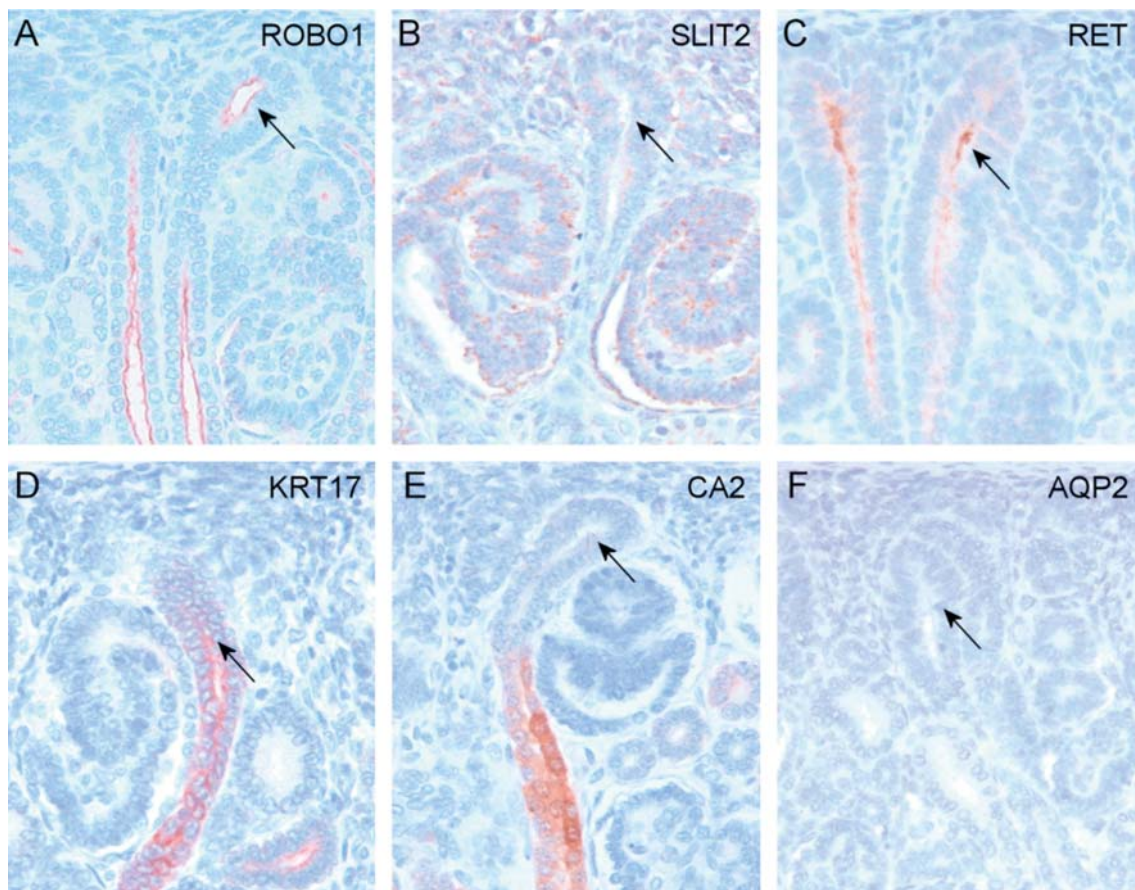
Először azokat a géneket elemeztük, amelyek kizárólag az elágazódó (branching) UB sejtekben fejeződnek ki. Ami az UB törzset, illetve az UB ampullát illeti, két különböző megjelenésű immunreakciót figyeltünk meg. A KRT17, RET és ROBO1 nem csak az UB trunk és collecting csatornák sejteiben fejeződött ki, hanem az UB tip pluripotenciális sejtjein is. Ezzel a három antitesttel nem találtunk pozitív immunreakciót az MM-eredetű sejtekben, mint a kondenzált blastéma, a renalis vesiculum (RV) vagy S-shaped body (SSB) sejtjei. Kivételt képezett a ROBO1 ligand SLIT2, amely gyenge immunreakciót mutatott UB tip és az UB trunk sejteiben, az MM-ből származó blastemális sejtekben, valamint a RV és SSB sejteiben is (5. táblázat).

A CA2 és AQP2 antitestekkel kapott immunreakció különbözött a fent leírtaktól. A CA2 és AQP2 a főtális vesében azokat a progenitor sejteket azonosítja, amelyek később a felnőtt vesében tovább differenciálódnak a kivezető csatornák meghatározott működésű sejtjeire, a PC és IC sejtekre. CA2 expresszió már a 10. hetes vesében megjelenik (11. ábra E). Ekkor és a későbbiekben is a pozitív festődés az UB trunk kortikális szakaszára korlátozódik, de a medulláris UB trunk és az UB tip sejtjei negatívak maradnak. Az UB-tip és a kortikális UB-trunk sejtjei nem adnak pozitív reakciót az AQP2 antitesttel. Viszont a medulláris UB trunk területén, ami később megfelel a medulláris gyűjtőcsatornának, erős AQP2 protein expresszió látható. Tehát a CA2 pozitív sejtek a vesefejlődést tekintve az UB fiatalabb kortikális doménjében fordulnak elő, közel az UB tip sejtekhez, míg az AQP2 expresszió az UB-trunk idősebb medulláris doménjében jelenik meg. Differenciálatlan IC sejtek pozitív festődést mutattak az IC marker ATP6V1B1 and ATP6V0D2 antitesttel. A két antitest a tubuláris sejtek lumináris felszínén egy vékony, egyenes vonal képében jelent meg. Csak kevés sejt mutatta felnőtt vese differenciálódott IC sejtjeire jellemző, capszerű pozitívítást (lásd 11. ábra).

6. táblázat – Az uréter bimbó és sejt specifikus gének kifejeződése humán főtális vesében

	KRT17	RET	ROBO1	SLIT2	CA2	ATPase	AQP2
UBT	+	+	+	+	-	-	-
C-TRUNK	+	+	+	+	+	+	-
M-TRUNK	+	+	-	-	-	-	+
MM-DE	-	-	-	+	-	-	-

UBT – uréter bimbóvég, C-TRUNK – kortikális uréter bimbótörzs, M-TRUNK – medulláris uréter bimbótörzs, MM-DE – metanefrikus, mesenchimális eredetű – negatív, + pozitív



11. ábra

Az uréter bimbó immunhisztológiai vizsgálata főtális vesében

A: *ROBO1* erőteljes kifejeződése az UB-ban és UBT-ben. **B:** gyenge immunreakció a *SLIT2* antitesttel mind az UB-ban, környező blasztémális és MM-származék epiteliális sejtekben. **C és D:** pozitív reakció a *RET* és *KRT17* antitestekkel az UB-ban és UBT-ben.

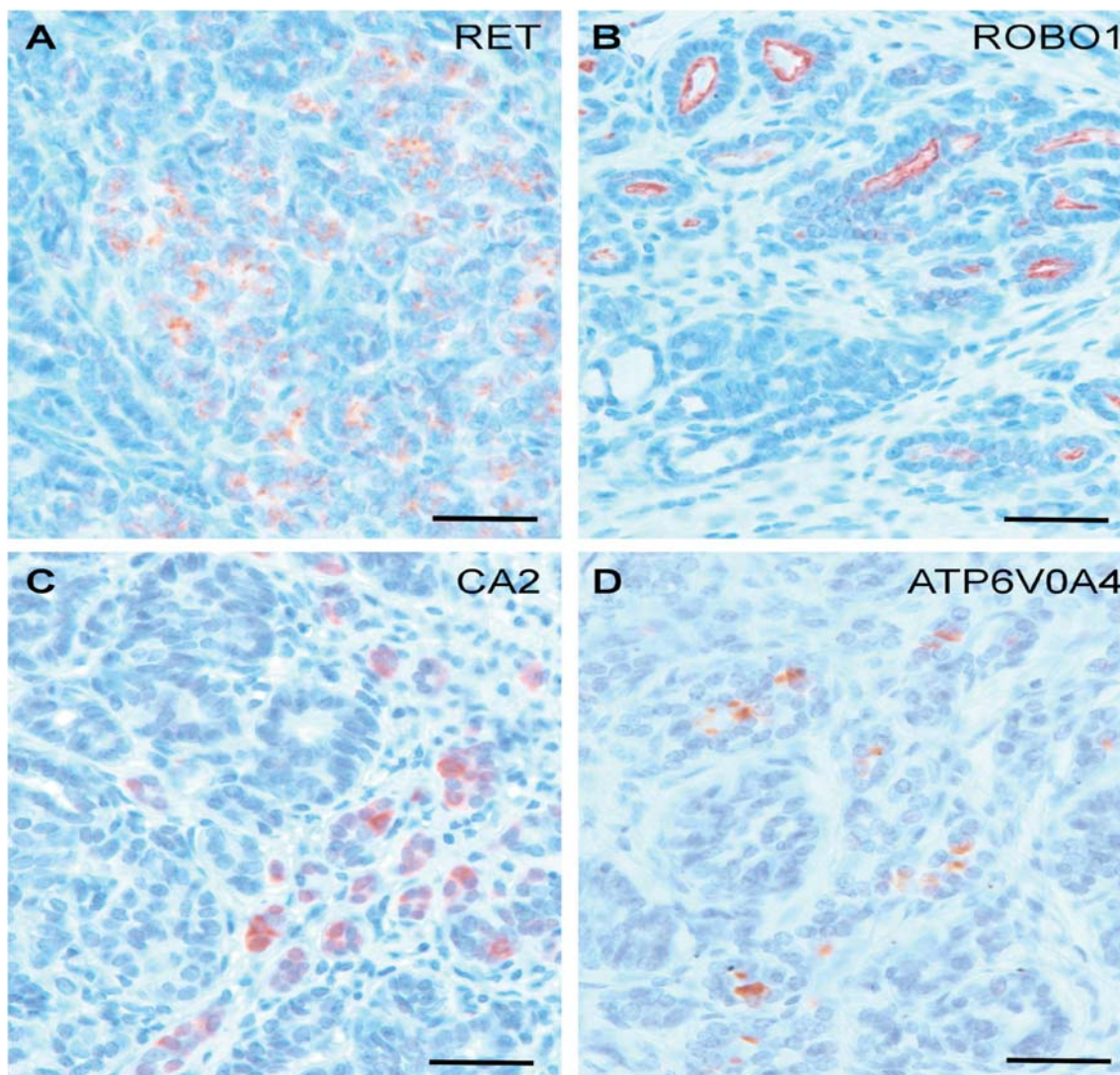
E: erős immunreakció a *CA2* antitesttel a kortikális kivezető csatornában, de az UBT sejtei negatívak. **F:** sem a kortikális UB, az UBT sem az MM-ből származó epitheliális sejtek sem mutattak pozitív reakciót az *AQP2* antitesttel (az *AQP2* csak a medulláris kivezető csatornában volt pozitív)

4.2.2. Az ureteric bud (UB) markerek expressziója nefrogén maradványokban

Az egy általánosságban elfogadott tény és irodalomban egyértelműen dokumentált, hogy a WT nefrogén maradványokból indul ki. Bár már két korábbi közlemény is utalt az UB markerek előfordulására WT-ban, nem vizsgálták PLNR-ben és ILNR-ben (Stupar és mtsai, 2007; Fukuzawa és mtsai, 2017). Korábban mi elvégeztük mind az NR és WT immunhisztológiai vizsgálatát. A KRT 17 antitest az UB származékok sejteiben mind WT-ban és ILNR-ben és PLNR-ben pozitív festődést mutatott (Sárkány és mtsai, 2020).

Ezért ebben a munkában megvizsgáltunk 6 perilobáris nefrogén maradványt és 3 intralobuláris nefrogén maradványt, közöttük egy 6 mm átmérőjű hiperplasztikus maradványt azokkal az antitestekkel, amelyeket az UB ampulla differenciálódásának azonosítására használtunk fel főtális vesékben. UBT-re specifikus markerek, mint a KRT17, ROBO1, RET és SLIT2 mellett a prekursor sejteket jelölő CA2 és a differenciálódott PC és IC sejteket jelző markereket használtuk fel.

Három PLNR-ben, két ILNR-ben, közöttük a hiperplasztikus nefrogén maradványban pozitív immunreakciót kaptunk mind a négy UB markerral, azaz KRT17, ROBO1, RET és SLIT2 antitestekkel. Pozitív immunreakciót elsősorban a nefrogén maradványon belül körülírtan proliferáló epiteliális sejtsoportokban valamint körülírtan proliferáló tubuláris sejtsoportokban figyeltünk meg (*12. ábra A, B*). Pozitív immunreakciót kaptunk a hiperplasztikus nefrogén maradványban megfigyelt epiteliális sejtsoportokban a főtális prekursor IC sejteket kimutató CA2 antitesttel. Továbbá két fibrotikus epiteliális nefrogén maradványban a differenciálatlan IC sejteket jellemző ATP6V0A4 és ATP6 V1B1 antitestek bizonyultak pozitívnak. Nem találtunk pozitív reakciót AQP2, SLC26A4 és SLC4A1 antitestekkel.



12. ábra

Az UBT-ből származó részben differenciálódott sejtek előfordulása nefrogén maradványokban

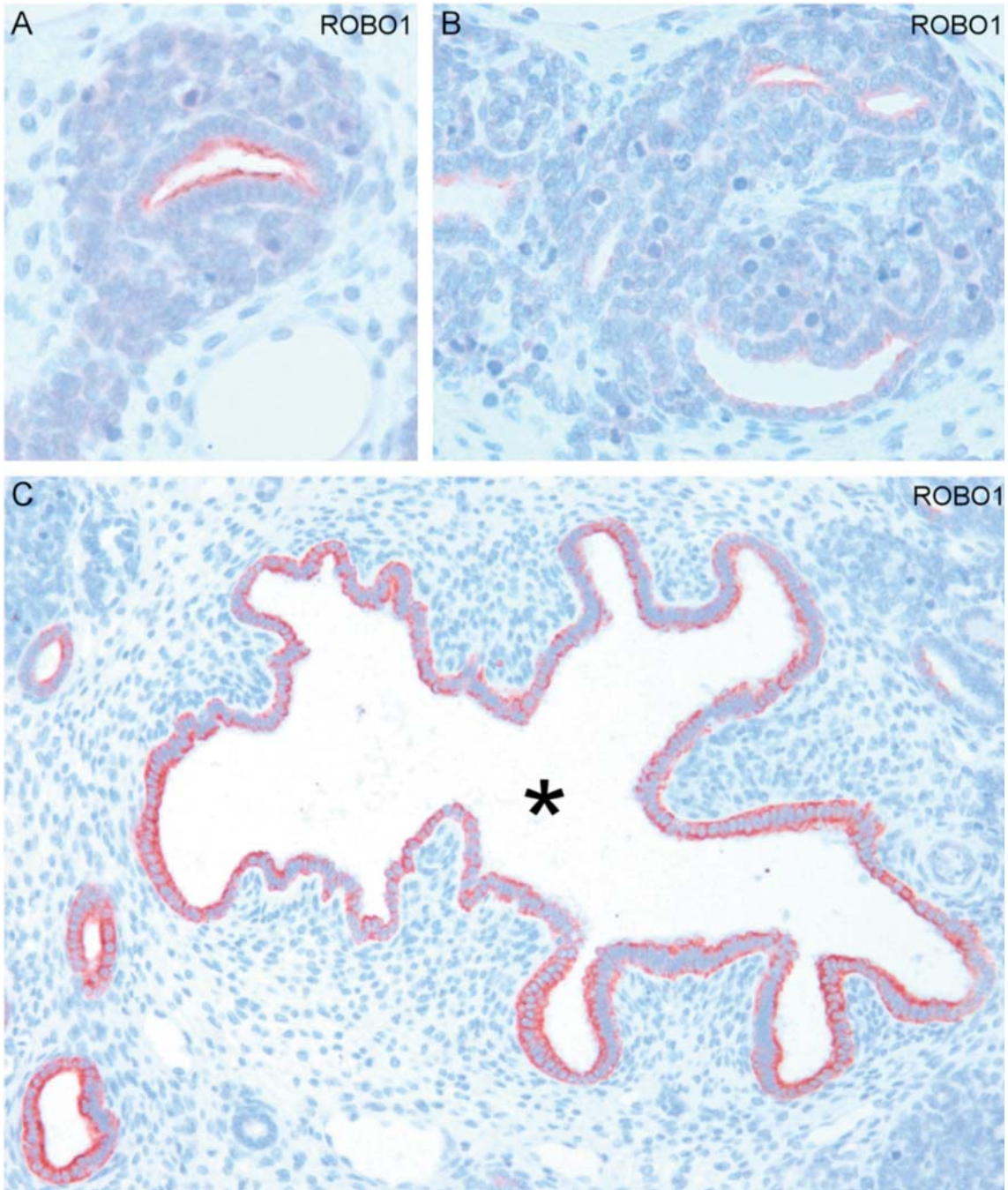
***A:** hiperplastikus ILNR nefrogén maradványon belül epiteliális sejtek pozitív immunreakciót adnak a RET antitesttel **B:** ILNR fibrotikus stromájába ágyazott ROBO1 pozitív tubuláris sejtek **C:** ILNR-ben CA2 pozitív differenciálatlan prekursor sejtek. **D:** ILNR részlete, az IC sejtekre jellemző ATP6V1B1 expressziót mutat.*

4.2.3. Az uréter bimbó markerek expressziója Wilms tumorban

Wilms tumorban elemeztük azoknak a proteineknek a celluláris kifejeződését, melyeket a KRT17, RET, ROBO1, SLIT2, CA2 és AQP2 kódol. Ezzel kapcsolatban fontos megjegyezni, hogy ezek közül a ROBO1, RET és KRT17 főtális vesében csak az UB trunk és UB ampulla sejtjeiben fejeződik ki, egyetlen blasztémális sejt vagy a MM-ből kiinduló képlet, mint RV vagy SSB sem mutatott pozitív immunreakciót.

