

Adenoid cysticus emlő- és nyálmirigy carcinomák miRNS-expressziós és immunhisztokémiai vizsgálata

Doktori értekezés

dr. Virágh-Kiss Orsolya

Semmelweis Egyetem

Patológiai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kulka Janina, Ph.D., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Méhes Gábor, Ph.D., intézetvezető egyetemi docens

Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Fehér Erzsébet, D.Sc., professor emerita

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Nagy Péter, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Kovács Ilona, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest

2015

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	6
1.1. Adenoid cysticus carcinoma (ACC)	6
1.1.1. Az ACC szövettana, patológiai diagnosztikája	6
1.1.2. Az emlőből kiinduló ACC és a tripla negatív emlőtumorok	9
1.1.3. Az ACC prognózisa és klinikopatológiája	10
1.1.4. Az ACC molekuláris és genetikai jellegzetességei	11
1.1.5. Az ACC terápiás lehetőségei az eddig ismert hisztopatológiai, molekuláris és genetikai jellegzetességek tükrében	16
1.2. A mikroRNS-ek	18
1.2.1. A mikroRNS-ekről általában	18
1.2.2. A miRNS-ek nevezéktana, miRNS családok	20
1.2.3. A miRNS-ek szerepe élettani és kórélettani folyamatokban	21
1.2.4. miRNS-ek és ACC	22
2. CÉLKITŰZÉSEK	24
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	25
3.1. Kiindulási vizsgálat: miRNS expressziós mintázat feltérképezése	25
3.2. Szűkített számú miRNS-ek expressziójának vizsgálata és az általuk potenciálisan regulált fehérjék mennyiségi meghatározása	29
3.2.1. Célgének keresése	35
3.2.2. Fehérje szintű vizsgálatok	35
3.2.3. Túlélési adatok	39
4. EREDMÉNYEK	40
4.1. Bevezető vizsgálatunk eredményei	40
4.1.1. miRNS szelekció Affymetrix® Gene Chip® alkalmazásával	40
4.1.2. Célgén – miRNS interakciós vizsgálat IPA® analízissel	41
4.1.3. Hierarchizált cluster analízis alcsoportok meghatározására	44
4.1.4. Potenciális célgének azonosítása miRecords adatbázis segítségével	46
4.2. Magasabb esetszámon végzett vizsgálataink eredményei	51
4.2.1. Az egyes vizsgálati csoportok miRNS expressziójának összehasonlítása	52
4.2.1.1. bACC esetek és normál emlőszövetek miRNS mintázatának összehasonlítása	52

4.2.1.2.	A sACC esetek és kontrolljaik miRNS expressziójának összehasonlítása	54
4.2.1.3.	bACC és sACC miRNS expressziós mintázatának összehasonlítása	55
4.2.1.4.	Normál emlő és nyálmirigy szövetek miRNS mintázatának összehasonlítása	55
4.2.2.	A miRNS-célgén kapcsolat további vizsgálata, a célgének szűkítése	58
4.2.3.	Immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei	64
4.2.3.1.	cyclin D1 és Bcl-2 kimutatása	64
4.2.3.2.	ER, PgR, HER2 és Ki67 immunhisztokémiai reakciók eredményei	68
4.3.	Túlélési adatok	71
5.	MEGBESZÉLÉS	72
6.	KÖVETKEZTETÉSEK	80
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	82
8.	SUMMARY	83
9.	IRODALOMJEGYZÉK	84
10.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ ABSZTRAKTOK)	115
11.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (A DISSZERTÁCIÓTÓL FÜGGETLEN KÖZLEMÉNYEK)	116
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	117
	FÜGGELÉK	119

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3'-UTR/5'-UTR:	át nem íródó régió (untranslated region)
5-FU:	5-fluorouracil
ACC:	adenoid cysticus carcinoma (adenoid cystic carcinoma)
AJCC:	a ráktípusok stádiumainak meghatározásával foglalkozó amerikai bizottság (American Joint Committee on Cancer)
AKT:	v-akt rágszáló thymoma virális onkogén homológ 1
ANOVA:	variancia analízis (Analysis of variance)
bACC:	emlőből kiinduló adenoid cysticus carcinoma (breast-derived adenoid cystic carcinoma/)
BCL2:	B-sejtes CLL/lymphoma 2 (apoptózist gátló molekula)
BCL9:	B-sejtes CLL/lymphoma 9
BCR/ABL:	fúziós fehérje a Philadelphia kromoszómán a 22-es és 9-es kromoszómák transzlokációjának következtében (breakpoint cluster region/ ABL proto-oncogene 1)
BIM/BCL2L11:	BCL2-szerű 11 (szerin-treonin kináz)
BMPR2:	csontvelő morfogenetikus protein receptor, 2-es típus
bN:	kontroll emlőszövet (breast – normal)
CCND1:	cyclin D1
CDC25A:	sejtosztódás ciklus 25A (foszfatáz)
CDH1/ECAD	cadherin 1/ E-kadherin (E-cadherin)
CDK6:	cyclin-dependens kináz 6 (cyclin-dependent kinase)
cDNS:	komplementer DNS (mRNS-ről szintetizált DNS)
CGH:	komparatív genomiális hibridizáció (comparative genomic hybridization)
CK:	citokeratin (cytokeratin)
c-KIT/KIT:	v-kit macska sarcoma vírus onkogén homológ
c-Myb:	v-myb madár myeloblastosis virális onkogén homológ
CNN2:	calponin 2
C _i :	küszöb ciklusszám, vagy áttörési pont a fluoreszcens jel detektálása szempontjából kvantitatív PCR esetén
DGCR8:	DiGeorge syndroma kritikus régió gén 8 mikroprocesszor komplex alegység (diGeorge syndrome critical region 8)
DNS:	dezoxiribonukleinsav
ER/ESR1:	ösztrogén receptor-1
ERBB1/EGFR:	epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
FFPE:	formalin-fixált, paraffinba ágyazott (formalin-fixed, paraffin-embedded)
FGFR2:	fibroblaszt növekedési faktor receptor 2
FOXO1:	a forkhead domént tartalmazó transzkripció faktorok családjának tagja (forkhead box O1)
HE	hematoxylin-eosin
HER-2/neu/HER2/ERBB2:	humán epidermalis növekedési faktor receptor 2 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2)
HMGA2:	magas mobilitású csoport AT-hurok 2 (high mobility group AT-hook 2)

IGFR1:	inzulin-szerű növekedési faktor receptor 1 (insulin-like growth factor type 1 receptor)
IL-8:	interleukin 8
IPA [®] :	Ingenuity útvonal analízis (Ingenuity Pathway Analysis [®])
JAK1	Janus kináz 1 (Janus kinase 1)
Ki-67:	sejtosztódással társított magi fehérje
KISS1R:	(a KiSS-1 metasztázis-szupresszor gén termékének, a metastatinnak a receptora)
KRAS:	Kirsten patkány sarcoma virális onkogén homológ
LAMTOR3:	késői endosomális/lysosomális adaptor, MAPK és MTOR aktivátor 3
MAP3K12:	mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz 12
MAPK1/ERK:	mitogén-aktivált protein kináz 1
MEF2D:	myocytafokozó faktor 2D (sejtek differenciációjában részt vevő transzkripciós faktor)
miRNS/miR:	mikro-RNS
MTOR	rapamycin mechanikus targetje (szerin/treonin kináz)
MTX:	metothrexát
MYB:	v-myb madár myeloblastosis virális onkogén homológ, transzkripciós faktor
MYC:	v-myc madár myelocytomatosis virális onkogén homológ, transzkripciós faktor
NFIB:	magi faktor I/B
NOTCH1:	notch 1 (transzmembrán fehérje)
NOTCH2:	notch 2 (transzmembrán fehérje)
p53:	protein 53
PACT/PRKRA:	az interferon által indukált protein kináz protein aktivátora
PgR:	progeszteron receptor
PIK3CA/PI3K:	foszfatidylinozitol-4,5-biszfoszfát 3-kinázkatalitikusalegység alpha
PLAU:	plazminogén aktivátor, urokináz (szerin proteáz)
PRIM1:	primáz, DNS, polypeptid 1 (primerekként funkcionáló RNS-eket szintetizál DNS megkettőződés során)
PTEN:	foszfatázás tenzin homológ (tumor szupresszor)
RET:	ret protoonkogén (receptor tirozin kináz)
RNS	ribonukleinsav
rRNS:	riboszomális RNS
qPCR:	kvantitatív/valós idejű polimeráz láncreakció (quantitative/real time polimerase chain reaction)
RUNX1:	a CBF transzkripciós faktor alfa alegysége (runt-related transcription factor 1)
sACC:	nyálmirigyből kiinduló adenoid cysticus carcinoma (salivary gland-derived adenoid cystic carcinoma)
sN:	normál/kontroll nyálmirigy szövet
SNAIL2:	snail cink-ujj fehérjék családjába tartozó transzkripciós faktor
snoRNA	kis nukleoláris RNS (small nucleolar ribonucleic acid/RNA)

STK11:	szerin/treonin kináz 11
TNBC:	tripla-negatív emlőrák (triple-negative breast cancer)
TNF α :	tumor nekrozis faktor alfa
TP53:	tumor protein p53
TRBP:	transz-aktivációs válasz serkentő (TAR) RNS-hez kötődő fehérje
tRNS:	transzfer RNS
VEGFA:	vaszkuláris endothelialis növekedési faktor A (vascular endothelial growth factor A)

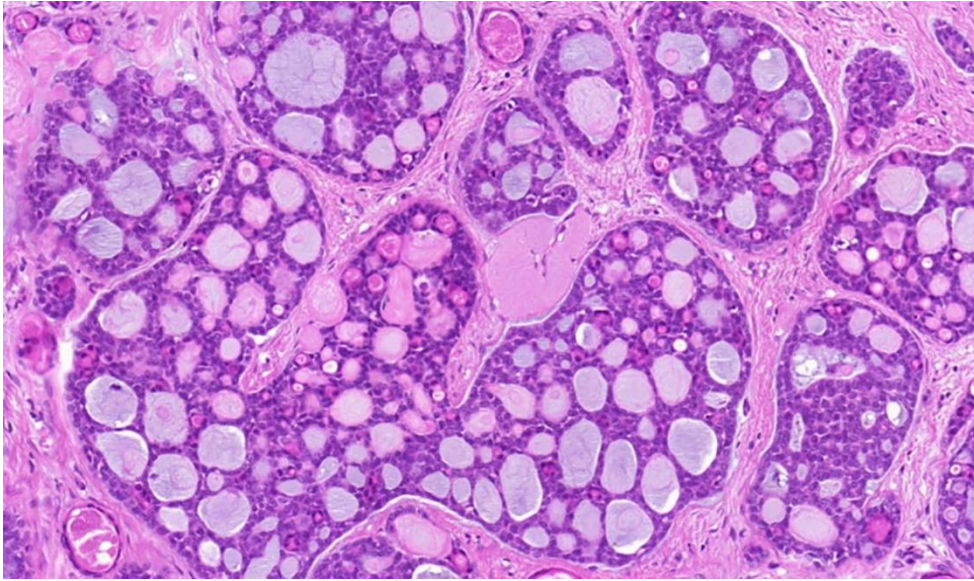
1. BEVEZETÉS

1.1. Adenoid cysticus carcinoma (ACC)

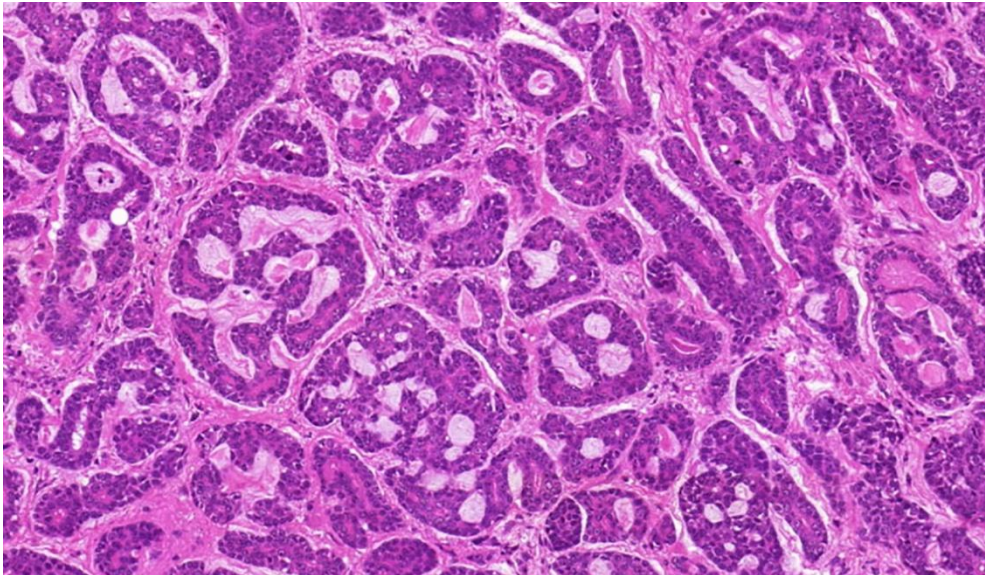
Az ACC a fej-nyak régió malignomáinak csupán kevesebb mint 5%-ában előforduló daganattípus^{Dodd,2006;Gomez,2008}, azonban a nyálmirigyeket érintő rosszindulatú daganatok között viszonylag gyakori elváltozásnak számít. Átlagosan minden negyedik nagy nyálmirigyből kiinduló^{Renehan,1996} és szinte minden második kis nyálmirigyét érintő rosszindulatú daganat ACC^{Anderson,1995}, mely leggyakrabban a fültőmirigyét, az állkapocs alatti mirigyeket, valamint a szájpád területén található mirigyeket érinti^{Marchio,2010}. Az ACC egyéb szervek szeromucinózus mirigyeiből is kiindulhat: megjelenhet a bőrben^{Gray,1963}, az emlőben^{Weitzner,1970}, előfordulhat a könnymirigyekben^{Paulino,1999}, a prosztatában^{Nkanza,1988}, vaginalis^{Stefani,1970}, valamint cervikális mirigyekben^{Tchertkoff,1962}, valamint érintheti a hallójáratokat^{Mashkevich,2006}, a légcsövet^{Hajdu,1970}, a tüdőt^{Reid,1952}, illetve akár a nyelőcsövet^{Kitada,1997;Tonini,1995} is. Ritka esetekben petefészek, pajzsmirigy, illetve lágyrész kiindulású ACC is előfordul^{Li,2012}.

1.1.1. Az ACC szövettana, patológiai diagnosztikája

Az ACC hisztomorfológiailag igen változatos képet mutat amellet, hogy a sejtek viszonylag egységes megjelenésűek. Szövettani képére kettős sejtpopuláció jellemző: myoepithelialis (basalis) és ductalis (luminalis) sejtek egyaránt megtalálhatóak benne, melyek szorosan egymás mellé rendeződve viszonylag egységes megjelenésű csoportokat alkotnak. Az egyes sejtcsoportok között hyalinnal kitöltött terek láthatóak, melyek környezetében az alacsony mitotikus aktivitást mutató, szegényes citoplazmával rendelkező tumorsejtek gyakran paliszád-szerű elrendeződést mutatnak. A sejtcsoportok leggyakrabban cribriform megjelenést öltenek, azonban tubularis és szolid mintázatot is mutathatnak. A cribriform mintázatot sokszor „svájci sajt” („Swiss cheese”) jelzővel is illetik^{Tauxe,1962}. Az 1. és 2. ábrákon egy emlő és egy nyálmirigy eredetű ACC mikroszkópos képe látható.



1. ábra: Emlőből kiinduló Grade II ACC szövettani képe (HE, 10x)



2. ábra: Nyálmirigy eredetű Grade II ACC szövettani képe (HE, 10x)

A daganat cribriform megjelenésű formáját korábban – cilinderekre emlékeztető daganatos stromája miatt – cylindromának nevezték, mely az összetéveszthetőségig hasonlít a bőrből kiinduló cylindroma szöveti képéhez. A megnevezés Theodor Billroth, XIX. századi sebészorvos nevéhez fűződik^{Billroth,1859.}, azonban a daganat első leírói az 1850-es években Robin, Lorain és Laboulbene voltak^{Mehta,2013.} Billroth nevéhez az elváltozás kiújulásra való fokozott hajlamának felismerése fűzhető, ennek ellenére azonban az ACC-t sokáig benignus tumornak tartották. Ezt a tévhitet az 1940-es években Quattlebaum, Dockerty és Mayo cáfolták meg^{Quattlebaum,1946.}

A nyálmirigy eredetű ACC (salivary gland-derived adenoid cystic carcinoma/sACC) szövettani grádusát egy három pontos skálán határozzuk meg, melynek alapját a daganaton belül előforduló, eltérő morfológiát mutató területek százalékos megoszlása adja. A jól differenciált (grade I) ACC-k közé a javarészt tubularis és cribriform megjelenésű területeket tartalmazó daganatok sorolhatóak, melyekben a szolid területek aránya nem haladja meg a 30%-ot. Közepesen differenciált (grade II) ACC-k közé tartoznak a 30 és 70% közötti szolid komponenst tartalmazó tumorok, míg rosszul differenciált (grade III) daganatok esetében 70% feletti szolid komponenst láthatunk^{Batsakis,1990;Szanto,1984}. Rosszul differenciált ACC esetén szövettanilag szembenően nagyobb, hyperchromatikus, kifejezett pleomorfiát mutató sejtek, valamint magas osztódási arány figyelhető meg. Ezek az esetek rendszerint kedvezőtlen prognózissal társulnak^{Mitani,2011;Shin,2002}.

Az emlő eredetű ACC (breast-derived adenoid cystic carcinoma/bACC) esetében szintén a nyálmirigy kiindulású forma gradálási rendszerét, a morfológiai megjelenést alapul vevő osztályozást alkalmazzuk.

1.1.2. Az emlőből kiinduló ACC és a tripla negatív emlőtumорок

Az bACC egy igen ritkán, a rosszindulatú emlődaganatok kevesebb mint 0,1%-ában előforduló daganat^{Glazebrook,2010}, mely az ún. „basal-like” (bazális típusú) molekuláris alcsoportba tartozik. Az emlő malignómáinak molekuláris felosztása Prat, Perou és Sorlie nevéhez köthető, akik génexpressziós mintázat alapján új csoportosítást alkottak^{Perou,2000;Sorlie,2001}. Ennek alapján a mindennapi diagnosztikában immunhisztokémiai reakciókkal meghatározható fehérje expressziós mintázaton alapuló csoportosítást használunk. Ennek a „surrogate” osztályozásnak az alapját a daganatok hormonreceptor-expressziós (ösztrogén, és progeszteron receptor /ER, PgR/), valamint HER2-génamplifikációs és/vagy Her2-fehérje expressziós státusza adja. A hormonreceptor pozitív emlőcarcinómák *luminalis típusú*nak nevezendők, melyek proliferációs aktivitásuktól függően további kétszakra oszthatóak. A *luminalis A* csoport tagjai alacsony (14% alatti), a *luminalis B* csoportba tartozók magas (14% feletti) Ki67-expressziót mutatnak^{Prat,2013}. A hormonreceptor expressziót nem mutató emlőrákok tartozhatnak a *HER2-pozitív (HER2+)*, vagy a „basal-like” csoportba. Előbbi tagjai HER2-génamplifikációt mutatnak és fokozott mértékben expresszálják a Her2 fehérjét. Utóbbiak génexpressziós mintázatuk alapján sem ER, PgR kifejeződést, sem HER2 génamplifikációt nem mutatnak, azonban legalább egy basalis típusú citokeratint expresszálnak (CK5/6, CK14, vagy CK17)^{Perou,2000;Sorlie,2001;Sorlie,2003}. Fehérje mintázatuk alapján ezek az emlődaganatok *atripla-negatív (triple-negative breast cancer/TNBC)* csoportba tartoznak. A „basal-like” csoporton belül génexpressziós mintázatuk alapján elkülöníthetők továbbá a „*claudin-low*” típusú *emlőcarcinómák*, melyeket epithelialis-mesenchymalis átalakulással (epithelial-mesenchymal transition/EMT) összefüggésbe hozható gének expressziója és daganatos őssejtekre jellemző genotípus jellemez^{Creighton,2009}.

Az egyes alcsoportok ugyan klinikopatológiailag igen heterogén csoportokat alkotnak, általánosságban elmondható, hogy a legrosszabb klinikai kimenetellel leggyakrabban a tripla-negatív emlőcarcinómák rendelkeznek, melyek tagjait terápiára fokozottan rezisztens sejtek jellemzik és egyelőre célzott kezelési lehetőség sem áll rendelkezésre^{Dent,2007;Prat,2014}.

1.1.3. Az ACC prognózisa és klinikopatológiája

Az egyes szervekből kiinduló ACC mikroszkópos képe az összetéveszthetőségig megegyezik (1. és 2. ábra), ezzel ellentétben kiindulási szervtől függően igen változatos klinikai viselkedést mutathat. A nem nyálmirigyekből kiinduló ACC-k prognosztikai jellegzetességeiről ritka előfordulásuk miatt igen kevés adattal rendelkezünk, azt azonban tudjuk, hogy a legrosszabb lefolyás általában a cervixből, a könnymirigyekből, illetve a tüdőből kiinduló ACC-k esetében tapasztalható^{Elhassani,2009;Font,1998;Li,2012;Ro,1987}.

Az bACC az emlő rosszindulatú daganatainak körében speciális helyet foglal el: génexpressziós mintázata alapján ugyan a „basal-like” csoportba tartozik, prognózisa – ellentétben az erre a csoportra egyébként jellemző kedvezőtlen biológiai viselkedéssel – igen jó: sok éves követési időszak elteltével is 90% feletti teljes túlélés jellemzi^{Ghabach,2010}. Ezzel szemben a sACC kedvezőtlen klinikai viselkedést mutat: a korai túlélési adatok kedvező volta ellenére (90% feletti túlélési arány), 5 év elteltével már 65-68% közötti^{Ciccolallo,2009;Lin,2012}, ennél is hosszabb távú követési idő elteltével a pedig már csupán 50-60% közötti túlélési arányszámmal találkozhatunk^{Ampil,1987;Lin,2012}. A sACC esetek lefolyása a primer tumor pontos lokalizációjától is függ: a kis nyálmirigyekből kiinduló formák általában kedvezőtlenebbül viselkednek, mint nagy nyálmirigyekből kiinduló társaik^{Lin,2012}.

Az bACC kiváló prognózisához feltehetően hozzájárul, hogy igen ritkán képez távoli áttétet (az esetek 91-96%-ában a tumor a kiindulási helyre lokalizálódik^{Ghabach,2010;Li,2012}), valamint hogy igen magas arányban (mintegy 80%-ban) képvisel alacsony szövettani grádust^{Li,2012}. Mindezek ellenére egyes magas grádusú, távoli áttétet képző bACC-k esetében is megfigyelhető kedvező klinikai kimenetel^{Millar,2004;Vranic,2007}.

Ugyanakkor a sACC sokszor sokszor sokáig tünetmentesen, rejtett lokalizációban progrediál, így az esetek többségében csupán előrehaladott stádiumban kerül felismerésre, mely miatt operálhatósága is sokszor kérdéses. A sACC esetek nagy részére jellemző perineurális invázió, valamint távoli áttétek képzésére és recidívára való fokozott hajlam szintén kedvezőtlenül befolyásolja a prognózist^{Marchio,2010}.

A betegek korát illetően bACC és sACC esetek között számottevő eltérés nem azonosítható: szinte bármely életkorban manifesztálódhatnak (sACC: 21-89 év közöttiekben, bACC: 33-97 év közöttiekben), leggyakrabban azonban a bACC és sACC is 50-60 éves kor körül jelenik meg. Nyálmirigy eredetű ACC-k nők és férfiak körében közel azonos arányban

fordulnak elő, míg a bACC főleg nőkben fordul elő – hasonlóan a többi típusú rosszindulatú emlődaganathoz^{Ghabach,2010;Sur,1997;Triantafillidou,2006}. Regionális nyirokcsomó áttétek képzése sem bACC, sem sACC daganatokra nem jellemző^{Arpino,2002;van der Wal,2002}, ezek leggyakrabban a tüdő, valamint bronchus eredetű tumoroknál figyelhetők meg^{Li,2012}.

1.1.4. Az ACC molekuláris és genetikai jellegzetességei

Mivel a bACC esetek többsége a bazális/tripla-negatív emlőtumorok közé sorolható, több kutatócsoport vizsgálta a nyálmirigyekből kiinduló ACC-k **ER**, **PgR** és **HER2** státuszát. Ezzel kapcsolatban ellentmondásos eredményekkel találkozhatunk: míg egyes vizsgálatok alátámasztották, hogy a sACC esetek az emlő eredetű formákhoz hasonlóan mindkét hormonreceptor (ER, PgR) tekintetében negatívak^{Marcinow,2014}, más eredmények szerint azonban előfordulhatnak közöttük ER, vagy PgR receptort expresszáló formák^{Ozono,1992;Shick,1995}. A sACC esetek HER2/Her2-státuszára vonatkozóan hasonló ellentmondásokba ütközhetünk: fehérjeexpressziós és in situ hibridizációs vizsgálatok egyaránt változó eredményeket hoztak^{Cho,1999;Clauditz,2011;Dori,2002;Gibbons,2001;Glisson,2004;Karja,1994;Kernohan,1991;Seethala,2011}. Az irodalmi adatok szerint főleg a tubularis és cribriform megjelenésű sACC daganatok expresszálják Her2-t^{Kusafuka,1991;Shintani,1995}.

ACC-k egy részében kimutatták az **ErbB1** (**EGFR**/epidermal growth factor receptor/növekedési faktor receptor) expresszióját is, mely a sejtek proliferációjának, motilitásának, adhéziójának és inváziójának szabályozásában, valamint angiogenetikus folyamatokban és a sejtek túlélésében szerepet játszó molekula. Az EGFR kifejeződése sACC esetekben – hasonlóan a Her2 fehérje expressziójához – az egyes tanulmányok szerint igen változó arányú (2 és 85% közötti^{Chen,2001;Gibbons,2001;Kusafuka,1991;Shintani,1995;Vered,2002}), melynek oka feltehetően az egyes vizsgálati módszerek eltérő specificitásában és szenzitivitásában rejlik^{Vered,2002}.

Az ACC-k proliferációs aktivitása és prognózisa között – számos más daganatfajtaéhoz hasonlóan – egyenes arányú összefüggés figyelhető meg. sACC esetek Ki-67 expressziója egyes tanulmányok alapján igen változó (12-100%-os)^{Alves,2004;Carlinfante,2005;Lazzaro,2000}. Az alacsony Ki-67 expresszió feltehetően a lassú növekedés jelzője, míg magas Ki-67 szintek

gyakran rosszul differenciált (szolid) megjelenéssel^{Alves,2004;Cho,1999;Nordgard,1997} és rosszabb klinikai kimenetellel társulnak^{Norberg-Spaak,2000;Triantafyllidou,2006;Wegner,2007}. Mindezek alapján a Ki-67 expresszió meghatározása segítségünkre lehet az agresszívebb kórlefolyást mutató sACC esetek elkülönítésében^{Lazzaro,2000;Norberg-Spaak,2000}. Az igen agresszív megjelenést mutató daganatokon kívül mind az emlőből, mind a nyálmirigyekből kiinduló ACC esetekre egyaránt alacsony Ki67 expresszió jellemző^{Marcinow,2014;Trendell-Smith,1999}.

Az ACC fontos differenciáldiagnosztikai markerének számít a **c-KIT** proto-onkogén, melynek fokozott expressziója fej-nyak régió területén található nyálmirigyekből kiinduló ACC-k mintegy 80-100%-ában^{Edwards,2003;Vila,2009;Weigelt,2008}, az emlőből kiinduló formák pedig közel 100%-ában kimutatott.^{Crisi,2005;Mastropasqua,2005}. A normál szövetekben sejtnövekedést, differenciálódási folyamatokat és sejtmigrációt szabályozó c-KIT^{Woodburn,1999} –ellentétben a Her2 fehérjével – leggyakrabban a szolid megjelenésű formával asszociálódik^{Holst,1999;Jeng,2000}. KIT mutációt ugyan sACC esetekben leírtak már^{Vila,2009}, azonban bACC esetekben jelen tudásunk szerint még nem sikerült igazolni^{Wetterskog,2013}. Eszerint a c-KIT fehérje fokozott expressziójának oka a **KIT gén mutációján** felül más is lehet^{Holst,1999}.

ACC esetek egy részében detektálható a **MYB** transzkripció faktor fokozott expressziója is, mely gyakran társul rossz prognózissal sACC-ban szenvedő betegek körében^{Mitani,2011}. A MYB fokozott expressziójának egyik oka mind bACC, mind sACC esetekben egy nemrégiben leírt mutáció^{Persson,2009}, melyről Marta Persson munkacsoportja számolt be elsőként. A mutáció következtében a 6-os kromoszóma hosszú karjának 22-23-as régiója, valamint 9-es kromoszóma rövid karjának 14-es régiója között transzlokáció alakul ki (t(6;9)(q22-23;p23-24), mely az érintett régiókban lokalizált **MYB** és **NFIB**-t (nuclear transcription factor I/B) gének közötti **fúzió**hoz vezet. Az onkogén elváltozás az ACC-k patogenezisében kulcsfontosságú szerepet játszik és jelen tudásunk szerint az ACC-k eddig ismert egyetlen visszatérő mutációjának számít^{Brill,2011;Persson,2009;Wetterskog,2012}. Gao és munkacsoportja által végzett tanulmányokban a forszírozott MYB/NFIB expresszió sACC esetekben a sejtek morfológiájának és a sejtek adhézión tulajdonságainak megváltozásához vezet^{Gao,2014}. Ugyan az ACC-kben gyakran megfigyelhető fokozott MYB expresszió bizonyos esetekben a MYB/NFIB gének közötti fúzió miatt jön létre, számos esetben annak hiányában is kimutatható^{Persson,2009;Wetterskog,2012}. Ezáltal feltehetően egyéb mechanizmusok is közrejátszanak a magas MYB expresszió kialakulásában.

A különböző szervekből kiinduló ACC esetekben egyaránt megfigyelhető, MYB/NFIB fúziós gént kialakító transzlokáción kívül egyes kutatócsoportok sACC esetekben jelen lévő, további transzlokációk jelenlétét is igazolták (*1. táblázat*). Ugyan ezen felfedezések lényegesek lehetnek sACC esetek molekuláris jellegzetességeinek megismerésében, az egyes munkacsoportok által közölt eltérések csupán egy-egy különálló ACC esetben igazolódtak, melyeket más tanulmányok mind ez idáig nem támasztottak alá.

1. táblázat: sACC-ban, csupán egyedi esetekben igazolt kromoszómális transzlokációk és leíróik listája.

Transzlokáció megnevezése	Irodalmi hivatkozás
t(6;12)(p21;q13)	Martins ^{Martins,2001}
t(6;14)(q22;q11)	Bell ^{Bell,2007}
t(6;9)(q23eq25;p22ep24)	Nordkvist ^{Nordkvist,1994} , Stenman ^{Stenman,1986}
t(6;15)(q25;q15)	el-Naggar ^{el-Naggar,1999}
t(1;9)(q21;p21e22)	Nordkvist ^{Nordkvist,1994}
der(9)i(9)(q10)inv(9)(q12q13)	
der(X)t(X;9)(p21;p22e23)	

Rabban munkacsoportja által végzett tanulmányban a fent említett transzlokációkon felül további, egyéb mutációs mechanizmusokat is leírtak. Ezek között említhetjük a 22q, 19p13.3, a 11q13, a 12p13 és a 16q24 lókuszek funkciónyeréses, valamint a 9p13, 10p11, 14q11, 1p12, 2p11, 5q13, 1p36, 2q21, 4p11, 7p11, 8p23, 10q11, 15p11 és 21p11 kromoszómák funkcióvesztéses mutációit^{Vranic,2013}. A funkciónyerő mutációk területein a *CNN2*, *STK11*, *KISS1R*, valamint *CCND1* géneket kódoló szakaszok találhatóak, a funkcióvesztéssel járó mutációk helyén a *BCL9*, *NOTCH2*, valamint *RET* gének kódoló szakaszai detektálhatók. A 16q régió funkciónyerését és a 2q, valamint az 5p régiók funkcióvesztését bACC esetekben Fulford, Reis-Filho és Lakhani megfigyelései támogatják^{Marchio,2010}. Ugyanez a munkacsoport nyálmirigy eredetű ACC esetekben abACC daganatokban megfigyeltekkel elentétben a 8p és 14q régiók funkciónyeréséről számolt be^{Marchio,2010}. Reis-Filho és munkatársai – bACC esetekkel megegyező módon – sACC esetekben is kimutatták a 16q kromoszómális régiók funkciónyerését. Az 1p32-36 és a 9p régiókat érintő funkcióvesztést nyálmirigy eredetű ACC esetekben is alátámasztották^{Mark,1996;Rao,2008}, az 1p32-36 funkciónyeréses mutációját pedig összefüggésbe hozták a sACC esetek rossz klinikai kimenetelével^{Rao,2008}.

ACC esetekben a tumor szupresszorként ismert *p53* gén mutációjával és az általa kódolt, megváltozott fehérje expressziójával kapcsolatban kevés adattal rendelkezünk. A sACC esetek egy részében kimutatható *p53* mutáció nagyobb gyakorisággal fordul elő rosszul differenciált esetekben, mint jól differenciált sACC tumorokban és ezek a mutációk gyakran figyelhetők meg rekurráló ACC esetekben. Mindezek alapján a *p53* expressziójának, valamint

a TP53 mutációjának vizsgálata hasznos prognosztikus marker sACC tumorokban^{Kiyoshima,2001;Papadaki,1996;Preisegger,2001;Yamamoto,1998}.