A ROBO1, amely a főtális vesék UB ampulla sejtjeiben fejeződik ki, és jelentős szerepe van ezek kialakulásában valamint elágazódásában, erős immunreakciót mutatott trifázisú WT-ban. Az UB ampulla sejtjeire emlékeztető tubulusokban, amelyek noduláris, szerpentinszerű növekedést mutató blasztémális sejtek csoportjába vannak beágyazva, az epiteliális sejtek erős ROBO1 pozitív festődést mutattak (13. ábra A). Azok a képletek, amelyekben egy-egy blasztémális sejtcsoportban több, szabálytalan formájú UB-szerű tubulusok láthatók egyértelműen a WT-ban előforduló tumoros proliferációra utalnak (13. ábra B). Számos, néha meglepő formát mutató, laza fibrotikus stromába ágyazott cisztikusan tágult, kifejezetten ROBO1 pozitív epiteliális sejtekkel bélelt tubulus fordult elő (13. ábra C). A WT stromális részébe ágyazott köbhámmal bélelt tubulusok is erős ROBO1 festődést mutattak (14. ábra A). A ROBO1 kifejeződése elsősorban a nagyobb, epiteliálisan differenciálódott sejtekben volt megfigyelhető. Ezt láttuk az egyetlen, a vizsgálati anyagba bevont hyperplasztikus nefrogén maradványban is, ahol a körülírtan proliferáló nagyobb epiteliális sejtek élénk ROBO1 immunreakciót adtak (14. ábra B). Viszont a trifázisú WT kizárólag epiteliálisan növekvő részében a nefrogén vezikelszerű képletek, amelyek feltehetően a blasztémális sejtekből erednek, negatív ROBO1 festődést mutattak (14. ábra C).

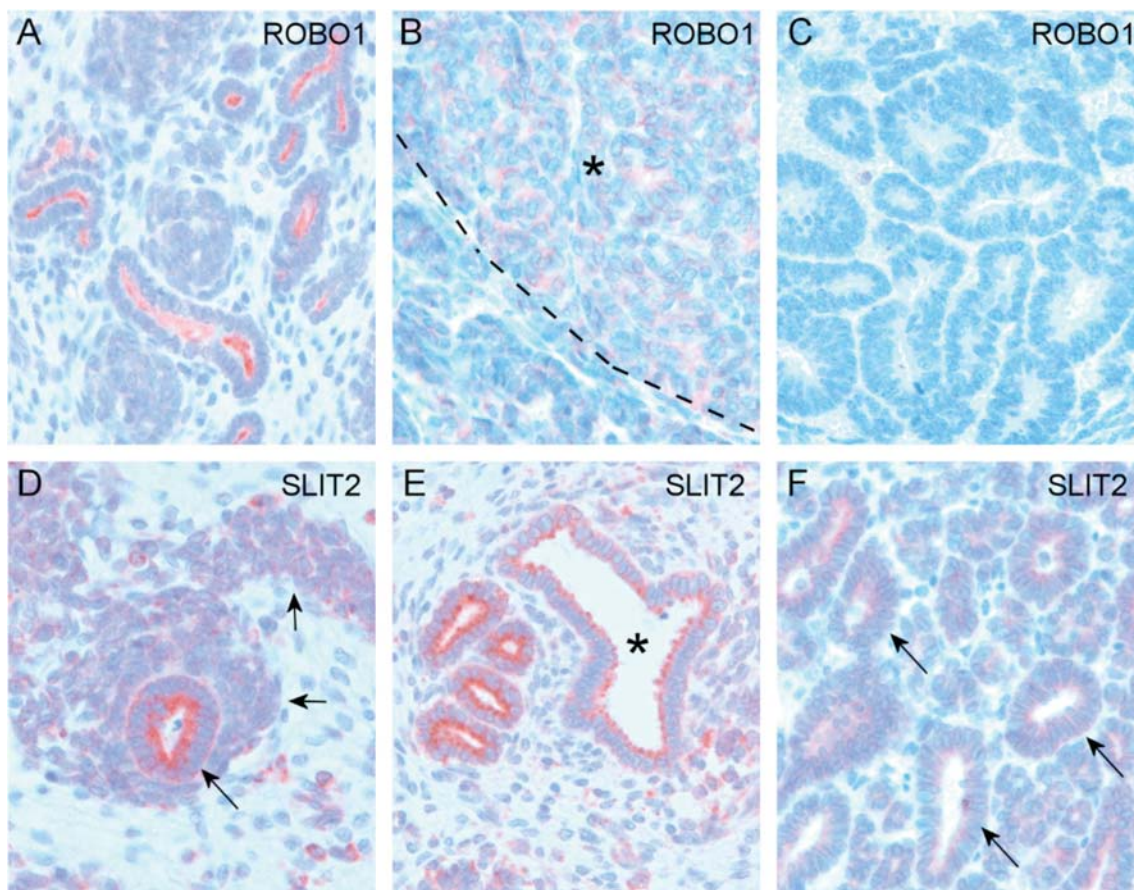
A ROBO1 receptor SLIT2, amint azt a főtális vesében is megfigyeltük, úgy a WT-ban is mind az UB-ból származó, mind az MM-ből származó sejtekben is kifejeződik. A nodulárisan növekvő tumoros blasztémális sejtek és a fibrotikus stroma sejtjei SLIT2 pozitív festődést mutattak (14. ábra D és E). A részben differenciált UB törzsre emlékeztető szűk és cisztikusan tágult tubulusok sejtjei erős immunreakciót mutattak a SLIT2 antitesttel (14. ábra E). A ROBO1-el ellentétben, a SLIT2 antitest pozitív immunreakciót mutatott a renális vezikulumra emlékeztető tubulusokban (14. ábra F)



13. ábra

ROBO1 kifejeződése Wilms tumorban

A: szerpentinszerűen növekvő blasztémális sejtek között ROBO1 pozitív tubulus, amely a főtális vese fejlődésére jellemző, uréter bimbó és blasztémális sejtek kölcsönhatására emlékeztet. B: helyenként több, kisebb-nagyobb ROBO1 pozitív tubulus látható nagyobb blasztémális sejtcsoportba ágyazva. C: a ROBO1 pozitív tubulusok helyenként jelentősen kitérültek, sőt cisztikus átalakulást is mutatnak (csillag).



14. ábra

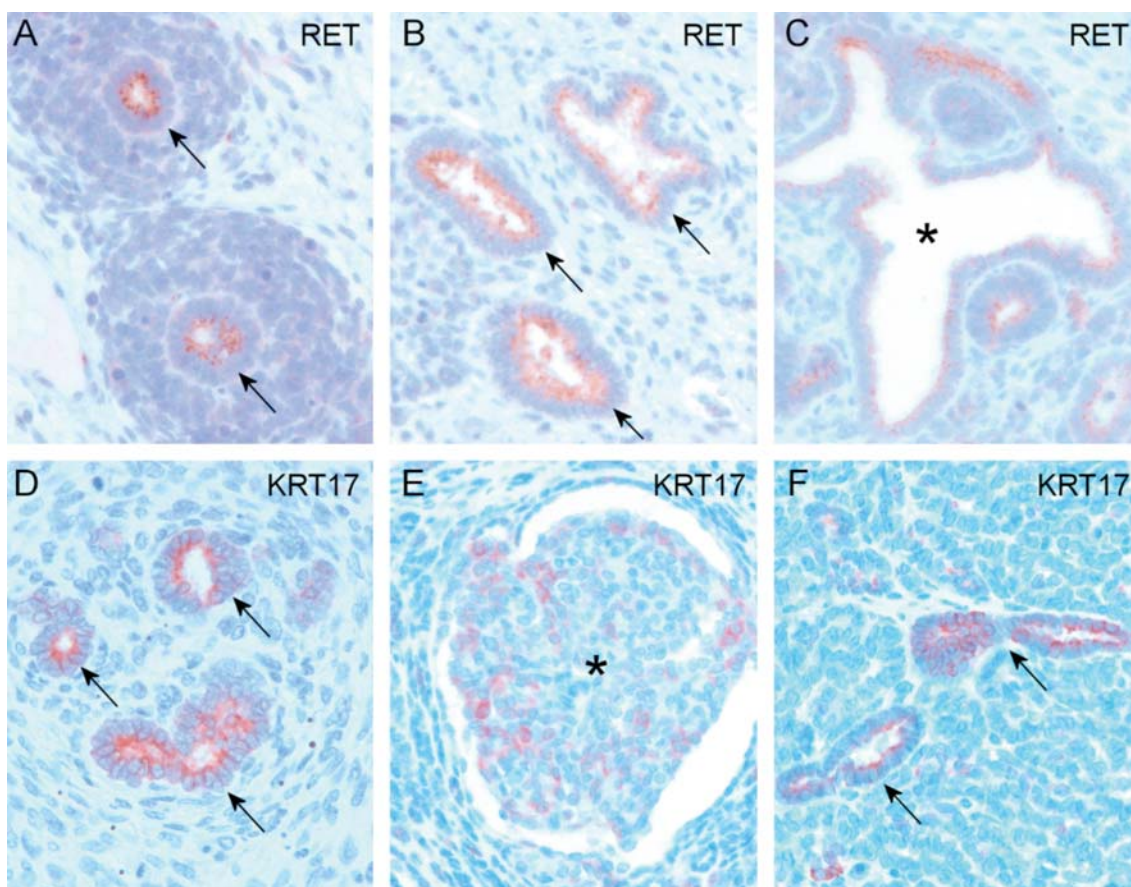
A ROBO1 és receptorának kifejeződése WT-ban és hyperplastikus nefrogén maradványban

A: erőteljes ROBO1 immunreakciót mutató kisebb-nagyobb tubulusok fibrotikus strómába ágyazva. **B:** ROBO1 pozitív epiteliális sejtek egy 6 mm átmérőjű hyperplastikus nefrogén maradványban. **C:** negatív ROBO1 festődés nefrogén vezikelre emlékeztető tubulusokban. **D:** SLIT2 pozitív blasztémális sejtekbe ágyazott erősen SLIT2 pozitív tubulus. **E:** fibrotikus strómába ágyazott SLIT2 pozitív részben tágult tubuláris struktúrák (csillag). **F:** a nefrogén vezikelnek megfelelő tubulusok pozitív immunreakciót mutatnak a SLIT2 antitesttel.

A RET és KRT17 hasonlóan a ROBO1 génhez, az főtális vesében megfigyelhető UB és blasztéma kölcsönhatására emlékeztető UB-szerű tubuláris sejtekben fejeződtek ki. Ezek vagy RET negatív tumoros blasztémális sejtcsoportokba vagy fibroblasztra emlékeztető strómába voltak ágyazva (15. ábra A és B). A tisztikusan tágult tubulusok jelentős része is RET pozitivitást mutatott (15. ábra C). KRT17 a blasztémális sejtekbe ágyazott UBT-szerű tubulusokban mutatott erős immunreakciót, de a fibrotikus strómában megfigyelhető egyszerű tubulusok is pozitív festődést mutattak. A perilobuláris NR tubuláris sejtei nem adtak KRT17 reakciót, viszont a körülírtan proliferáló szolid epiteliális nodulusok sejtei KRT17

festődést mutattak (15. ábra E). A hyperplastikus ILNR-ben egyes tubuláris, nagyobb hámsejtekkel bélelt képletek erős immunreakciót adtak a KRT17 antitesttel (15. ábra F).

A környező blasztémális vagy stromális sejtek egyike sem volt pozitív ROBO1, RET vagy KRT17 immunreakcióval. Továbbá, az MM-ből származó, primitív proximális és disztális tubuláris sejtekre vagy glomerulusra emlékeztető (glomeruloid) képletek negatívak voltak mind a KRT17, ROBO1, RET és SLIT2 festésre. Mivel célunk az UB-tip sejteinek kimutatása és differenciálódási képességének megállapítása volt, nem végeztük el az MM-ből származó sejtekre jellemző markerek immunhisztológiai kimutatását.



15. ábra

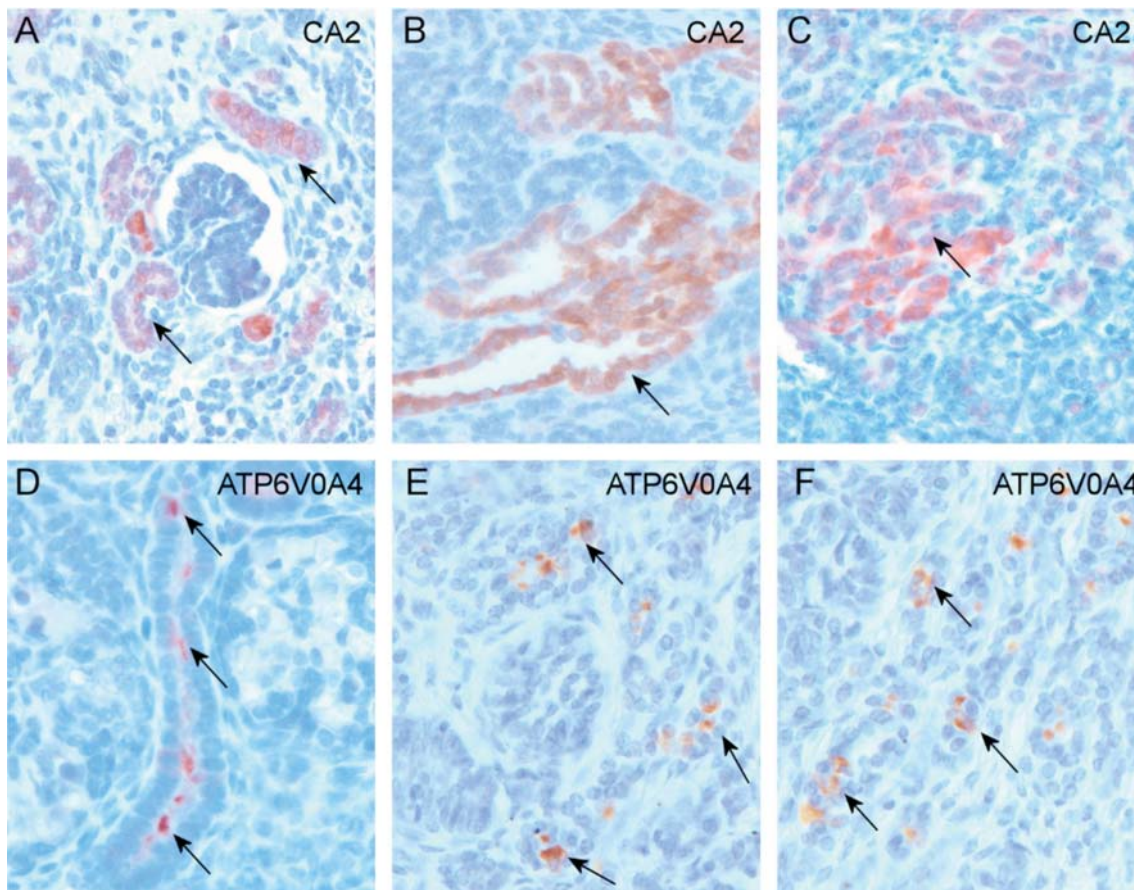
RET és KRT17 kifejeződése WT-ban és nefrogén maradványban

- A:** blasztémális sejtcsoport köze pén RET pozitív tubulus, amely a főtális vesében megfigyelhető blasztémális sejt és uréterbimbó kapcsolatára emlékeztet (nyíl). **B:** fibrotikus strómába ágyazott kitágult tubulusok sejtjei erős ROBO1 immunreakciót mutatnak (nyíl). **C:** cisztikusan tágult tubulus, amelyet RET pozitív epiteliális sejtek bélelnek (csillag). **D:** részben fibrotikusan difeenciálódott strómába ágyazott KRT17 pozitív tubulusok. **E:** perilobuláris nefrogén maradványban nagyobb epiteliális sejtekből álló körülírt sejtproliferáció látható, egyes sejtek pozitív KRT17 immunreakciót mutatnak. **F:** KRT17 pozitív tubulusok egy 6 mm átmérőjű hyperplastikus nefrogén maradványban.

4.2.4. Az uréter bimbó származékok differenciálódása Wilms tumorban

A CA2 az IC és PC sejtek prekursor sejtjeiben ad pozitív immunreakciót. Fötális vesében az UBT sejtjei nem festődtek a CA2 antitesttel. Azonban WT-ban pozitív immunreakciót figyeltünk meg a laza strómába ágyazott proliferáló tubuláris sejtekben, amelyek a kortikális UB-trunk sejtjeire emlékeztetnek (16. ábra A). A CA2 antitest pozitív reakciót adott számos cisztikusan tágult tubulusban is (16. ábra B). Ugyancsak pozitív CA2 reakciót figyeltünk meg a hyperplasztikus ILNR egyes tubuláris képleteiben is (16. ábra C).

Megvizsgáltuk az éretlen IC sejtek esetleges jelenlétét WT-ban az ATP6V1B1 és ATP6V0A4 antitestekkel. Mindkét ATPase pozitív reakciót adott a fötális vesék kifejlődő tubuláris képleteiben. Meglepetésünkre, ezek a differenciálatlan IC sejtek nemcsak a fötális vesékben, hanem WT-ban és nefrogén maradványban is előfordulnak (16. ábra D–F). Egyetlen WT sem mutatott pozitív immunreakciót a felnőtt vese összekötő és kivezető csatornájában látható differenciálódott α - és β -IC sejteket jellemző SLC4A1 és SLC26A4 antitestekkel. Egyetlen WT vagy nefrogén maradvány sem mutatott pozitív reakciót az AQP2 antitesttel.