A szájüreg területéről kiinduló ACC-k esetében szintén rossz prognosztikai jelnek számít az alacsony *E-cadherin* expresszió, mely összefüggésbe hozható a fokozott metastasis képesséssel^{Franchi,1999}. Az E-cadherin csökkent expressziójának oka Ge és munkatársai szerint a CDH1 gén metiláltsága következtében alakul ki^{Ge,2012}, amely sACC esetekben perineurális invázióhoz, valamint regionális és távoli áttétképzéshez is hozzájárul.

Nyálmirigy eredetű ACC-k fokozott *cyclin D1* expressziójáról mind a fej-nyak, mind a tüdő régióból kiinduló daganatok esetében beszámoltak már^{Bernheim,2008;Greer,2007;Sequeiros Santiago,2004;Wegner,2007}. A sACC esetekben kimutatható elváltozás összefüggést mutat ezen daganatok magas proliferációs aktivitásával^{Shintani,2000}. Ellentétben a nagy arányban kimutatható fokozott fehérjeexpresszióval, a cyclin D1 -et kódoló gén, a *CCND1* amplifikációja sACC esetek csupán igen kis százalékában (5-33%) mutatható ki^{Greer,2007;Sequeiros Santiago,2004}, így a fehérje fokozott kifejeződésének oka más mechanizmusokban keresendő^{Greer,2007}. Emlő eredetű ACC tumorokban cyclin D1 expresszióra vonatkozó irodalmi adat jelen tudásunk szerint nincsen.

Az apoptózist szabályozó *Bcl-2* (B-cell CLL/lymphoma) protoonkogén nyálmirigy eredetű ACC esetekben fokozott expressziót mutat, mely a rosszul differenciált sACC esetekben kifejezetten magas százalékban detektálható^{Al-Rawi,2010}. A sACC tumorok hisztopatológiai jellegzetességeiktől függetlenül igen magas százalékban expresszálják a Bcl-2 fehérjét^{Bell,2011;Norberg-Spaak,2000}. Emlőből származó ACC esetek Bcl-2 expressziójával kapcsolatban tudomásunk szerint még nem közöltek eredményeket.

Egy bACC-vel kapcsolatos esettanulmányban a *PIK3CA (PIK3K)* és *PTEN* gének mutációjáról számolnak be^{Vranic,2007}. Egy munkacsoport nyálmirigy eredetű ACC-k esetében is kimutatta a PIK3CA gén mutációját^{Stephens,2013}, PTEN mutációról azonban sACC esetekben nem számol be az irodalom. Ezzel szemben a PTEN génexpressziót több kutatócsoport is kiterjedten vizsgálta, főként annak progresszióra, valamint klinikopatológiai jellemzőkre való hatásait^{Chen,2013;Kou,2013}. Egy munkacsoport a PTEN epigenetikai módosulásairól is beszámolt, melynek jelentőségét az ACC korai felismerésében látták^{Fan,2010}.

A fent ismertetett jellegzetességek ugyan hozzájárulhatnak az ACC egyes szervekből kiinduló és változó klinikai lefolyásának kialakításához, azonban eddig egyik esetben sem

sikerült összefüggést igazolni a molekuláris, vagy genetikai eltérés és a daganat prognózisa között. Feltehetően további mechanizmusok kulcsfontosságú szerepét is vizsgálnunk kell: akár összetett jelátviteli útvonalak (migráció, proliferáció, valamint immunválasz) szabályozási folyamatait^{Weigelt,2008}, akár epigenetikai mechanizmusokat figyelembe véve.

1.1.5. *Az ACC terápiai lehetőségei az eddig ismert hisztopatológiai, molekuláris és genetikai jellegzetességek tükrében*

Eltérő klinikopatológiai jellegzetességeik miatt abACC és sACC esetek terápiaja különbözik: míg az emlőből kiinduló tumor esetében sokszor a sebészi rezekció önmagában kuratív^{Miyai,2014}, addig a nyálmirigy eredetű forma kezelése során radikális sebészi beavatkozás és sugárterápia alkalmazása mellett^{Gomez,2008;Triantafillidou,2006} is magas recidívahajlam tapasztalható. A sACC esetek aspecifikus kemoterápiás kezelése során ezidáig platina-származékok, anthracyclinek, 5-FU (5-fluorouracil), alkiláló szerek, valamint metotrexát (MTX) alkalmazását tanulmányozták, melyek klinikai eredményessége változó^{Agulnik,2007;Ghosal,2011;Hitre,2013}. Az aspecifikus kezeléssel túl a fentiekben ismertetett molekuláris és genetikai jellegzetességek lehetőséget nyújtanak célzott kezelési eljárások kifejlesztésére is.

Az elmúlt években feltárt molekuláris és genetikai eltérések sACC esetek célzott kezelésének alapjaként szolgálhatnak. Az ATP kötőhelyekkel rendelkező tirozin-kináz receptorok kompetitív és szelektív gátlója az *imatinib*, mely az ABL, BCR-ABL fehérjék és a PDGF receptorok gátlásán kívül a c-KIT fehérjének is ismert inhibitora^{Hotte,2005}. Ezáltal az imatinib fokozott c-KIT expressziót mutató sACC esetek kezelésének ígéretes célpontjaként szolgálhat. Ezzel szemben klinikai vizsgálatok alapján igen ellentmondásos eredmények születtek: míg egyes munkacsoportok szerint sACC-ban szenvedő betegek imatinib kezelése során szembetűnő klinikai választ tapasztalható^{Faivre,2005}, ezt az eredményt más tanulmányok nem támasztották alá^{Hotte,2005;Pfeffer,2007}. Sőt, bizonyos esetekben az imatinib kezelést a sACC progressziója követte^{Lin,2005}. Kedvező klinikai hatás érhető el azonban sACC esetek kezelése során, amennyiben az imatinib kezelést hagyományos kemoterápiás szerek (pl.: ciszplatin) alkalmazásával egészítjük ki^{Bruce,2005;Ghosal,2011}.

A Her2-t fokozottan expresszáló sACC esetek célzott kezelésére nyílik lehetőség a *trastuzumab (Herceptin)* alkalmazásával, mely rekombináns monoklonális antitestként a Her-2 extracelluláris doménjének direkt antagonistájaként viselkedik. Mindezek ellenére a trastuzumab sACC esetekben mutatott klinikai hatásainak vizsgálatáról mindezidáig még nem számolt be az irodalom, melynek elsődleges oka feltehetően a Her2-t fokozottan expresszáló sACC esetek igen alacsony száma lehet.

Ahogy láthattuk, a sACC esetek célzott kezelése annak ellenére nehézkes, hogy számos molekuláris és genetikai jellegzetességüket ismerjük már. A célzott kezelések kifejlesztését és alkalmazhatóságát nem csak az alkalmazott szerek előre ki nem számítható hatástalansága korlátozza. Az ACC-k nagy hányadában azonosítható eltérések (MYB fehérje fokozott expressziója, a MYB/NFIB fúziós gén jelenléte és a c-KIT overexpresszió) terápiás célpontként való alkalmazása ugyan kézenfekvőnek tűnik, ACC-k patogenezisében betöltött kulcsfontosságú szerepük azonban megkérdőjelezhető. Ezek az eltérések ugyanis egyaránt detektálhatóak a kiváló prognózisú bACC, valamint a kedvezőtlen klinikai kimenetelt mutató sACC esetekben. További molekuláris és genetikai eltérések terápiás célpontként való alkalmazhatóságát pedig az a tény nehezíti, hogy ezek jelentős hányada csupán egy-egy egyedülálló sACC esetben igazolható.

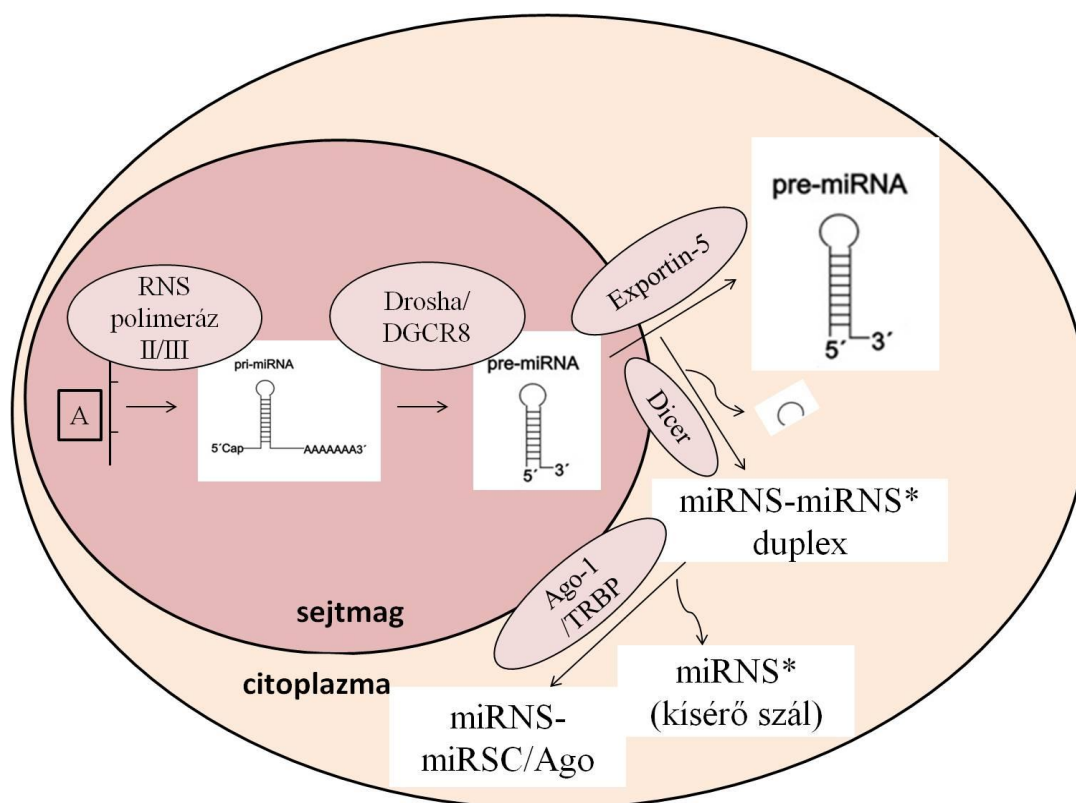
A hatékony célzott kezelés kifejlesztéséhez elsősorban a bACC és a sACC esetek szélsőségesen eltérő biológiai viselkedésére kell magyarázatot találnunk, mely az eddig leírt molekuláris és genetikai szintű jellegzetességeken túl feltehetően epigenetikai szintű szabályozás által is befolyásolt.

1.2. A mikroRNS-ek

1.2.1. A mikroRNS-ekről általában

A mikroRNS-ek (miRNS) rövid, 20-24 nukleotidból álló, egyláncú, fehérjét nem kódoló RNS molekulák, melyek funkciója pár évtizeddel ezelőtt még teljesen ismeretlen volt. Az elmúlt években fény derült arra, hogy ezek az apró molekulák a sejtélettani folyamatok szabályozásában központi szerepet töltenek be^{Moss,2002;Scherr,2004}. Máig már több ezer miRNS-t azonosítottak, melyek között közel 2000 az emberi fajra specifikus. A miRNS-ek nagy részétfehérjét nem kódoló, és ezért korábban „hulladék DNS”-ként (junk DNA) számon tartott DNS régiók kódolják. Jelen ismeretünk szerint a miRNS gének az ismert humán gének mintegy 3%-át teszik ki. A miRNS-ek szövetspecifikusak: minden szövettípusnak egy kizárólag rá jellemző miRNS-expressziós mintázata van, mely egyedi és általa a szövet felismerhető, a többi szövettípustól elkülöníthető^{Guo,2014;Lagos-Quintana,2002}.

A miRNS-ek többlépcsős folyamat eredményeképpen szintetizálódnak klasszikus, vagy alternatív útvonalon keresztül. A *klasszikus útvonal* esetében a miRNS saját DNS kódoló régióval rendelkezik, melyről a sejtmagban RNS-polimeráz II/III közreműködésével primer-miRNS készül^{Lee,2003}. Ez a hajtű alakú előalak a Drosha endoribonukleáz és a DGCR8 kofaktor közreműködésével a hurok régiót megőrző, de rövidebb pre-miRNS-sé alakul, majd az Exportin-5 fehérje segítségével a citoplazmába kerül. A citoplazmában a Dicer nevű ribonukleáz kofaktorok (TRBP és a PACT) közreműködésével eltávolítja az előalak hurok részét, így létrehozza a kb. 22 nukleotid hosszú szabad végekkel rendelkező miRNS duplexet^{Bohnsack,2004;Chendrimada,2005;Lee,2006;Lee,2002;Morlando,2008;Murchison,2004}. A Dicer és kofaktorai közreműködnek továbbá a miRISC (miRNA induced silencing complex), vagy más néven a miRNP (miRNA ribonucleoprotein particle) kialakításában is. A szintézis végső lépése során a kettős szálú miRNS egyik szála degradálódik (kísérő szál), a másik szál (vezető szál) megmarad, az effektor komplexbe épülve (Argonaute fehérje/Ago 1-4) érett, funkcionális miRNS-sé válik, mely az mRNS-ek megfelelő szekvenciáihoz kötődve regulálja azok működését (3. ábra). Az *alternatív biogenezis* során a miRNS egy gén kódoló szekvenciájában az exonok között elhelyezkedő intronról íródik át. Ennek a mechanizmusnak a lényege, hogy a Drosha enzim közreműködése nélkül, egy úgynevezett debranching enzim segítségével alakul ki a pre-miRNS. A szintézis alternatív útvonala ezek után kapcsolódik a klasszikus útvonal többi lépéséhez^{Naqvi,2009;Ying,2005}.



3. ábra. AmiRNS bioszintézis klasszikus útvonalának sematikus ábrája. (A bioszintézis lépéseinek részletes leírását ld. a szövegben)

A miRNS-ek, döntően a komplementaritás elve alapján, az általuk szabályozott hírvivő RNS-ek (messenger RNS/mRNS) fehérjévé át nem íródó, 3' végéhez (3'-UTR/untranslating region/) kötődnek, majd többféle hatásmechanizmus révén előidézik a célgén poszt-transzlációs gátlását. A negatív reguláció egyik formája a *transzláció iniciációjának gátlása*, mely többféle úton keresztül vezethet az mRNS fehérjére történő átírásának megakadályozásához^{Chendrimada,2007;Mathonnet,2007;Wakiyama,2007}. Másik lehetséges hatásmechanizmus a *poszt-iniciációs gátlás*, mely során a transzláció elongációs fázisa blokkolódik^{Petersen,2006}. A gén expressziójának további lehetséges gátlása az *mRNS destabilizációja*, mely az mRNS degradálódásával jár, és ennek köszönhetően a miRNS-ek nem csupán a fehérjék expresszióját képesek csökkenteni, hanem az mRNS-ek mennyiségét is befolyásolni tudják^{Bagga,2005;Giraldez,2006}. Végül pedig a gátlás az ún. *P-testek (P-body, processing body)* segítségével is megvalósulhat, melynek során miRNS-ek hatására a transzlációsán inaktív mRNS-ek citoplazmatikus granulumokban akkumulálódnak^{Brenques,2005;Eulalio,2007}.

A miRNS-ek hatása egyben pleiotróp és redundáns is: egy miRNS sokféle célgénen kifejtheti a hatását, valamint egyazon célgén több miRNS szabályozása alatt állhat^{Naqvi,2009}. A miRNS-ek nem csupán szabályoznak, ők maguk is bonyolult folyamatok révén

szabályozottak: egyrészt egymás működését is szabályozni képesek, másrészt gének által is reguláltak^{Krol,2010}. Célgénjeiket ugyan a miRNS-ek javarészt negatívan regulálják, egyes esetekben beszámoltak már aktiváló miRNS-ekről is^{Vasudevan,2008;Zhu,2008}. A fenti hatásmechanizmusok láttán nyilvánvaló, hogy ezek az apró molekulák minden egyes sejtben egy differenciált és igen finoman hangolt szabályozást visznek végbe és bonyolult szabályozási mechanizmusok révén egy szinte átláthatatlan hálózatot képezve biztosítják a gének megfelelő működését.

1.2.2. A miRNS-ek nevezéktana, miRNS családok

A miRNS-ek érett formáját nemzetközileg a „miR-” előtag után feltüntetett arab számmal jelölik (pl. miR-155). Az eltérő fajokból származó miRNS-ek azonosítására a „miR” előtag elé az adott fajt beazonosító, hárombetűs rövidítés kerül (humán/Homo sapiens: hsa; Caenorhabditis elegans: cel). Bizonyos esetekben ugyanazon fajon belül, a genom különböző lókusairól azonos szekvenciájú, érett miRNS-ek íródnak át, mely esetekben a miRNS száma után kötőjellel újabb arab számot helyezünk (pl. api-mir-210-2). Amennyiben a bioszintézis során az adott miRNS a prekürzora 5' karjáról kerül kihasításra, a név után -5p utótag kerül, amennyiben a lehasítás a 3' karról történik, a név után -3p utótagot applikálunk (pl.: hsa-miR-126-5p és hsa-miR-126-3p).

Egyes miRNS-ek között az átlagosnál több hasonlóság mutatkozik érett alakjaik szekvenciája, valamint éretlen alakjuk (pre-miRNS) nukleotidsorrendje, vagy szerkezeti felépítése között^{Ding,2011;Kozomara,2011}. Az egymásra ily módon fokozottan hasonlító miRNS-eket ún. **miRNS-családok**ba sorolják, melyek tagjaira – az átlagosnál nagyobb fokú szerkezeti hasonlóságon túl – hasonló funkciók jellemzőek^{Kaczkowski,2009}. Az egy családba sorolható miRNS-eket kódoló gének non-random módon helyezkednek el olyan gének körül, melyek a fertőzésekben, az immunválaszban, neurodegeneratív betegségekben, vagy daganatos megbetegedésekben játszanak kiemelt szerepet^{Mathelier,2013}. A legismertebb és leginkább kutatott humán miRNS családok között említhetjük a *let-7*, a *miR-17-92*, valamint a *miR-23b/27b/24-1* családokat.

A „legősibb” miRNS csoportnak a *let-7* család tekinthető, hiszen az elsőként felfedezett miRNS-ek (cel-lin-4 és cel-let-7) ebbe a csoportba tartoznak. A nagyfokú konzerváltságot (fajok közötti homológiát) mutató *let-7* család tagjai között számos humán miRNS is

azonosítható (let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i), melyek különböző szervek malignus folyamataiban játszanak szerepet^{Chen,2014;Liang,2011;Ma,2014}. Egyik legfontosabb célpontjuk a **KRAS** gén, melynek szabályozása révén kiemelt jelentőségük van a colorectalis, valamint tüdő eredetű daganatokban, személyre szabott terápiák kifejlesztésére is lehetőséget nyújtva^{Kasinski,2014;Langevin,2014}. A KRAS génre kifejtett hatásaik révén TNBC-k KRAS variánsai kapcsán is felmerült már potenciális terápiás célpontként való alkalmazásuk^{Paranjape,2011}.

A *miR-17 (miR-17-92) család* legismertebb tagjai a miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92, melyek szerepe daganatfajtától eltérően változhat. Egyes esetekben ezek a miRNS-ek onkogén, máskor tumor szuppresszor szerepet töltenek be^{Chang,2013;Goto,2014;Li,2014;Wu,2014}. Fontos célmolekulák szabályozása révén (CCND1, MYC, BCL2, ERBB2, FGFR2, stb.) ez a miRNS család hozzájárulhat számos daganatfajta proliferációjához, metasztázis képzéséhez, angiogenetikus folyamatok kialakulásához^{Jackstadt,2014;Park,2014;Yin,2012}, és befolyásolhatja bizonyos daganatok kemoterápiára való érzékenységét is^{Chatterjee,2014}. A miR-17-92 család tagjai az emlődaganatok különböző molekuláris alcsoportjainak elkülönítésében is szerepet játszhatnak (lásd később)^{Calvano Filho,2014}.

1.2.3. *A miRNS-ek szerepe élettani és kórélettani folyamatokban*

A felsorolt mechanizmusokkal, számos gén kifejeződését regulálva a miRNS-ek rendkívül sokféle élettani folyamatban szerepet játszanak, így befolyásolják a sejten belüli jelátviteli folyamatokat, a sejtek differenciálódását és proliferációját, valamint apoptotikus folyamatokat is regulálnak. A miRNS-ek ismert szabályozói immunológiai folyamatoknak, valamint az inzulinszekréciónak is. Összetett mechanizmusuk révén a miRNS-ek a szervezet homeosztázisának kialakításában elengedhetetlen résztvevők. A normáltól eltérő miRNS-expresszió szinte bármely szerv egyensúlyát felboríthatja, ezáltal számtalan kórélettani folyamat előidézéséhez hozzájárul: fontos szerepet töltenek be többek között iszkémiás szívbetegségekben^{Cao,2014;Song,2014}, krónikus vesebetegségekben^{Chung,2013}, tüdőfibroszisban^{Pandit,2015;Pandit,2011;Wang,2013}, valamint diabetes mellitusban is^{Chen,2014;Figueira,2014;Li,2014}. A miRNS-ek jelentősége napjainkban vitathatatlanul az egyre nagyobb számban megjelenő daganatos betegségekben a legnagyobb^{Calin,2006}. A normál szövethez képest a daganatok miRNS mintázata (sok esetben az adott elváltozásra specifikus módon) megváltozik, melynek ismeretében a daganatok egymástól, valamint a normál

szövetektől elkülöníthetőké válnak, lehetőség nyílik a daganatok miRNS-specifikus, célzott terápiájára is^{Garg,2015;Gong,2005}, valamint sok esetben a daganatok klinikai viselkedése is megjósolható^{Calin,2005}. Ezen felül az egyes daganatokban speciális megoszlást mutató miRNS-ek által regulált célgének felderíthetők. A daganatra jellegzetes gének ismerete további terápiás célpontok azonosítását teszi lehetővé.

A daganatokban betöltött szerepük alapján a miRNS-ek rendelkezhetnek tumor keletkezést gátló (tumor szuppresszor), valamint a tumoros proliferációt elősegítő (onkogén) funkcióval. Ez utóbbiakat onkomir-eknek is nevezzük^{Folini,2010;Wang,2015}.

1.2.4. *miRNS-ek és ACC*

Az adenoid cysticus carcinomákban szerepet játszó miRNS-ekről kevés irodalmi adattal rendelkezünk, melyek között saját közleményeinken kívül csupán sACC esetek epigenetikai vizsgálatai szerepelnek, míg bACC esetekben miRNS expressziós vizsgálatokat korábban (a nyilvánosan elérhető adatbázisok alapján) csak munkacsoportunk végzett^{Kiss,2013;Kiss,2014;Kiss,2015}.

Az elmúlt évek során igazolódott, hogy az ACC-kre jellemző MYB/NFIB fúziós gén egyik tagját, a MYB gént több humán miRNS is negatívan regulálja: **miR-15a/16** miRNS-eket fokozottan expresszáló daganatokban alacsony MYB expressziót találtak, míg a **miR-150**-ról igazolódott, hogy a c-MYB-en keresztül a B-sejtek differenciálódási folyamatait szabályozza^{Xiao,2007;Zhao,2009}. Marta Persson munkacsoportjában ezen miRNS-ek terápiás célpontként való alkalmazhatósága is felmerült^{Persson,2009}, mely az ACC-kben magas arányban előforduló MYB/NFIB fúziós gén jelenléte miatt különösen kiemelt jelentőséggel bírhat.

2013-ban Mitani és kutatócsoportja a **miR-17/92** család fokozott expressziójának hatását vizsgálta sACC esetekben (lásd később)^{Mitani,2013}. Ugyanebben az évben He és munkatársai a **miR-181a** a MAPK-Snail2 útvonalon keresztüli metasztázis képzést csökkentő funkcióját igazolta nyálmirigy eredetű ACC esetekben^{He,2013}. Chen és munkatársai szintén ebben az évben nagyfokú metasztázist képző potenciállal rendelkező sACC sejtvonalakban három fokozottan expresszálódó (miR-4487, -4430 és -486-3p), valamint három csökkent expressziót mutató (miR-5191,-3131 and -211-3p) miRNS-t azonosított^{Chen,2014}.

Ugyan az elmúlt években nagy előrelépések történtek az ACC esetekben szerepet játszó miRNS-ek felderítésében, az imént ismertetett eredmények kezdetlegesek, önmagukban nem

magyarázzák a sACC esetek bACC-tól eltérő agresszív klinikai viselkedését. Ahhoz, hogy a miRNS-ek ACC-ban betöltött esetleges szerepét jobban feltárjuk, a két szervből kiinduló daganatok egyidejű miRNS-profil vizsgálatára van szükség.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálatunk két részből állt: egy kiindulási, előzetes miRNS expressziós vizsgálatból, illetve a kapott eredmények alapján kiválasztott miRNS-ek expressziójának vizsgálatából, valamint azok lehetséges célgénjei által kódolt fehérjék mennyiségi meghatározásából. Ennek alapján a következő célokat tűztük ki:

2.1 A bevezető vizsgálat/”screening”:

- Emlőből és nyálmirigyekből kiinduló ACC (bACC és sACC) és normál emlő, valamint nyálmirigy kontroll szövetek (bN és sN) miRNS expressziós profiljának vizsgálata, különös tekintettel a vizsgált minták mindegyikében expresszálódó miRNS-ek, valamint az egyes vizsgálati csoportok között speciális eloszlást mutató miRNS-ek azonosítására.
- A kiválasztott miRNS-ek lehetséges célgénjeinek, potenciálisan érintett fehérjék, valamint érintett jelátviteli folyamatok feltérképezése nyilvános adatbázisok segítségével.

2.2 Szűkített számú miRNS-ek és az általuk szabályozott gének által kódolt fehérjék vizsgálata:

- A kiindulási vizsgálat során kiválasztott miRNS-ek expressziójának meghatározása magasabb esetszámú mintákon és annak összehasonlítása az egyes vizsgálati csoportok között.
- A miRNS-célgén vizsgálat szűkítése a speciális megoszlást mutató miRNS-ekre és a legtöbb miRNS-célgén interakciót mutató gének kiválasztása.
- A kiválasztott célgének által kódolt fehérjék expressziójának meghatározása és összehasonlítása a vizsgálati csoportok között.
- Tumoros minták (bACC és sACC) ER, PgR és Her2 expressziójának vizsgálata.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kiindulási vizsgálat: miRNS expressziós mintázat feltérképezése

Szövetminták

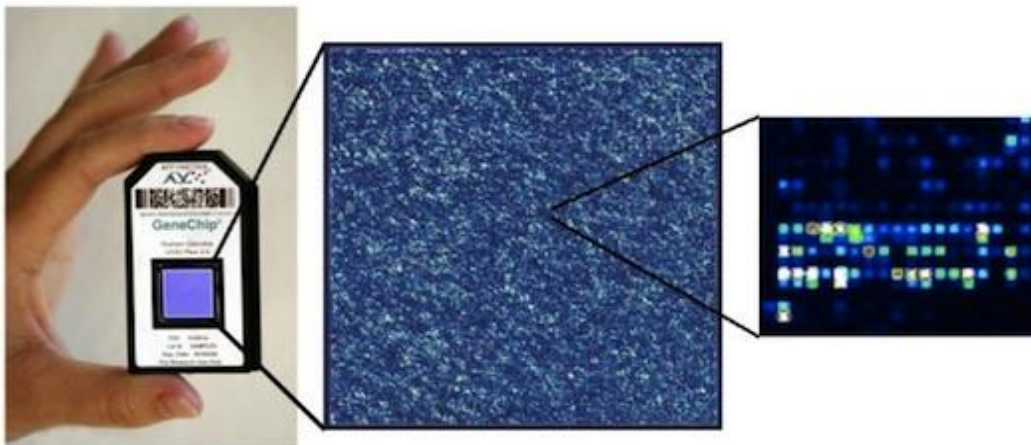
Bevezető vizsgálataink során 6 esetet vizsgáltunk, melyeket a Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézetének archívumából választottunk ki. Ezek között két bACC, valamint két sACC eset szerepelt. Kontrolljaikként egy-egy normál submandibularis nyálmirigyből (sN), valamint emlőszövetből származó (bN) mintát vizsgáltunk. Az egyik bACC esetet a szolnoki Hetényi Géza Kórház, a másikat a székesfehérvári Szent György Kórház Patológiai Osztálya konzíliumi vizsgálat céljából küldte intézetünkbe.

RNS izolálás, minőségellenőrzés

Az esetekhez tartozó reprezentatív szövettani metszetek megfelelő FFPE (formalin-fixált, paraffinba ágyazott/ formalin-fixed, paraffin embedded/) blokkjainak kiválasztását követően az RNS izoláláshoz mintánként 10 db 5 µm vastag metszetet készítettünk. A tumoros esetekből származó metszetekből izolálás előtt makrodisszekciót végeztünk, mely során a környező normál szövetet eltávolítottuk. Makrodisszekáláshoz az 5 µm vastag metszeteket kétszer 5 percen át xilolban áztattuk, majd szobahőn száradni hagytuk. A xilol elpárolgása után a vizsgálni kívánt területeket metszeteinkről a HE festett metszet alapján pengével távolítottuk el és Eppendorf csőbe helyeztük. Az RNS izolálás a Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével történt a gyártó útmutatása szerint. Az izolátum minőségellenőrzését az ajánlott protokollnak megfelelően 6000 Pico Chip Kit (Agilent, Palo Alto, CA, USA; Agilent 2100 Bioanalyzer készüléken futtatva) segítségével végeztük.

miRNS expressziós mintázat meghatározása

Az RNS izolátum mennyiségét fluorometriás mérésel Qubit RNA Assay (Life Technologies, Gand Island, NY, USA) segítségével határoztuk meg. Minden mintából 1 μ g mennyiséget a Genisphere HSP Labeling Kit (Genisphere, Hatfield, PA, USA) segítségével biotinnal jelöltünk, a gyártó által megadott instrukcióknak megfelelően. A jelölt RNS-izolátumokat az Affymetrix® GeneChip® miRNA Array-en (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA, AF-901325) található komplementer láncokkal hibridizáltattuk (4. ábra). Ez a vizsgálati felület 847 humán miRNS, valamint számos további faj miRNS-ének detektálására alkalmas egyszerre. A vizsgált mintában található miRNS-ek és a felületen lévő komplementer láncok hibridizációja streptavidin-phicoerythrin komplex segítségével váltak detektálhatóvá, mely láthatóvá tette a biotinnal jelölt miRNS-eket. A minták miRNS expresszióját a reakciók fényintenzitása alapján határoztuk meg, mely korrelált az egyes vizsgálati mintákban található miRNS-ek mennyiségével. A kvantifikációhoz miRNA QC Tool software-t (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) használtunk.



4.ábra. Az Affymetrix® GeneChip® miRNA array a fényintenzitás alapján következtet a minták miRNS tartalmára (<http://www.stemcore.ca/services/microarrays>)

A jelátviteli folyamatok érintettsége az ACC tumor mintákban

Az azonosított miRNS-ek és sejten belüli jelátviteli útvonalak potenciális kapcsolatait az IPA® (Ingenuity Pathway Analysis) adatbázis segítségével tártuk fel. Az IPA® útvonal analízise segítségével lehetőségünk nyílt az irodalomban korábban publikált molekuláris útvonalak azonosítására, melyek ezen publikációk alapján kapcsolatba hozhatóak egyes, általunk detektált miRNS-ekkel. Ebben az elemzésben olyan miRNS-ek interakcióit vizsgáltuk, melyek az Affymetrix® GeneChip® miRNA Array eredményei szerint mind a 6 vizsgált mintánkban expresszálódtak. Az analízis során az emlőből és nyálmirigyből kiinduló ACC esetek miRNS expresszióját normál szöveteikben kapott miRNS expressziós értékekhez normalizáltuk. Az adatbázisba az így kapott értékeket vittük be, mely alapján a program potenciálisan szabályozott gének érintettségét, miRNS-mRNS interakciók lehetőségét listázta számunkra, melyet hálózatos formában is megjelenített.

Az egyes miRNS-ek és az általuk szabályozott célgének interakcióinak meghatározására nyilvános célgén predikciós adatbázisokat használtunk. A feltételezhető miRNS-célgén interakciók azonosítására miRecords felületet alkalmaztuk, mely átfogó adatbázisát képezi több miRNS-célgén interakciót tartalmazó rendszernek^{Xiao,2009}. Ezen adatbázisok között megtalálhatóak a DIANA-microT, a MicroInspector, a miRanda, a MirTarget, az NBmiRTar, a PicTar, a PITA, az RNA22, az RNAhybrid, valamint a TargetScan/TargetScanS, melyek a potenciális miRNS-célgén interakciókat eltérő paraméterek alapján azonosítják (2. táblázat). Az egy helyen integrált adatok széles körű célgén elemzésre adtak lehetőséget. Ugyanakkor a találatokat nagy mértékben megerősítette, ha a vizsgált miRNS és célgénjei közötti interakciókat publikált validációs vizsgálatok alá is támasztották.