16. ábra

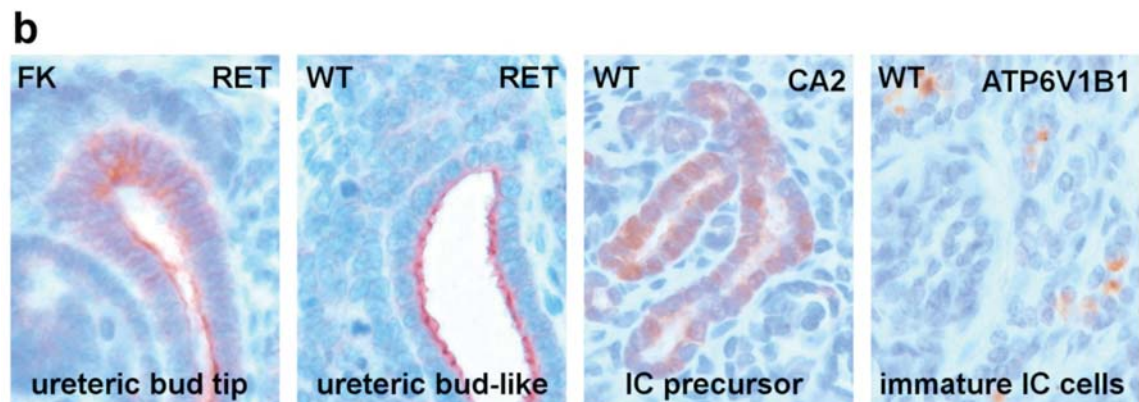
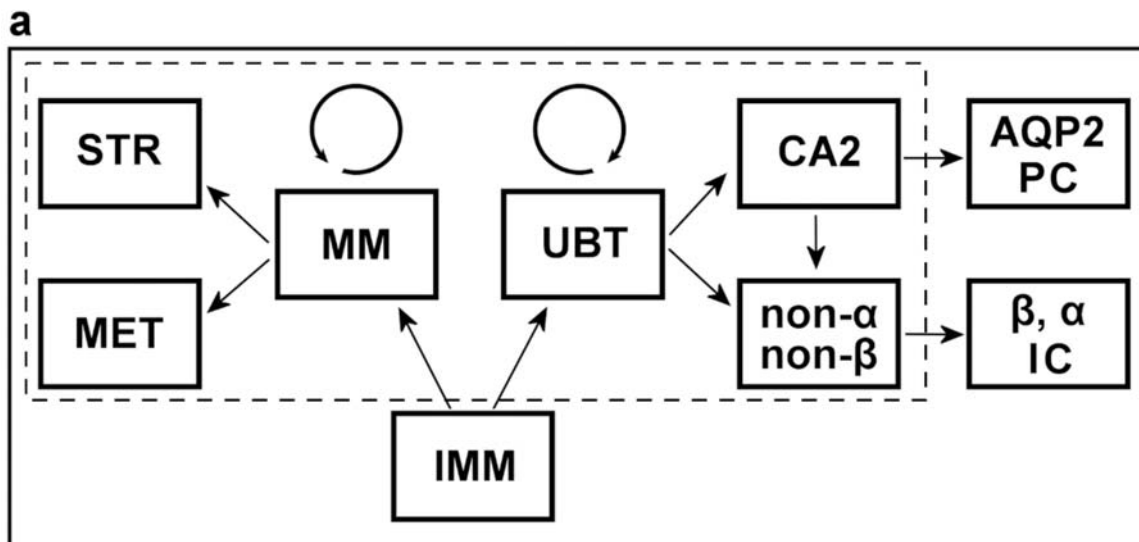
Az IC sejt prekursor CA2 és ATPáze kifejeződése WT-ban és nefrogén maradványban
A: fibrotikus strómában egy abortív glomerulus szerű képlet és körülötte CA2 pozitív tubulusok (nyíl). **B:** cisztikusan tángult CA2 pozitív sejtekkel bélelt tubulus egy WT-ban (nyíl). **C:** CA2 pozitív epiteliális sejtek egy 6 mm átmérőjű hyperplasztikus nefrogén maradványban. **D:** ATP6V0A4 pozitív sejtek 15 hetes főtális vesében (nyíl). **E:** ATP6V0A4 pozitív tubulusok WT-ban (nyíl). **F:** ATP6V0A4 pozitív tubuláris sejtek interlobuláris nefrogén maradványban (nyíl).

4.2.5. A WT eredetének új modellje

Mind a MM és UB az IMM-ből alakul ki, két különböző irányban differenciálódik, de megtartja a sejtproliferációs képességét (self-renewal capacity) a 36. terhességi hét végéig, amikor a vese fejlődése befejeződik. Az MM pluripotenciális sejtjeiből alakul ki egyrészt a vese strómája valamint a mesenchymális epiteliális differenciálódás során a RV, SSB és végül a nefron a kivezető tubulusok kivételével (Boyle és mtsai, 2008). Az UB ampulla képezi a sejt rezervoárt a CNT és kivezető tubulusok kialakítására. A bipotenciális sejtek egy része tovább proliferál a megfelelő számú UB elágazódásokhoz szükséges sejtek biz-

tosítására. Az UB ampullából kialakuló UB törzs sejtjei elsősorban a prekursor sejtekre jellemző CA2 expressziót mutatják. Az UB fokozatos hosszirányú növekedésével a régebbi UB szakaszban, azaz a CD sejtjeiben megjelenik a PC sejtekre jellemző AQP2 expresszió. A CA2 pozitív kezdeti, fiatalabb UB törzsben először differenciálatlan non-a non-b IC sejtek, majd a vesefejlődés későbbi szakaszában először a b IC sejtek (a 18. terhességi héten) majd az a-IC sejtek (28. terhességi hét) jelennek meg. Amint az ábrán látható, a szaggatott vonallal bekeretezett sejtek vesznek részt a NR és WT kialakulásában. A veseműködés fenntartásához szükséges teljesen differenciálódott AQP2 pozitív PC valamint b- és a-IC sejtek nem láthatók sem NR-ben sem WT-ban.

Differentiation of ureteric bud tip in Wilms' tumour



17. ábra

A NR és WT kialakulásának új modelje
(Sárány és mtsai, közlésre elküldve)

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az összekötő tubulus eredete

A DCT és CCD közötti összekötő elem (connecting piece, Verbindungsstück) léteére már 40 évvel ezelőtt utaltak (Kaissling és Kriz, 1979; Morel és mtsai, 1976; Imai, 1979). A szövettani megfigyelések mellett biokémiai és fiziológiai vizsgálatok is alátámasztották az összekötő elem, azaz a CNT jelenlétét. Az összekötő csatorna a nefron különleges szegmense, amelyik megteremti a kapcsolatot a metanefrogén mezenchímából (MM)-származó distalis convoluted tubulust (DCT) és az ureteric bud (UB)-ból származó CCD között. Az összekötő csatorna sejtes eredetét illetően az elképzelések ellentmondóak. Ez valószínűleg abból ered, hogy ismereteink nagy része a CNT fejlődését illetően, az embrionális és felnőtt egerek veséjének vizsgálataiból származik (Georgas és mtsai, 2009; Mugford és mtsai, 2009; Brunskill és mtsai, 2014). Azt feltételezték, hogy egérben a connecting segment az MM-eredetű renal vesicula (RV) distal compartmentjéből származik (Bard és mtsai 2001; Georgas és mtsai, 2009).

Egérben kimutatták a homeobox jelátviteli gén *Pou3f3* kifejeződését a renalis vesikel (RV) distális doménjében, ami arra utalt, hogy egérben a CNT az MM-ből származó RV disztális domainjéből keletkezik. (A humán nefron disztális szakasza, a CNT és CD, szemben a nefron más szegmenseivel, működési és szerkezeti heterogenitást mutat (Al Awqati, 2013). A mozaik szerkezet principális (PC) az interkaláris sejtekből (IC) tevődik össze, amelyek kifejezik azokat a géneket, amelyek szükségesek a víz és elektrolit homeosztázis fenntartásához. A PC sejteket az AQP2 expressziója jellemzi, míg az α -IC sejtek az SLC4A1 basolaterális expresszióját és a β -IC sejtek az SLC26A4 (pendrin) apikális expresszióját mutatják. A non α -non β IC sejtek mellett CA2 pozitív prekursor sejtek egészítik ki a kivezető csatorna szöveti heterogenitását. Ez a heterogenitás mind a CNT-ben, mind a CD-ben megtalálható, de egyetlen más nefron szegmensben sem. Ez megerősíti a CNT és CD közös embrionális kifejlődését.

5.1.1. Tér-és időbeli („spatiotemporal”) különbségek az MM és UB kölcsönhatásában egér és a humán vesében

A működő, felnőtt vese kialakulásához szükséges a nefron szegmentálódása és a specifikus nefron domének kialakulása (Dressler, 2009; Costantini és Kopan, 2010). Egerekben a szegmentáció már megtörténik a renális vezikulumban (RV) (Nakai és mtsai 2003; Kobayashi és mtsai, 2005). Azt feltételezték, hogy az MM-derived epitheliális sejtek kapcsolódása az uréter bimbó sejtjeivel az RV stádiumban történik azáltal, hogy a disztális RV sejtek penetrálnak az UT-be (Bard és mtsai 2001; Kao és mtsai, 2012). Ezt a modellt alátámasztja a *Pou3f3* szegment specifikus expressziója nemcsak a disztális RV-ban, de az összekötő szegmentben is, ami az MM-ből származó közös celluláris eredetre utal (Georgas és mtsai, 2009). Az UT-marker *Calb1* hiánya a tubular szegmensben, amely a RV-hez kapcsolódik, további érv mellett, hogy connecting segment a disztális RV-ből származik, szemben az esetleges UT eredettel (Georgas és mtsai, 2008). Jóllehet *Pou3f3* pozitív RV sejtek részvétele az egér CNT fejlődésben egy korábbi knockout kísérletben megkérdőjeleződött. A *Pou3f3*^{-/-}-egér vesékben csak Henle-kacs és a DCT kifejlődése maradt el, de connecting tubules (CNT) normálnak látszott, ahogy azt a CNT és CD specifikus markerek expressziója igazolta (Nakai és mtsai, 2003).

Mi nem találtunk *Pou3f3* expressziót a humán főtális vese RV-ban. Humán vesében specifikus markerekkel egyértelműen felismerhető szegmentáció, azaz egy disztális, mediális és proximális domain, először az S-shaped body (SSB) fázisban volt látható. A *Pou3f3* protein expresszió először az SSB disztális compartmentjében jelent meg. Az RV, valamint az UB-tip következetesen *CALB1* negatív volt és ez a protein humán vesében először csak az UB trunkban expresszálódik. Számos alapvető különbség van az egér- és humán vese embrionális fejlődésében (Little, 2015). Többek között a humán vese teljes kifejlődése a terhesség 36. hetében befejeződik, míg egérben még a születés után is folytatódik. Eredményeink egyértelműen bizonyítják az MM-ből származó epitheliális sejtek, azaz az SSB distális doménje és UB-tip fúziójának időbeli és térbeli különbözőségét egérben és emberben.

Szövetteni és immunhisztológiai vizsgálataink egyértelműen alátámasztják, hogy a CNT az UB tip sejtjeiből indul ki, amelyek az SSB disztális doménje felé nőnek, és a fenesztráció után a vese tubuláris rendszerének egy részét képezik. Felnőtt vesében a CNT a gyűjtőcsatorna rendszer részét képezi, amely hasonló citológiájú és működésű sejtekből

áll, amelyek α - és β -IC sejt és PC markereket fejeznek ki. A közös citológia és működés alátámasztja a disztális csatornák működési egységét.

5.1.2. A CNT az UB tip sejtjeiből származik, humán főtális vesében az uréter bimbó sejtjei csatlakoznak az SSB disztális doménjéhez és nem fordítva

Mind az UB és MM az intermediate mesenchymából származik. Az UB kezdeti kialakulásában jelentős szerepet játszik a SLIT/ROBO1 axon guidance szignál. A SLIT/ROBO szignálnak jelentős szerepe van az UB növekedésében, elágazódásában és a CD kialakulásában (Grieshammer és mtsai, 2004; Kramer és mtsai, 2001). A növekedés és elágazódás során a medulláris és corticális UB az embrionális/foetális, MM-mal vesében PC és IC progenitor sejtekre jellemző géneket expresszál, fokozatosan kialakul a kortikális és medulláris gyűjtőcsatorna. Azonban az elágazódó UB tip sejtjei megtartják a „stem cell” jellegüket. Ezek a sejtek képezik a rezervoárt a további, folyamatos növekedéshez és elágazódáshoz, amely ahhoz szükséges, hogy a kb 200 000-től 2 millió nefronból álló vese létrejöhessen (Puelles és mtsai, 2011).

A fejlődő vese nefrogén zónájában az UB közvetlen kapcsolatba kerül a MM-mal. Kölcsönhatás útján elindul az MM epitélizációja, azaz kialakul a RV és az SSB a disztális, intermediér és proximális doménnal. A MET után az SSB disztális doménjének kapcsolatba kell kerülni az elágazódó UB-vel, hogy felépülhessen a működőképes nefron. ROBO1 által közvetített „chemo-repellent” szignál a SLIT2 ligandot kifejező SSB-t a megfelelő pozícióba juttatja, hogy az UBT tipből kinövő CNT prekursor sejtekkel összeköttetésbe kerülhessen. Ez a komplex folyamat az alapja a normál nefron kifejlődésének. Ahogy az UB tip sejtjei differenciálódni tudnak IC, illetve PC progenitor sejteknek, hogy létrejöjjön a CD összetett mozaik felépítése, az UB tip valószínűleg rendelkezik olyan molekuláris programmal, amely CNT-t eredményező differenciálódáshoz vezet, amikor az kapcsolatba kerül az SSB-vel. Ez lehet a magyarázata annak, hogy a CNT és a CCD azonos PC és IC sejtek mozaik szerkezettel rendelkeznek felnőtt vesében.

5.1.3. Az IC és a PC progenitor sejtek már a főtális vesében kifejezik a CA2 és AQP2 géneket

A CA2 and AQP2 pozitivitás jellemzi azokat a progenitor sejteket, amelyek elkötelezettek a differenciálódott, működő IC és PC kialakulására mind a CD mind a CNT nefron szeg-mentekben. Vizsgálataink az UB trunk, fejlődést tekintve fiatalabb kortikális doménjében kifejezett CA2 pozitív festődést találtunk, amely a kivezető csatorna differenciálódásával a medulláris szakaszban már csak elvétve adott pozitív festődést. Ezzel ellentétben a kortikális UB trunk csak gyenge AQP2 immunreakciót mutatott, viszont az AQP2 a medulláris kivezetőcsőben már erős, diffúz festődést mutatott. Tehát a CA2 festődés erős-sége és gyakorisága a kortikális doméntól a medulláris domén irányában csökkent, míg az AQP2 kifejeződése a kortikális szakasztól fokozatosan erősödött a medulláris domain irányába. Az AQP2 és CA2 nem fejeződik ki főtális vese más tubuláris sejtjein. Ezek a megfigyelések jól tükrözik a CA2 és AQP2 gének időbeni és térbeni (spatiotemporal) ki-fejeződését és ennek jelentőségét a disztális tubuláris rendszer kialakulásában.

Amikor a kezdeti UB elkezdi elongálódni és elágazódni, a folyamatosan növekvő kivezető csatorna egy UB tip és törzs domainre oszlik. Az UB tip sejtjei specifikus génexpresszió befolyása alatt rendelkeznek önmegújító tulajdonsággal (self-renewing capacity) és így biztosítják az UB növekedéséhez és az elágazásához szükséges sejteket, amíg a vese fejlődése be nem fejeződött (Schmidt-Ott és mtsai, 2005; Packard és mtsai, 2013).

Azok a sejtek, melyek a tip növekedése és elágazódása mögött visszamaradnak a trunk domainben, elveszítik azon gének expresszióját, amelyek a folytonos növekedéshez szükségesek és fokozatosan CA2 pozitív epithelial sejtekké alakulnak. Amikor a nefrogén zóna és az UB növekedés és elágazódás a vese tokja felé halad, az UB törzs CA2 pozitív sejtjei fokozatosan differenciálódnak AQP2 pozitív sejtekké. Ebben a viszonylatban a CA2 pozitív kortikális tubulusok képviselik a legfiatalabb, ezzel szemben a medulláris AQP2 pozitív tubulusok pedig az UB törzs legrégebbi szegmentjét. Mind a kortikális mind a medulláris kivezetőcsőben további differenciálódás során kialakulnak a végleges specifi-kus működésű PC és IC sejtek.