2. táblázat. A miRecords adatbázis által integrált miRNS-célgén interakciós adatbázisok, predikcióik alapja, valamint a rájuk vonatkozó hivatkozások

Adatbázis neve	Célgén predikció módja	Hivatkozás
TargetScan	<ul style="list-style-type: none"> komplementaritás¹ 	Lewis ^{Lewis,2005} Grimson ^{Grimson,2007} Friedman ^{Friedman,2009}
Diana microT v.4	<ul style="list-style-type: none"> más miRNS adatbázisok becslése 	Maragkakis et al. ^{Maragkakis,2009}
PicTar	<ul style="list-style-type: none"> komplementaritás¹ 	Krek et al. ^{Krek,2005}
MicroInspector	<ul style="list-style-type: none"> komplementaritás speciális kötődési tulajdonságok figyelembe vétele 	Rusinov ^{Rusinov,2005}
Targetminer	<ul style="list-style-type: none"> 10 különböző célgén elemző algoritmus alapján 	Bandyopadhyay ^{Bandyopadhyay,2009}
miRanda/microrna.org	<ul style="list-style-type: none"> komplementaritás miRNS-mRNS kötődéskor felszabaduló szabad energia 	Betel ^{Betel,2008}
miRTarget2/miRDB	<ul style="list-style-type: none"> komplex algoritmus 	Wang, Naqa ^{Wang,2008;Wang,2008} El
RNA22	<ul style="list-style-type: none"> nem támaszkodik a fajok közti konzervációs mechanizmusokra elsőként az mRNS-ben keresi a vélt kötőhelyeket, aztán azonosítja a miRNS-t 	Miranda ^{Miranda,2006}
PITA	<ul style="list-style-type: none"> mag (seed) régióparaméterei, az elégtelen komplementaritás és hurkok kizárásával 	Kertész ^{Kertész,2007}
RNAHybrid	<ul style="list-style-type: none"> a miRNS-mRNS kötődéskor felszabaduló minimális szabad energia 	Krüger ^{Krüger,2006} Rehmsmeier ^{Rehmsmeier,2004}

¹ az mRNS-ek 3'-UTR régiója és a miRNS-ek „mag” (seed) régiója közötti komplementaritás² Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

3.2. Szűkített számú miRNS-ek expressziójának vizsgálata és az általuk potenciálisan regulált fehérjék mennyiségi meghatározása

Szövetminták

A validációs vizsgálatokra 63 esetet választottunk ki. A kiválasztott esetek között 20 bACC, 22 sACC, kontrolljaikként pedig 11 bN és 13 sN esetből származó minta szerepelt. A validációs vizsgálatok elvégzése egyes minták esetében nem volt kivitelezhető, melynek okait a későbbiekben ismertetem. Az egyes kísérletekben szereplő pontos esetszámot az adott módszer leírása kapcsán ismertetem.

A tumoros esetekhez tartozó szöveti mintáink egy részét a II. sz. Patológiai Intézet beteganyagából választottuk, a további mintákat pedig külső patológiai intézetek biztosították, melyek a bevezető vizsgálathoz esetet szolgáltató intézményeken kívül a kistarcsai Flór Ferenc Kórház Patológiai Osztálya, az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris és Sebészeti Patológiai Osztálya, a sarajevói Clinical Center of the University of Sarajevo Patológiai Osztálya voltak. Kontrollcsoportjaink összes mintája intézetünk beteganyagából került ki. Az emlő eredetű tumorok 43-83 éves, míg nyálmirigy eredetű tumoraink 31-79 év közötti betegekből származtak. bACC eseteink három kivételével jól, valamint közepesen differenciált tumorok voltak, míg sACC esteink között rosszul differenciált esetek nem szerepeltek (3. táblázat). A klinikopatológiai adatok néhány esetben nem voltak elérhetőek, így nem rendelkezünk minden eset TNM státuszára vonatkozó információkkal. A rendelkezésünkre álló adatok szerint vizsgált eseteink nagy része (emlő és nyálmirigy eredetű daganatok egyaránt) korai stádiumban került felismerésre (T1 és T2 klinikopatológiai stádiumok). Mind bACC, mind sACC esetek között ismertek voltak olyan daganatok, melyek már a felismerés pillanatában regionális áttétet adtak, azonban a legtöbb betegnél a primer daganat felismerésekor még nem volt azonosítható nyirocsomó metasztázis. Emlő és nyálmirigy eredetű ACC-k között is két-két olyan esetünk volt, akiknél már a felismeréskor ismert volt a primer daganat távoli metasztázisa.

3. táblázat: *bACC* és *sACC* eseteink klinikopatológiai jellegzetességei

	<i>Eset jelölése</i>	<i>Kor</i>	<i>Műtét éve</i>	<i>Szövetteni grádus</i>
<i>bACC</i>	B1	83	2003	1
	B2	53	2006	1
	B3	57	2007	3
	B4	64	2009	1
	B5	67	2011	3
	B6	71	2005	2
	B7	47	2005	1
	B10	46	2010	2
	B11	52	2002	1
	B12	64	2006	1
	B13	52	2002	2
	B21	64	1996	1
	B22	78	2009	2
	B23	71	2001	1
	B24	53	2006	2
	B25	56	1984	1
	B26	59	1999	1
	B27	43	2007	3
	B28	49	2003	2
B29	51	2009	2	
<i>sACC</i>	S1	61	1999	1
	S2	61	2000	2
	S3	54	2002	1
	S4	71	2003	2
	S5	39	2005	2
	S6	74	2005	1
	S7	31	2006	1
	S8	36	2009	1
	S9	61	2010	2
	S10	79	2009	2
	S11	72	2012	2
	S13	62	2009	1
	S21	63	2003	2
	S22	63	2004	1
	S23	45	2004	2
	S24	37	2004	1
	S25	44	2006	1
	S26	54	2010	2
	S27	70	2010	1
S28	42	2011	2	
S29	75	2011	2	
S30	31	2012	2	

miRNS expresszió meghatározása

A kiválasztott microRNS-ek mennyiségi meghatározása a betegek FFPE szövetmintáiból történt. Az esetekhez tartozó reprezentatív blokkokból 10 db 5 µm vastag metszetet készítettünk, melyeket a HE festés alapján makrodisszekáltunk azokban az esetekben, amelyekben a metszeten látott szöveti struktúra a tumor mellett jelentős mennyiségű normál szövetet is tartalmazott (ha a tumorsejtek százaléka nem érte el a 80%-ot).

RNS izolálását a Life Technologies teljes RNS izoláló kitjével végeztük (RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit, kat. szám: AM1975), a gyártó útmutatásai szerint, melyet kísérleti eredményeink alapján a legjobb minőségű végtermék elérése céljából – elsősorban az emésztési folyamatok időtartamára vonatkozóan módosítottunk (*ld. Függelék, 1. pont*). Az RNS koncentráció meghatározásához NanoDrop 1000 Spektrofotométert (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) használtunk. Azon mintákat, amelyek RNS koncentrációja az ideális határérték alatt (20 ng/µl érték alatt) volt, a későbbi vizsgálatokból kizártuk. Ezek alapján 6 bACC, 6 sACC eset, valamint egy nyálmirigy kontroll és 2 normál emlőszövet esett ki és végül a vizsgálatunkba összesen 16 s ACC, valamint 14 bACC eset került be. A kontroll csoportokba tartozó esetek mindegyikéből ideális mennyiségű RNS volt izolálható, így a 11 nyálmirigyből származó és 9 emlőből származó normál szövet további vizsgálatát elvégeztük.

miRNS expressziós vizsgálatokat a következő humán (hsa) miRNS-ek esetében terveztünk: let-7b, let-7c, let-7e, miR-17, miR-17*, miR-20a, miR-23b, miR-24, miR-27b, miR-125a-3p, miR-134, miR-181a-2*, miR-193b, miR-195, miR-206, miR-320a, miR-320c, miR-379, miR-382, valamint miR-1275, miR-1234, miR-1280, miR-1826, miR-768-3p és miR-768-5p. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai alapján kontroll (referencia) miRNS-ként két kis nukleoláris RNS (sno/small nucleolar RNA), az RNU43 és RNU48 expresszióját vizsgáltuk.

A kiválasztott miRNS-ek közül nem nyílt lehetőségünk mindegyik miRNS mennyiségi meghatározására. Az érett miR-768 3p és 5p egymással részlegesen komplementer szálaikat egy snoRNS-sel (HBII-239) való átfedés miatt kellett kizárni, a miR-1826-ot azért, mert korábban az 5,8S rRNS egy fragmentjének bizonyult, a miR-1280-at pedig azért, mert korábban egy tRNS fragmentumaként azonosították^{Kozomara,2011}. A let-7c és miR-181a-2* és miR-1234 mennyiségi analízisét azért nem tudtuk kivitelezni, mert specifikus primerek ezekre a miRNS-

ekre nem szerepeltek a gyártó (Life Technologies®) által forgalmazott termékek között. Két további miRNS, a miR-320a és miR-320c esetében közös primert alkalmaztunk, mivel ezekre külön-külön specifikus primert a gyártó szintén nem forgalmazott (későbbiekben: miR-320).

A mennyiségi meghatározás első lépésében a mintáinkból származó miRNS-t cDNS-re írtuk át miRNS specifikus primerek és TaqMan® Reverz Transzkripció Kít segítségével a gyártó utasításai alapján. Az átíró kit, az alkalmazott mestermix és az egyes miRNS-ekhez tartozó primerek pontos azonosítóit a 4. táblázat tartalmazza. A 7,5 µl osztérfogatú reakcióelegy 4 µl mestermixet (puffer, dNTP, MultiScribe enzim, RNáz inhibitor, nukleázmentes víz), 1,5-1,5 µl primert és 0,5 µl RNS-t (20 ng/µl koncentrációjú) tartalmazott. (*ld. Függelék, 2. pont*). A reverz transzkripciót Eppendorf Mastercycler PCR gép segítségével végeztük a következő hőprofil szerint: 4 perc 4°C-on, 30 perc 16 °C-on, 30 perc 42 °C-on, 5 perc 85 °C-on, végül 4 °C-ra hűtés és további felhasználásig 4 °C-on tárolás.

4. táblázat: A reverz transzkripció és a qPCR során alkalmazott reagensek pontos gyártói azonosítói

Termék pontos neve és azonosítója		Katalógusszám
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit, 1000 reactions		4366597
TaqMan® Universal Master Mix II, No UNG		4440047
TaqMan® MicroRNA Assays INV, S 002308, Human	miR-17	4427975
	miR-20a	
	miR-24	
	miR-195	
	miR-23b	
	miR-27b	
	miR-320	
	miR-193b	
	miR-1280	
	miR-1275	
	miR-125a-3p	
	miR-134	
	miR-17*	
	miR-206	
	miR-379	
	miR-382	
	let-7b	
	let-7e	
RNU43		
RNU48		

A minták közötti miRNS expresszió mértékének összehasonlításához qPCR-t végeztük szintén miRNS specifikus primerek (4. táblázat) és TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies; katalógusszám: 4366597) felhasználásával a gyártó utasításai szerint. A 10 µl reakcióelegy 8,84 µl mestermixet (TaqMan mix és nukleázmentes víz), 0,5 µl primert és 0,65 µl cDNS-t tartalmazott (ld. *Függelék, 3. pont*). A minták mérése triplikátumban, 96 lyukú PCR plate-en történt ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)/LightCycler 480 Instrument II (Roche Applied Science) készüléssel. Minden plate-en szerepelt tumoros, valamint normál esetekből származó kontrollminta, valamint egy cDNS-t nem tartalmazó negatív kontroll az esetleges nukleinsavszennyeződések kizárására.

A qPCR-rel azt a ciklusszámot kapjuk meg eredményül, ahol az adott miRNS kiinduló kópiaszámától függően és a DNS amplifikálással arányosan növekvő fluoreszcens jel eléri a küszöbszintet. Az egy mintához tartozó Cq (quantification cycle) értékeket átlagoltuk, a triplikátumok között a 0,5-nél nagyobb különbségű értékeket az átlagnál nem vettük figyelembe. A legstabilabb expressziót mutató miRNS-nek, a kísérletet megelőző feltételezésünktől eltérően nem az RNU43 vagy RNU48, hanem a miR-125a-3p bizonyult, melyet a számolás során referenciaként használtunk. A relatív expressziót a $2^{-(\Delta Cq_{\text{tumor}} - \Delta Cq_{\text{normál}})}$ alapján számoltuk, ahol a ΔCq az adott miRNS és a referencia miRNS Cq értékének különbsége.

Eredményeink statisztikai elemzéséhez ANOVA (variancia-analízis/**AN**alysis **O**f **V**ariance) és Tukey-teszteket alkalmaztunk a STATISTICA program (v 9.1, StatSoft Inc., Tulsa, OK), vagy GraphPad PRISM. program (v 5.001, GraphPad Software Inc, La Jolla, CA) segítségével. A p-érték <0,05 feltétel teljesülésekor a különbséget szignifikánsnak tekintettük.

3.2.1. *Célgének keresése*

miRNS expressziós vizsgálataink eredményeinek statisztikai elemzése után 4 miRNS-t választottunk ki, melyek esetében részletes célgén keresést végeztünk. A célgének azonosításához nyilvánosan elérhető adatbázisokat, miRWalk^{Dweep,2011} és miRTarBase^{Hsu,2014} programokat alkalmaztuk, melyek lehetőséget nyújtanak olyan miRNS-célgén interakciók szelektív keresésére, amelyeket validációs vizsgálatok korábban már megerősítettek. A kizárólag validált interakciók figyelembe vételével kiszűrhetőek a csupán feltételezéseken alapuló miRNS-célgén szabályozási folyamatok.

3.2.2. *Fehérje szintű vizsgálatok*

Fehérje szintű vizsgálatainkat két csoportra osztottuk: egyrészt a kiválasztott, legtöbb interakciót mutató célgének által kódolt fehérjék mennyiségi analízisére, másrészt olyan fehérjék mennyiségének mérésére, melyek irodalmi adatok alapján meghatározzák bACC esetek klinikopatológiai jellegzetességeit.

Lehetséges célgének által kódolt fehérjék vizsgálata

A célgén azonosítást követően az alábbi két fehérje immunhisztokémiai vizsgálatát végeztük el: cyclin D1 és Bcl-2 expresszióját vizsgáltuk. Immunhisztokémiai vizsgálatunkhoz FFPE szövettani blokkokat használtunk. Az egyes mintákhoz tartozó paraffinos blokkokból 5 µm vastag metszeteket készítettünk. Az immunhisztokémiai reakciókat automata immunfestő rendszerrel végeztük. (Ventana ES immunostainer system; VentanaMedical Systems Inc., Tucson, AZ, USA). Az epitópok feltárása Target Retrieval Solution (DAKO K4001, Glostrup, Dánia) oldattal történt, chromogénként 2,3-diamino-benzidint használtunk (CMD401; CellMarque, Rocklin, CA, USA). Az immunhisztokémiai vizsgálatok során alkalmazott antitestek adatait az 5. táblázat tartalmazza.

A *cyclin D1* és *Bcl-2* immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzésére a validációs vizsgálatokba besorolt minden minta alkalmasnak bizonyult, ezáltal ezeket a reakciókat minden kiválasztott mintán elvégeztük: 22 *sACC*, 20 *bACC*, valamint 13 *sN* és 11 *bN* esetben.

Terveink között szerepelt a *Myc* fehérje expressziójának vizsgálata is. Kísérleteink során kétféle *Myc* antitestet alkalmaztunk (Abcam[®], AB32072; Sigma-Aldrich, 9E10) változó koncentrációban, valamint különböző feltárási módszereket is megkíséreltünk, azonban az immunhisztokémiai reakciókat mindezek ellenére sem sikerült megfelelően beállítanunk.

5.táblázat: cyclin D1 és Bcl-2 immunhisztokémiai reakciók során alkalmazott reagensek tulajdonságai

Antitest	Gyártó	Azonosító szám	Antigén feltárás	PA* hígítási arány
cyclin D1	Neomarkers	0329101	MW** 90 min	1:120
Bcl-2	Biogenex	932287M4	MW** 90 min	1:50

*: PA: elsődleges (primer) antitest

** : mikrohullámú sütő (microwave oven)

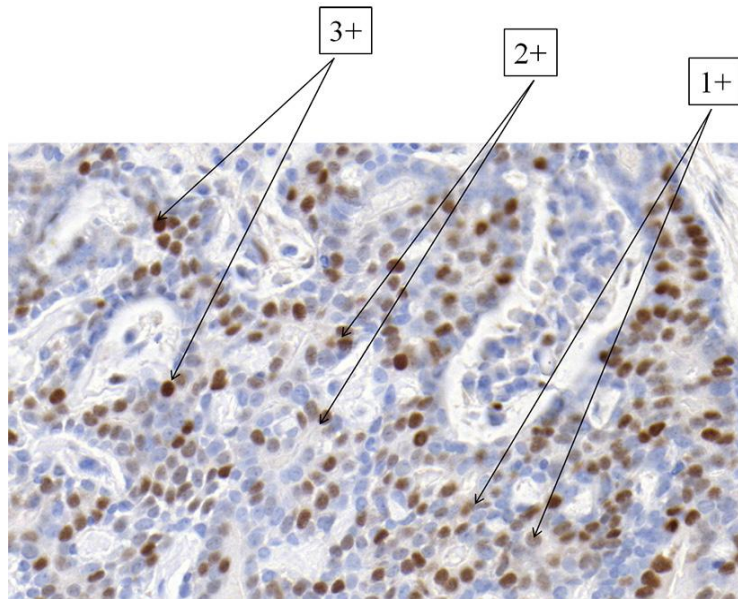
Az immunhisztokémiai reakciók eredményeit szemikvantitatív módon elemeztük. az intra-, valamint interobszerver variabilitást is figyelembe véve: a reakciókat két megfigyelő két-két alkalommal értékelte, egymástól függetlenül.

Mivel mind a cyclin D1, mind a bcl-2 reakciók esetében egyazon eseteken belül is heterogén intenzitást tapasztaltunk, a kiértékeléshez Hirsch-féle pontozási rendszert alkalmaztunk. Az ún. Hirsch-scoring egy 0-300 pontos osztályozó rendszer, mely figyelembe veszi az eltérő intenzitású reakciót adó területek százalékos megoszlását. Az intenzitás erősségét 3 pontos skálán adtuk meg (1+: gyenge; 2+: közepes; 3+: kifejezett), míg a százalékos megoszlást 0-100 közötti pontszámmal értékeltük. Egy-egy esethez tartozó immunhisztokémiai vizsgálat végső pontszámát (Hirsch-pontszám) a következő képlet alapján számoltuk:

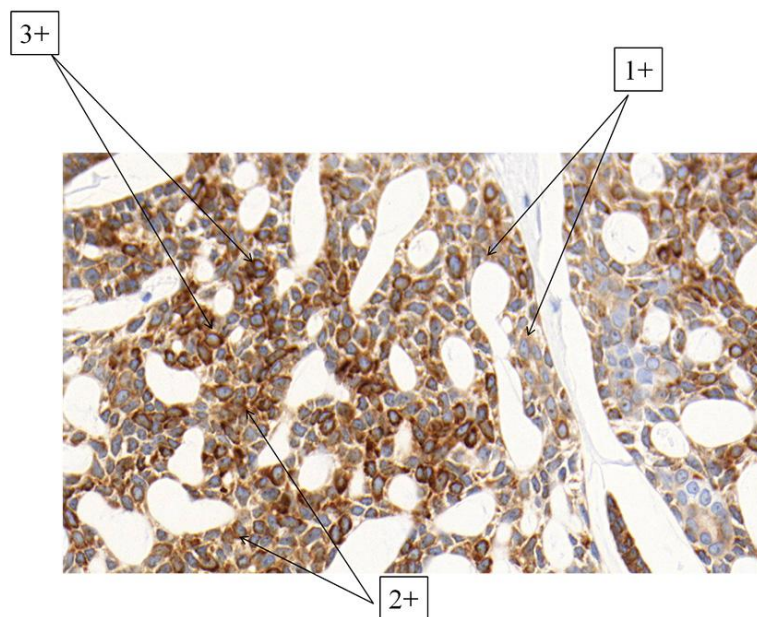
$$[1 \times (\text{az } 1+ \text{ sejtek \% -a}) + 2 \times (\text{a } 2+ \text{ sejtek \% -a}) + 3 \times (\text{a } 3+ \text{ sejtek \% -a})]$$

A végső pontszámot a két megfigyelő által több ízben elvégzett kiértékelések pontszámainak átlaga adta. A Bcl-2 immunhisztokémiai reakciók értékelése esetében az 1+ erősségű területeket aspecifikus, háttér reakció jellegű megjelenésük miatt negatívnak értékeltük, a Hirsch pontokat ez alapján adtuk meg.

A cyclin D1 és Bcl-2 immunhisztokémiai reakciók kiértékelésének alapját az 5. és 6. ábrák szemléltetik.



5. ábra. A cyclin D1 immunhisztokémiai reakciók kiértékelése során a festődés intenzitását 0-3 pontos skálán adjuk meg – ábránkon két-két enyhe (1+), közepes (2+) és erős (3+) intenzitású reakciót nyíllal jelöltünk (cyclin D1; 1:120; eredeti nagyítás: 100x)



6. ábra. A Bcl-2 immunhisztokémiai reakciók kiértékelése során a festődés intenzitását 0-3 pontos skálán adjuk meg – ábránkon két-két enyhe (1+), közepes (2+) és erős (3+) intenzitású reakciót nyíllal jelöltünk (cyclin D1; 1:50; 10x)

ER, PgR, Her2 és Ki67 fehérjék immunhisztokémiai vizsgálata

Tumoros szöveteinken további immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk: meghatároztuk mind bACC, mind sACC esetek ösztrogén receptor (ER), progeszteron receptor (PgR), valamint a Her2 státuszát és proliferációs aktivitásuk meghatározására azok Ki67-expresszióját. Az IHC reakciók minden esetben pozitív kontroll bevonásával történtek. Az ER, PgR és Her2 immunhisztokémiai reakciókat 20 bACC és 20 sACC esetben végeztük, míg Ki67 expressziós vizsgálatra 10 bACC és 20 sACC esetben nyílt módunk.

Az ER, PgR és Her2 és Ki67 fehérjék expressziójának vizsgálata során – hasonlóan a cyclin D1 és Bcl-2 immunhisztokémiai reakciókhoz – FFPE szövettani blokkokat használtunk, melyekből reakciónként 1-1 5 µm vastag metszetet készítettünk. A reakciókat ebben az esetben is festőautomata végezte. (Az alkalmazott protokoll a gyártó ajánlásai szerint történt, a reagensek tulajdonságait és a feltárás körülményeit az 6. táblázatban tüntettük fel.)

6.táblázat: ER, PgR, Her-2 és Ki-67 immunhisztokémiai reakciók kapcsán alkalmazott antitestek tulajdonságai

Antitest	Gyártó	Azonosító szám	Antigén feltárás	PA* hígítási arány
ER	Novocastra	6003537	MW** 90 min	1:100
PgR	Novocastra	6010350	MW** 90 min	1:200
Her2/4B5	Ventana	8002996	MW** 30 min	hígítani nem kell
Ki67/MIB1	Dako	M7240	MW** 30 min	1:100

*: PA: elsődleges (primer) antitest

** : mikrohullámú sütő (microwave oven)

Az ER és PgR immunhisztokémiai reakciók kiértékelését szemikvantitatívan végeztük, két megfigyelő által az Allred-féle pontozó rendszert használva. Eszerint a pozitív reakciót adó sejtek százalékos arányát, valamint a reakciók intenzitásának erősségét vettük figyelembe. Az intenzitás erőssége 1-3 pont között változhatott (1: enyhe, 2: közepes, 3: erős), míg a pozitív reakciók százalékos arányára 0-5 pont volt adható a következő beosztás alapján:

nincs reakció: 0 pont

1% pozitív: 1 pont

1-10%: 2 pont

11-33%: 3 pont

34-66%: 4 pont és

67-100%: 5 pont.

Az intenzitás erősségéből kapott és a pozitív reakciót adó területek százalékos arányából kapott pontszámokat összeadtuk és ezek alapján egy-egy reakcióra 0 vagy 2-8 pont volt adható.

A Her2 immunhisztokémiai reakció kiértékelésére az emlőtumorokban rutinszerűen alkalmazott értékelési sémát használtuk (0: negatív; 1+: enyhe, negatív; 2+: közepes; 3+: kifejezett).^{Wolff,2014}

3.2.3. *Túlélési adatok*

A vizsgálatban részt vevő tumoros betegcsoportjaink (bACC, valamint sACC esetek) tagjainak teljes túlélését a Közigazgatási és Elektronikus Közszolgáltatások Központi Okmányiroda Speciális Szolgáltatások Osztálya segítségével határoztuk meg. A vizsgálatban részt vevő betegek azonosítása pontos születési nevük, édesanyjuk neve, születési dátumuk, valamint társadalombiztosítási számuk alapján történt.

Vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottágának (TUKEB) 101/2012-es számú etikai engedélyében foglaltaknak megfelelően végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Bevezető vizsgálatunk eredményei

4.1.1. miRNS szelekció Affymetrix® Gene Chip® alkalmazásával

Az Affymetrix® GeneChip® miRNA array segítségével vizsgálható 847 humán miRNS közül 57 olyan miRNS-t azonosítottunk, melyek az alkalmazott software statisztikai számításai alapján az összes vizsgálati mintában (minden tumoros és mindkét normál szövetből származó mintában) jelen voltak (7. táblázat és Függelék). A szoftver számításai alapján a fennmaradó 790 miRNS közül 216 miRNS legalább egy vizsgált mintában expresszáldott. A legalább egy vizsgálati mintában expresszáldó miRNS-ek között 8 olyan miRNS-t azonosítottunk, amelyek sACC esetekben fokozottan expresszáldottak (miR-17*, miR-125a-3p, miR-134, miR-181a-2*, miR-206, miR-379, miR-382 és miR-1275). Ezzel ellentétben egy miRNS éppen a sACC tumorokban nem expresszáldott, az összes többi vizsgált mintában előfordult: bACC esetekben és normál kontrollokban is (miR-1234). Az Affymetrix® GeneChip® miRNA array által detektálható humán miRNS-ek közül összesen 572 olyan miRNS-t azonosítottunk, amely egyik vizsgált mintában sem volt detektálható.

7. táblázat: Az Affymetrix® GeneChip® miRNA array által azonosított 57 miRNS, melyek az összes vizsgált mintában detektálhatók voltak

let-7a	miR-99a	miR-296-3p
let-7b	miR-103	miR-320a
let-7c	miR-107	miR-320b
let-7d	miR-125b	miR-320c
let-7e	miR-143	miR-338-5p
let-7f	miR-145	miR-342-3p
let-7g	miR-146a	miR-361-5p
let-7i	miR-149*	miR-494
miR-16	miR-151-5p	miR-638
miR-17	miR-182	miR-768-3p
miR-20a	miR-185	miR-768-5p
miR-23a	miR-191	miR-923
miR-23b	miR-193b	miR-938

miR-24	miR-195	miR-1228*
miR-26a	miR-199a-3p	miR-1267
miR-27b	miR-199b-3p	miR-1280
miR-29b-2*	miR-200c	miR-1281
miR-34a	miR-205	miR-1308
miR-92a	miR-214	miR-1826

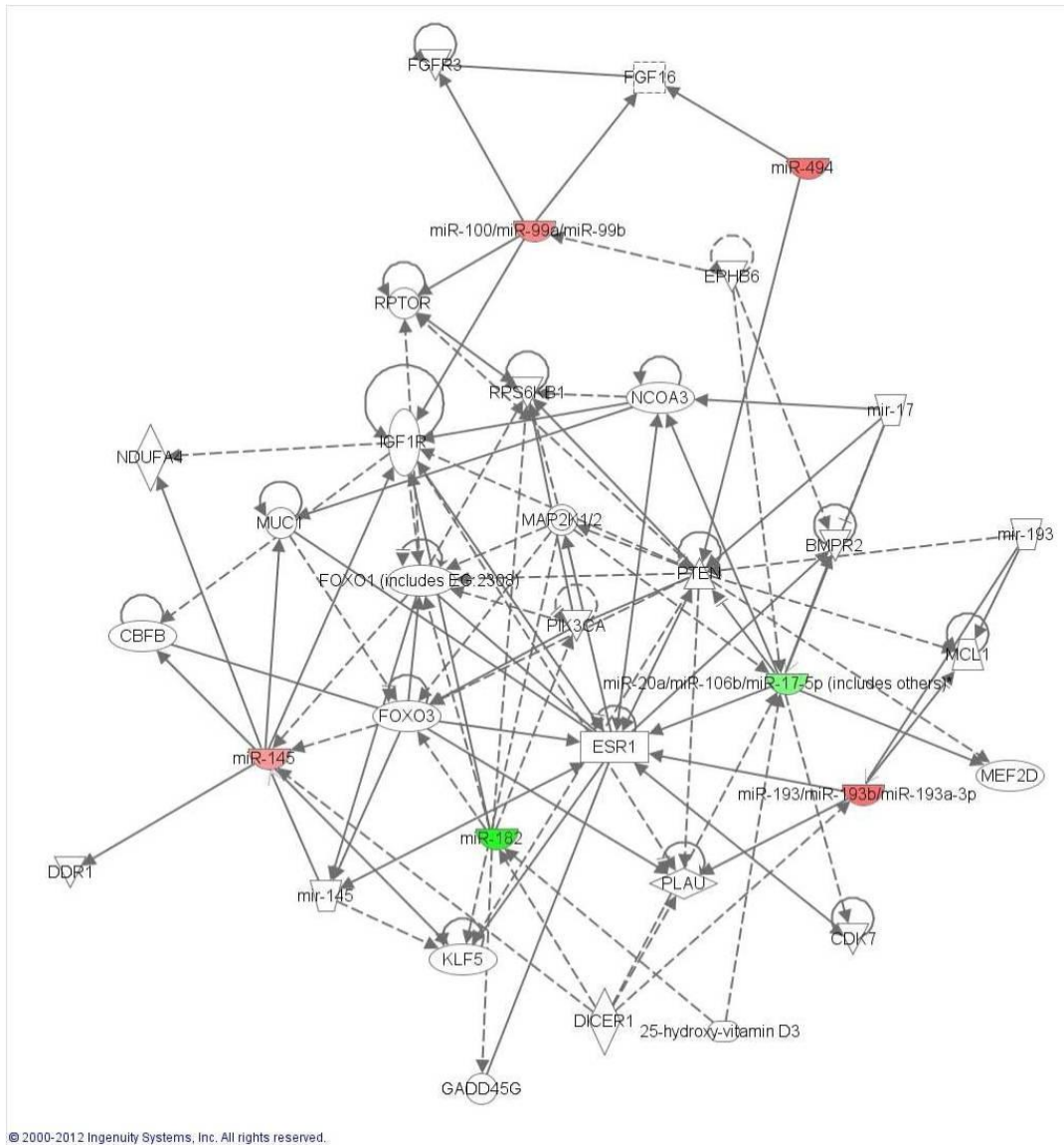
4.1.2. Célgén – miRNS interakciós vizsgálat IPA[®] analízissel

Bevezető vizsgálataink következő lépésében az összes vizsgált mintában detektálható 57 miRNS egymással, valamint célgénekkal való interakciójának vizsgálatára IPA[®] útvonal elemzést végeztünk. Mivel a kiválasztott 57 miRNS emlőből és nyálmirigyből származó ACC esetekben és a kontroll szövetekben eltérő mértékben expresszáldott, a vizsgálatot külön-külön elvégeztük emlőből származó szöveti mintákon, valamint a nyálmirigy eredetű esetekben is.

Az IPA[®] analízis eredményei alapján az irodalomban fellelhető információk szerint tumoros és normál *emlőszövetekben* való eloszlásuk figyelembe vételével a vizsgált 57 miRNS elsősorban a **TP53**, a **DGCR8** (DiGeorge syndroma kritikus régió gén 8), a **LAMTOR3** (késői endosomális/lysosómális adaptor), az **AKT** (PDGF által aktivált szerin-treoninkináz), valamint a **PRIMI** (primáz, DNS, polypeptid 1) mRNS-ekkel állhat interakcióban.

Ugyanezt az elemzést nyálmirigy eredetű szövetekben elvégezve, az 57 miRNS *nyálmirigyben* tapasztalt eltérő eloszlásuk alapján elsősorban a **PTEN** (foszfatázés tenzin homológ), a **PIK3CA** (foszfatidylinositol-4,5-biszfoszfát 3-kináz, katalitikus alegység alfa), az **ESR1** (ösztrogén receptor-1), az **IGFRI** (insulin-szerünövekedési faktor1), valamint a **FOXO1** (forkhead box O1) mRNS-ekkel állhat kapcsolatban.

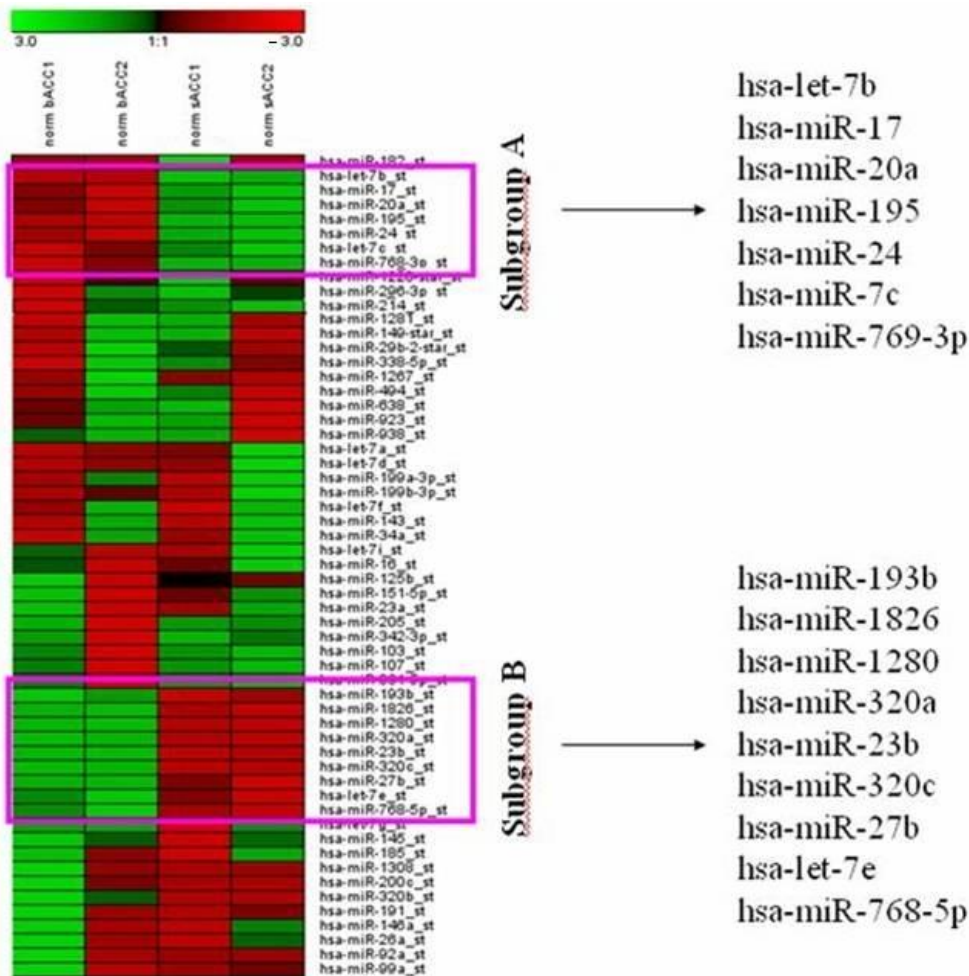
Az IPA[®] útvonal analízis a miRNS-mRNS, valamint az általuk regulált és velük kapcsolatba hozható gének interakcióit hálózatok formájában ábrázolta, melyeket emlő-, valamint nyálmirigy eredetű szövetek esetében az 7. és 8. ábrák szemléltetik. Ezeken az ábrákon a fentiekben felsorolt interakciókon felül mind emlő, mind nyálmirigy eredetű szövetekben további interakciók is láthatóak.