5.1.4. A PC és IC sejtek fejlődési útjának javasolt formája

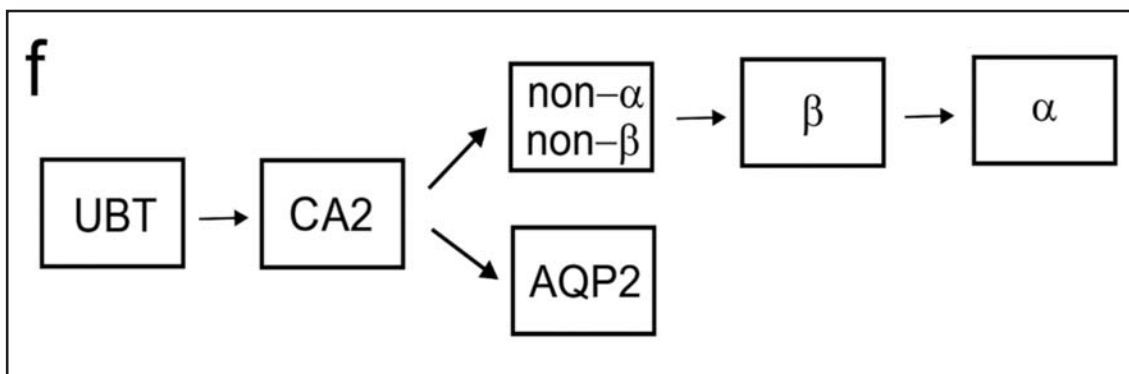
Számos modellt közöltek a PC és IC sejtek kialakulásáról, amelyek nagy része egér kísérletek vagy in vitro vizsgálatok eredményeire támaszkodik. Az egyik elmélet szerint az UB sejtekből egyrészt AQP2 pozitív PC sejtek indulnak ki, másrészt a Notch szignál kikapcsolódása után proto-IC sejtek keletkeznek, amelyek tovább differenciálódnak β -IC és α -IC sejtekké (Al Awqati és Gao, 2011). Egy másik tanulmány is arra a következtetésre jutott, hogy az IC sejtek az AQP2 pozitív PC sejtekből alakulnak ki (Wu et al. 2013). Az AQP2 expresszáló sejtek már korán megjelennek a főtális egér vesében, ezért arra gondoltak, hogy a PC jelenik meg legelőször, és ebből fejlődnek ki az IC sejtek (Treppiccione és mtsai, 2016). Az „egy-sejt-szekvenálási technikával” azt találták, hogy az AQP2 expressziója megelőzi a CA2 expressziót, humán főtális vesében (Wang és mtsai, 2018). Arra következtettek, hogy az AQP2 pozitív sejtekből alakulnak ki a PC sejtek, és az átmenetileg AQP2/CA2 dupla-pozitív sejtek további differenciálódása vezet az IC sejtek kialakulásához.

Az IC sejteket a transporter proteinek expressziójával, úgymint a vATPases, az SLC4A1 és az SLC26A4 lehet azonosítani (Roy és mtsai, 2015). A vATPase már a 8. gesztációs héten megjelenik humán vese medulláris tubulusában (Hiatt és mtsai, 2010). Saját anyagunkban az IC sejtekre specifikus ATP6V1D1 gén expressziója az UB törzsben már megjelent a 10. hetes terhességből származó vesében. A 10–15 hetes vesékben a tubulusok felszínén észlelhető finom vonalas festődés mellett néhány sejt ATPase expressziót mutatott az apical plasma membránon, hasonlóan a felnőtt vesében látható szignálhoz.

Eredményeink arra utalnak, hogy IC sejtek a korai terhesség idején differenciálatlan fenotípust mutatnak. A differenciálódott, működőképes β -IC sejtre jellemző SLC26A4 (pendrin) csak a 17 hetes vesében fejeződött ki először, és ugyanezek a vesék vATPase pozitivitást is mutattak. Az SLC4A1, α -IC sejt marker csak jóval később, a 26 hetes terhességből származó vesében fejeződik ki először (Hiatt és mtsai, 2010). Ez az adat is alátámasztja, hogy a β -IC sejtek megjelenése megelőzi a α -IC sejtét.

Vizsgálataink alapján bizonyítottnak látjuk, hogy a kortikális UB CA2 pozitív progenitor sejtjeiből először ATPase és SLC26A4 pozitív non α /non β IC sejtek alakulnak ki, amelyek tovább differenciálódnak β -IC sejtekké, amelyekből később kialakulnak α -IC sejtek. Ezt a fejlődési útvonalat már harminc évvel ezelőtt jól dokumentálták in vitro ki-

sérletekkel (Fejes–Tóth és Náray–Fejes–Tóth 1992, 1993). A β -IC a vér pH savas csökkentésével átalakulnak α -IC sejtekre in vivo körülmények között a vér semleges pH biztosítására (Gao és mtsai, 2010). Ezek a differenciálódási folyamatok kizárólag a CNT és CD doménben figyelhetők meg, más nefron szakaszokban nem fordulnak elő.



18. ábra

Az UB ampulla javasolt differenciálódási lépései

5.1.5. Szegment specifikus gének vizsgálata felnőtt vesében megerősíti a CNT és CCD közös eredetét

Felnőtt vesék nefronjainak különböző morfológiai és funkcionális szegmenseit (Roy és mtsai, 2016) antitest jelöléssel vizsgáltuk. Az eredményeket az 1. számú táblázatban foglaltuk össze.

A TMEM27, amely a proximal tubularis sejtek strukturális fehérjéi, kizárólag a proximal tubulusok területén expresszáldott, ugyanakkor a *POU3F3* a Henle-kacs, a macula densa és a disztális kanyarulat csatornában volt kimutatható, de nem volt jelen a CNT-ben.

A SCEL csak a DCT területére korlátozódott, a macula densa és a CNT negatív volt.

A CA2 expresszió a CCD területén volt a legintenzívebb, kevésbé CNT és OMCD lokalizációban, de egyáltalán nem volt detektálható IMCD területén.

Az AQP2 pozitív sejtek festődési intenzitása és száma az IMCD és az OMCD területén volt a legkifejezettebb, kevésbé volt észlelhető a CCD és a CNT területén. A CALB1 expressziója intenzív volt a CCD- nek megfelelően és gyenge volt CNT-ban, valamint teljesen negatív volt az OMC és a IMCD lokalizációban.

Az α - and β -IC a CNT és CCD területén mutatott pozitív festődést SLC4A1 és SLC26A4 antitesttel. Az OMCD sejtek gyengén festődtek, ugyanakkor az MCD sejtek negatívak voltak α - és β -IC azon markereivel, melyeket ebben a vizsgálatban használtunk. Érdekes módon a β -IC marker SLC26A4 expresszáldott a CCD és CNT területén, de az OMCD vagy az IMCD negatív volt. Összességében azt találtuk, hogy a PC és az IC markerek karakterisztikusak mind a CCD, mind pedig CNT struktúrára. Érdekes módon felnőtt és a főtális vesében a PC and IC száma és disztribúciója hasonló volt.

Az AQP2 pozitív sejtek száma magas volt a medullaris, illetve az OMCD és az IMCD régióban és alacsony volt a kortikális CD és CNT struktúrában.

A felnőtt vesében a PC fokozatosan növekedett számú, az IC csökkent számú volt a medulla felé haladva, ahogy az a főtális vesében UB szárban differenciálódás során észlelhető. Az IC sejtek száma legmagasabb a CNT és CCD struktúrában, alacsony az OMCD területén és egyáltalán nincs IC az IMCD-nek.

5.1.6 A CNT és CD sejtek plaszticitása

Szövetteni vizsgálattal igazolt sejtek mikrodisszekcióját követő egy sejt expressziós tanulmány a disztális és kivezető tubulusok átmenetén egérben különböző sejt típusokat azonosítottak, ami arra utalhat, hogy a sejtek reprogramozzák génexpressziójukat in vivo (Ransick et al. 2019). Továbbá kimutatták, hogy a humán disztális nefron szegmens sejtek meghatározott sejtenyészési körülmények között UB sejtekhez hasonló citológiát mutatnak (Howden et al. 2021). Egy másik egysejt szekvenálást alkalmazó tanulmány több PC-IC sejt hibridet és több IC sejt szubtypust azonosított. Rövid UPEC kezelés után a sejtek megváltoztatták RNA expressziójukat (Saxena et al. 2021). „Knock out” kísérlet és ezt követő immunhisztológiai vizsgálat alátámasztotta a kivezető csatorna sejtjeinek plaszticitását egérben (Pannequin et al 2018, Werth et al 2017).

Az IC és a PC sejtek plaszticitását kutatásunk megerősítette. A PC és IC sejtek száma változott egyes CNT és CD tubulusokon belül, valamint különböző vesék tubulusaiban. Emellett a CA2 pozitív prekursor sejtek aránya is változott tubulusonként mind a CNT, mind a CD sejtjei között. A kísérletes munkákat és megfigyelésünket emberi vesékben figyelembe véve valószínű, hogy a CNT és CD sejtjei azonos molekuláris programmal bírnak, és a víz- és elektrolit háztartás szükségletének megfelelően működésüket átprogra-

mozhatják. Összefoglalva, a disztális nefron (CNT és CD) sejtjei a többi nefron szakasztól eltérően jelentős citomorphológiai és működési plaszticitást mutatnak.

5.2. A Wilms tumor eredete

5.2.1 Az uréter bimbó (UB) szerepe a főtális vese kialakulásában

Célunk az volt, hogy megállapítsuk az UB sejtjeinek jelenlétét NR-ben és WT-ban. Ezért először megvizsgáltuk az ismert UB markerok kifejeződését különböző terhességi hétből származó főtális vesékben. RET, KRT17 és ROBO kizárólag az UB-ban és a növekedés során a medulláris régió felé egyre kifejezettebben differenciálódó kivezető tubulusokban adott pozitív immunreakciót. A vese növekedési régiójában előforduló blasztémális sejtek és az MM-eredetű epiteliális elemek, mint a vese vezikulum (RV), CSB és az S-shape body (SSB) negatív maradt mindhárom vizsgált antitesttel.

A tyrosine kinase RET transzmembrán receptor kapcsolódása a ligandjához, a GDNF-hez a feltétele annak, hogy a vesefejlődés korai szakaszában a ND-ből a kezdeti UB kifejlődjön. A GDNF/RET szignál a ND sejtek növekedését és irányított mozgását szabályozza, amely végül a kezdeti UB kialakulásához vezet (Chi et al. 2009). Amennyiben RET funkciója miatt kiesik, a vese nem fejlődik ki (Skinner et al. 2008). Az UB formáció kezdeti szakaszában a SLIT/ROBO szignál „axon guidance” jelet biztosít, represszálja az ektópiás UB túlnövekedést a ND-ből azáltal, hogy meggátolja a GDNF expressziót a metanephric mesenchymában. (Grieshammer et al. 2004). Azok a mutáns egerek, melyekben hiányzik a Slit2 és a Robo2, számfeletti UB fejlődést mutatnak, melyek nem tudnak megfelelően kapcsolatba kerülni a nephritic ducttal (Costantini és Kopan, 2010). A ROBO szignál kiesése húgyúti fejlődési rendellenességhez vezet (Lu és mtsai, 2007)

Az UB növekedése, mely a sejt proliferáció következménye, az UB és az UB törzs szakaszán történik, melyek közül az UB az elágazódási fázisban, az UB törzs a CD elongációjában játszik szerepet (Karner et al. 2011). A növekedés és elágazódási fázisban a RET az UB végén fejeződik ki, amelyet körülvesz a MM, ami a neurotrophic factor GDNF ligandot szekretálja. Ez a GDNF/RET signalling kezdeményezi nemcsak az UB kialakulását a ND-ből, de meghatározza az UB szabályos elágazódását a vese fejlődése során. A GDNF/RET szignálon kívül az MM számos gént szekretál, amelyek az UB és kivezető tubulusok kialakulását szabályozzák (Costantini és Sakiya, 2006).

A SLIT2/ROBO1 jelátviteli rendszer fontos szerepet játszik, az UB szabályozott kifejlődésében, az UB növekedésében és eloszlásában, valamint a kivezető tubulusok fejlődésében is. ROBO1 a vese növekedési régiójában az UB sejtek felszínén fejeződik ki. A SLIT2 az UB sejteiben, extracellulárisan, és az MM-ből származó RV, CSB és SSB sejtek membránján is kifejeződik. Az UB sejteinek ROBO1/SLIT2 expressziója egy chemorepellens (gátló) szignált ad. A kezdeti CNT kialakulása után a ROBO1/SLIT2 jelátviteli rendszer az SSB distális doménjét a megfelelő helyzetbe hozza, hogy kapcsolódni tudjanak. Ezáltal lehetővé teszi a normál nefron fejlődését. A SLIT2/ROBO1 jelátvitelnél számos más szerepe is van, mint például az angiogenesis vagy a duktusok elágazódását az emlőmirigyben (Macias et al 2011).

A 46-47 kDa I típusú KRT17 egy humán többrétegű epithélialis stuktúrákban kifejeződő basal/myoepithélialis sejt keratin (Moll és mtsai, 2008; Troyanovsky és mtsai, 1989). Mi azt találtuk, hogy a KRT17 expresszálódik a vese egyrétegű CD sejteiben is. A KRT17 expressziója a főtális vesében az UB és UB származék kezdeti kivezető tubulusok sejteire, valamint felnőtt vesében a CNT és CD sejteire korlátozódik (Sarlós és mtsai, 2017). A KRT17 a többrétegű epithélben a sejtek differenciálódását szabályozza és így epithélialis „stem cell” markernak tekinthető. Ezen kívül a KRT17 stressz-reaktív protein, amely szerepet játszik a sejtnövekedésben azáltal, hogy szabályozza a fehérje szintézist (Kim és mtsai, 2006; Toivola és mtsai, 2009). A KRT17 pontos szerepe az UB fejlődésében és elágazódásában még nem tisztázódott. Munkánkban, mint egy UB sejteket jelző markert alkalmaztuk.

Az UB növekszik a sejt proliferációval a tip és a trunk területén: az előbbi a rapid branching fázisban dominál, az utóbbi a CD elongáció szakaszában (Karner és mtsai, 2011). Az UB csúcsának gyors proliferációja megnöveli a terminális ampulla méretét, ami aztán újabb elágazódásokhoz vezet (Constantini és Kopan, 2010). Ahogy UB növekszik, az egyben a legproximálisabb UB tőptől a legtávolabbi distal domain (e.g. UB törzs) irányában differenciálódik és előbb CA2, majd AQP2 pozitívítást mutat. Gyakorlatilag az UB ampulla sejtek progenitorként szolgálnak az egész kivezető tubulus kialakulására (Shakiya és mtsai, 2005). Az ampulla sejtekből kiinduló UB törzs differenciálódása különböző gének időben és térben meghatározott kifejeződésével függ össze (Schmidt–Ott és mtsai, 2005). Számos UB ampulla specifikus gén részt vesz a növekedésben és szabályozott elágazódásban, ugyanakkor számos UB törzs specifikus gén, mint például az ioncsatorna gének kifejeződése a meghatározott működéssel rendelkező PC és IC sejtek ki-

alakulásához vezet. Azok a sejtek, amelyek kezdetben az elongált elágazások ampullájában helyezkednek el, részben tovább proliferálnak, részben az UB törzs sejtjeinek differenciálódásában vesznek részt. Ez a jelenség arra utal, hogy az UB ampulla egy sejt-reservoir a sejtek bi-potenciális jellegével, melyekből további ampulla sejtek származnak részben a CD törzs, azaz CD sejtek kialakulásához vezetnek. Az UB ampulla sejtjei magas proliferációs képességgel rendelkeznek, és így biztosítják a kivezető tubulusok kialakulását.

Összefoglalva: a RET, ROBO1, SLIT2, és KRT17 géneknek jelentős szerepük van a normál kivezető tubulusok és nefron kialakulásában. Így érthető, hogy amennyiben zavar következik be ezeknek a géneknek térbeli és időbeli kifejeződésében, vagy hiányában, az a vesefejlődés zavarához, illetve tumor kialakulásához vezethet.

5.2.2. Uréter bimbó (UB) származékok nefrogén maradványokban és Wilms tumorban

Korábbi vizsgálatok már utaltak rá, hogy a WT-ban és NR-ben is UB sejtjeire emlékeztető tubulusok is előfordulnak (Stupár és mtsai, 2007; Fukuzawa és mtsai, 2017; Sárkány és mtsai, 2020). Vizsgálataink egyértelműen bizonyítják az NR és WT összetett eredetét a MM és UB ampulla sejtjeiből. Ezen kívül rámutattunk arra, hogy a NR-ben és WT-ban előforduló UB származékok az UB ampulla részleges differenciálódásából származnak. Az UB specifikus gének, mint a ROBO1, SLIT2, RET and KRT17 kifejeződése a szabálytalanul proliferáló tubuláris sejtekben, amelyek néha az UB elágazását is utánozzák, egyértelműen arra utal, hogy az UB ampulla integrális része a MM és UB köcsönhatás zavara miatt kialakult tumornak. Ezek a sejt elemek legtöbb esetben szerpentinszerűen proliferáló tumoros blasztémális sejtek közepén láthatók, így a főtális vese növekedési zónájában látható szövettani képre emlékeztetnek. Ezenkívül számos UB ampulla marker pozitív tubulus figyelhető meg a fibrotikus tumor strómában is. A blasztémális sejtek, primitív RV, a strómális sejtek a MM-ből származnak. Így az eredmények egyértelműen bizonyítják az NR és WT eredetét a MM és UB ampulla sejtjeiből.

5.2.3. Az UB ampulla sejtjei képesek differenciálódni a nefrogén maradványokban és Wilms tumorban

Megvizsgáltuk, hogy az UB ampulla sejtjei képesek-e tumoros körülmények közt a normál főtális veséhez hasonlóan differenciálódni. ROBO1, SLIT2, RET és KRT17 pozitív immunreakció nemcsak UB ampullaszerű tubulusokban hanem megnyúlt, hosszabb, sőt

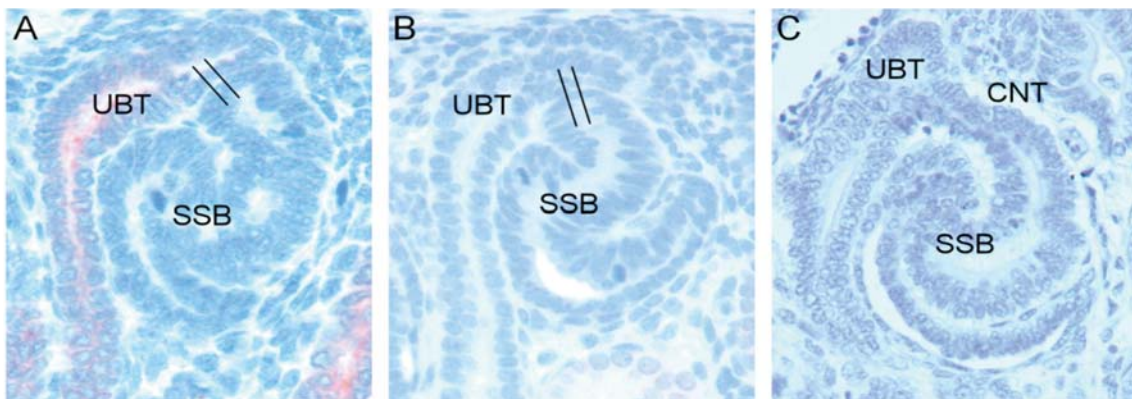
cisztikusan tárgult tubulusokban is előfordult. Az utóbbiak már az UB törzs, azaz a kezdődő CD sejteire emlékeztetnek. Ugyanezek a tubuláris képletek sejtjei erős CA2 pozitivitást mutattak, amely arra utal, hogy az UB-származékok NR-ben és WT-ban, csakúgy, mint a normál főtális vesében, képesek tovább differenciálódni. Normál főtális vesében a CA2 pozitív sejtek a PC és IC sejtek prekursorának felelnek meg. A CA2 pozitív sejtek elsősorban a vese fejlődésének fiatalabb szakaszában az UB ampulla közeli kortikális tubulusokban fordulnak elő. Ahogy a kialakuló kortikális régió fokozatosan távolodik a medulláris régiótól, a CA2 pozitív prekursor sejtek fokozatosan AQP2 pozitív PC sejtekké differenciálódnak, amelyek a medulláris CD speciális élettani működésű sejteinek jelentős részét teszik ki. Ez a folyamat az UB differenciálódás végstádiumának tekinthető és ez a differenciálódás ad arra magyarázatot, hogy a NR és WT sejtjei között nem láthatók AQP2 pozitív sejtek.

A CA2 sejt nemcsak a PC sejtek, hanem az α - és β - IC sejtek prekursora is. Normál főtális vese kortikális régiójában először non- α non- β éretlen IC sejtek jelennek meg, amelyek később működőképes β - és α -IC sejtekké differenciálódnak. Vizsgálatunk során pozitív immunreakciót figyeltünk meg az ATP6V1B1 és az ATP6V0D2 antitestekkel mind NR, mind WT sejtekben, amely az éretlen, még nem differenciálódott IC sejtek jelenlétére utal. Azonban az AQP2 pozitív PC sejtekhez hasonlóan, nem sikerült SLC4A1 és SLC26A4 pozitív érett, működőképes β - és α -IC sejteket azonosítani sem NR-ben, sem WT-ban. Eredményünk azt mutatja, hogy az UB ampulla sejtjei képesek korlátozott differenciálódásra tumoros körülmények között is. Ez a folyamat tulajdonképpen megfelel a MM korlátozott differenciálódásának NR-ben és WT-ban, amit a blasztémális sejtek mellett a RV, sőt SSB szerű képletek jelenléte is igazol.

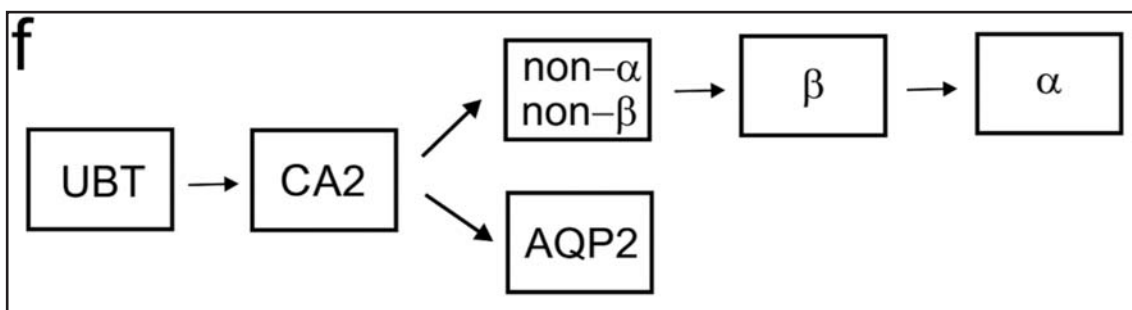
6. KÖVETKEZTETÉSEK

6.1. Az összekötő csatorna eredete

Hipotézisünket, hogy a CNT az UBT-ből indul ki, a főtális vesék H&E festett szövettani metszeteinek megfigyelésére alapoztuk. Ennek alapján *a humán főtális vesében az uréter bimbóból kinövő sejtek irányítottan csatlakoznak az SSB distális doménjéhez és nem fordítva.* (Ezt a folyamatot az alábbi ábra szemlélteti).



Immunhisztológiai vizsgálattal egyértelműen bebizonyítottuk, hogy az összekötő tubulus (CNT) emberi vesében az UBT sejtjeiből alakul ki, és így a disztális nefron szerves része. Az UB ampulla (UBT) sejtjei először CA2 pozitív precursor sejtékké differenciálódnak, amelyek az UB növekedése és elágazódása során a fejlődésileg idősebb, medulláris gyűjtőcsatornáknak AQP2 pozitív PC sejtéket, míg a fiatalabb kortikális régióban először differenciálatlan non- α non- β -IC, majd pedig β -IC és α -IC sejtéket képeznek. Ez a differenciálódási folyamat az alábbi ábrán látható:



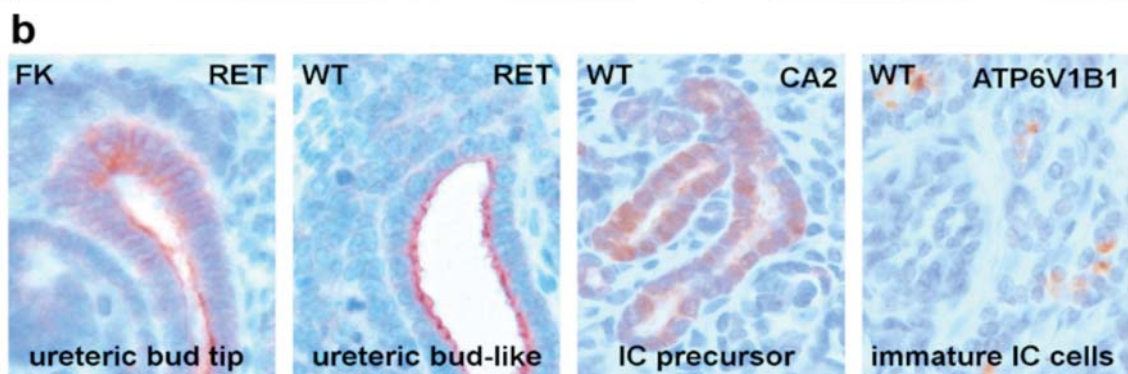
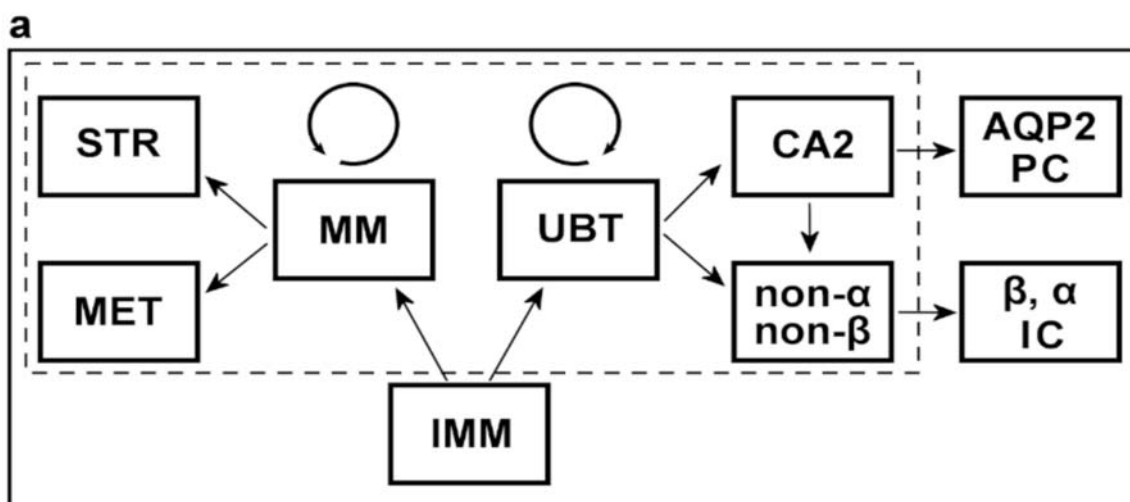
(Sárkány és Kovács, Histochem Cell Biol, etc 2021)

6.2. A Wilms tumor eredete

Az irodalomban elfogadott tény, hogy a NR és WT blasztémális sejtekből indul ki. A WT definíciója (WHO 2016): “Nephroblastoma is a malignant embryonal neoplasm derived from *nephrogenic blastemal cells*”.

Mi egyértelműen kimutattuk, hogy a Wilms tumor kialakulásában az UB ampulla sejtei is részt vesznek, amelyek tumoros körülmények között is képesek differenciálódni. Ezért a WHO meghatározás nem felel meg valóságnak. Javasoljuk a WT meghatározására: *“Wilms tumor is a malignant embryonal neoplasm derived from pluripotential cells of nephrogenic blastema and of ureteric bud”*. A WT és NR kialakulásának alapvetően új szemléletét az alábbi ábrán foglaltuk össze:

Differentiation of ureteric bud tip in Wilms' tumour



(Sarkany és mtsai, közlésre elküldve)

7. IRODALOMJEGYZÉK

- 1 **Al Awqati Q.** Cell biology of the intercalated cell in the kidney. *FEBS Letters* 587:1911–1914(2013).
- 2 **Al Awqati Q, Gao X.** Differentiation of intercalated cells in the kidney. *Physiology* 26:266–272 (2011).
- 3 **Alami J, Williams BRG, Yeger H.** Expression and localisation of HGF and met in Wilms tumours. *J. Pathol.* 196:76–84 (2002).
- 4 **Argani P, Bruder E, Dehner L, Vujanic GM.** Nephroblastic and cystic tumours occurring mainly in children. In *WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*, Moch, H. Humphrey, P.A. Ulbright, T.M. Reuter, V.E. (eds). IARC Press: Lyon, pp. 48–53, (2016).
- 5 **Bard JBL, Gordon A, Sharp L, Sellers WI.** Early nephron formation in the developing mouse kidney. *J. Anat.* 199:385–392 (2001).
- 6 **Beckwith JB, Kiviat NB, Bonadio JF.** Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. *Pediatric Pathology* 10:1–36 (1990).
- 7 **Beckwith JB.** Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms' tumor: developmental and clinical considerations. *Am. J. Med. Genet.* 79:268–273 (1998).
- 8 **Beckwith JB.** Precursor lesions of Wilms tumor: clinical and biological implications. *Med. Pediatr. Oncol.* 21:158–168 (1993).
- 9 **Blomquist SR, et al.** Distal renal tubular acidosis in mice that lack of forkhead transcription factor Fox11. *J. Clin. Invest.* 113:1560–1570 (2004).
- 10 **Bove KE, McAdams A.** The nephroblastomatosis complex and its relationship to Wilms' tumor: a clinicopathologic treatise. *Perspect. Pediatr. Pathol.* 3:185–223, (1976).
- 11 **Boyle S, et al.** Fate mapping using Cited1-CreERT2 mice demonstrates that the cap mesenchyme contains self-renewing progenitor cells and gives rise exclusively to nephronic epithelia. *Dev. Biol.* 313:234–245 (2008).

- 12 **Brunskill EW, Park JS, Chung E, Chen F, Magella B, Potter SS.** Single cell dissection of early kidney development: multilineage priming. *Development* 141: 3093–3101 (2014).
- 13 **Carroll TJ, et al.** Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Developmental Cell* 9:283–292 (2005).
- 14 **Chi X, et al.** Ret-dependent cell rearrangements in the Wolffian duct epithelium initiate ureteric bud morphogenesis. *Developmental Cell* 17:199–209 (2009).
- 15 **Connheim J. Vorlesungen über allgemeine Pathologie.** Berlin August Hirschwald p.737, (1882).
- 16 **Costantini F.** Renal Branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. *Differentiation* 74:402–421 (2006).
- 17 **Costantini F, Kopan R.** Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Developmental Cell* 18:698–712 (2010).
- 18 **Costantini F, Shakya R.** GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *Bioessays* 28:117–127 (2006).
- 19 **Davidoff AM.** Wilms tumor: *Adv. Pediatr.* 59:247–267 (2012).
- 20 **Dressler GR.** The cellular basis of kidney development. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 22:509–529 (2006).
- 21 **Dressler GR.** Advances in early kidney specification, development and patterning. *Development* 136:3863–3874 (2009).
- 22 **Fejes-Toth G, Naray-Fejes-Toth.** Differentiation of the renal beta-intercalated cells to alpha-intercalated and principal cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:5487–5491 (1992).
- 23 **Fejes-Toth G, Naray-Fejes-Toth.** Differentiation of intercalated cells in culture. *Pediatr. Nephrol.* 7:780–784 (1993).
- 24 **Fujimura S, Jiang Q, Kobayashi C, Nishinakamura R.** Notch2 activation in the embryonic kidney depletes nephron progenitors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21:803–810 (2010).

- 25 **Fukuzawa R, Anaka MR, Morison IM, Reeve AE.** The developmental programme for genesis of the entire kidney is recapitulated in Wilms tumour. *PloS ONE* 12 (10): e0186333 (2017).
- 26 **Fukuzawa R, et al.** Myogenesis in Wilms' tumors is associated with mutations of the WT1 gene and activation of Bcl-2 and the Wnt signaling pathway *Pediatr. Dev. Pathol.* 7:125–37 (2004).
- 27 **Fukuzawa R, et al.** Wilms tumour histology is determined by distinct types of precursor lesions and not epigenetic changes, *J. Pathol.* 2015:377–387 (2008).
- 28 Gao X, et al. Deletion of *hensin/DMBT1* blocks conversion of b- to a-intercalated cells, and induces distal renal tubular acidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:21872–21877 (2010).
- 29 **Georgas K, et al.** Analysis of early nephron patterning reveals a role for distal RV proliferation in fusion to the ureteric tip via a cap mesenchyma-derived connecting segment. *Dev. Biol.* 332:273–286 (2009).
- 30 **Georgas K, et al.** Use of dual section mRNA in situ hybridisation/immunocytochemistry to clarify gene expression patterns during the early stages of nephron development in the embryo and in the mature nephron of the adult mouse kidney. *Histochem. Cell Biol.* 130:927–942 (2008).
- 31 **Grieshammer, U. et al.** SLIT2-mediated ROBO2 signalling restricts kidney induction to a single site. *Dev. Cell* 6:709–717 (2004).
- 32 **Hiatt MJ, Ivanova L, Toran N, Tarantal AF, Matsell DG.** Remodeling of the fetal collecting duct epithelium. *Am. J. Pathol.* 176:630–637 (2010).
- 33 **Howden SE, et al.** Plasticity of distal nephron epithelia from human kidney organoids enables the induction of ureteric tip and stalk. *Cell Stem Cell* 28:671–684 (2021).
- 34 **Hoy WE, et al.** Nephron number, glomerular volume, renal disease and hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 17:258–265 (2008).
- 35 **Imai M.** The connecting tubule: A functional subdivision of the rabbit distal nephron segments. *Kidney Int.* 15:346–356 (1979).
- 36 **Kaissling B, Kriz W.** Structural analysis of the rabbit kidney. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 56:1–123 (1979).

- 37 **Kao RM, Vasilyev A, Miyawaki A, Drummond IA, McMahon AP.** Invasion of distal nephron precursors associates with tubular interconnection during nephrogenesis. *J Am. Soc. Nephrol.* 23:1682-1690 (2012).
- 38 Karner CM, et al. Canonical Wnt9b signaling balances progenitor cell expansion and differentiation during kidney development. *Development* 138:1247–1257 (2011).
- 39 Kidd T, Bland KS, Goodman CS. Slit is the midline repellent for the Robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96:785–794 (1999).
- 40 **Kim S, Wong P, Coulombe PA.** A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature* 441:362–365 (2006).
- 41 **Kispert A, Vainio S, McMahon AP.** Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* 125:4225–4234 (1998).
- 42 **Kobayashi A, Valerius MT, Mugford JW, et al.** Six2 defines and regulates the multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development. *Cell Stem Cell* 3:169–181 (2008).
- 43 **Kopan R, Turner DL.** The Notch pathway: democracy and aristocracy in the selection of cell fate. ***Curr. Opin. Neurobiol.* 6:594–601 (1996).**
- 44 **Kramer SG, Kidd T, Simpson JH, Goodman CS.** Switching repulsion to attraction: changing responses to SLIT during transition in mesoderm migration. *Science* 292: 737–740 (2001).
- 45 **Li CM, et al.** Gene expression in Wilms’ tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am. J. Pathol.* 160:2181–2190 (2002).
- 46 Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F “GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons”. *Science.* 260: 1130–1132 (1993).
- 47 **Lindström NO, et al.** Conserved and divergent molecular and anatomic features of human and mouse nephron patterning. *J. Am. Soc. Nephrol.* 29:825–840 (2018).
- 48 **Little MH.** Improving our resolution of kidney morphogenesis across time and space. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 32:135–143 (2015).