8. ábra: miRNS – célgén interakciók nyálmirigyből származó szövetekben (normál és tumoros) IPA[®] útvonal analízis alapján. A piros szín az adott gén/mikroRNS fokozott expresszióját, a zöld szín a csökkent expressziót jelöli. A folytonos vonalak a direkt interakciókat, a szaggatott vonalak az indirekt interakciókat szemléltetik.

4.1.3. Hierarchizált cluster analízis alcsoportok meghatározására

További vizsgálatok megkezdése előtt az Affymetrix® GeneChip® miRNA Array által azonosított 57 miRNS-t, hierarchizált cluster analízis alkalmazásával hőtésképen is ábrázoltuk (Genesis®)^{Stum,2002}. A hőtésképes ábrázolás során az 57 vizsgált miRNS expresszióját mind emlőből, mind nyálmirigyből kiinduló tumoros esetekben egészséges kontroll szövetek miRNS expressziójához normalizáltuk.



9. ábra. hőtésképe az Affymetrix® GeneChip® miRNA array által azonosított 57 miRNS-ről. Bal oldali két oszlop („normbACC1” és „normbACC2” jelöléssel): bACC szövetek miRNS-expressziói (egészséges emlőszövet miRNS-expresszióhoz normalizált értékek). Jobb oldali két oszlop („normsACC1” és „normsACC2” jelöléssel): sACC szövetek miRNS-expressziói (egészséges nyálmirigy szövetek miRNS-expresszióhoz normalizált értékek). Piros színnel a kontrolljaikhoz képest csökkent expressziót, zöld színnel a fokozott expressziót jelöltük. Az „A” és „B” alcsoportokat ezen eltérések alapján határoztuk meg.

A miRNS-ek expressziójának kontroll szöveteikhez képest tapasztalt növekedését, vagy csökkenését a hőtérképen zöld és piros színek jelzik (9. ábra). Ezáltal könnyen átlátható formában tudtuk ábrázolni, hogy az emlő, valamint a nyálmirigy eredetű tumorok esetében az egyes miRNS-ek expressziója hogyan változott az egészséges kontrolljukhoz képest.

Az ábrázolt hőtérkép segítségével választottuk ki azokat a miRNS-eket, amelyek megoszlása normál és tumoros emlő-, valamint nyálmirigy szövetekben speciális volt:

- „A” alcsoportba kerültek azok a miRNS-ek, amelyek expressziója emlőből származó ACC esetekben csökkent, nyálmirigy eredetű ACC esetekben pedig nőtt saját kontroll szövetükhöz viszonyítva (9. ábra: „subgroup A”):

<i>let-7b</i>	<i>miR-24</i>
<i>let-7c</i>	<i>miR-195</i>
<i>miR-17</i>	<i>miR-768-3p.</i>
<i>miR-20a</i>	

- „B” alcsoportba azokat a miRNS-eket soroltuk, melyek expressziója az „A” alcsoport tagjaival ellentétben változott emlő és nyálmirigy eredetű szövetek esetében: emlő eredetű tumorokban fokozott, nyálmirigy eredetű ACC esetekben pedig csökkent expressziót mutattak saját kontroll szövetükhöz képest. (9. ábra: „subgroup B”):

<i>let-7e</i>	<i>miR-23b</i>
<i>miR-27b</i>	<i>miR-193b</i>
<i>miR-320a</i>	<i>miR-320c</i>
<i>miR-768-5p</i>	<i>miR-1280</i>
<i>miR-1826</i>	

4.1.4. *Potenciális célgének azonosítása miRecords adatbázis segítségével*

További célgén elemzéshez a fent kiválasztott miRNS-eket vettük alapul. A miRNS-ek célgén interakciókat a miRecords adatbázis alapján azonosítottuk (kizárólag a validált kapcsolatokat figyelembe véve - 8/A és 8/B, valamint 9. táblázatok).

Az *Anyag és módszerek miRNS expressziós vizsgálatok* alfejezetében ismertetet okoknál fogva a miR-768-3p, miR-768-5p, miR-1280, miR-1826 és miR-320c expresszióját nem tudtuk lemérni, célgén elemzést csupán a fennmaradó miRNS-ek esetében végeztünk: *let-7b*, *let-7c*, *miR-17*, *miR-20a*, *miR-24*, *miR-195*, *let-7e*, *miR-23b*, *miR-27b*, *miR-193b* és *miR-320a*.

8/A. táblázat: Az „A” alcsoport több tagja által is szabályozott gének listája („+”: az adott miRNS és célgén közötti validált interakció; „-”: az adott miRNS és célgén közötti interakció nem ismert/nem validált)

CÉLGÉN	GÉN TELJES NEVE	let-7b	let-7c	miR-17	miR-20a	miR-24	miR-195
BCL2	B-cell CLL/lymphoma	-	-	+	+	-	-
BIM/BCL2L11	BCL2-like 11	-	-	+	+	-	-
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II	-	-	+	+	-	-
CCND1	cyclin D1	+	-	+	+	-	+
CDC25A	cell division cycle 25A	+	-	-	-	+	-
CDK6	cyclin-dependent kinase 6	+	-	-	-	-	+
IL-8	interleukin 8	-	-	+	+	-	-
JAK1	Janus kinase 1	-	-	+	+	-	-
MAP3K12	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12	-	-	+	+	-	-
MEF2D	myocyte enhancer factor 2D	-	-	+	+	-	-
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	-	+	-	-	+	-
RUNX1	runt-related transcription factor 1	-	-	+	+	-	-
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	-	-	+	+	-	-
NOTCH1	notch 1	-	-	-	-	+	-
HMGA2	high mobility group AT-hook 2	+	+	-	-	-	-

8/B. táblázat: A „B” alcsoport több tagja által is szabályozott gének listája („+”: az adott miRNS és célgén közötti validált interakció; „-”: az adott miRNS és célgén közötti interakció nem ismert/nem validált)

CÉLGÉN	CÉLGÉN TELJES NEVE	let-7e	miR-23b	miR-27b	miR-193b	miR-320a
NOTCH1	notch 1	-	+	+	-	-
HMGA2	high mobility group AT-hook 2	+	-	-	-	-
PLAU	plasminogen activator, urokinase	-	-	+	+	-

9.táblázat: Az „A” és „B” alcsoport egy-egy tagja által potenciálisan szabályozott gének I. („+”: az adott miRNS és célgén közötti validált interakció; „-”: az adott miRNS és célgén közötti interakció nem ismert/nem validált)

CÉLGÉN	CÉLGÉN TELJES NEVE	„A” alcsoport						„B” alcsoport				
		let- 7b	let - 7c	miR- 17	miR- 20a	miR- 24	miR- 195	let- 7e	miR- 23b	miR- 27b	miR- 193b	miR- 320a
ACVR1B	activin A receptor, type IB					+						
AURKB	aurora kinase B					+						
BCL7A	B-cell CLL/lymphoma 7A	+										
BRCA1	breast cancer antigen 1					+						
CCNA2	cyclin A2					+						
CDK4	cyclin- dependent kinase 4					+						
CDKN1A	cyclin- dependent kinase inhibitor 1A			+								
CDKN2A	cyclin- dependent kinase inhibitor 2A					+						
DHFR	dihydrofolate reductase					+						
E2F1	E2F transcription factor 1				+							
E2F2	E2F transcription factor 2					+						
E2F3	E2F transcription factor 3						+					
EDG1/ S1PR1	sphingosine-1- phosphate receptor 1			+								

EIF3S1	eukaryotic translation initiation factor 3		+										
FEN1	flap structure-specific endonuclease 1					+							
KRT/ KRT126P	keratin126 pseudogene	+											
LIN28/ LIN28A	lin-28 homolog A	+											
MAPK14	mitogen-activated kinase 14					+							
MED28	mediator complex 28		+										
MKK4/ MAP2K4	mitogen-activated protein kinase kinase 4					+							
NCOA3	nuclear receptor coactivator 3			+									
p21/ CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A			+									
RTCD1	RNA 3'-terminal phosphate cyclase		+										
TGFBR1	transforming growth factor, beta receptor1		+										
TRIM71	tripartite motif containing 71		+										
VIM	vimentin			+									
ADORA2B	adenosine A2b receptor									+			
CYP1B1	cytochrome P450 family 1, subfamily B									+			

DAD1	defender against cell death 1							+				
ESR1	estrogen receptor 1							+				
MCL1	myeloid cell leukaemia 1											+
MET	MET proto-oncogene								+			
MMP13	matrix metalloproteinase 13									+		
PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma									+		
RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like								+			
SMC1A	structural maintenance of chromosome 1A							+				
ST14	suppression of tumorigenicity 14									+		
WNT1	wingless-type MMTV integration site family, member 1							+				

4.2. Magasabb esetszámon végzett vizsgálataink eredményei

A nagyobb esetszámra kiterjesztett vizsgálatunk során a bevezető vizsgálat eredményei alapján kiválasztott miRNS-ek expresszióját határoztuk meg az egyes mintákban qPCR technikával, kiegészítve a célgén-expresszió immunhisztokémiai mérésével.

A validálás során az alábbi 19 miRNS mennyiségi analízisét végeztük el:

“A” alcsoportba sorolt miRNS-ek:

<i>let-7b</i>	<i>miR-24</i>
<i>miR-17</i>	<i>miR-195</i>
<i>miR-20a</i>	

“B” alcsoportba sorolt miRNS-ek:

<i>let-7e</i>	<i>miR-193b</i>
<i>miR-23b</i>	<i>miR-320</i>
<i>miR-27b</i>	

Csak sACC-ban expresszálódó miRNS-ek:

<i>miR-17*</i>	<i>miR-379</i>
<i>miR-125a-3p</i>	<i>miR-382</i>
<i>miR-134</i>	<i>miR-1275</i>
<i>miR-206</i>	

Kontroll miRNS-ek:

<i>RNU43</i>	<i>RNU48</i>
--------------	--------------

4.2.1. Az egyes vizsgálati csoportok miRNS expressziójának összehasonlítása

Az eredetileg kontrollnak szánt miRNS-ek (RNU43 és RNU48) kizárása után fennmaradó 17 miRNS expresszióját összevetettük egyes vizsgálati csoportok között: összehasonlítottuk emlőszövetek (bACC és bN), nyálmirigy szövetek (sACC és sN), tumoros (bACC és sACC), és normál szövetek (bN és sN) miRNS-profilját.

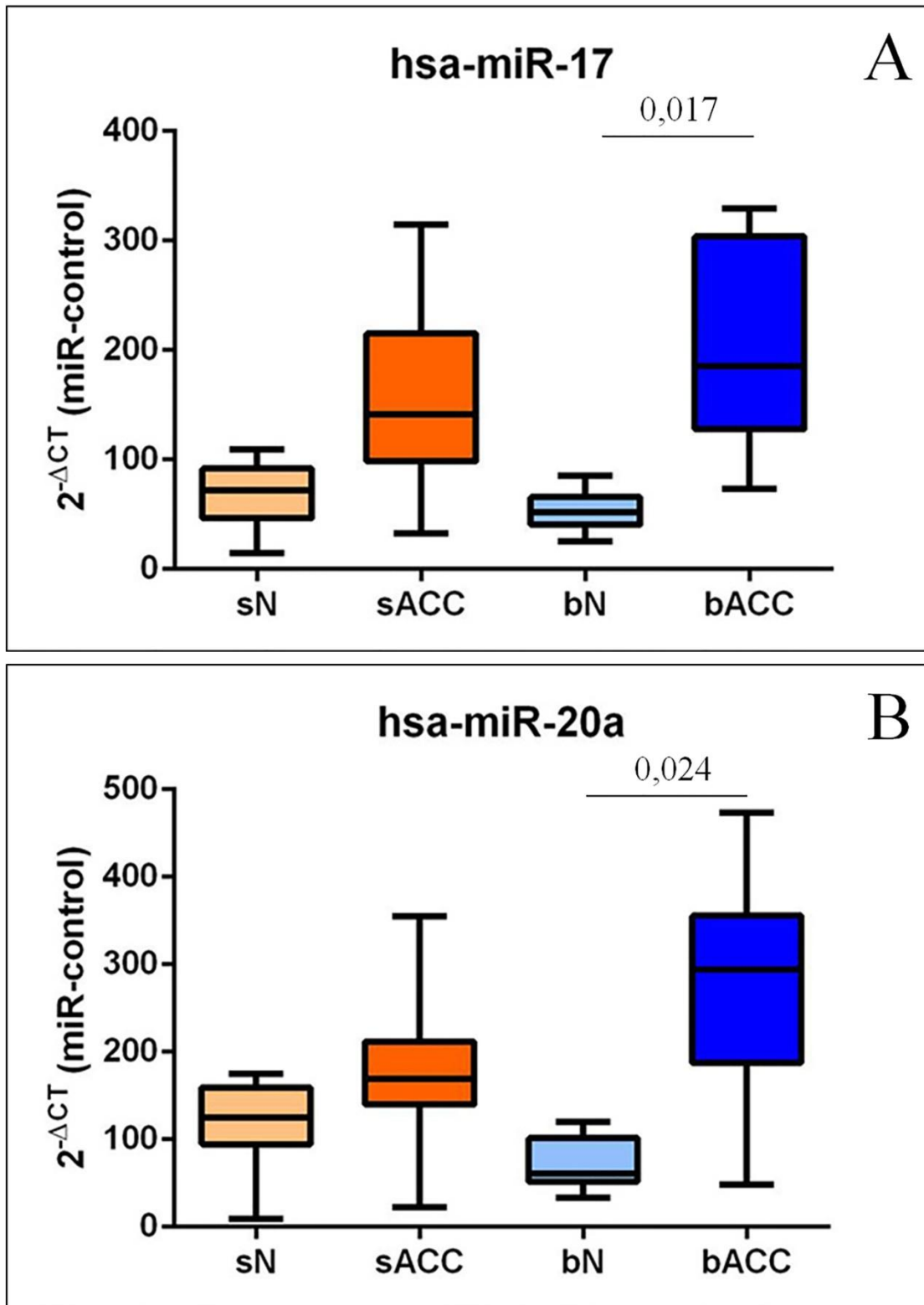
4.2.1.1. bACC esetek és normál emlőszövetek miRNS mintázatának összehasonlítása

Emlőből származó tumoros szövetekben két olyan miRNS-et azonosítottunk, amely normál kontrolljukhoz viszonyítva jelentős expressziós különbséget mutattak. Mindkét miRNS, a *miR-17* és a *miR-20a* expressziója szignifikánsan magasabb volt bACC esetekben kontrolljaikhoz képest ($p_{miR-17_bN_vs_bACC}=0,017$ és $p_{miR-20a_bN_vs_bACC}=0,024$).

A két miRNS egyes csoportokban mutatott expresszióját a 10/A és 10/B ábrák szemléltetik.

A *miR-17* és *miR-20a* miRNS-ek expressziós szintjében a többi csoport összehasonlításakor nem találtunk jelentős különbséget: sem sACC és kontrolljaik ($p_{miR-17_sN_vs_sACC}=0,050$ és $p_{miR-20a_sN_vs_sACC}=0,422$), sem emlőből és nyálmirigyből kiinduló ACC esetek ($p_{miR-17_bACC_vs_sACC}=0,831$ és $p_{miR-20a_bACC_vs_sACC}=0,542$), sem a kontroll csoportok ($p_{miR-17_bN_vs_sN}=0,972$ és $p_{miR-20a_bN_vs_sN}=0,851$) nem mutattak szignifikáns eltérést a két miRNS expressziójában.

A *miR-17* és *miR-20a*-n kívül a többi vizsgált miRNS expressziójának tekintetében az emlőből származó tumoros és ép szövetek között nem találtunk szignifikáns eltéréseket (ld. Függelék, 5. pont).



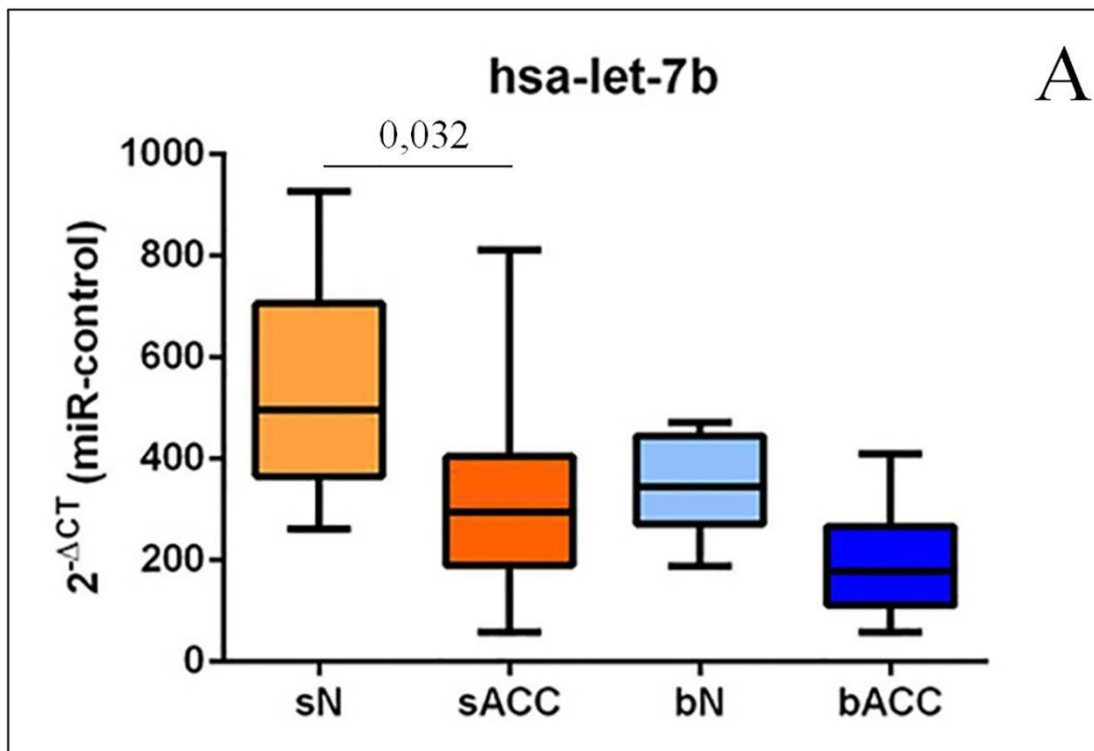
10. ábra. A miR-17 (A) és miR-20a (B) relatív expressziója a vizsgált szövetekben. Mindkét miRNS statisztikailag szignifikáns eltérést mutatott a bACC és bN minták között. sN: normál nyálmirigy, sACC: nyálmirigy eredetű ACC, bACC: emlő eredetű ACC, bN: normál emlő szövet.

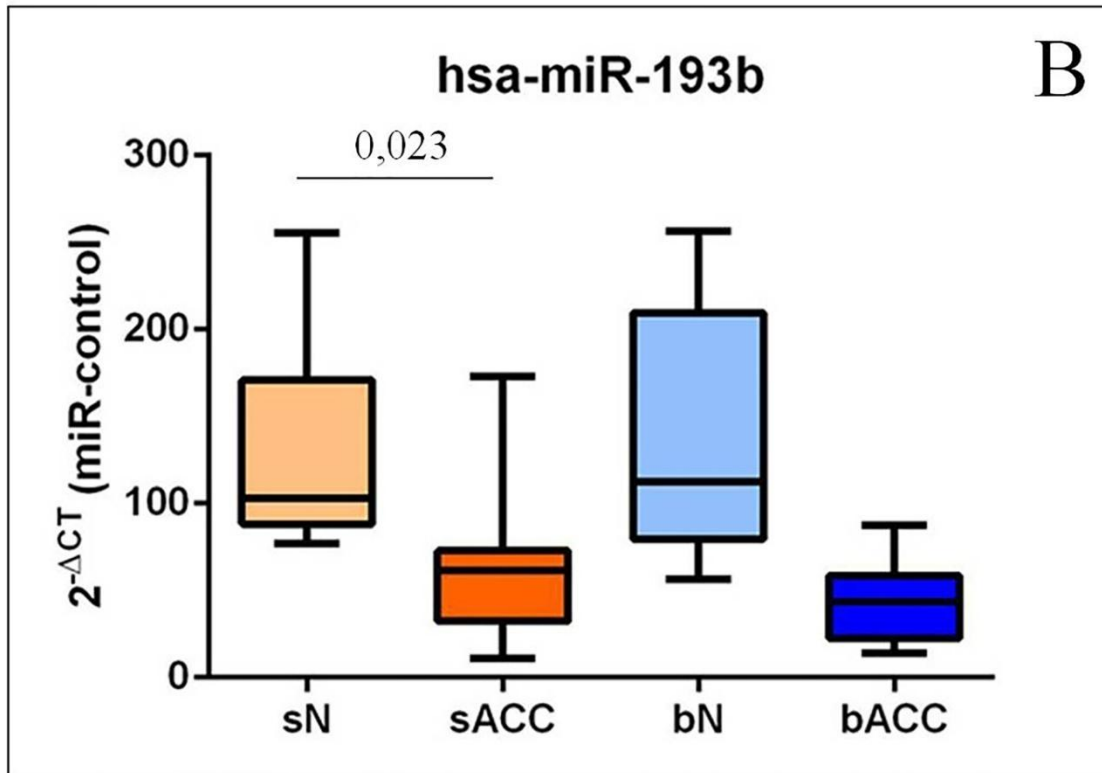
4.2.1.2. A sACC esetek és kontrolljaik miRNS expressziójának összehasonlítása

Nyálmirigyből származó minták összehasonlításakor validációs vizsgálataink során két olyan miRNS-t detektáltunk, melyek expressziója jelentős eltérést mutatott tumoros és normál szövetek között: sACC esetekben szignifikánsan alacsonyabb mértékű expressziót mértünk *let-7b* és *miR-193b* miRNS-ek mennyiségi analízise során ($p_{let-7b_sN_vs_sACC}=0,032$ és $p_{miR-193b_sN_vs_sACC}=0,023$). A *let-7b* és *miR-193b* expressziójának megoszlását az egyes vizsgálati csoportok között a 11/A és 11/B ábrák szemléltetik.

E két miRNS expressziójában szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk sem bACC és kontrolljaik ($p_{let-7b_bN_vs_bACC}=0,694$ és $p_{miR-193b_bN_vs_bACC}=0,057$), sem emlőből és nyálmirigyből származó ACC esetek között ($p_{let-7b_bACC_vs_sACC}=0,421$ és $p_{miR-193b_bACC_vs_sACC}=0,995$), sem pedig a kontroll csoportok között ($p_{let-7b_sN_vs_bN}=0,193$, és $p_{miR-193b_sN_vs_bN}=0,969$).

Nyálmirigyből kiinduló ACC és kontroll szövetek között további miRNS-ek tekintetében szignifikáns eltérést nem detektáltunk (ld. *Függelék, 5. pont*).





11. ábra. A *let-7b* (A) és *miR-193b* (B) relatív expressziója a vizsgált szövetekben. Mindkét miRNS expressziója szignifikáns eltérést mutatott sN és sACC között. sN: normál nyálmirigy, sACC: nyálmirigy eredetű ACC, bACC: emlő eredetű ACC, bN: normál emlő szövet.

4.2.1.3. bACC és sACC miRNS expressziós mintázatának összehasonlítása

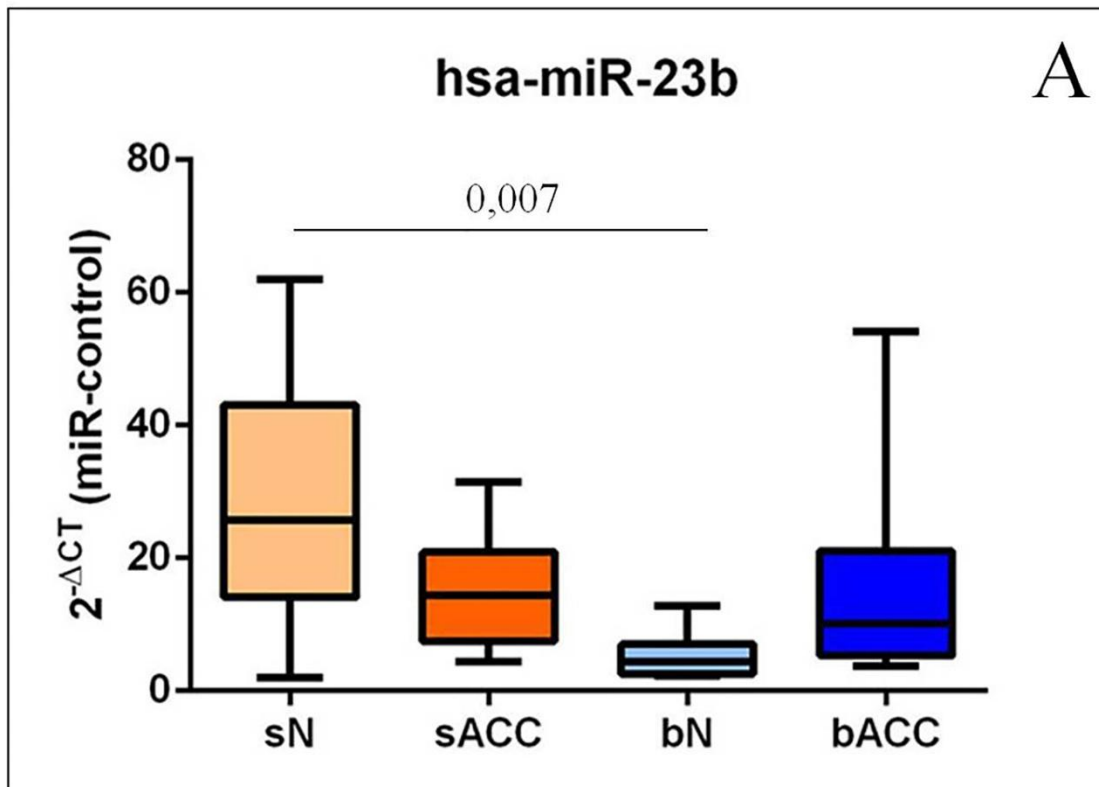
A vizsgált 17 miRNS expressziójában emlő, valamint nyálmirigy eredetű ACC esetekben statisztikailag értékelhető eltérést nem találtunk (ld. Függelék, 5. pont).

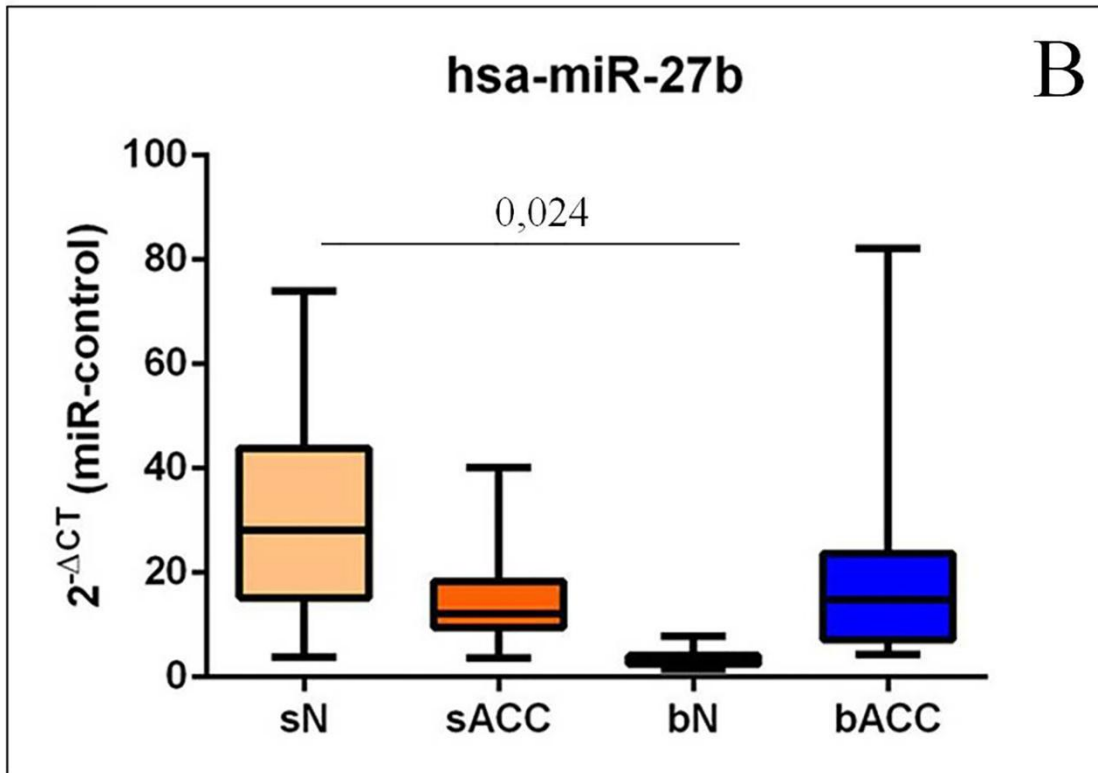
4.2.1.4. Normál emlő és nyálmirigy szövetek miRNS mintázatának összehasonlítása

A kontroll csoportok miRNS expressziója két miRNS tekintetében mutatott jelentős eltérést. A *miR-23b* és a *miR-27b* kifejeződése nyálmirigy eredetű kontroll szövetekben magasabbnak bizonyult normál emlőszövetekéhez képest ($p_{miR-23b_bN_vs_sN}=0.007$ és $p_{miR-27b_bN_vs_sN}=0.024$). A *miR-23b* és *miR-27b* expressziójának megoszlását az egyes vizsgálati csoportok között a 12/A és 12/B ábrák szemléltetik.

A *miR-23b* és *miR-27b* miRNS-ek expressziós szintje statisztikailag nem bizonyult különbözőnek sem az emlőből származó tumoros és kontroll szövetek ($p_{\text{miR-23b_bN_vs_bACC}}=0.545$ és $p_{\text{miR-27b_bN_vs_bACC}}=0.410$) sem nyálmirigyből kiinduló ACC esetek és kontrolljaik ($p_{\text{miR-23b_sN_vs_sACC}}=0.072$ és $p_{\text{miR-27b_sN_vs_sACC}}=0.099$), sem a két szervből kiinduló tumoros esetekből származó minták ($p_{\text{miR-23b_bACC_vs_sACC}}=0.957$ és $p_{\text{miR-27b_bACC_vs_sACC}}=0.981$) összehasonlításakor.

További miRNS-ek expressziója nem mutatott szignifikáns eltérést a két normál szövet között (ld. *Függelék, 5. pont*).





12. ábra. A miR-23b (A) és miR-27b (B) relatív expressziója a vizsgált szövetekben. Mindkét miRNS statisztikailag szignifikáns eltérést mutatott a sN és bN minták között. sN: normál nyálmirigy, sACC: nyálmirigy eredetű ACC, bACC: emlő eredetű ACC, bN: normál emlő szövet

4.2.2. *A miRNS-célgén kapcsolat további vizsgálata, a célgének szűkítése*

A validációs vizsgálat során négy olyan miRNS-t találtunk, melyek expressziója tumoros esetekben szignifikánsan eltért normál kontrolljaikhoz képest: miR-17 és miR-20a bACC-ban, valamint a let-7b és miR-193b sACC-ban. A korábban már validált miRNS-célgén interakciókat az egyes esetekben a 10. és 11 táblázatokban tüntettük fel.

A miRWalk adatbázis alapján 3 olyan gént azonosítottunk, melyek az általunk vizsgált négy miRNS mindegyike által reguláltak. Ezek a MYC, a CCND1 és a BCL2 gének voltak. A miRTarBase adatbázis információi szerint a CCND1 bizonyult mind a négy miRNS által szabályozott génnek. E géneket a 10. és 11. táblázatokban piros keret jelzi.

10. táblázat: A miRWalk adatbázis adatai alapján a kiválasztott miRNS-ek közül legalább kettő által regulált célgének listája („+”: az adott miRNS és célgén közötti interakció; nincs jel: az adott miRNS és célgén közötti validált interakció nem ismert). Piros keretben azok a gének láthatók, melyeket mind a 4 vizsgált miRNS szabályoz.