- 49 **Little MH, McMahon P.** Mammalian kidney development: principles, progress, and projections. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1:a008300 (2012).
- 50 **Lu WN, et al.** Disruption of ROBO2 is associated with urinary tract anomalies and confers risk of vesicoureteral reflux. *Am. J. Hum. Genet.* 80:616–632 (2007).
- 51 **Macias H. et al.** SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number. *Dev. Cell* 20:827–840 (2011).
- 52 **Michos O. Kidney Development:** from ureteric bud formation to branching morphogenesis, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19:484–490 (2009).
- 53 **Minuth WW.** Shaping the nephron – a complex, vulnerable, and poorly explored backdrop for noxae impairing nephrogenesis in the fetal human kidney. *Mol. Cell. Pediatr.* 7:2 (2020).
- 54 **Moll R, Divo M, Langbein L.** The human keratins: biology and pathology. *Histochem. Cell. Biol.* 129:705–733 (2008).
- 55 **Morel M, Charbardes D, Imbert M.** Functional segmentation of the rabbit distal tubule by microdetermination of hormone-dependent adenylate cyclase activity. *Kidney Int.* 9:264–277 (1976).
- 56 **Mugford JW, et al.** High-resolution gene expression analysis of the developing mouse kidney defines novel cellular compartments within the nephron progenitor population. *Dev. Biol.* 333:312–323 (2009).
- 57 **Nakai S, et al.** Crucial role of Brn1 in distal tubule formation and function of mouse kidney. *Development* 130:4751–4759 (2003).
- 58 **Packard A, et al.** Luminal mitosis drives epithelial cell dispersal within the branching ureteric bud. *Dev. Cell* 27:319–330 (2013).
- 59 **Pannequin J, et al.** Single-cell transcriptomics of the mouse kidney reveals potential cellular targets of kidney disease. *Science* 360:758–763 (2018).
- 60 **Park JS, Valerius MT, McMahon AP.** Wnt/ β -catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. *Development* 134:2533–2539 (2007).
- 61 **Perlman EJ, Grosfeld JL, Togashi K, Boccon-Gibod L.** Nephroblastoma. In WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System

- and Male Genital Organs, Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. (eds). IARC Press: Lyon, IARC Press: Lyon, pp. 48–54 (2004).
- 62 Puelles VG, Hoy WE, Hughson M, et al. Glomerular number and size variability and risk for kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 20:7–15 (2011).
- 63 **Ransick A, et al.** Single cell profilin reveals sex, lineage and regional diversity in the mouse kidney. *Dev. Cell* 51:399–413 (2019).
- 64 **Reggiani L, et al.** The prepattern transcription factor *Irx3* directs nephron segment identity. *Genes Dev.* 20:2358–2370 (2007).
- 65 **Rivera MN, Haber DA.** Wilms tumor: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat. Rev. Cancer* 5:669–712 (2005).
- 66 **Roy A, Al-bataineh M, Pastor-Soler N.** Collecting duct intercalated cell function and regulation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10:305–324 (2015).
- 67 Santos OF, et al. Involvement of hepatocyte growth factor in kidney development. *Dev. Biol.* 163:525–529 (1994).
- 68 **Sarkany B, Kovacs G.** Connecting tubules develop from the tip of the ureteric bud in the human kidney. *Histochem. Cell Biol.* 156:555–560 (2021).
- 69 **Sarkany B, Kovacs G, Banyai D.** Ureteric bud-derivatives in Wilms’ tumor and nephrogenic rest. *In Vivo* 35:2159–2162 (2021).
- 70 **Sarlos DP, Yusenko MV, Peterfi L, Szanto A, Kovacs G.** Dual role of KRT17: development of papillary renal cell tumor and progression of conventional renal cell carcinoma. *J. Cancer* 10:5124–5129 (2017).
- 71 **Saxén L.** Organogenesis of the Kidney. Barlow PW, Green PB, Wylie CC. editors. Cambridge: Cambridge University Press, (1987).
- 72 **Saxena V, et al.** Kidney intercalated cells are phagocytic and acidify internalized uropathogenic *Escherichia coli*. *Nature Comm.* 12:2405 (2021).
- 73 **Schedl A.** Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat. Rev. Genet.* 8:791–802 (2007).
- 74 **Schmidt-Ott KM, et al.** Novel regulators of kidney development from the tip of the ureteric bud. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:1993–2002 (2005).
- 75 **Schuler D.** Magyar Gyermekek Tumor Regiszter (1971).

- 76 **Shakyr R, Watanabe T, Costantini F.** The role of GDNF/Ret signalling in ureteric bud cell fate and branching morphogenesis. *Cell. Dev.* 8:65–4 (2005).
- 77 **Sheldon H, et al.** Active involvement of Robo1 and Robo4 in filopodia formation and endothelial cell motility mediated via Wasp and other actin nucleation-promoting factors. *FASEB J.* 23:513–522 (2009).
- 78 **Skinner MA, Safford SD, Reeves JG, Jackson ME, Freemerman AJ.** Renal aplasia in humans is associated with RET mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 82:344–351 (2008).
- 79 **Stupar Z, et al.** Wilms' tumour may develop from impaired differentiation of the ureteric bud as well. *Histopathology* 51:265–268 (2007).
- 80 **Toivola DM, Strnad P, Habtezion A, Omary MB.** Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends Cell Biol.* 20:79–91 (2009).
- 81 **Trepiccione F, et al.** A fate-mapping approach reveals the composite origin of the connecting tubule and alerts on “single-cell”-specific KO model of the distal nephron. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 311:F901–F906 (2016).
- 82 **Troyanovsky SM, et al.** Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position. *J. Cell Sci.* 93:419–426 (1989).
- 83 **Vivante A, et al.** Single-gene causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in humans. *Pediatr. Nephrol.* 29:695–704 (2014).
- 84 **Vize PD, Woolf AS, Bard JBL.** *The Kidney: From Normal Development to Congenital Diseases.* Amsterdam, Boston: Academic Press (2002).
- 85 **Vounonvirta R, et al.** Expression of hepatocyte growth factor and its receptor Met in Wilms tumors and nephrogenic rests reflects their roles in kidney development. *Clin. Cancer Res.* 15:2723–2723 (2009).
- 86 **Vujanic GM et al.** The pathology of Wilms' tumour (nephroblastoma): the International Society of Paediatric Oncology approach. *J. Clin. Pathol.* 63:102–109 (2010).
- 87 **Vujanic GM et al.** The UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 Wilms tumour pathology and molecular biology protocol. *Nat. Rev. Urol.* 15:693–701 (2018).
- 88 **Wang P, Chen Y, Yong J, Wen L, Qiao J, Tang F.** Dissecting the global dynamic molecular profiles of human fetal kidney development by single cell RNA sequencing. *Cell Reports* 24:3554–3567 (2018).

- 89 Werth M, et al.** Transcription factor TFCP2L1 patterns cells in the mouse kidney collecting ducts. *Elife* 6:0–0 (2017).
- 90 Woolf AS, Winyard PJD.** Molecular mechanism of human embryogenesis: developmental pathogenesis of renal tract malformations. *Ped. Dev. Pathol.* 5:108–129 (2002).
- 91 Wu H, et al.** Aqp2-expressing cells give rise to renal intercalated cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24:243–252 (2013).

8. KÖZLEMÉNYEK

8.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke

1. Sarkany Beatrix, Kovacs Gyula. Connecting tubules develop from the tip of the ureteric bud in the human kidney.

Histochem. Cell Biol. 156:555-560 (2021). **IF: 4.304**

2. Sarkany Beatrix, Kovacs Gyula, Banyai D. Ureteric bud-derivatives in Wilms' tumor and nephrogenic rest.

In Vivo 35:2159-2162 (2021). **IF: 2.155**

3. Sarkany Beatrix, Kuthi Levente, Kovacs Gyula. Pluripotential cells of ureteric bud tip are involved in the development of nephrogenic rest and Wilms' tumor.

Scientific Reports (submitted)

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora **IF: 6.459**

Histochemistry and Cell Biology (2021) 156:555–560 <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02033-5>



Connecting tubules develop from the tip of the ureteric bud in the human kidney

Beatrix Sarkany¹ · Gyula Kovacs^{1,2}

Accepted: 4 September 2021 / Published online: 23 September 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

The connecting tubule (CNT) is a unique segment of the nephron connecting the metanephric mesenchyme (MM)-derived distal convoluted tubule (DCT) and ureteric bud (UB)-derived collecting duct (CD). Views on the cellular origin of the CNT in the human kidney are controversial. It was suggested that in mice, the connecting segment arises from the distal compartment of the renal vesicle (RV). However, there are several differences in embryonic development between the mouse and human kidney. The aim of our study was to establish the possible origin of the CNT in the human kidney. We analysed the expression of markers defining distinct cells of the CNT CD in foetal and adult human kidneys by immunohistochemistry. Based on microscopic observation, we suggest that CNT differentiates from the outgrowth of cells of the UB tip, and therefore the CNT is an integral part of the CD system. In the adult kidney, the CNT and CD consist of functionally and morphologically similar cells expressing α - and β -intercalated cell (IC) and principal cell (PC) markers, indicating their common origin.

Keywords Connecting tubules · Kidney development · Intercalated cells · Principal cells

Introduction

Morphological studies several decades ago suggested the existence of a connecting piece (*Verbindungsstück*) between the distal convoluted tubule (DCT) and cortical collecting duct (CCD), and demonstrated biochemical and physiological differences between the DCT and the connecting tubule (CNT) in rabbits (Kaissling et al. 1979; Morel et al. 1976; Imai 1979). The CNT is a unique segment of the nephron which connects the metanephric mesenchyme (MM)-derived DCT and ureteric bud (UB)-derived CCD. Most of our knowledge on the development of the CNT comes from studies on embryonic and adult mouse kidneys (Georgas et al. 2009; Mugford et al. 2009; Brunskill et al. 2014). As segment-specific expression of POU class 3 homeobox 3 (Pou3f3) transcription factor has been detected in the distal domain of the renal vesicle (RV) and also in the connecting segment, it was suggested that in mice, the connecting

segment arises from the distal compartment of the MM-derived RV (Bard et al. 2001; Georgas et al. 2009). The lack of ureteric tip (UT) marker calbindin 1 (Calb1) in the tubular segment connected to the RV further suggested that the connecting segment arises from the distal RV rather than the UT (Georgas et al. 2008).

The distal part of the nephron including the CNT, in contrast to other segments of the nephron, has functional and morphological heterogeneity (Al Awqati 2013). The mosaic structure consists of principal cells (PC) and intercalated cells (ICs), each expressing genes to maintain water and electrolyte homeostasis. Expression of water channel aquaporin 2 (AQP2) is restricted to PCs, whereas α -ICs display basolateral expression of the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger solute carrier family 4 member 1 (SLC4A1), and the β -ICs show apical expression of the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger solute carrier family 26 member 4 (SLC26A4). The apical expression of SLC26A4 and ATPase H^+ transporting V1 subunit B1 (ATP6V1B1) defines non- α /non- β ICs. Intercalated precursor cells express carbonic anhydrase 2 (CA2). These cell types occur exclusively in the CNT and collecting duct (CD) and cannot be seen in other segments of the nephron. Despite this finding, it was suggested that the CNT consists of a mixture of cells of the DCT and CCD (Hiatt et al. 2010).

✉ Gyula Kovacs
g.kovacs@gmx.de

¹ Department of Urology, Medical School, University of Pecs, Pecs 7621, Hungary

² Medical Faculty, Ruprecht-Karls-University, 69120 Heidelberg, Germany

The aim of our study was to establish the possible origin of the CNT in the human kidney. First we searched for the microscopic structure of the UB in foetal kidneys and subsequently analysed the expression of markers defining different cells of the CD system in foetal and adult human kidneys by immunohistochemistry. We showed that the development of the CNT in humans differs from the model described in mice and confirmed that the CNT and CCD are composed of cells occurring specifically in this segment of the nephron.

Materials and methods

Sample collection

Normal foetal kidneys were collected at 10 weeks ($n=2$), 12 weeks ($n=2$), 15 weeks ($n=2$), 17 weeks ($n=5$) and 21 weeks ($n=5$) of gestation, and adult kidneys were obtained from the Archive of the Institute of Pathology, Medical School Pecs, Hungary. All tissues were fixed in 4% buffered formaldehyde and embedded in paraffin. No known abnormalities were recorded for the foetal kidneys. The use of tissue samples for this study was approved by the Ethics Committee of the University Pecs, Hungary (no. 5343/2014). All procedures were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and with the 1964 Helsinki Declaration.

Immunohistochemistry

After removing the paraffin and rehydration, 4- μm -thick sections were subjected to heat-induced epitope retrieval in citrate buffer (pH 6.0) or EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (Dako/Agilent Technologies, Glostrup, Denmark) in a 2100 Retriever (PickCell Laboratories, Amsterdam, Netherlands). Endogenous peroxidase activity was blocked with EnVision FLEX Peroxidase Blocking Reagent (Dako) for 10 min at room temperature.

Slides were then incubated for 1 h with the primary antibodies listed in Table 1. We used antibodies marking PCs, precursors of ICs, and α - and β -ICs. EnVision FLEX horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Dako) was applied for 30 min at room temperature. The signal was visualized with aminoethyl carbazole (AEC) or 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Dako). Tissue sections were counterstained with Mayer's haematoxylin (Lillie's modification, Dako), and after 10 s bluing in ammonium hydroxide solution were mounted using PERTEX (MED-ITE GmbH, Burgdorf, Germany) or Glycergel (Dako). For negative control, the primary antibody was omitted. The immune reaction was evaluated by both authors. Photographs were taken using a Leitz DMRBE microscope (Leica/Leitz, Wetzlar, Germany), equipped with an HC plan apo 20 \times /0.70 objective, and a ProgRes C14 camera (Jenoptik, Jena, Germany).

Number of cell types in nephron segments

To estimate the percentage of cell types, we scored three adult kidneys stained with antibodies listed in Table 1. We identified areas containing CNT, CCD, outer medullary collecting duct (OMCD) and inner medullary collecting duct (IMCD) using a $\times 10$ objective. We then selected 10 tubules from each area using a $\times 25$ objective and counted the number of cell nuclei and cells stained positively with antibody. The number of positive cells varied between individual tubules; therefore, we calculated the mean value. We also observed differences in mean values among the three adult kidneys. The lowest and highest percentages observed in the three kidneys are presented in Table 2.

Table 1 Pertinent data of antibodies used in this study

	Antibody	Reference	Species	Clonality	Dilution	Source
LOH, MD, DCT	Anti-POU3F3	Anti-POU3F3-18,999-1-AP	Rabbit	Poly	1:200	Proteintech
PCs	Anti-AQP2	Anti-AQP2-PA5-38,004	Rabbit	Poly	1:500	Thermo Fisher
PCs	Anti-CALB1	Anti-CALB1-HPA023099	Rabbit	Poly	1:5000	Sigma-Aldrich
ICs	Anti-CA2	Anti-CA2-PA5-28,267	Rabbit	Poly	1:1000	Invitrogen
β -ICs	Anti-SLC26A4	Anti-SLC26A4-NBP1-60,106	Rabbit	Poly	1:200	Novus Biologicals
α -ICs	Anti-SLC4A1	Anti-SLC4A1-HPA015584	Rabbit	Poly	1:200	Sigma-Aldrich
α -ICs	Anti-ATP6V1B1	Anti-ATP6V1B1-EPR16401	Rabbit	Mono	1:2000	Abcam
α -ICs	Anti-ATP6V0D2	Anti-ATP6V0D2-NDBP2-31,600	Rabbit	Poly	1:100	Novus Biologicals
α -ICs	Anti-TMEM213	Anti-TMEM213-PA5-62,905	Rabbit	Poly	1:100	Invitrogen

LOH loop of Henle, MD macula densa, DCT distal convoluted tubule, PCs principal cells, ICs intercalated cells

Table 2 Number of cells (in %) expressing cell-specific gene products in human adult kidney

Gene	LOH	MD	DCT	CNT	CCD	OMCD	IMCD
POU3F3	90–100	100	40–60	0	0	0	0
AQP2	0	0	0	30–50	60–80	100	95–100
CALB1	0	0	0	20–40	30–70	0	0
CA2	0	0	0	30–50	100	80–90	0
SLC26A4	0	0	0	10–30	40–60	0	0
SLC4A1	0	0	0	20–60	40–70	0–20	0
ATP6V1B1	0	0	0	40–60	40–60	0–10	0
ATP6V0D2	0	0	0	20–40	40–70	20–40	0
TMEM213	0	0	0	30–50	30–60	10–20	0

LOH loop of Henle, *MD* macula densa, *DCT* distal convoluted tubule, *CNT* connecting tubule, *CCD* cortical collecting duct, *OMCD* outer medullary collecting duct, *IMCD* inner medullary collecting duct

Results

In the human kidney the ureteric bud tip (UBT) is connected to the distal compartment of the S-shaped body (SSB)

The expression of *Pou3f3* in the distal domain of the RV and the lack of UT-marker *Calb1* in the connecting segment in the mouse kidney suggested that the connecting segment arises from the RV. Therefore, we analysed the expression of the *POU3F3* and *CALB1* genes in human foetal kidneys. We did not find *POU3F3* expression in the RV stage in human foetal kidneys; it was first seen in the distal domain of the SSB (Fig. 1a). The UB tip (UBT) and the RV were consequently negative for *CALB1*, and the protein was expressed in the UB trunk (Fig. 1b).

We searched for a possible connection between the RV and UB in haematoxylin and eosin (H&E)-stained histological slides of foetal kidneys of different gestational ages. We did not detect any sign of fusion between the RV and UB. However, we observed several UBTs with outgrowth of the epithelial tubular structure towards the distal compartment of the SSB. The cuboid cells of the emerging CNT and SSB were flattened in the area of future fusion (Fig. 1c). In some of the slides, complete fusion between the UBT outgrowth and distal domain of the SSB was seen, with continuous lumen between the UBT and SSB (Fig. 1d).