GÉN	GÉN TELJES NEVE	let-7b	miR-193b	miR-17	miR-20a	Interakciók száma
		sN>sACC	bN<bACC			
BCL2	B-cell CLL/lymphoma	+	+	+	+	4
CCND1	cyclin D1	+	+	+	+	4
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	+	+	+	+	4
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	+		+	+	3
CDKN1A/ p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	+		+	+	3
COX8A	cytochrome oxidase subunit 8A	+		+	+	3
DDX20/ EIF4A1	eukariotic translation initiation factor 4A1	+		+	+	3
E2F1	E2 transcription factor 1	+		+	+	3
E2F2	E2 transcription factor 2	+		+	+	3
E2F3	E2 transcription factor 3	+		+	+	3
ESR1	estrogen receptor 1	+	+		+	3
IL6	interleukin 6	+		+	+	3
KIT	v-kit Hardy Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	+	+		+	3
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	+		+	+	3
MCL1	myeloid cell leukaemia 1	+	+		+	3
PAK3	p21 protein activated kinase 3	+		+	+	3
PTEN	phosphatase and tensin homolog	+		+	+	3
RNASEN/DROSHA	drosha ribonuclease type III	+		+	+	3

RUNX1	runt-related transcription factor 1	+		+	+	3
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	+		+	+	3
TP53	tumor protein p53	+		+	+	3
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	+		+	+	3
ZNF167	zinc finger protein 167	+		+	+	3
ZNF512B	zinc finger protein 512B	+		+	+	3
BCL2L11	BCL2-like 11			+	+	2
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor type II			+	+	2
BRAF	B-Raf proto-oncogene	+	+			2
BRCA1	breast cancer antigen 1	+		+		2
BRCA2	breast cancer antigen 2	+			+	2
C17orf91/MIR22HG	MIR22 host gene	+			+	2
CD4	CD4 molecule	+			+	2
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	+		+		2
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	+			+	2
CEBPZ	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), zeta	+		+		2
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	+			+	2
DGCR8	DGCR8 microprocessor complex subunit	+			+	2
DICER1	DICER1, ribonuclease type III			+	+	2
EGFR	epidermal growth factor	+		+		2
EIF2C2	eukaryotic translation initiation factor 2C, 2			+	+	2
EIF2C2/ AGO2	argonaute 2 catalytic component 2	+		+		2
ERBB2	erb-b2 receptor tyrosine kinase	+			+	2

	2					
FBXW7	F-boksz and WD repeat domain containing 7	+		+		2
FH	fum arate hydratase			+	+	2
FNDC3	fibronectin type III domain containing 3A	+			+	2
FOXP1	forkhaed boksz P1	+			+	2
GEMIN4	gem (nuclear organell) associated protein 4			+	+	2
H2AFX	H2 histone family, member X			+	+	2
HNRNPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	+		+		2
IMPACT	impact RWD domain protein	+			+	2
JAK2	janus kinase 2	+		+		2
JUN	jun proto-oncogene	+		+		2
LARP6	Laribonucleoprotein domain family, member6			+	+	2
LIN28	lin-28 homolog A	+			+	2
LYPLA3/ PLA2G15	phospholipase A2, group XV	+			+	2
MAPK14	mitogen activated protein kinase 14	+		+		2
MEF2D	myocyte enhancer factor 2D			+	+	2
MET	MET proto-oncogene	+		+		2
NPAT	nuclear protein, ataxia-teleangiectasia locus	+			+	2
NPC1	Niemann-Pick disease, type C1	+			+	2
NPM1	nucleofosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	+		+		2
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	+	+			2
PIK3CA/ PIK3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha	+			+	2

PRDM1	PR domain containing2, with ZNF domain	+			+	2
RAB14	RAB14, member RAS oncogene family			+	+	2
RB1	retinoblastoma 1			+	+	2
ROS1	ROS proto-oncogene 1	+		+		2
SOCS1/ CISH	cytokine inducible SH2-containing protein	+			+	2
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	+			+	2
STMN1	stathmin 1			+	+	2
TGFB1	transforming growth factor beta 1	+		+		2
TGFBR2	transforming growth factor beta receptor II			+	+	2
THBS1	thrombospondin 1	+		+		2
TIMM8A	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A			+	+	2
TNF	tumor necrosis factor	+		+		2
TWIST1	twist family bHLH transcription factor 1	+			+	2
ULK1	unc51-like autophagy activating kinase 1			+	+	2
ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1	+			+	2

11. táblázat: A miRTarBase adatbázis adatai alapján a kiválasztott miRNS-ek közül legalább kettő által regulált célgének listája („+”: az adott miRNS és célgén közötti interakció; „-”: az adott miRNS és célgén közötti validált interakció nem ismert). Piros keretben azok a gének láthatók, melyet mind a 4 vizsgált miRNS szabályoz.

GÉN	GÉN TELJES NEVE	let-7b	miR-193b	miR-20a	miR-17	Interakciók száma
		sN>sACC	bN<bACC			
CCND1	cyclin D1	+	+	+	+	4
CCND2	cyclin D2	+	-	+	+	3
APP	amyloid beta (A4) precursor protein	-	-	+	+	2
BCL2	B-cell CLL/lymphoma	-	-	+	+	2
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II	-	-	+	+	2
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	-	-	+	+	2
E2F1	E2 transcription factor 1	-	-	+	+	2
E2F3	E2 transcription factor 2	-	-	+	+	2
MAP3K12	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12	-	-	+	+	2
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9	-	-	+	+	2
MEF2D	myocyte enhancer factor 2D	-	-	+	+	2
MUC17	mucin 17, cell surface associated	-	-	+	+	2
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	-	-	+	+	2
PTEN	phosphatase and tensin homolog	-	-	+	+	2
RB1	retinoblastoma 1	-	-	+	+	2
RBL1	retinoblastoma-like 1	-	-	+	+	2
RBL2	retinoblastoma-like 2	-	-	+	+	2
RUNX1	runt-related transcription factor 1	-	-	+	+	2
SMAD4	SMAD family member 4	-	-	+	+	2
TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II	-	-	+	+	2
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	-	-	+	+	2
WEE1	WEE1 G2 checkpoint kinase	-	-	+	+	2

4.2.3. *Immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei*

Elsőként azon fehérjék expresszióját vizsgáltuk, amelyek a validáció során szignifikáns különbségeket mutató miRNS-ek potenciális célgénjei által kódoltak, vagyis a cyclin D1 és Bcl-2 fehérjék expresszióját.

A továbbiakban nem a miRNS-ekhez köthető, hanem a klinikopatológiai jellegzetességeket meghatározó fehérjék, ER, PgR és HER2 expresszióját vizsgáltuk, majd meghatároztuk a tumoros csoportok (bACC és sACC) Ki67-tel mérhető proliferációs indexét.

4.2.3.1. cyclin D1 és Bcl-2 kimutatása

A cyclin D1 és Bcl-2 fehérjék mennyiségének meghatározását követően az expresszió mértékét a következőképpen vetettük össze a csoportok között:

- normál emlő és nyálmirigyszövetek (bN vs. sN),
- tumoros emlő és nyálmirigyszövetek (bACC vs. sACC),
- tumoros és normál emlő (bN vs. bACC), valamint
- tumoros és normál nyálmirigy szövetek (sN vs. sACC) között.

Az bACC és sACC, valamint normál kontrolljaik cyclin D1 expressziójának összehasonlítása

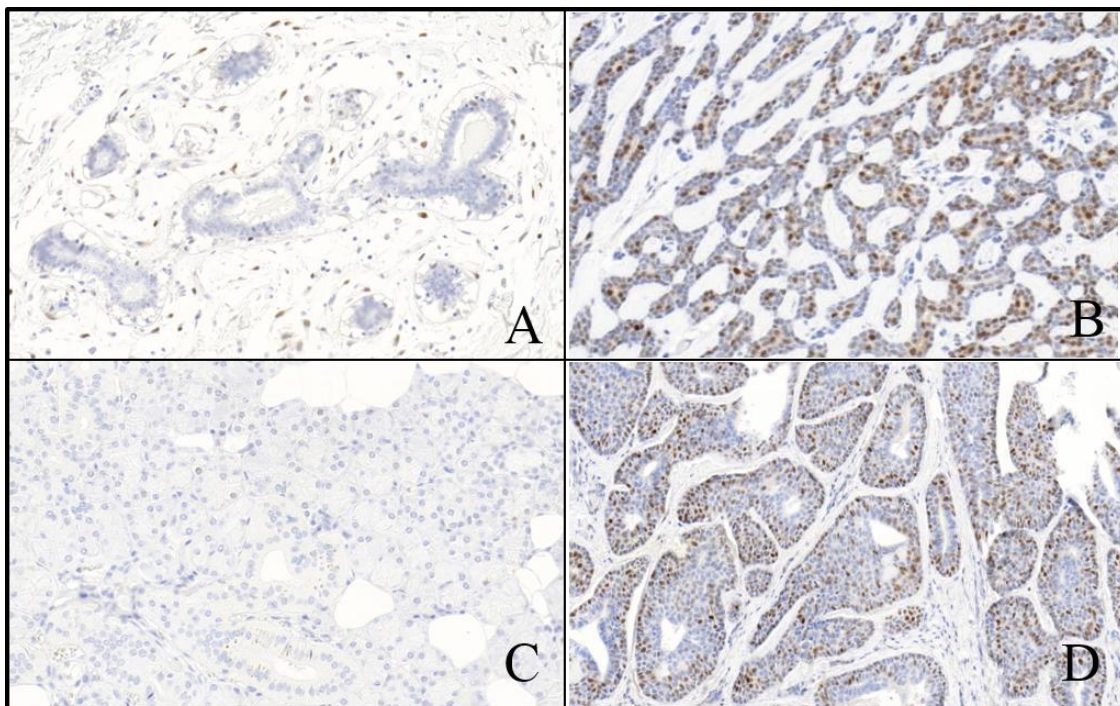
cyclin D1 és Bcl-2 immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzésére ugyan minden kiválasztott eset alkalmasnak bizonyult, egyes esetekben értékelhetetlen reakciót adott, melynek oka többnyire anyaghiány volt, mely 2 sACC és 7 bACC esetben volt megfigyelhető. Ezekben az esetekben az immunhisztokémiai vizsgálatok kiértékelésétől el kellett tekintenünk, melynek eredményeképpen 20 sACC, valamint 13 bACC esetből, valamint 13 normál nyálmirigyből és 11 normál emlőmirigyből származó esetek szövettani reakcióinak eredménye képezte a statisztikai vizsgálataink alapját.

Az emlőből származó szövetek cyclin D1 expressziójának összehasonlításakor magasabb fehérje expressziót tapasztaltunk bACC-ban mint kontroll csoportjukban ($p_{\text{cyclinD1_bN_bACC}} < 0.0001$).

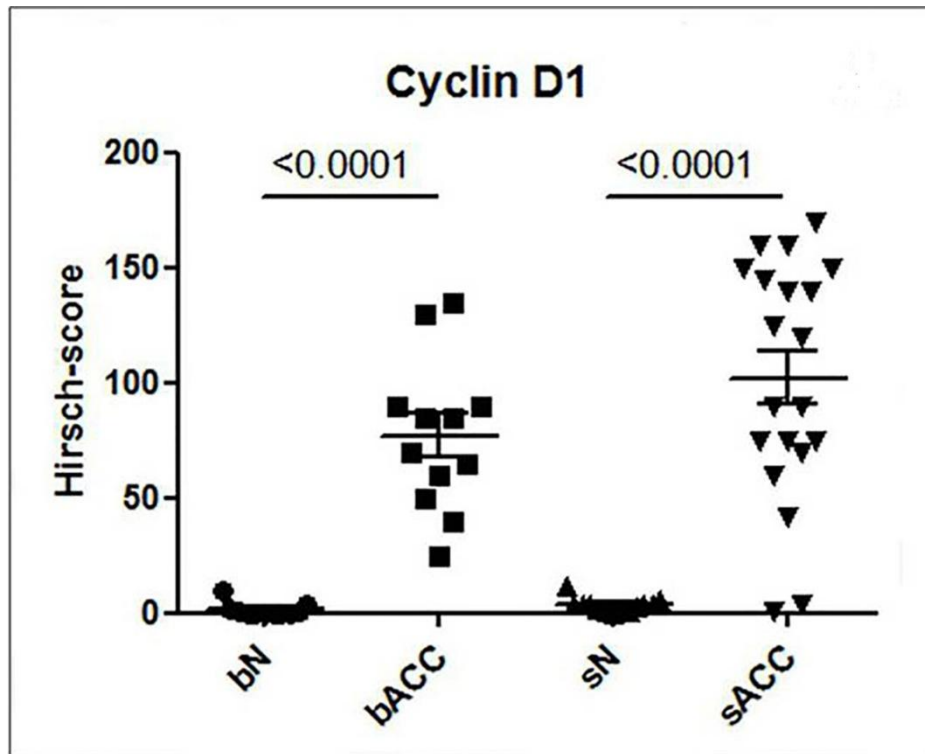
Nyálmirigy eredetű szövetek összehasonlítása során – hasonlóan az emlő szövetéhez -, a cyclin D1 expressziója magasabbnak bizonyult sACC-ban, mint kontroll szöveikben ($p_{\text{cyclinD1_sN_sACC}} < 0.0001$).

A cyclin D1 expressziójának vizsgálata során emlő és nyálmirigy tumorok között nem találtunk szignifikáns különbséget ($p_{\text{cyclinD1_bACC_sACC}} = 0,112$), ahogyan a kontroll szövetek sem mutattak jelentős eltérést egymáshoz viszonyítva ezen fehérje tekintetében ($p_{\text{cyclinD1_bN_sN}} = 0,125$).

Az egyes vizsgálati csoportokból származó esetek cyclin D1 immunhisztokémiai reakciójának mikroszkópos képét a 13. ábra szemlélteti, az egyes esetek cyclin D1 immunhisztokémiai vizsgálatának kiértékelésekor kapott Hirsch-pontszámokat a 14. ábrán látható grafikonon szemléltettük.



13. ábra. Cyclin D1 immunhisztokémiai reakció mikroszkópos képe normal emlőszövetben (A), bACC esetében (B), normal nyálmirigy szövetben (C) és sACC esetében (D) (cyclin D1; 1:120; 20x-os nagyítás; Panoramic 250 Flash II scan)



14. ábra. Cyclin D1 fehérje expressziója a szövetekben. bN: normál emlőszövet; bACC: adenoid cysticus emlő carcinoma; sN: normál nyálmirigy szövet; sACC: adenoid cysticus nyálmirigy carcinoma

A bACC és sACC, valamint normál kontrolljaik Bcl-2 expressziója

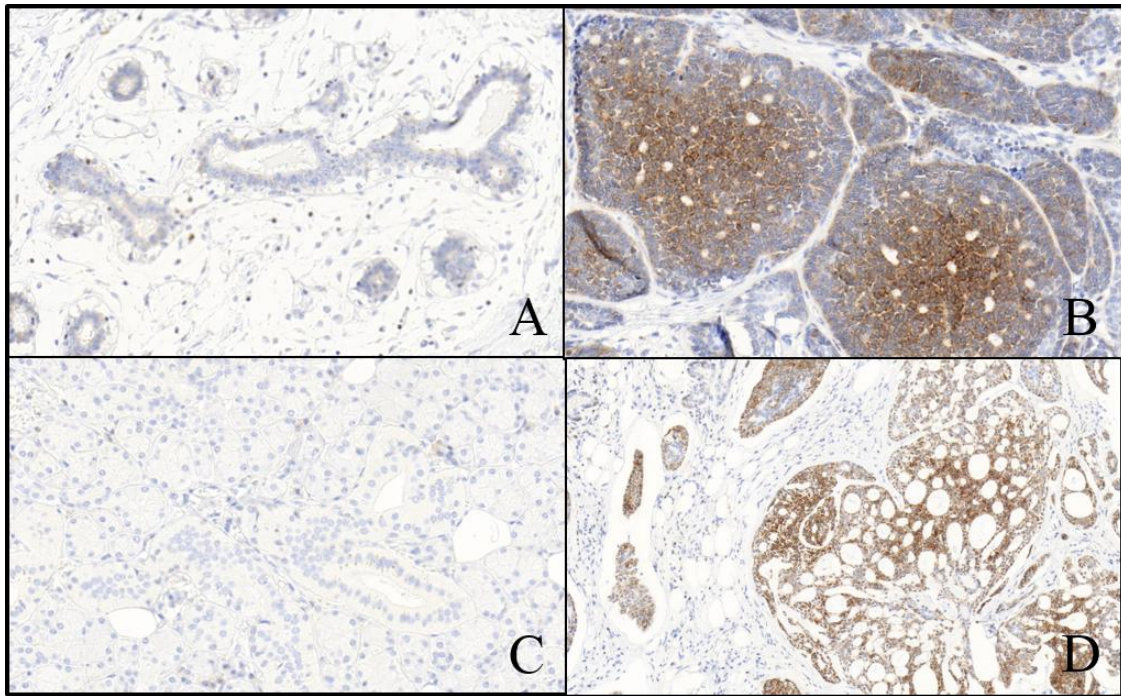
A Bcl-2 fehérje expressziójának megoszlása az egyes vizsgálati csoportok között a cyclin D1 fehérjéhez hasonló eredményt adott.

Emlőből származó szövetekben bACC-ban mutatkozott magasabb Bcl-2 expresszió a kontroll csoportjukhoz képest ($p_{\text{Bcl-2}_{\text{bN}_{\text{bACC}}}}=0.005$).

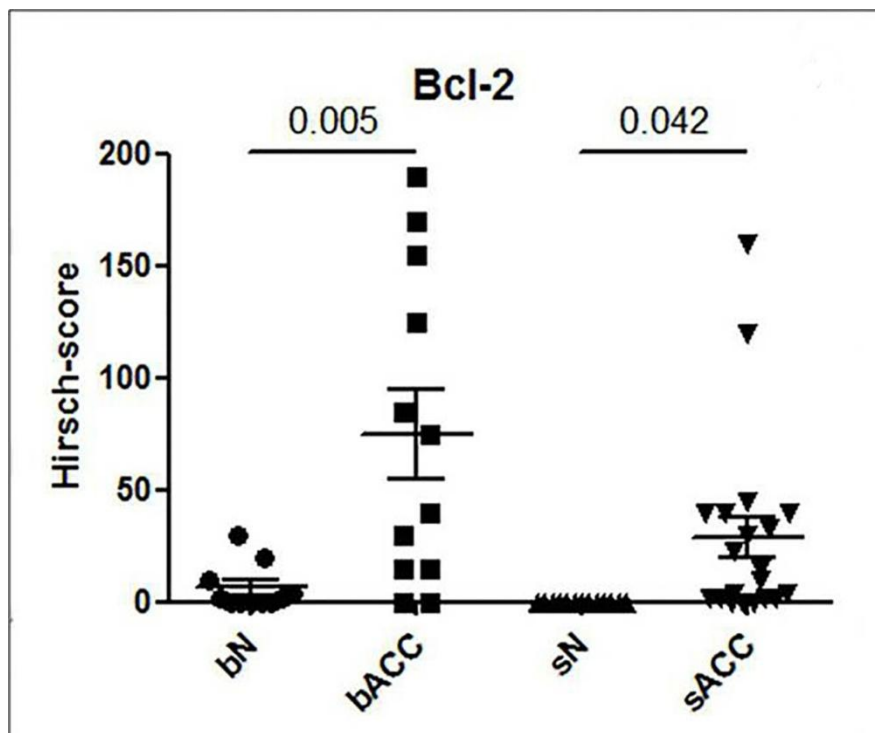
Hasonlóképpen, tumoros és normál nyálmirigyszövetek Bcl-2 expresszióját összevetve sACC-ban mértünk fokozott expressziót ($p_{\text{Bcl-2}_{\text{sN}_{\text{sACC}}}}=0.042$).

A két tumoros betegcsoport és a két kontroll csoport között – hasonlóan a cyclin D1 expresszióhoz - Bcl-2 kifejeződésre vonatkozóan sem találtunk szignifikáns különbséget ($p_{\text{Bcl-2}_{\text{bACC}_{\text{sACC}}}}=0,109$, valamint $p_{\text{Bcl-2}_{\text{bN}_{\text{sN}}}}=0,067$).

Az egyes csoportok Bcl-2 expresszióját a 15. és 16. ábrák szemléltetik: előbbi az egyes csoportok Bcl-2 immunhisztokémiai reakcióinak mikroszkópos képét mutatja, míg az utóbbin a Bcl-2 fehérje expressziójának megoszlása látható grafikonon szemléltetve.



15. ábra. *Bcl-2* immunhisztokémiai reakció mikroszkópos képe normál emlőszövetben, (A), bACC esetében (B), normál nyálmirigy szövetben (C) és sACC esetében (D) (*Bcl-2*; 1:50; eredeti 200x-os nagyítás; Panoramic 250 Flash II scan)



16. ábra. *Bcl-2* fehérje expressziójának megoszlása a szövetekben. bN: normál emlőszövet; bACC: adenoid cysticus emlő carcinoma; sN: normál nyálmirigy szövet; sACC: adenoid cysticus nyálmirigy carcinoma

bACC és sACC tumorok cyclin D1 és Bcl-2 expressziójának összehasonlítása

Ellentétben a tumoros és normál szövetek összehasonlításakor tapasztaltakkal, bACC és sACC összehasonlítása során sem a *cyclin D1* fehérje expresszióban ($p_{\text{cyclinD1_bACC_sACC}}=0,113$), sem pedig a Bcl-2 expresszióban nem találtunk jelentős eltérést ($p_{\text{Bcl-2_bACC_sACC}}=0,110$). Az immunhisztokémiai reakciókról készült összehasonlító felvételeket lásd a *Függelék 6. pontjában*.

Normál emlő és nyálmirigy szövetek cyclin D1 és Bcl-2 expressziója

Hasonlóan a tumoros csoportok összehasonlításakor tapasztaltakkal, sem a kontroll csoportok *cyclin D1*, sem *Bcl-2* expressziójának tekintetében a két csoport között nem tapasztaltunk jelentős eltérést ($p_{\text{cyclinD1_bN_sN}}=0,126$) ($p_{\text{Bcl-2_bN_sN}}=0,068$). Az immunhisztokémiai reakciókról készült összehasonlító felvételeket lásd a *Függelék 7. pontjában*.

4.2.3.2. ER, PgR, HER2 és Ki67 immunhisztokémiai reakciók eredményei

Az elvégzett ER, PgR és Her2 immunhisztokémiai reakciók analízisét követően, az értékelhető reakciók között a bACC és sACC eseteink jelentős többsége a vizsgált antitestekre negatív volt. Egy esetben tapasztaltunk enyhe ER pozitivitást (Quick score 3), amely minta szövettanilag rosszul differenciált bACC-nak felelt meg. Szintén egy esetben enyhe PgR pozitivitást találtunk (Quick score 3), mely minta jól differenciált bACC-nak felelt meg.

Ki-67 immunhisztokémiai reakcióink kiértékelése során, az értékelhető reakciók között mind bACC, mind sACC esetekben alacsony proliferációt tapasztaltunk (1-15%). Két sACC mintában 30%-os Ki67 pozitivitást figyeltünk meg, melyek egyike jól differenciált carcinoma szöveti képét mutatta, a másik sACC eset közepesen differenciált daganat volt. bACC mintáink között két esetben 50%-os proliferációs arányt tapasztaltunk. A magas proliferációs arány mindkét esetben rosszul differenciált bACC esetből származó mintában mutatkozott. (Kiegészítő immunhisztokémiai vizsgálatunk eredményeit a 12. táblázatban tüntettük fel.)

12. táblázat: ER, PgR, Her2 és Ki67 immunhisztokémiai reakciók eredményei

	ER	PgR	Her2	Ki67 (%)
B1	negatív	negatív	negatív	1
B2	negatív	negatív	negatív	1
B3	negatív	negatív	negatív	50
B4	negatív	negatív	negatív	NE*
B5	negatív	negatív	negatív	50
B6	negatív	negatív	negatív	3
B7	negatív	negatív	negatív	2
B10	negatív	negatív	negatív	3
B11	negatív	negatív	negatív	1
B12	negatív	negatív	negatív	2
B13	negatív	negatív	negatív	1
B21	negatív	pozitív	negatív	-
B22	negatív	negatív	negatív	-
B23	negatív	negatív	negatív	-
B24	negatív	negatív	negatív	-
B25	negatív	negatív	negatív	-
B26	negatív	negatív	negatív	-
B27	pozitív	negatív	negatív	-
B28	negatív	negatív	negatív	-
B29	negatív	negatív	negatív	-
S1	negatív	negatív	negatív	1
S2	negatív	negatív	negatív	3
S3	NE*	negatív	negatív	7
S4	negatív	negatív	negatív	10
S5	negatív	negatív	negatív	3
S6	negatív	negatív	negatív	1
S7	negatív	negatív	negatív	2
S8	negatív	negatív	negatív	30
S9	negatív	negatív	negatív	5
S10	negatív	negatív	negatív	30

S11	negatív	negatív	negatív	15
S12	negatív	negatív	negatív	2
S21	negatív	negatív	negatív	NE*
S22	negatív	negatív	negatív	1
S23	negatív	negatív	negatív	1
S24	negatív	negatív	negatív	1
S25	negatív	negatív	negatív	3
S26	negatív	negatív	negatív	1
S28	negatív	negatív	negatív	5
S29	negatív	negatív	negatív	2

**NE: nem értékelhető reakció; „-„: nem történt immunhisztokémiai reakció*

4.3. Túlélési adatok

Túlélési adatok a Közigazgatási és Elektronikus Közszolgáltatások Központi Okmányiroda Speciális Szolgáltatások Osztálya adatai alapján 10 bACC-ban, valamint 21 sACC-ban szenvedő beteg esetében álltak rendelkezésünkre. További 10 bACC-ban szenvedő beteg túlélési adatait Dr. Semir Vranic (University of Sarajevo) szolgáltatatta számunkra.

Ezen adatok alapján bACC-ban szenvedő betegek közül a diagnózis felállítása, valamint a műtét lezajlása óta egy beteg elhalálozásáról tudunk, a többi 19 beteg közül 2 esetben ismert a betegség jelen fennállása is, 17 beteg tumormentes.

A 21 sACC-ban szenvedő beteg közül 8 beteg hunyt el a diagnózis felállítása óta. Ezen betegek átlagos teljes túlélése 5,625 év (1-9 év) volt. A fennmaradó 13 beteg közül egy esetben a betegség jelenleg is perzisztál, a többi betegről azonban pontos klinikai információnk nincsen.

Betegségmentes túléléssel, valamint betegség specifikus elhalálozással kapcsolatban nem rendelkezünk információval.

5. MEGBESZÉLÉS

Az ACC-k molekuláris és genetikai vizsgálatával kapcsolatosan az elmúlt évek során számos közlemény született, azonban epigenetikai jellegzetességeikről igen kevés irodalmi adattal rendelkezünk. Teljes miRNS expressziós profil meghatározást sACC esetekben korábban csupán Mitani munkacsoportja folytatott, akik magas tumoros esetszám mellett igen alacsony számú kontroll eset elemzését végezték el^{Mitani,2013}. Tudomásunk szerint bACC esetekben korábban nem végeztek még miRNS profil meghatározást.

Munkánk kiindulási vizsgálata során alacsony esetszámon emlő és nyálmirigy eredetű ACC-k, valamint normál szöveti kontrolljaik miRNS profil meghatározását végeztük Affymetrix[®] GeneChip[®] miRNA Array segítségével. Az eredmények bioinformatikai elemzését követően 57 olyan miRNS-t azonosítottunk, melyek mind bACC, mind sACC, mind pedig normál kontroll szöveteinkben expresszálódtak. A detektált miRNS-ek potenciális célgénjeit több adatbázis segítségével azonosítottuk. Az egyes szövetekben mutatott expressziós mintázat alapján az IPA[®] analízis bACC és sACC esetekben eltérő gének érintettségét valószínűsítette. Emlőben a TP53, DGCR8, LAMTOR3, AKT és a PRIM1 gének lehetséges szerepe merült fel, míg sACC-ban PIK3CA, PTEN, ESR1, IGFR1, valamint FOXO1 gének szabályozása volt valószínűsíthető. A felsorolt célgének között emlő és nyálmirigy eredetű szövetekben is fellelhetőek a sejtciklus szabályozásában központi szerepet játszó elemek (PIK3CA, AKT, PTEN). Az AKT aktiválása a **PIK3CA/AKT jelátviteli útvonalban** foszforiláció révén történik a PI3K által, melynek következtében az AKT a sejtmembránba lokalizálódik. Az **AKT** számos folyamatban jelentős szerepet tölt be: indukálja a sejtek növekedését, a proliferációt, valamint gátolja az apoptózist. Mindemellet angiogenezist elősegítő hatásai is ismertek^{Hermann,2000;Tsatsanis,2000}. Az AKT számos „downstream” célponttal rendelkezik, melyek között találjuk az mTOR (mechanistic target of rapamycin), valamint a FOXO géneket is. Az **mTOR** szerepét figyelték meg a DNS károsodásra adott válaszban, valamint a transzláció elősegítésében^{Guo,2013;Wang,2013}. **AFOXO1** gént tumor szupresszorként tartják számon^{Zhang,2015}, mely az AKT aktiválás hatására ubiquitinizálódik és lebomlik. Sejtciklust gátló és DNS hibajavítást serkentő transzkripció faktoroként ismert^{Huang,2007;Yamagata,2008}. További funkciói között említhetjük az endothelsejtek működésében játszott szerepét a szív és a vaszkuláris strktúrák fejlődése során^{Sengupta,2012}. Az általunk vizsgált 57 miRNS közül egyesek nyálmirigy eredetű szövetekben a **PTEN** gén szabályozását végezhetik, mely a PIK3CA/AKT jelátviteli folyamat gátlójaként ismert és

számos daganatfélésegekben központi szerepet játszó elem^{Stephens,2005}. A PTEN és a PIK3CA gének ACC-ban betöltött szerepét Vranic és munkatársai egy ritka, metasztatikus bACC eset analízise során vizsgálták, melyben mindkét gén mutációját leírták. Munkacsoportjuk szerint ezek a gének központi szerepet tölthetnek be az igen ritka előfordulású, agresszív kórlefelet mutató bACC esetekben^{Vranic,2007}.

IPA[®] analízisünk által azonosított további potenciális célgén, a TP53 szerepét szintén vizsgálták már korábban: sACC esetek egy részében kimutatható a TP53 gén mutációja, amely korábbi tanulmányok alapján összefüggésben áll rosszul differenciált (szolid) megjelenésükkel^{Papadaki,1996}. Ezzel szemben a bACC-k TP53 mutációjával kapcsolatban nyilvános adatbázisok alapján nem áll rendelkezésünkre irodalmi adat. Az IPA[®] analízis során felmerült a **LAMTOR3** gén érintettsége is, amely egy másik jelátviteli út vonal, az ERK kaskád egyik elemeként ismert és feltehetően a sejtek proliferációjában játszik szerepet. A LAMTOR3 polimorfizmusának szerepét ugyan vizsgálták már korábban rosszindulatú emlődaganatokban, annak jelentőségét még nem sikerült igazolni^{De Araujo,2013}.

Bevezető vizsgálatunk által azonosított miRNS-ek lehetséges célgénjeinek keresésére *online elérhető, nyilvános adatbázisok* információit is felhasználtuk. Ebben az elemzésben olyan miRNS-ek vettek részt, amelyek expressziója speciális megoszlást mutatott az egyes vizsgálati csoportok között. A kiválasztott miRNS-ek egy része bACC esetekben csökkent, míg sACC esetekben fokozott expressziót mutatott kontroll csoportjaikhoz képest („A” alcsoport), míg másik részükben ezzel éppen ellentétes megoszlást találtunk: bACC esetekben emelkedett, sACC esetekben pedig csökkent mértékben expresszáódott kontroll szövetekkel összehasonlítva („B” alcsoport). Az elemzés során számos további gén érintettsége is felmerült bACC, valamint sACC esetekben. Az „A” és a „B” alcsoportba sorolt miRNS-ek („A”: *let-7b, let-7c, miR-17, miR-20a, miR-24 és miR-195*; „B”: *let-7e, miR-23b, miR-27b, miR-193b és miR-320*) célpontjai között számos ismert, sejtciklusban, apoptózisban, valamint angiogenezisben szerepet játszó gént azonosítottunk. Részletes irodalomkutatást a legalább két miRNS által potenciálisan szabályozott célgének kapcsán végeztünk. Így vizsgáltuk, hogy az „A” alcsoport által szabályozott **BCL2, BIM, BMPR2, CCND1, CDC25A, CDK6, IL-8, JAK1, MAP3K12, MEF2D, MYC, RUNX1** és **VEGFA** gének, valamint a „B” alcsoport tagjai által potenciálisan regulált **PLAU** célgénnek és az ACC kapcsolatát. Annak is megpróbáltunk utánajárni, hogy ismert-e már az „A”, valamint „B” alcsoport tagjai által egyaránt potenciálisan szabályozott gének (**NOTCH1** és **HMGA2**) szerepe ACC tumorokban.

A felsorolt gének egy részét korábban már kapcsolatba hozták ACC esetekkel, mely vizsgálatok szinte kizárólag nyálmirigy eredetű tumorokra terjedtek ki. A korábbi tanulmányok egyike szerint az apoptózist aktiváló fokozott **BIM** (más néven BCL2L11/BCL2-like 11), valamint az anti-apoptotikus hatású csökkent **BCL-2** expresszió ACC daganatokban terápiás célpontként szolgálnak a flavokawain kezelés során^{Zhao,2011}. Hoffmann munkacsoportjának vizsgálataiban az **IL-8** által kódolt interleukin sACC tumoros betegekben magas szérumszintet mutatott^{Hoffmann,2007}. Az „A” alcsoport további lehetséges célgénjei között találjuk a **RUNXI-1**-t (runt-related transcription factor 1) is, amely MYB jelenlétében extracelluláris mátrix elemek aktiválásában játszhat szerepet sACC tumorokban^{Gao,2014}. A miR-17 és miR-20a által szabályozott **VEGFA**-t számos tanulmányban vizsgálták már, melyek alapján szerepe ACC tumorokban ellentmondásos. Míg egyes esetekben nem mutatható ki szignifikáns összefüggés a VEGFA és a sACC-ban szenvedő betegek nyirokcsomó státusza, vagy túlélése között^{Lee,2012}, addig más tanulmányokban a VEGFA szintje egyértelműen korrelál a sACC metasztatikus hajlamával, a fokozott angiogenezissel és a rossz túlélési mutatókkal^{Hao,2010;Kondo,2014;Zhang,2007}.

A két alcsoport által egyaránt potenciálisan szabályozott **NOTCH1** Su és munkacsoportja szerint ACC-ban összefüggést mutat a sejtek növekedésével, anti-apoptotikus folyamatokkal és fokozott metasztatizáló hajlammal^{Su,2014}. Más tanulmányban a NOTCH1 szerepe kiemelendő a gamma-szekretáz inhibitorokra adott pozitív terápiás válasz kialakításában^{Stoeck,2014}. A **HMGA2** szerepét jóindulatú nyálmirigydaganatokban, pleomorfnádómában több közlemény is megerősítette^{Fehr,2009;Stenman,1986}, azonban ACC-kben betöltött szerepével kapcsolatban nem találtunk irodalmi adatot.

A **CCND1**, **BCL-2** és **MYC** gének ACC-ban betöltött potenciális szerepéről számos közlemény látott már napvilágot, melyekről bővebben validációs vizsgálataink eredményeinek elemzését követően tájékozódunk (lásd alább).

Bevezető vizsgálatunknak számos korlátja volt, melyek között elsősorban a kiindulási esetszám alacsony voltát kell megemlítenünk. Ezen vizsgálat során alkalmazott módszerek ugyan igen érzékeny és specifikus eredményekkel szolgáltak, melyek statisztikai elemzése (az Affymetrix® GeneChip® miRNA array által) az alacsony esetszám miatt feltehetően irreleváns. Ezen vizsgálatok jelentősége kimerül a validációs vizsgálatok megkezdéséhez szükséges irányvonalak felállításában, melynek során sok száz miRNS közül kiválaszthattuk azokat, amelyek jelentős szerepet játszhatnak a két eltérő szervből kiinduló ACC-k esetében.

Kiindulási vizsgálatunkkal kapott miRNS-ek célgén-elemzését tájékoztató jelleggel végeztük el, ezért az eredmények, a validálási kísérlet átfedést mutató célgén-predikciós eredményei ellenére, valószínűleg nem lehetnek teljes mértékben reprezentatívak.

Kiindulási vizsgálatunk után megnövelt esetszámú bACC és sACC mintákat vizsgáltunk az eltérő jellemzők felderítésére. Elsőként qPCR-rel határoztuk meg 19 miRNS (*let-7b*, *let-7e*, *miR-17*, *miR-17**, *miR-20a*, *miR-23b*, *miR-24*, *miR-27b*, *miR-125a-3p*, *miR-134*, *miR-193b*, *miR-195*, *miR-206*, *miR-320*, *miR-379*, *miR-382*, *miR-1275*, *RNU43* és *RNU48*) szintjét/expresszióját bACC, sACC esetekben, valamint normál kontroll szöveteikben. Az eredetileg kontrollnak szánt *RNU43* és *RNU48* helyett végül a *miR-125a-3p* miRNS szolgált kontrollként (*ld.: Anyagok és módszerek*).

A validációs vizsgálataink során számos eltérést detektáltunk a bevezető vizsgálathoz képest:

- Az bACC esetekben előzetes vizsgálatunkban csökkent expressziót mutató („A” alcsoportba sorolt) két miRNS, a *miR-17* és a *miR-20a* ezúttal szignifikánsan magasabb mértékben fejeződött ki kontroll emlőszövetekhez viszonyítva. Ezzel szemben validáció során sACC tumorok és kontroll szöveteik között e két miRNS expressziójában nem találtunk szignifikáns eltérést, habár a kiindulási vizsgálatok eredményei alapján jelentősen magasabb szintjüket mértük normál nyálmirigy szövetekhez képest.
- A „B” alcsoportba sorolt *miR-193b* validációs vizsgálatának elvégzése után a kiindulási vizsgálattal megegyezően is e miRNS alacsonyabban expresszálódott sACC esetekben, mint normál nyálmirigy szövetekben. Hasonló megoszlást tapasztaltunk a *let-7b* esetében is, mely alacsonyabb expressziót mutatott sACC-ban a korábbi vizsgálatunkkal szemben, ahol magasabb szintet találtunk sACC esetekben a kontroll szöveteikhez képest.
- Továbbá a „B” alcsoportba tartozó két miRNS, *miR-23b* és *miR-27b*, expressziója a korábbi vizsgálatától eltérően normál nyálmirigy szövetben mutatott statisztikailag fokozott expressziót a normál emlő szövetekhez képest.
- Kiindulási és validációs vizsgálataink eredményei közötti különbségek hátterében a megnövelt esetszámot és az ezáltal pontosabb eredményeket adó statisztikai elemzést feltételezzük. Bevezető és növelt esetszámon végzett analízisünk eredményeinek különbsége ezen felül származhat a két módszerben alkalmazott, eltérő normalizálási

módszerekből, valamint abból is, hogy ezen módszerek érzékenysége feltehetően nem azonos mértékű.

A validációs vizsgálatok során azonosított miRNS-ek között ismert miRNS-családok tagjait találjuk. Például a **miR-17 és a miR-20a** a miR-17/92 család egy-egy tagja, melyek az általuk szabályozott kulcsfontosságú gének révén számos malignus tumorban jelentős szerepet töltenek be (lásd korábban). Egy sACC esetek kapcsán végzett korábbi tanulmányban a miR-17/92 családba sorolható miRNS-ek fokozott expressziója és a kedvezőtlen klinikai kimenetel között jelentős összefüggést találtak^{Mitani,2013}. Ugyan a miR-17/92 család szerepét bACC esetekben korábban még nem vizsgálták, tripla-negatív emlőtumorsejtben (TNBC) több kutatócsoport is megerősítette fokozott expressziójukat^{Avery-Kiejda,2014;de Rinaldis,2013}. Reis-Filho munkacsoportja felvetette a miR-17/92 család differenciál diagnosztikai szerepét az emlőcarcinomák molekuláris alcsoportjainak elkülönítésében^{Calvano Filho,2014}.

Kontroll szöveteikhez képest nyálmirigy tumorokban alacsonyabban expresszálódó miRNS-ek, a **let-7b és miR-193b** szintén ismert miRNS családok képviselői (a let-7 és a miR-193b család tagjai). A miR-193b és nyálmirigy kiindulású daganatok összefüggéséről a szakirodalomban nem találtunk adatokat, míg rosszindulatú emlődaganatok kapcsán több kutatócsoportban is felmerült már a miR-193b potenciális tumor szuppresszor szerepe^{Leivonen,2011;Yang,2014}. Korábbi tanulmányok szerint a let-7b megítélése rosszindulatú emlődaganatokban ellentmondásos^{Hu,2013;Ma,2014}, míg a let-7b nyálmirigyekben betöltött szerepéről eddig még nem közöltek adatokat.

A **miR-23b és miR-27b** miRNS-ek expressziójában a nyálmirigyek javára tapasztalt különbségeket a miRNS-ek szövetspecifitásának tudjuk be. Ez a két miRNS szintén egy ismert miRNS család (miR-23b/27b/24) tagja, melyek szerepét több kutatócsoport is vizsgálta már rosszindulatú emlődaganatokban^{Pellegrino,2013;Wu,2011}. Jin és munkatársai a miR-23b/27b onkogén szerepét azonosították, melynek hátterében HER2/neu (ERBB2), EGF és TNF- α általi aktiválást találtak^{Jin,2013}.

A miRNS-ek egymással és a génekkel igen bonyolult hálózatot alkotva, bonyolult szabályozási rendszereken keresztül függnek össze. Ugyan a komplex szabályozási folyamatok teljes feltárása még a jövő feladata, egyes összefüggések azonosítása közelebb vihet bennünket az egyes szövetek, valamint daganattípusok jellegzetességeinek feltárásához. A legtöbb irodalmi adat alapján a miRNS-ek negatívan regulálják a gének működését (lásd korábban). Ezt feltételezve, a munkánk során igazolt fokozott **miR-17 és miR-20a** expresszió bACC-ban a

regulált génjeik csökkent expressziójához vezethet, mely által tumorszupresszor miR-eknek tekinthetők. Hasonló elmélet szerint, a *let-7b* és *miR-193b* csökkent expressziója sACC esetekben éppen az általuk regulált gének gátlás alóli felszabadulását okozhatja, tehát oncomiR hatású miRNS-ekként viselkedhetnek. Amennyiben elméletünk helytáll, a miR-17 és miR-20a célgénjeik által kódolt fehérjék expressziójának csökkenése várható bACC esetekben, ugyanakkor a *let-7b* és *miR-193b* célgénjei által kódolt fehérjék növekedése várható sACC esetekben. A fentiek alapján a nyilvános adatbázisok által azonosított, potenciális miRNS-célgén interakciók ismeretében elsődleges szempontunk volt olyan mRNS-ek kiválasztása, amelyek a fenti négy miRNS (*miR-17*, a *miR-20a*, a *let-7b*, *miR-193b*) mindegyike által egyaránt reguláltak. Epigenetikai szintű szabályozás révén azok a gének, amelyek a négy miRNS által egyaránt szabályozottak, hozzájárulhatnak az emlőből és nyálmirigyekből kiinduló ACC-k eltérő molekuláris mintázatához és ezáltal a két szervből kiinduló ACC-k eltérő prognózisának megértéséhez.

Részletes elemzést követően három olyan potenciális célgén azonosítottunk, melyek megfeleltek a fenti követelményeknek: a miRTarBase alapján a *MYC*, a *CCND1* és a *BCL2* is korábban már validált célgénjei a vizsgált miRNS-eknek. Fontos megemlítenünk, hogy ezen gének érintettsége már kiindulási vizsgálatunk eredményeinek elemzése során is felvetődött. A miRWalk adatbázis információi alapján a fenti kritériumoknak a *CCND1* gén felelt meg.

A *CCND1* nevű gén egy fontos sejtciklus szabályozó fehérjét, a cyclin D1-et kódolja, mely ciklin-dependens kinázokkal (cyclin-dependent kinases/CDKs) együttműködve a G1/S átmenet progresszióját segíti elő. A normál sejtciklust felgyorsító fehérje számos daganatféleségben központi szerepet játszik, melyek között – a teljesség igénye nélkül említhetjük a máj, a vese, vagy a nyelőcső rosszindulatú elváltozásait^{Jiang,1993;Leroy,2014;Zhang,1993}. A cyclin D1 szerepét emlőrákokban is kiterjedten vizsgálták, melyek szerint fokozott expressziója növeli a tumorok invazivitását^{Choi,2001;Dai,2013;Erickson,2000;Wong,2000}. A *CCND1* fokozott expressziója sACC-ban összefüggést mutat az előrehaladott stádiummal^{Sequeiros Santiago,2004}. Különböző szervekből kiinduló ACC-k cyclin D1 expressziójának összehasonlítása során Lin és munkatársai nem találtak lényeges különbséget^{Lin,2012}.

A *BCL2* gén egy anti-apoptotikus hatású fehérjét, a Bcl-2-t kódolja, mely – elsősorban nyirokcsomók rosszindulatú elváltozásaiban – hozzájárul a daganatos sejtek proliferációjához^{Korsmeyer,1992;Reed,1987;Tsujiimoto,1989}, mely által terápiás célpontként is szolgál^{Zhong,2014}. A Bcl-2 sACC esetekben betöltött szerepével kapcsolatos tanulmányok

ellentmondásosak: egyes munkacsoportok szerint ezekre általában alacsony Bcl-2 expressziós státusz jellemző^{Al-Rawi,2010}, míg mások a fokozott Bcl-2 expressziót a jobb prognózissal hozták összefüggésbe^{You,2008}.

A CCND1 és BCL2 gének által kódolt két fehérje, a *cyclin D1* és a *Bcl-2* expressziójának párhuzamos vizsgálatát bACC és sACC esetekben, valamint kontroll emlő és nyálmirigy szövetekben elsőként végeztük^{Kiss,2015}. Immunhisztokémiai vizsgálatunk eredményei alapján mindkét fehérje expresszióját szignifikánsan magasabbnak találtuk a tumoros szövetekben – emlő- és nyálmirigy eredetű ACC-kben egyaránt. A két fehérje fokozott expressziója – ismert sejten belüli hatásaik révén –feltehetően hozzájárul az ACC-k kialakulásához és proliferációjához, eredményeink alapján a két szervből kiinduló ACC esetek cyclin D1 és Bcl-2 expressziója között nem mutatkozott szignifikáns eltérés. Ezek alapján feltehetően nem expressziójukban keresendő a válasz a bACC és sACC esetek eltérő klinikai viselkedésére, illetve e két gén expressziójának szabályozásában minden bizonnyal nem kizárólagosan az említett miRNS-ek vesznek részt, hanem feltehetően vannak magasabb, erőteljesebb szabályozók is (pl a proliferációt serkentő jelátviteli utak).

A bACC esetek ismert molekuláris jellegzetességeinek figyelembe vétele alapján – miszerint azok a rosszindulatú emlődaganatok TNBC alcsoportjába tartoznak – további immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. Ezek során meghatároztuk bACC és sACC eseteink *ER*, *PgR*, valamint *HER2* státuszát, valamint *Ki67*-tel mért proliferációs aktivitását. Hormonreceptorok tekintetében mindkét szerv ACC esetei – egy-egy kivételtől eltekintve – negatívnak bizonyultak, mely eredményeink tükrözik az irodalomban ezzel kapcsolatos tanulmányok eredményeit. Az emlő és a nyálmirigy kiindulású ACC eseteink proliferációs aktivitása többnyire alacsony volt, azonban 2-2 bACC és sACC esetben emelkedett Ki-67 expressziót detektáltunk^{Kiss,2015}. A legmagasabb, 50%-os proliferációs aktivitást két bACC esetben figyeltünk meg, mindkét eset rosszul differenciált ACC volt. A két szervből kiinduló ACC esetek proliferációs aktivitása között a fentiek alapján lényeges különbség nem volt igazolható.

Tekintve, hogy az ACC-k nyálmirigyben és emlőben ritkán előforduló daganatfélések, a validációs vizsgálatunkban elemzett betegcsoportokat kellően reprezentatívnak tartjuk. A legtöbb ACC-vel kapcsolatos közleményben csupán esettanulmányokról olvashatunk, így a vizsgálatunkba bevont esetek száma elsősorban a bACC-kat tekintve irodalmi ritkaságnak számíthat.

Validációs vizsgálatunk korlátja, hogy az azonosított miRNS-mRNS interakciók korábbi vizsgálatok során már validált kapcsolatokat szemléltetnek, és ezek között ACC esetek nem fordulnak elő, ezért elképzelhető, hogy emlőben, valamint nyálmirigyben az általunk azonosított miRNS-célgén szabályozás esetleg nem jellemző. Azonban úgy véljük, hogy munkánk hozzájárult az ACC-k miRNS expressziós szintjeinek megismeréséhez.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Munkám során elsőként végeztünk párhuzamos miRNS expressziós profil meghatározást emlő- és nyálmirigy-eredetű adenoid cysticus carcinoma esetekben (bACC és sACC).
2. Kiindulási vizsgálatunkban elsőként azonosítottunk olyan miRNS-eket, melyek mind bACC, mind sACC esetekben, mind pedig normál emlő és nyálmirigy szövetekben (bN és sN) egyaránt expresszálódtak és a különböző vizsgálati csoportok között speciális eloszlát mutattak (57 miRNS).
3. Szintén kiindulási vizsgálatunkban azonosítottunk olyan miRNS-eket, melyek csupán sACC esetekben expresszálódtak (*miR-17**, *miR-125a-3p*, *miR-134*, *miR-181a-2**, *miR-206*, *miR-379*, *miR-382* és *miR-1275*), valamint egy miRNS-t, mely sACC esetek kivételével minden vizsgálati mintában detektálható volt (*miR-1234*).
4. A fentiek alapján azonosított miRNS-ek esetében alkalmazott kiterjedt célgén elemzés alapján (IPA[®] és nyilvános miRNS-célgén interakciókat tartalmazó adatbázisok) a következő gének érintettsége merült fel: *BIM*, *BMPR2*, *BCL2*, *CCND1*, *CDC25A*, *CDK6*, *IL8*, *JAK1*, *MAP3K12*, *MEF2D*, *MYC*, *RUNX1*, *VEGFA*, *HMGA2*, *NOTCH1* és *PLAU*.
5. Validációs vizsgálataink során két miRNS (*miR-17* és *miR-20a*) bACC esetekben mutatott fokozott expressziót, míg két miRNS (*let-7b* és *miR-193b*) szintje csökkent sACC esetekben. Két miRNS pedig (*miR-23b* és a *miR-27b*) a normál nyálmirigy és emlő szövetekben mutatott eltérő expressziót. A bACC és sACC esetek miRNS expressziójának statisztikai elemzése a két tumor között szignifikáns eltérést nem talált.
6. A *miR-17*, a *miR-20a*, a *let-7b* és a *miR-193b* miRNS-ek mindegyike által szabályozott közös célgénként azonosítottuk a *CCND1*, a *BCL2* és a *MYC* mRNS-eket (a miRWalk és miRTarBase adatbázisok adatai alapján).
7. A miRNS expresszióban tapasztalt eltérés ellenére a szöveti minták cyclin D1 és Bcl-2 expressziójának immunhisztokémiai vizsgálata e két fehérje expressziójában lényeges eltérést nem talált, detektálható szintjük a tumoros szövetekben egyaránt magas volt.
8. bACC mintáink ösztrogén receptor (ER), progeszteron receptor (PgR), valamint Her2 státuszának meghatározása során bACC eseteink szinte kivétel nélkül tripla-negatív

emlőtumoroknak bizonyultak. Közöttük 1-1 esetben gyenge ER, valamint PgR expressziót detektáltunk. sACC eseteink kivétel nélkül negatív ER-, PgR-, valamint Her2-expressziót mutattak.

9. Egyes esetekben meghatároztuk tumoros mintáink Ki67-expresszióját is, mely alapján néhány kivételtől eltekintve mind bACC, mind sACC eseteink alacsony proliferációs aktivitást mutattak. A legmagasabb proliferációs aktivitást két mintában, mindkét esetben rosszul differenciált emlő eredetű adenoid cysticus carcinoma esetében láttunk.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az emlőből és nyálmirigyekből kiinduló, azonos hisztopatológiai jellegzetességeket hordozó ACC prognózisa eltérő, melynek okát az eddigi molekuláris és genetikai vizsgálatok nem tárták fel. Munkánk során az epigenetikai szabályozás egy kis szegmensét vizsgáltuk, mivel feltevésünk szerint a miRNS-ek génekre gyakorolt szabályozási mechanizmusai befolyásolhatják az egyes szervekből kiinduló ACC-k prognózisát.

Vizsgálatunk kezdeti szakaszában kis esetszámon végeztünk miRNS expressziós profil vizsgálatot bACC és sACC, valamint normál szöveti kontrolljaik esetében. Ebben a vizsgálatban az Affymetrix® GeneChip® miRNA array segítségével 18 miRNS-t választottunk ki további analízisre. A későbbi vizsgálatok során qRT-PCR technikával magasabb esetszámon határoztuk meg a miRNS-ek expresszióját. Eredményeink szerint a miR-17 és miR-20a fokozottan expresszáldott bACC esetekben kontroll szöveteikhez képest, míg a let-7b és a miR-193b csökkent mértékben fejeződik ki sACC szövetekben, mint normál nyálmirigyekben. A miR-17, miR-20a, let-7b és miR-193b miRNS-ek közös célgénjei között azonosíthatóak a CCND1 és a BCL2. Mivel a miRNS-ek legtöbbször negatív szabályozó hatást fejtenek ki az általuk regulált génekre, azt feltételeztük, hogy a CCND1 és BCL által kódolt cyclin D1 és a Bcl-2 fehérjék eltérő módon expresszáldódnak bACC, valamint sACC esetekben. Immunhisztokémiai vizsgálataink alapján kontroll szöveteikhez képest mindkét fehérje fokozott expressziója volt detektálható a két szervből kiinduló ACC-ban. A bACC és sACC esetekben elvégzett ER, PgR, Her2 és Ki67 immunhisztokémiai vizsgálataink eredményei lényegében tükrözték az irodalmi adatokat.

Munkám során bACC és sACC esetek eltérő miRNS expressziós mintázatát találtam bACC és sACC esetekben, amennyiben azt normál emlő- és nyálmirigy szövetek miRNS szintjével vettem össze. A speciális eloszlást mutató miRNS-ek potenciális célgénjei által kódolt cyclin D1 és Bcl-2 fehérjék expressziója azonban nem különbözött jelentősen a két szervben: normál szöveteikhez képest bACC és sACC esetekben is magasabb cyclin D1 és Bcl-2 kifejeződést tapasztaltam. Feltehetően a két szervből kiinduló ACC eltérő klinikai lefolyása nem a vizsgált két fehérje működésében keresendő, azonban az eltérő expressziót mutató miRNS-ek további célgénjeinek szerepe nem zárható ki.

8. SUMMARY

The prognosis of breast-and salivary gland-derived ACC despite the identical histopathological features is different. The reason of it has not been explained by previous molecular and genetic assays so far. In our experiment we analyzed a minor segment of epigenetic regulation, since we assume that the prognosis of ACC of different organs may be influenced by miRNA regulatory effects on genes.

In our initial analysis we performed miRNA expression profiling on a small number of bACC and sACC tissues and their normal controls. In this experiment we selected 18 miRNAs for further experiments based on Affymetrix® GeneChip® miRNA array. In our further experiments we determined the expression of miRNAs on a higher number of cases by qRT-PCR method. We found miR-17 and miR-20a overexpressed in bACCs compared to their control tissues, while let-7b and miR-193 decreased in sACCs compared to normal salivary gland tissues. CCND1 and BCL2 are identified among the common target genes of miR-17, miR-20a, let-7b and miR-193b. As miRNAs mostly exert negative regulatory effects on their targets, we assumed that cyclin D1 and Bcl-2, encoded by CCND1 and BCL2 are expressed differently in bACC and sACC cases. Based on our immunohistochemical analysis, both proteins are overexpressed in ACCs of the two organs compared to their normal controls. The result of our ER, PgR, Her2 and Ki67 immunohistochemical analysis mainly reflected the data provided in literature.

In my work I found different miRNA expression pattern in bACC and sACC cases, when I compared those to miRNA levels of normal breast and salivary gland tissues. The expression of cyclin D1 and Bcl-2, encoded by two potential target genes of miRNAs with specific distribution, did not differ significantly in the two organs' ACCs: compared to normal controls, cyclin D1 and Bcl-2 were found overexpressed in both organs. Presumably, the diverse clinical course of ACC of the two organs is not hidden in the function of the analyzed two proteins, however the role of further target genes of miRNAs with specific distribution of the investigated study groups cannot be excluded.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Agulnik, M., E. W. Cohen, R. B. Cohen, E. X. Chen, E. E. Vokes, S. J. Hotte, E. Winquist, S. Laurie, D. N. Hayes, J. E. Dancey, S. Brown, G. R. Pond, I. Lorimer, M. Daneshmand, J. Ho, M. S. Tsao, L. L. Siu (2007). "Phase II study of lapatinib in recurrent or metastatic epidermal growth factor receptor and/or erbB2 expressing adenoid cystic carcinoma and non adenoid cystic carcinoma malignant tumors of the salivary glands." *J Clin Oncol* 25(25): 3978-3984.

Al-Rawi, N. H., H. Omer, S. Al Kawas (2010). "Immunohistochemical analysis of P(53) and bcl-2 in benign and malignant salivary glands tumors." *J Oral Pathol Med* 39(1): 48-55.

Alves, F. A., F. R. Pires, O. P. De Almeida, M. A. Lopes, L. P. Kowalski (2004). "PCNA, Ki-67 and p53 expressions in submandibular salivary gland tumours." *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(6): 593-597.

Ampil, F. L., R. P. Misra (1987). "Factors influencing survival of patients with adenoid cystic carcinoma of the salivary glands." *J Oral Maxillofac Surg* 45(12): 1005-1010.

Anderson, J. N., Jr., S. W. Beenken, R. Crowe, S. J. Soong, G. Peters, W. A. Maddox, M. M. Urist (1995). "Prognostic factors in minor salivary gland cancer." *Head Neck* 17(6): 480-486.

Arpino, G., G. M. Clark, S. Mohsin, V. J. Bardou, R. M. Elledge (2002). "Adenoid cystic carcinoma of the breast: molecular markers, treatment, and clinical outcome." *Cancer* 94(8): 2119-2127.

Avery-Kiejda, K. A., S. G. Braye, A. Mathe, J. F. Forbes, R. J. Scott (2014). "Decreased expression of key tumour suppressor microRNAs is associated with lymph node metastases in triple negative breast cancer." *BMC Cancer* 14: 51.

Bagga, S., J. Bracht, S. Hunter, K. Massirer, J. Holtz, R. Eachus, A. E. Pasquinelli (2005). "Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation." *Cell* 122(4): 553-563.

Bandyopadhyay, S., R. Mitra (2009). "TargetMiner: microRNA target prediction with systematic identification of tissue-specific negative examples." *Bioinformatics* 25(20): 2625-2631.

Batsakis, J. G., M. A. Luna, A. el-Naggar (1990). "Histopathologic grading of salivary gland neoplasms: III. Adenoid cystic carcinomas." *Ann Otol Rhinol Laryngol* 99(12): 1007-1009.

Bell, D., D. Roberts, M. Karpowicz, E. Y. Hanna, R. S. Weber, A. K. El-Naggar (2011). "Clinical significance of Myb protein and downstream target genes in salivary adenoid cystic carcinoma." *Cancer Biol Ther* 12(7): 569-573.

Bell, D., Y. J. Zhao, P. H. Rao, R. S. Weber, A. K. El-Naggar (2007). "Translocation t(6;14) as the sole chromosomal abnormality in adenoid cystic carcinoma of the base of tongue." *Head Neck Pathol* 1(2): 165-168.

Bernheim, A., S. Toujani, P. Saulnier, T. Robert, O. Casiraghi, P. Validire, S. Temam, P. Menard, P. Dessen, P. Fouret (2008). "High-resolution array comparative genomic hybridization analysis of human bronchial and salivary adenoid cystic carcinoma." *Lab Invest* 88(5): 464-473.

Betel, D., M. Wilson, A. Gabow, D. S. Marks, C. Sander (2008). "The microRNA.org resource: targets and expression." *Nucleic Acids Res* 36(Database issue): D149-153.

Billroth, T. (1859.). "Beobachtungen fiber Geschwulste der Speicheldriisen." *Virchow Arch Path Anat* 17(357-75).

Bohnsack, M. T., K. Czaplinski, D. Gorlich (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." *Rna* 10(2): 185-191.

Bregues, M., D. Teixeira, R. Parker (2005). "Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies." *Science* 310(5747): 486-489.

Brill, L. B., 2nd, W. A. Kanner, A. Fehr, Y. Andren, C. A. Moskaluk, T. Loning, G. Stenman, H. F. Frierson, Jr. (2011). "Analysis of MYB expression and MYB-NFIB gene fusions in adenoid cystic carcinoma and other salivary neoplasms." *Mod Pathol* 24(9): 1169-1176.

Bruce, I. A., N. J. Slevin, J. J. Homer, A. T. McGown, T. H. Ward (2005). "Synergistic effects of imatinib (STI 571) in combination with chemotherapeutic drugs in head and neck cancer." *Anticancer Drugs* 16(7): 719-726.

Calin, G. A., C. M. Croce (2006). "MicroRNA signatures in human cancers." *Nat Rev Cancer* 6(11): 857-866.

Calin, G. A., M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S. E. Wojcik, M. V. Iorio, R. Visone, N. I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, C. M. Croce (2005). "A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia." *N Engl J Med* 353(17): 1793-1801.

Calvano Filho, C. M., D. C. Calvano-Mendes, K. C. Carvalho, G. A. Maciel, M. D. Ricci, A. P. Torres, J. R. Filassi, E. C. Baracat (2014). "Triple-negative and luminal A breast tumors: differential expression of miR-18a-5p, miR-17-5p, and miR-20a-5p." *Tumour Biol* 35(8): 7733-7741.

Cao, Y., L. Lu, M. Liu, X. C. Li, R. R. Sun, Y. Zheng, P. Y. Zhang (2014). "Impact of epigenetics in the management of cardiovascular disease: a review." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18(20): 3097-3104.

Carlinfante, G., M. Lazzaretti, S. Ferrari, B. Bianchi, P. Crafa (2005). "P53, bcl-2 and Ki-67 expression in adenoid cystic carcinoma of the palate. A clinico-pathologic study of 21 cases with long-term follow-up." *Pathol Res Pract* 200(11-12): 791-799.

Chang, C. C., Y. J. Yang, Y. J. Li, S. T. Chen, B. R. Lin, T. S. Wu, S. K. Lin, M. Y. Kuo, C. T. Tan (2013). "MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma." *Oral Oncol* 49(9): 923-931.

Chatterjee, A., D. Chattopadhyay, G. Chakrabarti (2014). "miR-17-5p downregulation contributes to paclitaxel resistance of lung cancer cells through altering beclin1 expression." *PLoS One* 9(4): e95716.

Chen, C. H., B. Y. Li, J. T. Wan, A. Sun, J. S. Leu, C. P. Chiang (2001). "Expression of epidermal growth factor in salivary adenoid cystic carcinoma." *Proc Natl Sci Council Repub China B* 25(2): 90-96.

Chen, D., B. Zhang, J. Kang, X. Ma, Y. Lu, L. Gong (2013). "Expression and clinical significance of FAK, ILK, and PTEN in salivary adenoid cystic carcinoma." *Acta Otolaryngol* 133(2): 203-208.

Chen, H., H. Y. Lan, D. H. Roukos, W. C. Cho (2014). "Application of microRNAs in diabetes mellitus." *J Endocrinol* 222(1): R1-r10.

Chen, K. J., Y. Hou, K. Wang, J. Li, Y. Xia, X. Y. Yang, G. Lv, X. L. Xing, F. Shen (2014). "Reexpression of Let-7g microRNA inhibits the proliferation and migration via K-Ras/HMGA2/snail axis in hepatocellular carcinoma." *Biomed Res Int* 2014: 742417.

Chen, W., X. Zhao, Z. Dong, G. Cao, S. Zhang (2014). "Identification of microRNA profiles in salivary adenoid cystic carcinoma cells during metastatic progression." *Oncol Lett* 7(6): 2029-2034.

Chendrimada, T. P., K. J. Finn, X. Ji, D. Baillat, R. I. Gregory, S. A. Liebhaber, A. E. Pasquinelli, R. Shiekhattar (2007). "MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6." *Nature* 447(7146): 823-828.

Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura, R. Shiekhattar (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." *Nature* 436(7051): 740-744.

Cho, K. J., S. S. Lee, Y. S. Lee (1999). "Proliferating cell nuclear antigen and c-erbB-2 oncoprotein expression in adenoid cystic carcinomas of the salivary glands." *Head Neck* 21(5): 414-419.

Choi, Y. L., S. H. Park, J. J. Jang, C. K. Park (2001). "Expression of the G1-S modulators in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma and dysplastic nodule: association of cyclin D1 and p53 proteins with the progression of hepatocellular carcinoma." *J Korean Med Sci* 16(4): 424-432.

Chung, A. C., X. Yu, H. Y. Lan (2013). "MicroRNA and nephropathy: emerging concepts." *Int J Nephrol Renovasc Dis* 6: 169-179.

Ciccolallo, L., L. Licitra, G. Cantu, G. Gatta, E. W. Group (2009). "Survival from salivary glands adenoid cystic carcinoma in European populations." *Oral Oncol* 45(8): 669-674.

Clauditz, T. S., M. Reiff, L. Gravert, A. Gnoss, M. C. Tsourlakis, A. Munscher, G. Sauter, C. Bokemeyer, R. Knecht, W. Wilczak (2011). "Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in salivary gland carcinomas." *Pathology* 43(5): 459-464.

Creighton, C. J., X. Li, M. Landis, J. M. Dixon, V. M. Neumeister, A. Sjolund, D. L. Rimm, H. Wong, A. Rodriguez, J. I. Herschkowitz, C. Fan, X. Zhang, X. He, A. Pavlick, M. C. Gutierrez, L. Renshaw, A. A. Larionov, D. Faratian, S. G. Hilsenbeck, C. M. Perou, M. T. Lewis, J. M. Rosen, J. C. Chang (2009). "Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33): 13820-13825.

Crisi, G. M., S. A. Marconi, G. Makari-Judson, R. A. Goulart (2005). "Expression of c-kit in adenoid cystic carcinoma of the breast." *Am J Clin Pathol* 124(5): 733-739.

Dai, M., A. A. Al-Odaini, N. Fils-Aime, M. A. Villatoro, J. Guo, A. Arakelian, S. A. Rabbani, S. Ali, J. Lebrun (2013). "Cyclin D1 cooperates with p21 to regulate TGFbeta-mediated breast cancer cell migration and tumor local invasion." *Breast Cancer Res* 15(3): R49.

De Araujo, M. E., G. Erhart, K. Buck, E. Muller-Holzner, M. Hubalek, H. Fiegl, D. Campa, F. Canzian, U. Eilber, J. Chang-Claude, S. Coassin, M. Haun, L. Kedenko, B. Paulweber, R. Reitsamer, I. Himmel, D. Flesch-Janys, C. Lamina, F. Kronenberg, L. A. Huber, A. Kloss-Brandstatter (2013). "Polymorphisms in the gene regions of the adaptor complex LAMTOR2/LAMTOR3 and their association with breast cancer risk." *PLoS One* 8(1): e53768.

de Rinaldis, E., P. Gazinska, A. Mera, Z. Modrusan, G. M. Fedorowicz, B. Burford, C. Gillett, P. Marra, A. Grigoriadis, D. Dornan, L. Holmberg, S. Pinder, A. Tutt (2013). "Integrated genomic analysis of triple-negative breast cancers reveals novel microRNAs associated with clinical and molecular phenotypes and sheds light on the pathways they control." *BMC Genomics* 14: 643.

Dent, R., M. Trudeau, K. I. Pritchard, W. M. Hanna, H. K. Kahn, C. A. Sawka, L. A. Lickley, E. Rawlinson, P. Sun, S. A. Narod (2007). "Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence." *Clin Cancer Res* 13(15 Pt 1): 4429-4434.