PC and IC progenitor cell patterns in foetal kidneys

PCs and ICs occur exclusively in the CNT and CD. To establish the development of PCs and ICs in the foetal kidney, we applied immunohistochemistry for *AQP2* marking PCs and for *CA2* marking precursors of ICs. We found strong *CA2*-positive staining in the developmentally younger cortical domain of the UB trunk (Fig. 2a). In the medullary CD, only single cells displayed *CA2*-positive staining (Fig. 2a inset). In contrast to *CA2* expression, the cortical UB trunk

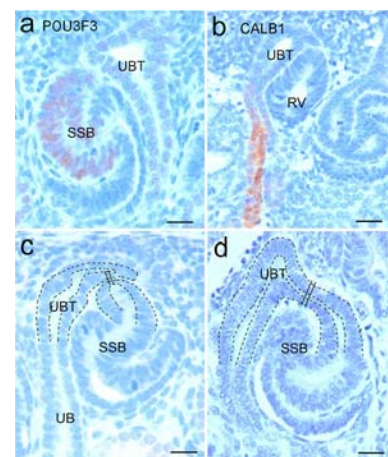


Fig. 1 Development of the CNT and *POU3F3* and *CALB1* expression in the foetal kidney. **a** Expression of *POU3F3* in the distal segment of the SSB, whereas the UBT remains negative. **b** *CALB1* is expressed in the UB trunk but not in the UBT or RV. **c** Example of emerging CNT and area of future fusion. The two vertical lines mark the area with flattened epithelia of future fusion between the CNT and distal domain of the SSB. **d** The fusion between the UBT and SSB is complete and the CNT has emerged, marked by two vertical lines. There is a lumen between the UB and distal SSB. Dashed line indicates the region of UBT and SSB distal compartment fusion. (Scale bar 25 μ m)

showed only weak *AQP2* staining, and the staining intensity gradually increased towards its medullary domain (Fig. 2b). Neither *CA2* nor *AQP2* was expressed in other tubular cells of the foetal kidney.

We also analysed the occurrence of *SLC4A1*, ATPase H^+ transporting V0 subunit D2 (*ATP6V0D2*), *ATP6V1B1*, and *SLC26A4* marking α - and β -ICs. We detected IC-specific *ATP6V1B1* expression in the cortical UB trunk in 10-week-old kidneys. In 10–15-week-old kidneys, in addition to the fine line of immune reactivity on the surface of the tubules, some cells expressed *ATP6V0D2* at the apical plasma membrane, forming a “cap”-like structure (Fig. 2c). Several tubular cells were

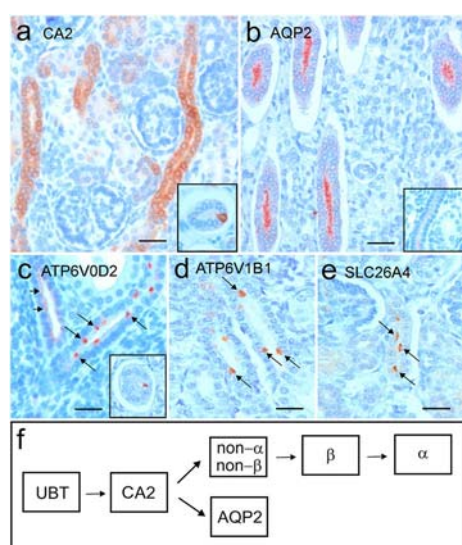


Fig. 2 Development of PCs and ICs in the foetal kidney. **a** Expression of CA2 in the cortical UB trunk and occasionally in single cells of the medullary CD (see inset). **b** Strong expression of AQP2 in the medullary CD but only weak signals in the emerging cortical UB trunk (see inset). **c** A fine line of expression (short arrows) and cap-like (long arrows) expression of ATP6V0D2 in a 15-week-old kidney. **d, e** Expression of ATP6V1B1 and SLC26A4 (arrows) in the cortical UB trunk in a 17-week-old kidney, respectively. **f** Proposed developmental pathway of PCs and ICs: CA2-positive cells of the cortical UB trunk are converted into AQP2-positive PCs and non- α /non- β ICs. The latter differentiate into β -ICs, which give rise to α -ICs. (Scale bar 25 μ m)

positive for ATP6V1B1 in 17-week-old kidneys (Fig. 2d) and also for the ultimate β -IC marker SLC26A4 (Fig. 2e). This finding indicates that many of the emerging ICs in the early gestational period have an immature phenotype. The expression of SLC26A4 and ATP6V1B1 indicates that these cells may correspond to non- α /non- β ICs.

Distribution of PCs and ICs in adult kidneys

We analysed adult kidneys with antibodies expressed specifically in the CNT and CD. We found PCs and ICs exclusively in the CNT and CD. CA2-positive IC progenitor cells were found in the CNT (Fig. 3a), CCD, and OMCD. A high number of AQP2-positive PCs were seen in the CCD, OMCD, and IMCD, and also a reduced number in the CNT (Fig. 3b). The α -IC-specific markers SLC4A1 (Fig. 3c), ATP6V1B1, ATP6V0D2 and TMEM213 (figure not shown) were positive in the CNT and CCD, and scattered positivity was also seen in the OMCD. SLC26A4 marking β -ICs was positive in the CNT (Fig. 3d) and CCD. The results are summarized in Table 2.

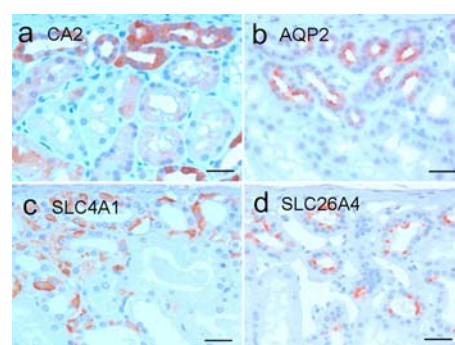


Fig. 3 Expression of IC and PC markers in the CNT of adult kidneys. CNTs have an alternate name, “arcuate tubules”, because they arch upwards before reaching the cortical collecting ducts. This arcuate feature can be easily detected under the renal capsule. **a** CA2-positive cells intermingled with negative cells. **b** AQP2 positivity on the luminal surface in PCs of the CNT. **c** Basolateral expression of SLC4A1 in ICs of the CNT. **d** Strong “cap”-like apical membrane staining with SLC26A4 in ICs of the CNT. (Scale bar 25 μ m)

Discussion

The development of a functioning mature nephron requires segmentation and patterning of emerging epithelial structures (Dressler et al. 2006; Costantini and Kopan 2010). In mice, the segmentation occurs at the RV stage (Nakai et al. 2003; Kobayashi et al. 2005). It was suggested that in mice, fusion of MM-derived epithelial structures with the UT occurs at the RV stage by penetration of distal RV cells into the UT (Bard et al. 2001). It was also shown that most cells of the distal segment of the SSB break into the ureteric epithelium in the mouse kidney (Kao et al. 2012). This model was supported by segment-specific expression of Pou3f3 not only in the distal RV but also in the connecting segment, indicating their common cellular origin from the MM (Georgas et al. 2009). The lack of the UT-marker Calb1 in the tubular segment connected to the RV further suggested that the connecting segment in mice arises from the distal RV rather than from the UT (Georgas et al. 2008). However, the involvement of Pou3f3-positive RV cells in the development of the connecting segment in mice was questioned by a previous Pou3f3^{-/-} knockout experiment (Nakai et al. 2003).

In the human kidney, a clear segmentation can be seen first in the SSB as distal, medial and proximal domains emerge. The RV does not express POU3F3, and a positive immune reaction appears in the distal compartment of the SSB (Fig. 1a). Cells of the UBT, as well as the RV, are consequently negative for CALB1; the protein is expressed only in the UB trunk (Fig. 1b). These findings show the difference between the development and segment-specific differentiation of the mouse and human kidney (Little 2015). In the human kidney, UB-derived cells, progenitors for emerging

CNT, grow out from the UBT towards the distal compartment of the MM-derived SSB. This developmental step can easily be followed in serial sections of H&E-stained foetal kidneys. Recently, the detailed morphology of the developing human nephron was presented in serial microscopic sections, but the origin of the CNT has not been documented (Minuth 2020). Common and divergent patterning features were found in mouse and human kidneys by applying 20 antibodies, but none of them was specific for the CNT or CD cells (Lindström et al. 2018).

Several models have been published for the development of ICs and PCs, most of them established in mouse models or in vitro studies. AQP2 expression occurs early in the developing mouse kidney, suggesting that PCs appear first and then convert to all types of ICs (Treppiccione et al. 2016). It was proposed that UB cells give rise to AQP2-positive PCs, and after turning off Notch signalling give rise to proto-ICs, which further differentiate into β -ICs and α -ICs (Al Awqati and Gao 2011). It was also demonstrated in another study that AQP2-positive cells can give rise to ICs (Wu et al. 2013). A single-cell sequencing approach showed that AQP2 expression precedes CA2 expression in human foetal kidneys (Wang et al. 2018).

Our findings indicate that CA2-positive cells of the UB trunk gradually differentiate into AQP2-positive cells in the medullary region and in the cortical UB trunk and are converted into ATP6V0D2-, ATP6V1B1- and SLC26A4-positive non- α /non- β cells resembling immature ICs. The non- α /non- β ICs next differentiate into β -ICs, which later give rise to α -ICs (Fig. 2f). The β -ICs can switch to α -ICs in vivo as well when animals are challenged with acid load (Gao et al. 2010). This developmental pathway of ICs and PCs was already documented in in vitro studies nearly 30 years ago (Fejes-Toth and Naray-Fejes-Toth 1992, 1993). Recently, single-cell transcriptomics identified IC-PC hybrids and several IC subtypes in the human kidney and showed the quick switch of RNA expression within an hour after exposure to uropathogenic *Escherichia coli* (Saxena et al. 2021). Anatomy-guided microdissection and single-cell RNA sequencing of mouse kidneys revealed cellular diversity at the nephron–collecting tubule junction, suggesting an in vivo reprogramming of progenitor cells (Ransick et al. 2019). It was shown that cells of the human distal nephron segment under pressure of defined culture conditions can acquire UBT characteristics (Howden et al. 2021). Single-cell RNA sequencing and knockout experiments followed by immunohistochemistry demonstrated the plasticity of the CD cells in mice (Park et al. 2018; Werth et al. 2017).

The plasticity of ICs and PCs is supported by our finding of the changing abundance of ICs and PCs between individual tubules within a kidney and also between distinct kidneys. Cells of the emerging CNT might have the same molecular program as the cortical UB trunk for

differentiation into ICs and PCs when it is connected to the SSB. We have demonstrated that the CNT in the adult kidney contains PCs and ICs, as can be seen in the CD. There is a gradually increased number of PCs and decreased number of ICs towards the medulla, as found during differentiation of the UB trunk in the foetal kidney. The number of ICs was highest in the CNT and CCD and low in the OMCD, and no ICs were detected in the IMCD.

In summary, based on our histological observations, we suggest that the CNT arises from the UBT through the outgrowth of the tubular segment towards the distal domain of the SSB. In the adult kidney, the CNT is an integral part of the CD system consisting of functionally and morphologically similar cells expressing α - and β -ICs as well as PC markers indicating their functional integrity. Recent data showing that distal nephron cells may acquire ureteric epithelial identity after reprogramming indicate a functional plasticity of cells in the connection between the DT and UBT (Ransick et al. 2019; Howden et al. 2021). Elucidation of the origin of the CNT from the UBT might be improved by microdissection of the UBT with the outgrowth of the CNT precursor and subsequent single-cell sequencing.

Acknowledgements The authors thank Ms Zsuzsanna Halas for preparing the histological slides for immunohistochemistry.

Author contributions BS: immunohistochemistry, evaluation of results, contribution to MS preparation. GK: concept and material, evaluation of results, critical review of the manuscript.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

References

- Al Awqati Q (2013) Cell biology of the intercalated cell in the kidney. *FEBS Lett* 587:1911–1914. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.007>
- Al-Awqati Q, Gao X (2011) Differentiation of intercalated cells in the kidney. *Physiology* 26:266–272. <https://doi.org/10.1152/physiol.00008.2011>
- Bard JBL, Gordon A, Sharp L, Sellers WI (2001) Early nephron formation in the developing mouse kidney. *J Anat* 199:385–392. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2001.19940385.x>
- Brunskill EW, Park JS, Chung E, Chen F, Magella B, Potter SS (2014) Single cell dissection of early kidney development: multilineage priming. *Development* 141:3093–3101. <https://doi.org/10.1242/dev.110601>
- Costantini F, Kopan R (2010) Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Dev Cell* 18:698–712. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.04.008>
- Dressler GR (2006) The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:509–529. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104340>

- Fejes-Toth G, Naray-Fejes-Toth A (1992) Differentiation of the renal beta-intercalated cells to alpha-intercalated and principal cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5487–5491. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5487>
- Fejes-Toth G, Naray-Fejes-Toth A (1993) Differentiation of intercalated cells in culture. *Pediatr Nephrol* 7:780–784. <https://doi.org/10.1007/BF01213359>
- Gao X, Eladari D, Leviel F, Tew BY, Miro-Julia C, Cheema FH, Miller L, Nelson R, Paunescu TG, McKee M, Brown D, Al-awqati Q (2010) Deletion of *hensin/DMBT1* blocks conversion of b- to a-intercalated cells, and induces distal renal tubular acidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21872–21877. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010364107>
- Georgas K, Rumballe B, Valerius MT, Chiu HS, Thiagarajan RD, Lesieur E, Aronow BJ, Brunskill EW, Combes AN, Tang D, Taylor D, Grimmond SM, Potter SS, McMahon AP, Little MH (2009) Analysis of early nephron patterning reveals a role for distal RV proliferation in fusion to the ureteric tip via a cap mesenchyme-derived connecting segment. *Dev Biol* 332:273–286. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.05.578>
- Georgas K, Rumballe B, Wilkinson L, Chiu HS, Lesoeur E, Gilbert T, Little MH (2008) Use of dual section mRNA in situ hybridisation/immunocytochemistry to clarify gene expression patterns during the early stages of nephron development in the embryo and in the mature nephron of the adult mouse kidney. *Histochem Cell Biol* 130:927–942. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0454-3>
- Hiatt MJ, Ivanova L, Toran N, Tarantal AF, Matsell DG (2010) Remodeling of the fetal collecting duct epithelium. *Am J Pathol* 176:630–637. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090389>
- Howden SE, Wilson SB, Groenewegen E, Starks L, Forbes TA, Tan KS, Vanslambrouck JM, Holloway EM, Chen YH, Jain S, Spence JR, Little MH (2021) Plasticity of distal nephron epithelia from human kidney organoids enables the induction of ureteric tip and stalk. *Cell Stem Cell* 28:671–684. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.12.001>
- Imai M (1979) The connecting tubule: a functional subdivision of the rabbit distal nephron segments. *Kidney Int* 15:346–356. <https://doi.org/10.1038/ki.1979.46>
- Kao RM, Vasilyev A, Miyawaki A, Drummond IA, McMahon AP (2012) Invasion of distal nephron precursors associates with tubular interconnection during nephrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 23:1682–1690. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012030283>
- Kobayashi A, Kwan KM, Carrol TJ, McMahon AP, Mendelsohn CL, Behringer RR (2005) Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim 1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development* 132:2809–2823. <https://doi.org/10.1242/dev.01858>
- Kaissling B, Kriz W (1979) Structural analysis of the rabbit kidney. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 56:1–123. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-67147-0>
- Lindström NO, Tran T, Guo J, Rutledge E, Parvez RK, Thornton ME, Grubbs B, McMahon JA, McMahon AP (2018) Conserved and divergent molecular and anatomic features of human and mouse nephron patterning. *J Am Soc Nephrol* 29:825–840. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017091036>
- Little MH (2015) Improving our resolution of kidney morphogenesis across time and space. *Curr Opin Genet Dev* 32:135–143. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.03.001>
- Minuth WW (2020) Shaping the nephron—a complex, vulnerable, and poorly explored backdrop for noxae impairing nephrogenesis in the fetal human kidney. *Mol Cell Pediatr* 7:2. <https://doi.org/10.1186/s40348-020-0094-9>
- Morel M, Charbades D, Imbert M (1976) Functional segmentation of the rabbit distal tubule by microdetermination of hormone-dependent adenylate cyclase activity. *Kidney Int* 9:264–277. <https://doi.org/10.1038/ki.1976.29>
- Mugford JW, Yu J, Kobayashi A, McMahon AP (2009) High-resolution gene expression analysis of the developing mouse kidney defines novel cellular compartments within the nephron progenitor population. *Dev Biol* 333:312–323. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.06.043>
- Nakai S, Sugitani Y, Sato H, Ito S, Miura Y, Ogawa M, Nishi M, Jishage K, Minowa O, Noda T (2003) Crucial roles of *Brn1* in distal tubule formation and function in mouse kidney. *Development* 130:4751–4759. <https://doi.org/10.1242/dev.00666>
- Park J, Shrestha R, Qiu C, Kondo A, Huang S, Werth M, Li M, Barasch J, Susztak K (2018) Single-cell transcriptomics of the mouse kidney reveals potential cellular targets of kidney disease. *Science* 360:758–763. <https://doi.org/10.1126/science.aar2131>
- Ransick A, Lindström NO, Liu J, Zhu Q, Gou JJ, Alvarado GF, Kim AD, Black HG, Kim J, McMahon AP (2019) Single cell profiling reveals sex, lineage and regional diversity in the mouse kidney. *Dev Cell* 51:399–413.e.7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.10.005>
- Saxena V, Gao H, Arregui S, Zollman A, Kamocka MM, Xuei X, McGuire P, Hutchens M, Hato T, Hains DS, Schwadere AL (2021) Kidney intercalated cells are phagocytic and acidify internalized uropathogenic *Escherichia coli*. *Nature Comm* 12:2405
- Trepiccione F, Soukaseum C, Iervolino A, Petrillo F, Zacchia M, Schutz G, Eladari D, Capasso G, Hadchouel J (2016) A fate-mapping approach reveals the composite origin of the connecting tubule and alerts on “single-cell”-specific KO model of the distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 311:F901–F906. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00286.2016>
- Wang P, Chen Y, Yong J, Wen L, Qiao J, Tang F (2018) Dissecting the global dynamic molecular profiles of human fetal kidney development by single cell RNA sequencing. *Cell Rep* 24:3554–3567. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.056>
- Werth M, Schmitt-Ott KM, Leete T, Qiu A, Hinze C, Viltard M, Paragas N, Shawber CJ, Yu W, Lee P, Chen X, Sarkar A, Mu W, Rittenberg A, Lin CS, Kitajewski J, Al-Awqati Q, Barasch J (2017) Transcription factor *TFCP2L1* patterns cells in the mouse kidney collecting ducts. *eLife* 6:e24265. <https://doi.org/10.7554/eLife.24265>
- Wu H, Chen L, Zhou Q, Zhang X, Berger S, Bi J, Lewis DE, Xia Y, Zhang W (2013) *Aqp2*-expressing cells give rise to renal intercalated cells. *J Am Soc Nephrol* 24:243–252. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012080866>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ureteric Bud-derivatives in Wilms Tumor and Nephrogenic Rest

BEATRIX SARKANY¹, GYULA KOVACS^{1,2} and DANIEL BANYAI¹

¹Department of Urology, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary;

²Medical Faculty, Ruprecht-Karls-University, Heidelberg, Germany

Abstract. *Background/Aim:* Recent studies suggest that not only the nephrogenic blastema but also the ureteric bud is involved in oncogenesis of Wilms' tumor (WT). However, the occurrence of ureteric bud (UB) derivatives in nephrogenic rest is not yet known. The aim of our study was to find UB derivatives in WT. *Materials and Methods:* Keratin 17 (KRT17) is expressed exclusively in UB in foetal kidneys. In this study KRT17 immunohistochemistry was used to detect UB-derivatives in 21 triphasic, 2 stromal and 3 epithelial predominant WTs and 9 nephrogenic rests. *Results:* We have detected KRT17 positive tubular structures resembling UB in 3 of 9 nephrogenic rests and 15 of 26 WTs. *Conclusion:* Not only the metanephric blastema but also the UB is involved in the histogenesis of nephrogenic rest and WT.