Ding, J., S. Zhou, J. Guan (2011). "miRFam: an effective automatic miRNA classification method based on n-grams and a multiclass SVM." *BMC Bioinformatics* 12: 216.

Dodd, R. L., N. J. Slevin (2006). "Salivary gland adenoid cystic carcinoma: a review of chemotherapy and molecular therapies." *Oral Oncol* 42(8): 759-769.

Dori, S., M. Vered, R. David, A. Buchner (2002). "HER2/neu expression in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin: an immunohistochemical study." *J Oral Pathol Med* 31(8): 463-467.

Dweep, H., C. Sticht, P. Pandey, N. Gretz (2011). "miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes." *J Biomed Inform* 44(5): 839-847.

Edwards, P. C., T. Bhuiya, R. D. Kelsch (2003). "C-kit expression in the salivary gland neoplasms adenoid cystic carcinoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma, and monomorphic adenoma." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 95(5): 586-593.

el-Naggar, A. K., M. Lovell, D. L. Callender, A. M. Killary (1999). "Limited nonrandom chromosomal aberrations in a recurrent adenoid cystic carcinoma of the parotid gland." *Cancer Genet Cytogenet* 109(1): 66-69.

Elhassani, L. K., H. Mrabti, N. Ismaili, Y. Bensouda, O. Masbah, I. Bekkouch, K. Hassouni, F. Kettani, H. Errihani (2009). "Advanced adenoid cystic carcinoma of the cervix: a case report and review of the literature." *Cases J* 2: 6634.

Erickson, L. A., L. Jin, J. R. Goellner, C. Lohse, V. S. Pankratz, L. R. Zukerberg, G. B. Thompson, J. A. van Heerden, C. S. Grant, R. V. Lloyd (2000). "Pathologic features, proliferative activity, and cyclin D1 expression in Hurthle cell neoplasms of the thyroid." *Mod Pathol* 13(2): 186-192.

Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, E. Izaurralde (2007). "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1): 9-22.

Faivre, S., E. Raymond, O. Casiraghi, S. Temam, P. Berthaud (2005). "Imatinib mesylate can induce objective response in progressing, highly expressing KIT adenoid cystic carcinoma of the salivary glands." *J Clin Oncol* 23(25): 6271-6273; author reply 6273-6274.

Fan, X., B. Chen, J. Xu, H. Zhang, F. Deng, X. Xiang (2010). "Methylation status of the PTEN gene in adenoid cystic carcinoma cells." *Mol Med Rep* 3(5): 775-779.

Fehr, A., G. Stenman, J. Bullerdiek, T. Loning (2009). "[Molecular markers in salivary gland tumors: their use in diagnostic and prognostic workup]." *Pathologie* 30(6): 466-471.

Figueira, M. F., G. Monnerat-Cahli, E. Medei, A. B. Carvalho, M. M. Morales, M. E. Lamas, R. N. da Fonseca, J. Souza-Menezes (2014). "MicroRNAs: potential therapeutic targets in diabetic complications of the cardiovascular and renal systems." *Acta Physiol (Oxf)* 211(3): 491-500.

Folini, M., P. Gandellini, N. Longoni, V. Profumo, M. Callari, M. Pennati, M. Colecchia, R. Supino, S. Veneroni, R. Salvioni, R. Valdagni, M. G. Daidone, N. Zaffaroni (2010). "miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer." *Mol Cancer* 9: 12.

Font, R. L., S. L. Smith, R. G. Bryan (1998). "Malignant epithelial tumors of the lacrimal gland: a clinicopathologic study of 21 cases." *Arch Ophthalmol* 116(5): 613-616.

Franchi, A., O. Gallo, C. Bocciolini, L. Franchi, M. Paglierani, M. Santucci (1999). "Reduced E-cadherin expression correlates with unfavorable prognosis in adenoid cystic carcinoma of salivary glands of the oral cavity." *Am J Clin Pathol* 111(1): 43-50.

Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge, D. P. Bartel (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." *Genome Res* 19(1): 92-105.

Gao, R., C. Cao, M. Zhang, M. C. Lopez, Y. Yan, Z. Chen, Y. Mitani, L. Zhang, M. Zajac-Kaye, B. Liu, L. Wu, R. Renne, H. V. Baker, A. El-Naggar, F. J. Kaye (2014). "A unifying gene signature for adenoid cystic cancer identifies parallel MYB-dependent and MYB-independent therapeutic targets." *Oncotarget* 5(24): 12528-12542.

Garg, M. (2015). "Targeting microRNAs in epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem cells: therapeutic approaches in cancer." *Expert Opin Ther Targets*: 1-13.

Ge, M. H., Z. Q. Ling, Z. Tan, C. Chen, J. J. Xu, J. L. Yu (2012). "[Expression and significance of E-cadherin in adenoid cystic carcinoma of salivary glands]." *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 92(2): 106-109.

Ghabach, B., W. F. Anderson, R. E. Curtis, M. M. Huycke, J. A. Lavigne, G. M. Dores (2010). "Adenoid cystic carcinoma of the breast in the United States (1977 to 2006): a population-based cohort study." *Breast Cancer Res* 12(4): R54.

Ghosal, N., K. Mais, P. Shenjere, P. Julyan, D. Hastings, T. Ward, W. D. Ryder, I. Bruce, J. Homer, N. J. Slevin (2011). "Phase II study of cisplatin and imatinib in advanced salivary adenoid cystic carcinoma." *Br J Oral Maxillofac Surg* 49(7): 510-515.

Gibbons, M. D., U. Manne, W. R. Carroll, G. E. Peters, H. L. Weiss, W. E. Grizzle (2001). "Molecular differences in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands." *Laryngoscope* 111(8): 1373-1378.

Giraldez, A. J., Y. Mishima, J. Rihel, R. J. Grocock, S. Van Dongen, K. Inoue, A. J. Enright, A. F. Schier (2006). "Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs." *Science* 312(5770): 75-79.

Glazebrook, K. N., C. Reynolds, R. L. Smith, E. I. Gimenez, J. C. Boughey (2010). "Adenoid cystic carcinoma of the breast." *AJR Am J Roentgenol* 194(5): 1391-1396.

Glisson, B., A. D. Colevas, R. Haddad, J. Krane, A. El-Naggar, M. Kies, R. Costello, C. Summey, M. Arquette, C. Langer, P. C. Amrein, M. Posner (2004). "HER2 expression in salivary gland carcinomas: dependence on histological subtype." *Clin Cancer Res* 10(3): 944-946.

Gomez, D. R., B. S. Hoppe, S. L. Wolden, J. E. Zhung, S. G. Patel, D. H. Kraus, J. P. Shah, R. A. Ghossein, N. Y. Lee (2008). "Outcomes and prognostic variables in adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a recent experience." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 70(5): 1365-1372.

Gong, H., C. M. Liu, D. P. Liu, C. C. Liang (2005). "The role of small RNAs in human diseases: potential troublemaker and therapeutic tools." *Med Res Rev* 25(3): 361-381.

Goto, Y., S. Kojima, R. Nishikawa, H. Enokida, T. Chiyomaru, T. Kinoshita, M. Nakagawa, Y. Naya, T. Ichikawa, N. Seki (2014). "The microRNA-23b/27b/24-1 cluster is a disease progression marker and tumor suppressor in prostate cancer." *Oncotarget* 5(17): 7748-7759.

Gray, H. R., E. B. Helwig (1963). "Epithelioma adenoides cysticum and solitary trichoepithelioma." *Arch Dermatol* 87: 102-114.

Greer, R. O., Jr., S. Said, K. R. Shroyer, V. G. Marileila, S. A. Weed (2007). "Overexpression of cyclin D1 and cortactin is primarily independent of gene amplification in salivary gland adenoid cystic carcinoma." *Oral Oncol* 43(8): 735-741.

Grimson, A., K. K. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim, D. P. Bartel (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." *Mol Cell* 27(1): 91-105.

Guo, F., J. Li, W. Du, S. Zhang, M. O'Connor, G. Thomas, S. Kozma, B. Zingarelli, Q. Pang, Y. Zheng (2013). "mTOR regulates DNA damage response through NF-kappaB-mediated FANCD2 pathway in hematopoietic cells." *Leukemia* 27(10): 2040-2046.

Guo, Z., M. Maki, R. Ding, Y. Yang, B. Zhang, L. Xiong (2014). "Genome-wide survey of tissue-specific microRNA and transcription factor regulatory networks in 12 tissues." *Sci Rep* 4: 5150.

Hajdu, S. I., A. G. Huvos, J. T. Goodner, F. W. Foote, Jr., E. J. Beattie, Jr. (1970). "Carcinoma of the trachea. Clinicopathologic study of 41 cases." *Cancer* 25(6): 1448-1456.

Hao, L., N. Xiao-lin, C. Qi, Y. Yi-ping, L. Jia-quan, L. Yan-ning (2010). "Nerve growth factor and vascular endothelial growth factor: retrospective analysis of 63 patients with salivary adenoid cystic carcinoma." *Int J Oral Sci* 2(1): 35-44.

He, Q., X. Zhou, S. Li, Y. Jin, Z. Chen, D. Chen, Y. Cai, Z. Liu, T. Zhao, A. Wang (2013). "MicroRNA-181a suppresses salivary adenoid cystic carcinoma metastasis by targeting MAPK-Snai2 pathway." *Biochim Biophys Acta* 1830(11): 5258-5266.

Hermann, C., B. Assmus, C. Urbich, A. M. Zeiher, S. Dimmeler (2000). "Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signaling cascade for endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(2): 402-409.

Hitre, E., B. Budai, Z. Takacsi-Nagy, G. Rubovszky, E. Toth, E. Remenar, C. Polgar, I. Lang (2013). "Cetuximab and platinum-based chemoradio- or chemotherapy of patients with epidermal growth factor receptor expressing adenoid cystic carcinoma: a phase II trial." *Br J Cancer* 109(5): 1117-1122.

Hoffmann, T. K., E. Sonkoly, B. Homey, K. Scheckenbach, C. Gwodz, M. Bas, A. Chaker, K. Schirlau, T. L. Whiteside (2007). "Aberrant cytokine expression in serum of patients with adenoid cystic carcinoma and squamous cell carcinoma of the head and neck." *Head Neck* 29(5): 472-478.

Holst, V. A., C. E. Marshall, C. A. Moskaluk, H. F. Frierson, Jr. (1999). "KIT protein expression and analysis of c-kit gene mutation in adenoid cystic carcinoma." *Mod Pathol* 12(10): 956-960.

Hotte, S. J., E. W. Winquist, E. Lamont, M. MacKenzie, E. Vokes, E. X. Chen, S. Brown, G. R. Pond, A. Murgo, L. L. Siu (2005). "Imatinib mesylate in patients with adenoid cystic cancers of the salivary glands expressing c-kit: a Princess Margaret Hospital phase II consortium study." *J Clin Oncol* 23(3): 585-590.

Hsu, S. D., Y. T. Tseng, S. Shrestha, Y. L. Lin, A. Khaleel, C. H. Chou, C. F. Chu, H. Y. Huang, C. M. Lin, S. Y. Ho, T. Y. Jian, F. M. Lin, T. H. Chang, S. L. Weng, K. W. Liao, I. E. Liao, C. C. Liu, H. D. Huang (2014). "miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions." *Nucleic Acids Res* 42(Database issue): D78-85.

Hu, X., J. Guo, L. Zheng, C. Li, T. M. Zheng, J. L. Tanyi, S. Liang, C. Benedetto, M. Mitidieri, D. Katsaros, X. Zhao, Y. Zhang, Q. Huang, L. Zhang (2013). "The heterochronic microRNA let-7 inhibits cell motility by regulating the genes in the actin cytoskeleton pathway in breast cancer." *Mol Cancer Res* 11(3): 240-250.

Huang, H., D. J. Tindall (2007). "CDK2 and FOXO1: a fork in the road for cell fate decisions." *Cell Cycle* 6(8): 902-906.

Jackstadt, R., H. Hermeking (2014). "MicroRNAs as regulators and mediators of c-MYC function." *Biochim Biophys Acta*.

Jeng, Y. M., C. Y. Lin, H. C. Hsu (2000). "Expression of the c-kit protein is associated with certain subtypes of salivary gland carcinoma." *Cancer Lett* 154(1): 107-111.

Jiang, W., Y. J. Zhang, S. M. Kahn, M. C. Hollstein, R. M. Santella, S. H. Lu, C. C. Harris, R. Montesano, I. B. Weinstein (1993). "Altered expression of the cyclin D1 and

retinoblastoma genes in human esophageal cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(19): 9026-9030.

Jin, L., O. Wessely, E. G. Marcusson, C. Ivan, G. A. Calin, S. K. Alahari (2013). "Prooncogenic factors miR-23b and miR-27b are regulated by Her2/Neu, EGF, and TNF-alpha in breast cancer." *Cancer Res* 73(9): 2884-2896.

Kaczkowski, B., E. Torarinsson, K. Reiche, J. H. Havgaard, P. F. Stadler, J. Gorodkin (2009). "Structural profiles of human miRNA families from pairwise clustering." *Bioinformatics* 25(3): 291-294.

Karja, V., S. Syrjanen, V. Kataja, K. Syrjanen (1994). "c-erbB-2 oncogene expression in salivary gland tumours." *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 56(4): 206-212.

Kasinski, A. L., K. Kelnar, C. Stahlhut, E. Orellana, J. Zhao, E. Shimer, S. Dysart, X. Chen, A. G. Bader, F. J. Slack (2014). "A combinatorial microRNA therapeutics approach to suppressing non-small cell lung cancer." *Oncogene*.

Kernohan, N. M., K. Blessing, G. King, I. P. Corbett, I. D. Miller (1991). "Expression of c-erbB-2 oncoprotein in salivary gland tumours: an immunohistochemical study." *J Pathol* 163(1): 77-80.

Kertesz, M., N. Iovino, U. Unnerstall, U. Gaul, E. Segal (2007). "The role of site accessibility in microRNA target recognition." *Nat Genet* 39(10): 1278-1284.

Kiss, O., A. M. Tokes, S. Spisak, A. Szilagyi, N. Lippai, A. M. Szasz, J. Kulka (2013). "[MicroRNA-profiling in breast- and salivary gland-derived adenoid cystic carcinomas]." *Orv Hetil* 154(25): 963-968.

Kiss, O., A. M. Tokes, S. Spisak, A. Szilagyi, N. Lippai, B. Szekely, A. M. Szasz, J. Kulka (2014). "Breast- and Salivary Gland-Derived Adenoid Cystic Carcinomas: Potential Post-Transcriptional Divergencies. A Pilot Study Based on miRNA

Expression Profiling of Four Cases and Review of the Potential Relevance of the Findings." *Pathol Oncol Res*.

Kiss, O., A. M. Tokes, S. Vranic, Z. Gatalica, L. Vass, N. Udvarhelyi, A. M. Szasz, J. Kulka (2015). "Expression of miRNAs in adenoid cystic carcinomas of the breast and salivary glands." *Virchows Arch*.

Kitada, H., K. Yamaguchi, M. Takashima, M. Tanaka (1997). "Adenoid cystic carcinoma of the esophagus: report of a case." *Surg Today* 27(3): 238-242.

Kiyoshima, T., K. Shima, I. Kobayashi, K. Matsuo, K. Okamura, S. Komatsu, A. M. Rasul, H. Sakai (2001). "Expression of p53 tumor suppressor gene in adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands." *Oral Oncol* 37(3): 315-322.

Kondo, S., Y. Mukudai, D. Soga, T. Nishida, M. Takigawa, T. Shiota (2014). "Differential expression of vascular endothelial growth factor in high- and low-metastasis cell lines of salivary gland adenoid cystic carcinoma." *Anticancer Res* 34(2): 671-677.

Korsmeyer, S. J. (1992). "Bcl-2: an antidote to programmed cell death." *Cancer Surv* 15: 105-118.

Kou, X. X., T. Hao, Z. Meng, Y. H. Zhou, Y. H. Gan (2013). "Acetylated Sp1 inhibits PTEN expression through binding to PTEN core promoter and recruitment of HDAC1 and promotes cancer cell migration and invasion." *Carcinogenesis* 34(1): 58-67.

Kozomara, A., S. Griffiths-Jones (2011). "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." *Nucleic Acids Res* 39(Database issue): D152-157.

Krek, A., D. Grun, M. N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E. J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K. C. Gunsalus, M. Stoffel, N. Rajewsky (2005). "Combinatorial microRNA target predictions." *Nat Genet* 37(5): 495-500.

Krol, J., I. Loedige, W. Filipowicz (2010). "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay." *Nat Rev Genet* 11(9): 597-610.

Kruger, J., M. Rehmsmeier (2006). "RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible." *Nucleic Acids Res* 34(Web Server issue): W451-454.

Kusafuka, K. (1991). "[Expressions of oncogene products in adenoid cystic carcinomas of salivary glands: immunohistochemical study]." *Kokubyo Gakkai Zasshi* 58(4): 696-717.

Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, T. Tuschl (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." *Curr Biol* 12(9): 735-739.

Langevin, S. M., B. C. Christensen (2014). "Let-7 microRNA-binding-site polymorphism in the 3'UTR of KRAS and colorectal cancer outcome: a systematic review and meta-analysis." *Cancer Med* 3(5): 1385-1395.

Lazzaro, B., D. Cleveland (2000). "P53 and Ki-67 antigen expression in small oral biopsy specimens of salivary gland tumors." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 89(5): 613-617.

Lee, S. K., M. S. Kwon, Y. S. Lee, S. H. Choi, S. Y. Kim, K. J. Cho, S. Y. Nam (2012). "Prognostic value of expression of molecular markers in adenoid cystic cancer of the salivary glands compared with lymph node metastasis: a retrospective study." *World J Surg Oncol* 10: 266.

Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, V. N. Kim (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." *Nature* 425(6956): 415-419.

Lee, Y., I. Hur, S. Y. Park, Y. K. Kim, M. R. Suh, V. N. Kim (2006). "The role of PACT in the RNA silencing pathway." *Embo j* 25(3): 522-532.

Lee, Y., K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim, V. N. Kim (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." *Embo j* 21(17): 4663-4670.

Leivonen, S. K., A. Rokka, P. Ostling, P. Kohonen, G. L. Corthals, O. Kallioniemi, M. Perala (2011). "Identification of miR-193b targets in breast cancer cells and systems biological analysis of their functional impact." *Mol Cell Proteomics* 10(7): M110.005322.

Leroy, X., P. Camparo, V. Gnemmi, S. Aubert, V. Flamand, M. Roupret, J. C. Fantoni, E. Comperat (2014). "Clear cell papillary renal cell carcinoma is an indolent and low-grade neoplasm with overexpression of cyclin-D1." *Histopathology* 64(7): 1032-1036.

Lewis, B. P., C. B. Burge, D. P. Bartel (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." *Cell* 120(1): 15-20.

Li, N., L. Xu, H. Zhao, A. K. El-Naggar, E. M. Sturgis (2012). "A comparison of the demographics, clinical features, and survival of patients with adenoid cystic carcinoma of major and minor salivary glands versus less common sites within the Surveillance, Epidemiology, and End Results registry." *Cancer* 118(16): 3945-3953.

Li, W., Z. Liu, L. Chen, L. Zhou, Y. Yao (2014). "MicroRNA-23b is an independent prognostic marker and suppresses ovarian cancer progression by targeting runt-related transcription factor-2." *FEBS Lett* 588(9): 1608-1615.

Li, X. (2014). "MiR-375, a microRNA related to diabetes." *Gene* 533(1): 1-4.

Liang, S., L. He, X. Zhao, Y. Miao, Y. Gu, C. Guo, Z. Xue, W. Dou, F. Hu, K. Wu, Y. Nie, D. Fan (2011). "MicroRNA let-7f inhibits tumor invasion and metastasis by targeting MYH9 in human gastric cancer." *PLoS One* 6(4): e18409.

Lin, C. H., R. F. Yen, Y. M. Jeng, C. Y. Tzen, C. Hsu, R. L. Hong (2005). "Unexpected rapid progression of metastatic adenoid cystic carcinoma during treatment with imatinib mesylate." *Head Neck* 27(12): 1022-1027.

Lin, Y. C., K. C. Chen, C. H. Lin, K. T. Kuo, J. Y. Ko, R. L. Hong (2012). "Clinicopathological features of salivary and non-salivary adenoid cystic carcinomas." *Int J Oral Maxillofac Surg* 41(3): 354-360.

Ma, C., K. Nong, H. Zhu, W. Wang, X. Huang, Z. Yuan, K. Ai (2014). "H19 promotes pancreatic cancer metastasis by derepressing let-7's suppression on its target HMGA2-mediated EMT." *Tumour Biol* 35(9): 9163-9169.

Ma, L., G. Z. Li, Z. S. Wu, G. Meng (2014). "Prognostic significance of let-7b expression in breast cancer and correlation to its target gene of BSG expression." *Med Oncol* 31(1): 773.

Maragkakis, M., M. Reczko, V. A. Simossis, P. Alexiou, G. L. Papadopoulos, T. Dalamagas, G. Giannopoulos, G. Goumas, E. Koukis, K. Kourtis, T. Vergoulis, N. Koziris, T. Sellis, P. Tsanakas, A. G. Hatzigeorgiou (2009). "DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction." *Nucleic Acids Res* 37(Web Server issue): W273-276.

Marchio, C., B. Weigelt, J. S. Reis-Filho (2010). "Adenoid cystic carcinomas of the breast and salivary glands (or 'The strange case of Dr Jekyll and Mr Hyde' of exocrine gland carcinomas)." *J Clin Pathol* 63(3): 220-228.

Marcinow, A., E. Ozer, T. Teknos, L. Wei, A. Hurtuk, M. Old, A. Agrawal, R. Carrau, O. H. Iwenofu (2014). "Clinicopathologic predictors of recurrence and overall survival in adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a single institutional experience at a tertiary care center." *Head Neck* 36(12): 1705-1711.

Mark, H. F., I. Hanna, D. R. Gnepp (1996). "Cytogenetic analysis of salivary gland type tumors." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82(2): 187-192.

Martins, C., I. Fonseca, L. Roque, C. Ribeiro, J. Soares (2001). "Cytogenetic similarities between two types of salivary gland carcinomas: adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma." *Cancer Genet Cytogenet* 128(2): 130-136.

Mashkevich, G., S. Undavia, C. Iacob, J. Arigo, C. Linstrom (2006). "Malignant cylindroma of the external auditory canal." *Otol Neurotol* 27(1): 97-101.

Mastropasqua, M. G., E. Maiorano, G. Pruneri, E. Orvieto, G. Mazzarol, A. R. Vento, G. Viale (2005). "Immunoreactivity for c-kit and p63 as an adjunct in the diagnosis of adenoid cystic carcinoma of the breast." *Mod Pathol* 18(10): 1277-1282.

Mathelier, A., A. Carbone (2013). "Large scale chromosomal mapping of human microRNA structural clusters." *Nucleic Acids Res* 41(8): 4392-4408.

Mathonnet, G., M. R. Fabian, Y. V. Svitkin, A. Parsyan, L. Huck, T. Murata, S. Biffo, W. C. Merrick, E. Darzynkiewicz, R. S. Pillai, W. Filipowicz, T. F. Duchaine, N. Sonenberg (2007). "MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F." *Science* 317(5845): 1764-1767.

Mehta, D. N., S. J. Parikh (2013). "Adenoid cystic carcinoma of palate." *J Nat Sci Biol Med* 4(1): 249-252.

Millar, B. A., M. Kerba, B. Youngson, G. A. Lockwood, F. F. Liu (2004). "The potential role of breast conservation surgery and adjuvant breast radiation for adenoid cystic carcinoma of the breast." *Breast Cancer Res Treat* 87(3): 225-232.

Miranda, K. C., T. Huynh, Y. Tay, Y. S. Ang, W. L. Tam, A. M. Thomson, B. Lim, I. Rigoutsos (2006). "A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes." *Cell* 126(6): 1203-1217.

Mitani, Y., P. H. Rao, P. A. Futreal, D. B. Roberts, P. J. Stephens, Y. J. Zhao, L. Zhang, M. Mitani, R. S. Weber, S. M. Lippman, C. Caulin, A. K. El-Naggar (2011). "Novel chromosomal rearrangements and break points at the t(6;9) in salivary adenoid cystic carcinoma: association with MYB-NFIB chimeric fusion, MYB expression, and clinical outcome." *Clin Cancer Res* 17(22): 7003-7014.

Mitani, Y., D. B. Roberts, H. Fatani, R. S. Weber, M. S. Kies, S. M. Lippman, A. K. El-Naggar (2013). "MicroRNA profiling of salivary adenoid cystic carcinoma: association of miR-17-92 upregulation with poor outcome." *PLoS One* 8(6): e66778.

Miyai, K., M. R. Schwartz, M. K. Divatia, R. C. Anton, Y. W. Park, A. G. Ayala, J. Y. Ro (2014). "Adenoid cystic carcinoma of breast: Recent advances." *World J Clin Cases* 2(12): 732-741.

Morlando, M., M. Ballarino, N. Gromak, F. Pagano, I. Bozzoni, N. J. Proudfoot (2008). "Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally." *Nat Struct Mol Biol* 15(9): 902-909.

Moss, E. G. (2002). "MicroRNAs: hidden in the genome." *Curr Biol* 12(4): R138-140.

Murchison, E. P., G. J. Hannon (2004). "miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery." *Curr Opin Cell Biol* 16(3): 223-229.

Naqvi, A. R., M. N. Islam, N. R. Choudhury, Q. M. Haq (2009). "The fascinating world of RNA interference." *Int J Biol Sci* 5(2): 97-117.

Nkanza, N. K. (1988). "Adenoid cystic carcinoma of the prostate." *Cent Afr J Med* 34(7): 166-168.

Norberg-Spaak, L., I. Dardick, T. Ledin (2000). "Adenoid cystic carcinoma: use of cell proliferation, BCL-2 expression, histologic grade, and clinical stage as predictors of clinical outcome." *Head Neck* 22(5): 489-497.

Nordgard, S., G. Franzen, M. Boysen, T. B. Halvorsen (1997). "Ki-67 as a prognostic marker in adenoid cystic carcinoma assessed with the monoclonal antibody MIB1 in paraffin sections." *Laryngoscope* 107(4): 531-536.

Nordkvist, A., J. Mark, H. Gustafsson, G. Bang, G. Stenman (1994). "Non-random chromosome rearrangements in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands." *Genes Chromosomes Cancer* 10(2): 115-121.

Ozono, S., M. Onozuka, K. Sato, Y. Ito (1992). "Immunohistochemical localization of estradiol, progesterone, and progesterone receptor in human salivary glands and salivary adenoid cystic carcinomas." *Cell Struct Funct* 17(3): 169-175.

Pandit, K. V., J. Milosevic (2015). "MicroRNA regulatory networks in idiopathic pulmonary fibrosis." *Biochem Cell Biol*: 1-9.

Pandit, K. V., J. Milosevic, N. Kaminski (2011). "MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis." *Transl Res* 157(4): 191-199.

Papadaki, H., S. D. Finkelstein, S. Kounelis, A. Bakker, P. A. Swalsky, S. B. Kapadia (1996). "The role of p53 mutation and protein expression in primary and recurrent adenoid cystic carcinoma." *Hum Pathol* 27(6): 567-572.

Paranjape, T., H. Heneghan, R. Lindner, F. K. Keane, A. Hoffman, A. Hollestelle, J. Dorairaj, K. Geyda, C. Pelletier, S. Nallur, J. W. Martens, M. J. Hooning, M. Kerin, D. Zelterman, Y. Zhu, D. Tuck, L. Harris, N. Miller, F. Slack, J. Weidhaas (2011). "A 3'-untranslated region KRAS variant and triple-negative breast cancer: a case-control and genetic analysis." *Lancet Oncol* 12(4): 377-386.

Park, D., S. C. Lee, J. W. Park, S. Y. Cho, H. K. Kim (2014). "Overexpression of miR-17 in gastric cancer is correlated with proliferation-associated oncogene amplification." *Pathol Int* 64(7): 309-314.

Paulino, A. F., A. G. Huvos (1999). "Epithelial tumors of the lacrimal glands: a clinicopathologic study." *Ann Diagn Pathol* 3(4): 199-204.

Pellegrino, L., J. Stebbing, V. M. Braga, A. E. Frampton, J. Jacob, L. Buluwela, L. R. Jiao, M. Periyasamy, C. D. Madsen, M. P. Caley, S. Ottaviani, L. Roca-Alonso, M. El-Bahrawy, R. C. Coombes, J. Krell, L. Castellano (2013). "miR-23b regulates cytoskeletal remodeling, motility and metastasis by directly targeting multiple transcripts." *Nucleic Acids Res* 41(10): 5400-5412.

Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown, D. Botstein (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* 406(6797): 747-752.

Persson, M., Y. Andren, J. Mark, H. M. Horlings, F. Persson, G. Stenman (2009). "Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(44): 18740-18744.

Petersen, C. P., M. E. Bordeleau, J. Pelletier, P. A. Sharp (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." *Mol Cell* 21(4): 533-542.

Pfeffer, M. R., Y. Talmi, R. Catane, Z. Symon, A. Yosepovitch, M. Levitt (2007). "A phase II study of Imatinib for advanced adenoid cystic carcinoma of head and neck salivary glands." *Oral Oncol* 43(1): 33-36.

Prat, A., M. C. Cheang, M. Martin, J. S. Parker, E. Carrasco, R. Caballero, S. Tyldesley, K. Gelmon, P. S. Bernard, T. O. Nielsen, C. M. Perou (2013). "Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer." *J Clin Oncol* 31(2): 203-209.

Prat, A., A. Lluch, J. Albanell, W. T. Barry, C. Fan, J. I. Chacon, J. S. Parker, L. Calvo, A. Plazaola, A. Arcusa, M. A. Segui-Palmer, O. Burgues, N. Ribelles, A. Rodriguez-

Lescure, A. Guerrero, M. Ruiz-Borrego, B. Munarriz, J. A. Lopez, B. Adamo, M. C. Cheang, Y. Li, Z. Hu, M. L. Gulley, M. J. Vidal, B. N. Pitcher, M. C. Liu, M. L. Citron, M. J. Ellis, E. Mardis, T. Vickery, C. A. Hudis, E. P. Winer, L. A. Carey, R. Caballero, E. Carrasco, M. Martin, C. M. Perou, E. Alba (2014). "Predicting response and survival in chemotherapy-treated triple-negative breast cancer." *Br J Cancer* 111(8): 1532-1541.

Preisegger, K. H., A. Beham, S. Kopp, G. Jessernigg, A. Gugl, H. Stammberger (2001). "Prognostic impact of molecular analyses in adenoid cystic carcinomas of the salivary gland." *Onkologie* 24(3): 273-277.

Quattlebaum, F. W., M. B. Dockerty, C. W. Mayo (1946). "Adenocarcinoma, cylindroma type, of the parotid gland." *Surg Gynecol Obstet* 82: 342-347.

Rao, P. H., D. Roberts, Y. J. Zhao, D. Bell, C. P. Harris, R. S. Weber, A. K. El-Naggar (2008). "Deletion of 1p32-p36 is the most frequent genetic change and poor prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands." *Clin Cancer Res* 14(16): 5181-5187.

Reed, J. C., Y. Tsujimoto, J. D. Alpers, C. M. Croce, P. C. Nowell (1987). "Regulation of bcl-2 proto-oncogene expression during normal human lymphocyte proliferation." *Science* 236(4806): 1295-1299.

Rehmsmeier, M., P. Steffen, M. Hochsmann, R. Giegerich (2004). "Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes." *Rna* 10(10): 1507-1517.

Reid, J. D. (1952). "Adenoid cystic carcinoma (cylindroma) of the bronchial tree." *Cancer* 5(4): 685-694.

Renehan, A., E. N. Gleave, B. D. Hancock, P. Smith, M. McGurk (1996). "Long-term follow-up of over 1000 patients with salivary gland tumours treated in a single centre." *Br J Surg* 83(12): 1750-1754.

Ro, J. Y., E. G. Silva, H. S. Gallager (1987). "Adenoid cystic carcinoma of the breast." *Hum Pathol* 18(12): 1276-1281.

Rusinov, V., V. Baev, I. N. Minkov, M. Tabler (2005). "MicroInspector: a web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence." *Nucleic Acids Res* 33(Web Server issue): W696-700.

Scherr, M., M. Eder (2004). "RNAi in functional genomics." *Curr Opin Mol Ther* 6(2): 129-135.

Seethala, R. R., K. Cieply, E. L. Barnes, S. Dacic (2011). "Progressive genetic alterations of adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation." *Arch Pathol Lab Med* 135(1): 123-130.

Sengupta, A., S. Chakraborty, J. Paik, K. E. Yutzey, H. J. Evans-Anderson (2012). "FoxO1 is required in endothelial but not myocardial cell lineages during cardiovascular development." *Dev Dyn* 241(4): 803-813.

Sequeiros Santiago, G., J. P. Rodrigo Tapia, D. Garcia-Carracedo, J. Garcia Pedrero, C. Suarez Nieto, M. V. Gonzalez Meana (2004). "[CCND1 gene amplification in the adenoid cystic carcinoma of the minor salivary glands]." *Acta Otorrinolaringol Esp* 55(2): 88-92.

Shick, P. C., G. P. Riordan, R. D. Foss (1995). "Estrogen and progesterone receptors in salivary gland adenoid cystic carcinoma." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 80(4): 440-444.

Shin, S. J., P. P. Rosen (2002). "Solid variant of mammary adenoid cystic carcinoma with basaloid features: a study of nine cases." *Am J Surg Pathol* 26(4): 413-420.

Shintani, S., T. Funayama, Y. Yoshihama, R. E. Alcalde, K. Ootsuki, N. Terakado, T. Matsumura (1995). "Expression of c-erbB family gene products in adenoid cystic

carcinoma of salivary glands: an immunohistochemical study." *Anticancer Res* 15(6B): 2623-2626.