Wilms' tumor (WT) or nephroblastoma is suggested to develop from maturation-arrested nephrogenic blastemal cells (1, 2). However, in triphasic WTs the presence of ureteric bud (UB)-like tubular structures surrounded by blastemal cells appear to indicate the involvement of UB or UB-derivatives in the development of WTs (3). A recent global gene expression analysis uncovered genes expressed in distinct compartments of the developing kidney as well as in WT (4). The presence of UB-like epithelial structures in WT has been confirmed by immunohistochemistry (3, 4). Recently, we showed that KRT17 expression is restricted to cells of the UB in foetal kidneys and, therefore, it can be used as biomarker to detect UB derivatives (5). To obtain more information on the involvement of UB in the

histogenesis of WT and its precursor lesions, we analysed the expression of KRT17 in WTs and accompanying nephrogenic rests by immunohistochemistry.

Materials and Methods

Tissue samples. Paraffin embedded material of foetal kidneys, WTs and nephrogenic rests were obtained from the Institute of Pathology, Medical School, University of Pecs in Hungary. We included foetal kidneys of 10, 12, 15, 17 and 21 weeks of gestation, 21 tri- or biphasic WT, 3 cases with blastemal, another 3 cases with epithelial and two with stromal predominant histological pattern. We have analysed 9 perilobar nephrogenic rests (PLNR) of 2 to 5 mm in diameter, including two hyperplastic PLNR for the expression of the KRT17 protein. The use of tissue samples for this study was approved by the Ethics Committee of the University Pecs, Hungary (No. 5343/2014).

Immunohistochemistry. Following deparaffinization and rehydration, the 4µm-thick sections were subjected to heat-induced epitope retrieval in citrate buffer, pH 6.0 in 2100-Retriever (Pierce & Warriner, Chester, UK). Endogenous peroxidase activity was blocked using the EnVision FLEX Peroxydase Blocking Reagent (DAKO, Glostrup, Denmark) for 10 min at room temperature. The tissue sections were incubated in a moist chamber for 1 h at room temperature with a rabbit polyclonal anti-KRT17 antibody (HPA 000452, lot Nr. A08686, Sigma Aldrich, Budapest, Hungary) in a 1:500 dilution. EnVision FLEX horse-radish-peroxydase-conjugated secondary antibody (DAKO) was applied for 30 minutes at room temperature. The signal was visualized using Amino-ethyl-carbazole (AEC) (DAKO). Tissue sections were counterstained with Mayer's haematoxylin (Lillie's modification, DAKO) and after 10 s bluing in ammonium-hydroxide solution, mounted in Glycergel (DAKO). As a negative control the primary antibody was omitted. Photographs were taken using a Leitz DMRBE microscope, equipped with HC PLAN APO 20x0.70 objective, and a ProgRes C14 camera (Leitz, Wetzlar, Germany).

Results

Expression of KRT17 in foetal kidney. We detected the expression of KRT17 in ureteric bud and emerging collecting duct in foetal kidneys at 10 weeks of gestation (Figure 1A and B). Each cell of the ureteric bud and medullary

This article is freely accessible online.

Correspondence to: Daniel Banyai, Department of Urology, Medical School, University of Pecs, Munkacsy M. u. 2, H-7621 Pecs, Hungary. Tel: +36 72507334, Fax: +36 72242374, e-mail: banyai.daniel@pte.hu

Key Words: Ureteric bud, Wilms'tumor, nephrogenic rest, keratin 17, immunohistochemistry.

collecting duct displayed KRT17 staining. No expression was seen in metanephric mesenchyma-derived structures, such as condensed blastemal cells, renal vesicles or the S-shaped body.

Expression of KRT17 in PLNR and in WT. Three of the 9 PLNR displayed KRT17-positive tall columnar tubules embedded in KRT17-negative nephrogenic rests (Figure 1C and D). KRT17 positive tubular structures were detected in 13 out of the 21 triphasic WTs. UB-derived tubules lined with tall columnar epithelial cells displaying strong KRT17 staining were embedded in undifferentiated blastema (Figure 1E). Some of the dilated tubules with cuboidal epithelial cells were also positive for the KRT17 antibody (Figure 1F). We also found UB-derived tubules lined with KRT17 positive high columnar cells in stromal predominant WT (Figures 1G). In some areas of predominantly stromal WT, a group of UB-derivative tubules mixed with renal vesicle-like KRT17 negative tubules were seen (Figure H). In epithelial predominant WT all epithelial tubular structures were consequently negative for KRT17 immunohistochemistry (Figure 1I).

Discussion

Kidney develops from cells of the metanephric mesenchyma as a result of inductive interaction between the metanephric blastema and UB (6). The former differentiates into epithelial structures of nephron from the proximal towards the distal convoluted tubules and forms the stromal components of the kidney. The UB gives rise to the connecting tubules and the collecting ducts of the kidney. WT has been shown to develop due to arrested differentiation of the metanephric blastema, resulting in tumorigenic growth of blastemal, epithelial and stromal cells. The three elements can be seen in WT with classical triphasic histology, even though epithelial, blastemal or stromal predominant variants may also occur (2, 7).

The exclusive role of metanephric blastema in the development of WT is challenged by Stupar et al., showing UB-derivative tubular structures in triphasic WTs (3). A recent comparative gene expression study selected genes expressed preferentially in the developing kidney and in WT and confirmed the occurrence of UB-like epithelial structures in triphasic WT using immunohistochemistry (4). Based on these two observations it appears that both the metanephric blastema and the UB are involved in the oncogenesis of WT.

Wilms tumor is suggested to develop from nephrogenic rest, which frequently accompanies clinically manifested WT (1, 7). Despite this, the possible involvement of the ureteric bud in the histogenesis of nephrogenic rests is not yet known. We showed in this study that KRT17 positive tubules resembling UB-derivative cells can already be seen in WT precursors, in nephrogenic rests.

KRT17, a 46-47 kDa type I keratin supports the integrity and mechanical stability of epithelial cells, regulates protein synthesis via intracellular signaling pathways and protects tubular cells from apoptosis (8-11). The role of KRT17 in growth and regular branching of the ureteric bud in foetal kidney is unknown. In this study we used KRT17 as marker to recognize UB-derived epithelial structures in nephrogenic rests and WTs.

In summary, we showed that KRT17, which is known to be expressed in multilayered epithelium, is expressed in single layered epithelium of UB in foetal kidney. We also documented that UB-derivatives occur not only in WT but also in nephrogenic rests. We suggest that the causality of WT should include in addition to the maturation-arrested nephrogenic blastemal cells a possible role for the ureteric bud cells. Further studies will help delineate this process.

Conflicts of Interest

The Authors have no conflicts of interest to declare.

Authors' Contributions

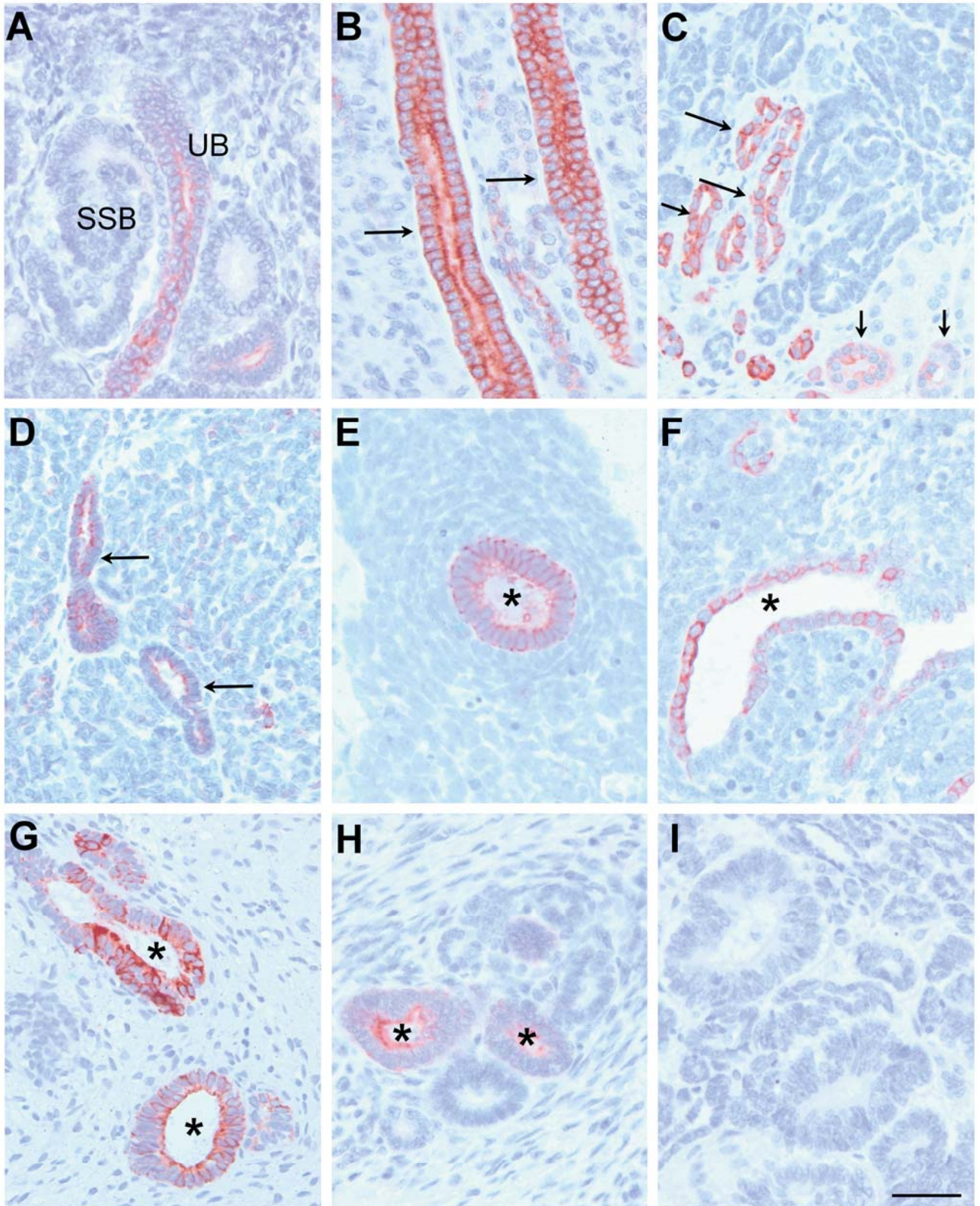
BS and DB designed the research study, BS performed the immunohistochemistry, BS and GK analyzed the data, BS and DB wrote the manuscript and GK reviewed the manuscript. All Authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by a Grant of the Medical Faculty, University of Pecs, Hungary to Daniel Banyai (PTE-AOK-KA-2018/16).

→

Figure 1. *Expression of the KRT17 protein in foetal kidneys, nephrogenic rests and Wilms' tumors. The background was stained with Mayer's haematoxylin. A) KRT17 (brown staining) expressed exclusively in utereric bud (UB). No positive immunoreaction was seen in surrounding blastemal cells and S-shaped body (SSB). B) Strong KRT17 immunreaction in each cell of the medullary collecting duct (arrows). C) Tubular cells of a perilobar nephrogenic rests are negative for KRT17, but some UB-derived tubules display KRT17 positivity (arrows). Differentiated cortical collecting ducts also show a weak KRT17 taining (short arrows). D) A hyperplastic perilobular nephrogenic rest negative for KRT17 staining but larger tubules with columnar epithels show positive KRT17 staining (arrows). E) A single UB-derivative tubulus lined by tall columnar cells display strong KRT17 staining (star). It is surrounded with tumorous blastemal cells resembling induction/aggregation phase around the UB in embryonal kidneys. F) Dilated UB-derived tubulus (star) surrounded by blastemal cells. G) Two UB-like tubules lined with KRT17 positive tall columnar cells (star) embedded in fibroblastic stroma. H) A group of epithelial tubules, two of them with KRT17 positive cells surrounded with stromal differentiated blastemal cells. I) Smaller and larger tubules, some resembling renal vesicles in epithelial predominant Wilms' tumor. Lack of KRT17 staining indicates their blastemal origin. A-I the same magnification, Scale bar: 35 µm.*



References

- 1 Beckwith JB, Kiviat NB and Bonadio JF: Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. *Pediatr Pathol* 10(1-2): 1-36, 1990. PMID: 2156243. DOI: 10.3109/15513819009067094
- 2 Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE and Ulbright TM: The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs-part A: renal, penile, and testicular tumours. *Eur Urol* 70(1): 93-105, 2016. PMID: 26935559. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.02.029
- 3 Stupar Z, Chi S, Veszpremi B, Koesters R, Stallmach T, Geng JG and Kovacs G: Wilms' tumour may also develop from impaired differentiation of the ureteric bud. *Histopathology* 51(2): 265-268, 2007. PMID: 17650220. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2007.02741.x
- 4 Fukuzawa R, Anaka MR, Morison IM and Reeve AE: The developmental programme for genesis of the entire kidney is recapitulated in Wilms tumour. *PLoS One* 12(10): e0186333, 2017. PMID: 29040332. DOI: 10.1371/journal.pone.0186333
- 5 Sarlos DP, Yusenko MV, Peterfi L, Szanto A and Kovacs G: Dual role of *KRT17*: development of papillary renal cell tumor and progression of conventional renal cell carcinoma. *J Cancer* 10(21): 5124-5129, 2019. PMID: 31602265. DOI: 10.7150/jca.32579
- 6 Little MH: Improving our resolution of kidney morphogenesis across time and space. *Curr Opin Genet Dev* 32: 135-143, 2015. PMID: 25819979. DOI: 10.1016/j.gde.2015.03.001
- 7 Beckwith JB: Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations. *Am J Med Genet* 79(4): 268-273, 1998. PMID: 9781906. DOI: 10.1002/(sici)1096-8628(19981002)79:4<268::aid-ajmg7>3.0.co;2-i
- 8 Moll R, Divo M and Langbein L: The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 129(6): 705-733, 2008. PMID: 18461349. DOI: 10.1007/s00418-008-0435-6
- 9 Tong X and Coulombe PA: Keratin 17 modulates hair follicle cycling in a TNFalpha-dependent fashion. *Genes Dev* 20(10): 1353-1364, 2006. PMID: 16702408. DOI: 10.1101/gad.1387406
- 10 Kim S, Wong P and Coulombe PA: A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature* 441(7091): 362-365, 2006. PMID: 16710422. DOI: 10.1038/nature04659
- 11 Yang L, Zhang S and Wang G: Keratin 17 in disease pathogenesis: from cancer to dermatoses. *J Pathol* 247(2): 158-165, 2019. PMID: 30306595. DOI: 10.1002/path.5178

Received January 25, 2021

Revised April 8, 2021

Accepted April 15, 2021

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki KOVÁCS GYULA professzornak, témavezetőmnek, aki elfogadott diákjának, megtanított az immunhisztológiai technikára és végig mellettem állt. Köszönöm, hogy bevezetett a gyakorló orvos számára ismeretlen tudományos világba.

Köszönöttem tartozom szerzőtársaimnak, dr. Kuthi Leventének a jól dokumentált Wilms's tumorok metszeteiért, és dr. Bányai Dánielnek a közös munkáért.

Köszönöm ÉDESANYÁMNAK, aki mindvégig segített támogatásával.

Köszönöm Székelyhidi Ica grafikusnak, aki tézisemet esztétikussá varázsolta.