Shintani, S., M. Mihara, Y. Nakahara, A. Kiyota, Y. Yoshihama, Y. Ueyama, T. Matsumura (2000). "Infrequent alternations of RB pathway (Rb-p16INK4A-cyclinD1) in adenoid cystic carcinoma of salivary glands." *Anticancer Res* 20(3b): 2169-2175.

Song, M. A., A. N. Paradis, M. S. Gay, J. Shin, L. Zhang (2014). "Differential expression of microRNAs in ischemic heart disease." *Drug Discov Today*.

Sorlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J. C. Matese, P. O. Brown, D. Botstein, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19): 10869-10874.

Sorlie, T., R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J. S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C. M. Perou, P. E. Lonning, P. O. Brown, A. L. Borresen-Dale, D. Botstein (2003). "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8418-8423.

Stefani, M., N. Speranza (1970). "[A case of cylindroma of the vagina]." *Riv Anat Patol Oncol* 36(1-4): 77-105.

Stenman, G., J. Sandros, R. Dahlenfors, M. Juberg-Ode, J. Mark (1986). "6q- and loss of the Y chromosome--two common deviations in malignant human salivary gland tumors." *Cancer Genet Cytogenet* 22(4): 283-293.

Stephens, L., R. Williams, P. Hawkins (2005). "Phosphoinositide 3-kinases as drug targets in cancer." *Curr Opin Pharmacol* 5(4): 357-365.

Stephens, P. J., H. R. Davies, Y. Mitani, P. Van Loo, A. Shlien, P. S. Tarpey, E. Papaemmanuil, A. Cheverton, G. R. Bignell, A. P. Butler, J. Gamble, S. Gamble, C.

Hardy, J. Hinton, M. Jia, A. Jayakumar, D. Jones, C. Latimer, S. McLaren, D. J. McBride, A. Menzies, L. Mudie, M. Maddison, K. Raine, S. Nik-Zainal, S. O'Meara, J. W. Teague, I. Varela, D. C. Wedge, I. Whitmore, S. M. Lippman, U. McDermott, M. R. Stratton, P. J. Campbell, A. K. El-Naggar, P. A. Futreal (2013). "Whole exome sequencing of adenoid cystic carcinoma." *J Clin Invest* 123(7): 2965-2968.

Stoeck, A., S. Lejnine, A. Truong, L. Pan, H. Wang, C. Zang, J. Yuan, C. Ware, J. MacLean, P. W. Garrett-Engele, M. Kluk, J. Laskey, B. B. Haines, C. Moskaluk, L. Zawel, S. Fawell, G. Gilliland, T. Zhang, B. E. Kremer, B. Knoechel, B. E. Bernstein, W. S. Pear, X. S. Liu, J. C. Aster, S. Sathyanarayanan (2014). "Discovery of biomarkers predictive of GSI response in triple-negative breast cancer and adenoid cystic carcinoma." *Cancer Discov* 4(10): 1154-1167.

Sturn, A., J. Quackenbush, Z. Trajanoski (2002). "Genesis: cluster analysis of microarray data." *Bioinformatics* 18(1): 207-208.

Su, B. H., J. Qu, M. Song, X. Y. Huang, X. M. Hu, J. Xie, Y. Zhao, L. C. Ding, L. She, J. Chen, L. S. Lin, X. Lin, D. L. Zheng, Y. G. Lu (2014). "NOTCH1 signaling contributes to cell growth, anti-apoptosis and metastasis in salivary adenoid cystic carcinoma." *Oncotarget* 5(16): 6885-6895.

Sur, R. K., B. Donde, V. Levin, J. Pacella, J. Kotzen, K. Cooper, M. Hale (1997). "Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a review of 10 years." *Laryngoscope* 107(9): 1276-1280.

Szanto, P. A., M. A. Luna, M. E. Tortoledo, R. A. White (1984). "Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands." *Cancer* 54(6): 1062-1069.

Tauxe, W. N., D. J. Mc, K. D. Devine (1962). "A century of cylindromas. Short review and report of 27 adenoid cystic carcinomas arising in the upper respiratory passages." *Arch Otolaryngol* 75: 364-376.

Tchertkoff, V., A. Sedlis (1962). "Cylindroma of the cervix." *Am J Obstet Gynecol* 84: 749-752.

Tonini, G., F. Ragni, D. Pezzola, R. Balzano, V. Villanacci, C. Baronchelli (1995). "[Cystic adenoid carcinoma of the esophagus. Description of a case and review of the literature]." *Minerva Chir* 50(3): 283-287.

Trendell-Smith, N. J., D. Peston, S. Shousha (1999). "Adenoid cystic carcinoma of the breast: a tumour commonly devoid of oestrogen receptors and related proteins." *Histopathology* 35(3): 241-248.

Triantafillidou, K., J. Dimitrakopoulos, F. Iordanidis, D. Koufogiannis (2006). "Management of adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands." *J Oral Maxillofac Surg* 64(7): 1114-1120.

Tsatsanis, C., D. A. Spandidos (2000). "The role of oncogenic kinases in human cancer (review)." *International Journal of Molecular Medicine* 5(6): 583-590.

Tsujimoto, Y. (1989). "Overexpression of the human BCL-2 gene product results in growth enhancement of Epstein-Barr virus-immortalized B cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(6): 1958-1962.

van der Wal, J. E., A. G. Becking, G. B. Snow, I. van der Waal (2002). "Distant metastases of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands and the value of diagnostic examinations during follow-up." *Head Neck* 24(8): 779-783.

Vasudevan, S., Y. Tong, J. A. Steitz (2008). "Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation." *Cell Cycle* 7(11): 1545-1549.

Vered, M., E. Braunstein, A. Buchner (2002). "Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin." *Head Neck* 24(7): 632-636.

Vila, L., H. Liu, S. Z. Al-Quran, D. P. Coco, H. J. Dong, C. Liu (2009). "Identification of c-kit gene mutations in primary adenoid cystic carcinoma of the salivary gland." *Mod Pathol* 22(10): 1296-1302.

Vranic, S., R. Bender, J. Palazzo, Z. Gatalica (2013). "A review of adenoid cystic carcinoma of the breast with emphasis on its molecular and genetic characteristics." *Hum Pathol* 44(3): 301-309.

Vranic, S., N. Bilalovic, L. M. Lee, B. Kruslin, S. L. Lilleberg, Z. Gatalica (2007). "PIK3CA and PTEN mutations in adenoid cystic carcinoma of the breast metastatic to kidney." *Hum Pathol* 38(9): 1425-1431.

Wakiyama, M., K. Takimoto, O. Ohara, S. Yokoyama (2007). "Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system." *Genes Dev* 21(15): 1857-1862.

Wang, S. S., J. J. Fan, C. H. Ni (2013). "[Pulmonary fibrosis and micro RNA]." *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 31(5): 398-400.

Wang, W., Y. P. Luo (2015). "MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential." *J Zhejiang Univ Sci B* 16(1): 18-31.

Wang, X. (2008). "miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface." *Rna* 14(6): 1012-1017.

Wang, X., I. M. El Naqa (2008). "Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals." *Bioinformatics* 24(3): 325-332.

Wang, Y., Z. Hu, Z. Liu, R. Chen, H. Peng, J. Guo, X. Chen, H. Zhang (2013). "MTOR inhibition attenuates DNA damage and apoptosis through autophagy-mediated suppression of CREB1." *Autophagy* 9(12): 2069-2086.

Wegner, A., E. Wasniewska, D. Jarmolowska-Jurczyszyn, W. Golusinski, W. Biczysko (2007). "[The role of immunohistochemical staining (protein p53, cyclin D1) in the prognosis of adenoid cystic carcinoma salivary gland tumors]." *Otolaryngol Pol* 61(4): 423-427.

Weigelt, B., H. M. Horlings, B. Kreike, M. M. Hayes, M. Hauptmann, L. F. Wessels, D. de Jong, M. J. Van de Vijver, L. J. Van't Veer, J. L. Peterse (2008). "Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types." *J Pathol* 216(2): 141-150.

Weitzner, S., G. C. Chaney, H. L. Bass (1970). "Adenoid cystic carcinoma of breast: report of a case and review of the literature." *Am Surg* 36(9): 571-574.

Wetterskog, D., M. A. Lopez-Garcia, M. B. Lambros, R. A'Hern, F. C. Geyer, F. Milanezi, M. C. Cabral, R. Natrajan, A. Gauthier, K. K. Shiu, N. Orr, S. Shousha, Z. Gatalica, A. Mackay, J. Palacios, J. S. Reis-Filho, B. Weigelt (2012). "Adenoid cystic carcinomas constitute a genomically distinct subgroup of triple-negative and basal-like breast cancers." *J Pathol* 226(1): 84-96.

Wetterskog, D., P. M. Wilkerson, D. N. Rodrigues, M. B. Lambros, K. Fritchie, M. K. Andersson, R. Natrajan, A. Gauthier, S. Di Palma, S. Shousha, Z. Gatalica, C. Topfer, V. Vukovic, R. A'Hern, B. Weigelt, A. Vincent-Salomon, G. Stenman, B. P. Rubin, J. S. Reis-Filho (2013). "Mutation profiling of adenoid cystic carcinomas from multiple anatomical sites identifies mutations in the RAS pathway, but no KIT mutations." *Histopathology* 62(4): 543-550.

Wolff, A. C., M. E. Hammond, D. G. Hicks, M. Dowsett, L. M. McShane, K. H. Allison, D. C. Allred, J. M. Bartlett, M. Bilous, P. Fitzgibbons, W. Hanna, R. B. Jenkins, P. B. Mangu, S. Paik, E. A. Perez, M. F. Press, P. A. Spears, G. H. Vance, G. Viale, D. F. Hayes, O. American Society of Clinical, P. College of American (2014). "Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast

cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update." *Arch Pathol Lab Med* 138(2): 241-256.

Wong, R. J., S. B. Keel, R. J. Glynn, M. A. Varvares (2000). "Histological pattern of mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma." *Laryngoscope* 110(1): 65-72.

Woodburn, J. R. (1999). "The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy." *Pharmacol Ther* 82(2-3): 241-250.

Wu, Q., Z. Lu, H. Li, J. Lu, L. Guo, Q. Ge (2011). "Next-generation sequencing of microRNAs for breast cancer detection." *J Biomed Biotechnol* 2011: 597145.

Wu, Q., G. Luo, Z. Yang, F. Zhu, Y. An, Y. Shi, D. Fan (2014). "miR-17-5p promotes proliferation by targeting SOCS6 in gastric cancer cells." *FEBS Lett* 588(12): 2055-2062.

Xiao, C., D. P. Calado, G. Galler, T. H. Thai, H. C. Patterson, J. Wang, N. Rajewsky, T. P. Bender, K. Rajewsky (2007). "MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb." *Cell* 131(1): 146-159.

Xiao, F., Z. Zuo, G. Cai, S. Kang, X. Gao, T. Li (2009). "miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions." *Nucleic Acids Res* 37(Database issue): D105-110.

Yamagata, K., H. Daitoku, Y. Takahashi, K. Namiki, K. Hisatake, K. Kako, H. Mukai, Y. Kasuya, A. Fukamizu (2008). "Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt." *Mol Cell* 32(2): 221-231.

Yamamoto, Y., Wistuba, II, Y. Kishimoto, A. K. Virmani, F. Vuitch, J. Albores-Saavedra, A. F. Gazdar (1998). "DNA analysis at p53 locus in adenoid cystic carcinoma: comparison of molecular study and p53 immunostaining." *Pathol Int* 48(4): 273-280.

Yang, Z., M. He, K. Wang, G. Sun, L. Tang, Z. Xu (2014). "Tumor suppressive microRNA-193b promotes breast cancer progression via targeting DNAJC13 and RAB22A." *Int J Clin Exp Pathol* 7(11): 7563-7570.

Yin, R., W. Bao, Y. Xing, T. Xi, S. Gou (2012). "MiR-19b-1 inhibits angiogenesis by blocking cell cycle progression of endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 417(2): 771-776.

Ying, S. Y., S. L. Lin (2005). "Intronic microRNAs." *Biochem Biophys Res Commun* 326(3): 515-520.

You, J. Q., P. Wang (2008). "[Protein expression of p53, bcl-2, and bax in adenoid cystic carcinoma of lacrimal gland]." *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 88(28): 1978-1982.

Zhang, B., L. S. Gui, X. L. Zhao, L. L. Zhu, Q. W. Li (2015). "FOXO1 is a tumor suppressor in cervical cancer." *Genet Mol Res* 14(2): 6605-6616.

Zhang, J., B. Peng (2007). "In vitro angiogenesis and expression of nuclear factor kappaB and VEGF in high and low metastasis cell lines of salivary gland Adenoid Cystic Carcinoma." *BMC Cancer* 7: 95.

Zhang, Y. J., W. Jiang, C. J. Chen, C. S. Lee, S. M. Kahn, R. M. Santella, I. B. Weinstein (1993). "Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma." *Biochem Biophys Res Commun* 196(2): 1010-1016.

Zhao, H., A. Kalota, S. Jin, A. M. Gewirtz (2009). "The c-myb proto-oncogene and microRNA-15a comprise an active autoregulatory feedback loop in human hematopoietic cells." *Blood* 113(3): 505-516.

Zhao, X., Y. L. Chao, Q. B. Wan, X. M. Chen, P. Su, J. Sun, Y. Tang (2011). "Flavokawain B induces apoptosis of human oral adenoid cystic cancer ACC-2 cells via up-regulation of Bim and down-regulation of Bcl-2 expression." *Can J Physiol Pharmacol* 89(12): 875-883.

Zhong, Y., Y. Liang, J. Chen, L. Li, Y. Qin, E. Guan, D. He, Y. Wei, Y. Xie, Q. Xiao (2014). "Propofol inhibits proliferation and induces neuroapoptosis of hippocampal neurons in vitro via downregulation of NF-kappaB p65 and Bcl-2 and upregulation of caspase-3." *Cell Biochem Funct* 32(8): 720-729.

Zhu, H., H. Wu, X. Liu, B. R. Evans, D. J. Medina, C. G. Liu, J. M. Yang (2008). "Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells." *Biochem Pharmacol* 76(5): 582-588.

**10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (A DISSZERTÁCIÓHOZ
KAPCSOLÓDÓ ABSZTRAKTOK)**

1. Kiss, O., Tőkés, A-M., Spisák, S., Szilágyi, A., Lippai, N., Székely, B., Szász, A.M., Kulka, J. (2015). „Breast- and Salivary Gland-Derived Adenoid Cystic Carcinomas: Potential Post-Transcriptional Divergencies. A Pilot Study Based on miRNA Expression Profiling of Four Cases and Review of the Potential Relevance of the Findings.” *Pathology&Oncology Research* 21(1):29-44
2. Kiss, O., Tőkés, A-M., Vranic, S., Gatalica, Z., Vass, L., Udvarhelyi, N., Szász, A.M., Kulka, J. (2015). „Expression of miRNAs in adenoid cystic carcinomas of the breast and salivary glands.” *Virchows Archive* DOI: 10.1007/s00428-015-1827-3
3. Kiss, O., Tőkés, A-M., Spisák, S., Szilágyi, A., Lippai, N., Szász, A.M., Kulka, J. (2013). „Mikro-RNS-expresszió vizsgálata adenoid cysticus emlő- és nyálmirigy-carcinomákban.” *Orvosi Hetilap* 154(25):963-8

**11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (A DISSZERTÁCIÓTÓL
FÜGGETLEN KÖZLEMÉNYEK)**

1. Madaras, L., Kovács, K.A., Szász, A.M., Kenessey, I., Tőkés, A-M., Székely, B., Baranyák, Z., Kiss, O., Dank, M., Kulka, J. (2014). „Clinicopathological features and prognosis of pregnancy associated breast cancer - a matched case control study.” Pathology&Oncology Research (3):581-90
2. Madaras, L., Baranyák, Z., Kulka, J., Szász, A.M., Kovács, A., Lan, PH., Székely, B., Dank, M., Nagy, T., Kiss, O., Harsányi, L., Barbai, T., Kenessey, I., Tőkés, A-M. (2013). „Retrospective analysis of clinicopathological characteristics and family history data of early-onset breast cancer: a single-institutional study of Hungarian patients.” Patholgy&Oncology Research (4):723-9

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Dolgozatom elkészítéséhez nyújtott segítségéért köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, **Kulka Janina Professzorasszonynak**, aki munkám során szeretetteljes, de szigorú tanácsaival, kritikáival folyamatos iránymutatást nyújtott. Köszönöm az évek során tanúsított végtelen türelmét, tökéletességre törekvését. Szakmai jellegű segítségnyújtásán túl végtelenül hálás vagyok rendkívüli emberi jellemének megismeréséért.

Hálás köszönettel tartozom **Családtagjaimnak**, akik az elmúlt években, évtizedekben **egyől egyig** önzetlen támogatással segítettek. Köszönöm, hogy nehezebb időszakokban határtalan türelmükkel és szeretetükkel mindig mellettem állnak olyankor is, amikor feladataim elvégzése csupán a Velük töltött idő rovására kivitelezhető.

Rendkívül sok szakmai segítséget kaptam az évek során **Szász A. Marcelltől** és **Tőkés Anna-Máriától**, akik a legapróbb felmerülő probléma során is nagy körültekintéssel, időt nem sajnálva segítettek a legmegfelelőbb megoldások megtalálásában.

Köszönöm **Schaff Zsuzsa** Professzorasszonynak az általa vezetett programban való részvétel lehetőségéért, valamint hallgatói éveim alatt nyújtott mindennemű – szakmai és emberi - támogatásáért. Köszönöm továbbá **Tímár József Professzor Úrnak**, hogy lehetőséget nyújtott számomra a II. sz. Patológiai Intézetben folytatott kutatói munkám kivitelezésére.

Köszönöm **Zlatko Marusicnak** önzetlen segítségét, amivel hozzájárult kezdeti munkám kiterjesztéséhez. Köszönöm továbbá **Semir Vranic** határtalan önzetlenségét és szakmai segítségét, aki szövettani blokkok rendelkezésre bocsátásán túl rendkívüli mértékben segítette a munka elméleti részét. Együttműködésükért külön köszönettel tartozom **Jäckel Mártnak**, **Lippai Norbertnek**, **Spisák Sándornak**, **Szilágyi Annának**, **Udvarhelyi Nórának**, valamint **Vass Lászlónak**.

Munkámhoz jelentős segítséget nyújtottak **Azumah Erzsébet**, Gregor Viktória és Sklánitzné Samodai Erika.

Az évek során adódó módszertani kérdésekben mindig támogattak *Gyöngyösi Benedek, Horváth Csilla, Lendvai Gábor, Oláh Gergely, Madaras Lilla és Tóth Barnabás*. A felmerülő technikai jellegű problémákon felül lelkiileg rengeteg támogatást nyújtott *Schlachter Krisztina*.

A munka során alkalmazott, valamint egyéb molekuláris vizsgálómódszerek technikájának elsajátításával kapcsolatban rengeteg tapasztalatot szereztem a Bostonban eltöltött nyolc hónap során. A *Beth Israel Deaconess Medical Center (Harvard Medical School)* Élettudományok Központjának Karnoub kutatólaborjában számos nagy tudású, tapasztalt kutatótól tanulhattam.

Köszönettel tartozom továbbá *Fehér Erzsébet Professzorasszonynak*, akitől az elmúlt évek során nagyon sok szeretetet és önzetlen segítséget kaptam. Anatómiai ismereteimen felül *Aldorfer Károly Docens Úrnak* köszönöm a hosszú évek óta tartó emberi példamutatását. Önzetlen támogatásuk mindig nagyon sok erőt nyújt számomra.

Végül pedig köszönöm **Dr.Tóth Erika** támogatását is, aki rugalmasságával és megértésével lehetőséget teremtett dolgozatom megírásához.

Kutatásunkhoz a következő támogatási források járultak hozzá: TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001; TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0001; TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0013.

FÜGGELÉK

1. RNS izolálási protokoll a validációs vizsgálatok során

Minden mintához 1 ml xilolt pipettáztunk, melyet 5 percig inkubáltunk. Az inkubáció eltelte után minden mintát alaposan felráztunk (vortexeltünk), majd 13000 rpm fordulatszámom szobahőmérsékleten 2 percig centrifugáltuk. Centrifugálást követően a xilolt a mintákról leöntöttük, majd 1 ml 100%-os ethanol adtunk hozzá. A mintákat újabb vortexelést követően ismételten 13000 rpm fordulatszámom centrifugáltuk, majd az ethanol lepipettázását követően ez utóbbi folyamatot (1 ml 100%-os ethanol, vortex, centrifugálás, ethanol lepipettázása) megismételtük. Következő lépésben a maradék ethanol szobahőn hagytuk elpárologni (15-20 perc). Mintáinkat ezután a kitben található emésztőenzimből és DNázból álló oldatban szuszpendáltuk a kithez mellékelt protokollnak megfelelően (mintánként 200µl Digestion Buffer+4 µl proteáz oldatot alkalmaztunk, vortexelést követően mintáinkat 50°C-on inkubáltuk 150 percen keresztül). Az emésztőenzimek leállításához a mintákat 15 percen keresztül 80°C-on inkubáltuk. 240 µl izoláló oldat (Isolation Additive) hozzáadását és vortexelést követően mintáinkhoz 550 µl 100%-os ethanol adtunk, majd azokat pipettázással elegyítettük. A kithez mellékelt 2 ml-es csövekbe a – kit által szintén tartalmazott – filtereket helyeztünk, majd az izoláló oldatot és ethanol tartalmazó mintáinkat 700 µl-enként rápipettáztuk a filterre. Mintáinkat 700 µl-enként 10000 rpm fordulatszámom centrifugáltuk 30 másodpercig. Az átszűrődött folyadékot leöntöttük, a filtert újra visszahelyeztük a csőbe és a fennmaradó oldatot rápipettáztuk a filterre, melyet ismételten 10000 rpm fordulatszámom 30 percig centrifugáltunk. Az átszűrődött folyadékot ismételten leöntöttük, a filtert ismét visszahelyeztük és mintáinkhoz 700 µl mosófolyadékot adtunk (Wash 1). 10000 rpm 30 másodperces centrifugálást követően az átszűrődött folyadékot ismét leöntöttük, majd 500 µl másik mosófolyadékot (Wash 2/3) pipettáztunk mintáinkhoz. Újabb 10000 rpm 30 másodperc centrifugálást követően mintáinkat 30 percig DNáz tartalmazó oldatban emésztettük. (Az emésztőoldat 6 µl DNáz puffert (DNase Buffer), 4 µl DNáz és 50 µl nucleáz mentes vizet tartalmazott, így mintánként 60 µl emésztőoldatot használtunk). Fél óra eltelte után újabb mosás következett (700 µl Wash 1 oldat, centrifugálás, majd 500 µl Wash2/3 oldat, majd centrifugálás). Filterünket ekkor egy újabb 2 ml-es csőbe helyeztük át és minden 30 µl

mosóoldatot (Elution Solution) pipettáztunk a filterek középre, mellyel mintáinkat 5 percig inkubáltuk. Újabb centrifugálás következett (1 percig 13000 rpm fordulatszámon). A filtert eltávolítottuk és a cső alján található izolátum koncentrációját NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel határoztuk meg. Mérést követően mintáinkat a további felhasználás idejéig -80°C-on tároltuk.

2. Reverz transzkripció protokoll

Reverz transzkripcióhoz szükséges anyagmennyiségek reverz transzkripcióhoz szükséges négyszeres mennyiségben:

	Egy reverz transzkripció reakcióhoz szükséges anyagmennyiségek
10X RT Puffer (10X Reverse Transcription Buffer)	0,750 µl
100mM dNTP (with dTTP)	0,075 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µl	0,500 µl
RNase Inhibitor, 20 U/µl	0,095 µl
Nuclease-free water	2,58 µl
Összesen	4 µl

3. qRT-PCR protokoll

qPCR reakciókhoz szükséges reakciós oldat anyagmennyiségei triplikátumonként:

	Mennyiség (µl)
qPCR Mix	16,8
H₂O	12,94
Primer*	1,68
cDNS**	2,23

*triplikátumonként 1-1 micro-RNS primert alkalmaztunk

**mivel a reverz transzkripció során egy-egy triplikátumban kétféle miRNS átírását végeztük, ugyanazon cDNS-ből két triplikátumhoz adtunk 2,23-2,23 µl mennyiséget

4. Affymetrix® GeneChip® miRNA array - eredmények

Az Affymetrix® GeneChip® miRNA array statisztikai számításai alapján minden mintában expresszálandó (bN, bACC1, bACC2, sN, sACC1 és sACC2) miRNS-ek, hozzájuk tartozó jeladási értékekkel I. („I”): az adott miRNS a mintában jelen van).

Vizsgált miRNS neve	bN*	bACC1*	bACC2*	sN*	sACC1*	sACC2*
hsa-let-7a_st	11,6735077	12,6448708	11,3704643	12,84664	12,8457651	13,2766447
hsa-let-7b_st	11,6069822	12,9148312	11,4785614	12,6318235	13,2824411	13,213912
hsa-let-7c_st	11,1887894	11,9736643	10,7559929	12,5300159	12,4965143	12,6896935
hsa-let-7d_st	10,558672	11,5208168	10,2141809	11,462882	11,4126472	11,9123907
hsa-let-7e_st	9,42948	10,579833	9,312275	11,0164089	10,8941612	10,7829933
hsa-let-7f_st	8,511496	9,216158	8,143291	10,1740475	9,642245	10,1485519
hsa-let-7g_st	8,436794	9,439601	7,925148	10,2545156	9,168972	10,0231266
hsa-let-7i_st	9,018677	11,1819153	9,248895	10,492507	10,8518934	11,5316868
hsa-miR-103_st	9,293724	11,42094	8,494539	10,8739119	11,4928274	11,7677927
hsa-miR-107_st	9,296203	10,904685	8,003281	10,6582289	10,9660664	11,2520781

hsa-miR-1228-star_st	7,899023	9,156628	8,832127	8,130872	9,522355	8,809151
hsa-miR-125b_st	10,6311045	12,2053995	8,57528	11,9614048	11,5376568	11,492341
hsa-miR-1267_st	5,553642	6,194113	7,524993	6,498166	6,21812534	5,833263
hsa-miR-1280_st	8,047313	8,444189	7,00615168	9,504274	7,4579463	7,351931
hsa-miR-1281_st	8,030417	6,98923	8,925432	7,400933	7,774637	6,47544861
hsa-miR-1308_st	7,55068827	10,4758186	8,6645565	9,12995	9,845788	9,912374
hsa-miR-143_st	10,2222528	9,43984	9,196884	11,7851477	10,498764	11,6162548
hsa-miR-145_st	9,651582	10,2639408	7,97373772	12,1685715	10,8403282	11,413763
hsa-miR-146a_st	7,70492029	8,713522	6,926238	10,347229	10,0234356	10,1512461
hsa-miR-149-star_st	8,964125	9,979605	10,6387043	10,1220922	11,0711174	9,860132
hsa-miR-151-5p_st	9,118494	10,7015171	6,7889986	10,4170027	9,970731	10,2609272
hsa-miR-16_st	10,9122143	11,8427391	8,532416	11,3667068	11,0567493	12,177145
hsa-miR-	8,770823	10,652607	7,936165	9,735787	10,6158934	11,0837746

17_st						
hsa-miR-182_st	6,322492	9,689505	8,290209	8,373533	10,983839	9,610238
hsa-miR-1826_st	8,40444	11,95386	11,0966692	12,67391	12,1027994	11,565093
hsa-miR-185_st	6,5128026	9,36243248	6,917721	8,111019	7,9654727	8,967185
hsa-miR-191_st	9,048916	11,3627367	8,520886	10,8541641	10,526823	10,8340454
hsa-miR-193b_st	7,196075	7,29729271	5,20006466	7,8911953	6,298359	6,570418
hsa-miR-195_st	11,2711163	9,789146	7,109769	10,4743042	10,8738766	11,0880537
hsa-miR-199a-3p_st	9,691317	10,15729	9,186421	10,3360052	9,696281	10,66785
hsa-miR-199b-3p_st	9,971316	10,1502237	8,9672575	10,3477945	9,669297	10,59113
hsa-miR-200c_st	10,7578506	13,1527834	10,125123	12,4327145	11,9661694	11,9891605
hsa-miR-205_st	8,917269	10,9668646	7,744831	10,9618464	11,3319454	11,3180027
hsa-miR-20a_st	9,127122	9,981365	6,089364	9,503568	10,0433226	11,0489187
hsa-miR-214_st	8,29029751	8,908069	8,45406	8,73891449	9,090319	9,3975

hsa-miR-23a_st	10,75694	12,4081259	9,051208	11,6490879	11,177784	11,7262592
hsa-miR-23b_st	9,796807	11,572506	10,1560068	12,2336559	12,1125832	12,18637
hsa-miR-24_st	11,168581	11,92607	9,707426	11,7830868	12,1981583	12,4691906
hsa-miR-26a_st	11,76628	12,8003559	10,9207945	13,1605825	12,7740574	12,926424
hsa-miR-27b_st	7,579687	9,252659	7,850317	10,5061016	10,55333	10,3054314
hsa-miR-296-3p_st	4,94744635	3,80738163	4,508216	3,86000443	4,349104	3,563384
hsa-miR-29b-2-star_st	8,074047	6,96917725	8,708451	7,61574841	6,964886	6,481799
hsa-miR-320a_st	6,839688	10,4284744	9,098162	9,904651	10,2321434	10,1182632
hsa-miR-320b_st	8,16898	10,2727709	8,545478	9,777195	10,0028267	10,0477133
hsa-miR-320c_st	7,033529	9,946894	8,596817	9,53473	9,602523	9,703136
hsa-miR-338-5p_st	4,236581	4,63401556	5,463869	5,23531532	5,56601572	5,317274
hsa-miR-342-	7,44842243	9,467436	6,98764324	8,234322	8,825025	8,655239

3p_st						
hsa-miR-34a_st	7,26487827	6,982417	6,74185944	9,048527	8,43651	9,142051
hsa-miR-361-5p_st	7,846286	9,542054	6,830909	8,690805	9,067253	9,28397751
hsa-miR-494_st	10,3432426	9,3067255	10,2668705	11,2810755	10,413763	9,244992
hsa-miR-638_st	9,79029751	11,5987425	10,98571	11,3804512	12,466794	10,8837881
hsa-miR-768-3p_st	8,869441	9,046466	8,05686	10,6075163	10,6388988	10,663949
hsa-miR-768-5p_st	6,984198	9,41386	8,787982	9,813073	10,1968994	10,0084705
hsa-miR-923_st	10,3269291	11,00499	11,0464144	12,0897427	12,298995	10,6953373
hsa-miR-92a_st	6,99899673	10,9030037	7,7961874	9,244465	9,91044	9,955816
hsa-miR-938_st	6,22446871	6,81355524	5,48533535	6,835762	6,52860928	6,168668
hsa-miR-99a_st	9,423712	9,63252	6,613502	11,5859747	10,2921276	10,4407692

5. Statisztika

Tukey teszt eredményei a qRT-PCR vizsgálat által meghatározott miRNS expressziók kontroll miRNS-hez vonatkoztatott relatív expressziója alapján. (1: sACC esetek; 2: normál nyálmirigy szövetek; 3: bACC esetek; 4: normál emlő szövetek; VAR01: az éppen vizsgált betegcsoport számmal feltüntetve (1-4); VAR02: az adott vizsgálati csoporttal (VAR01) összehasonlított vizsgálati csoportok számmal feltüntetve (1-4); narancssárga színnel a szignifikáns különbségeket jelöltük.):

Dependent Variable	I (VAR01)	J (VAR02)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sign. (p)
let-7b	1	2	-193,56	68,00	,032
		3	93,28	60,47	,421
		4	-3,52	88,95	1,000
	2	1	193,56	68,00	,032
		3	286,84	67,18	,001
		4	190,03	93,63	,193
	3	1	-93,28	60,47	,421
		2	-286,84	67,18	,001
		4	-96,80	88,32	,694
	4	1	3,52	88,95	1,000
		2	-190,03	93,63	,193
		3	96,80	88,32	,694
miR-193b	1	2	-63,72	21,38	,023
		3	-4,49	19,01	,995
		4	-77,05	27,97	,041
	2	1	63,72	21,38	,023
		3	59,23	21,12	,036
		4	-13,33	29,44	,969
	3	1	4,49	19,01	,995
		2	-59,23	21,12	,036
		4	-72,56	27,77	,057
	4	1	77,05	27,97	,041
		2	13,33	29,44	,969
		3	72,56	27,77	,057
miR-20a	1	2	59,41	38,57	,422
		3	-45,37	33,83	,542
		4	102,21	50,45	,193
	2	1	-59,41	38,57	,422
		3	-104,78	37,69	,038
		4	42,80	53,11	,851
	3	1	45,37	33,83	,542
		2	104,78	37,69	,038
		4	147,58	49,78	,024

	4	1	-102,21	50,45	,193
		2	-42,80	53,11	,851
		3	-147,58	49,78	,024
let-7e	1	2	81,01	106,35	,871
		3	242,29	93,30	,059
		4	209,91	139,12	,441
	2	1	-81,01	106,35	,871
		3	161,28	103,92	,416
		4	128,91	146,46	,815
	3	1	-242,29	93,30	,059
		2	-161,28	103,92	,416
		4	-32,37	137,27	,995
	4	1	-209,91	139,12	,441
		2	-128,91	146,46	,815
		3	32,37	137,27	,995
miR-320	1	2	91,35	40,50	,124
		3	38,22	35,53	,706
		4	18,38	52,97	,985
	2	1	-91,35	40,50	,124
		3	-53,13	39,57	,541
		4	-72,97	55,77	,562
	3	1	-38,22	35,53	,706
		2	53,13	39,57	,541
		4	-19,84	52,27	,981
	4	1	-18,38	52,97	,985
		2	72,97	55,77	,562
		3	19,84	52,27	,981
miR-17*	1	2	0,36	0,21	,344
		3	0,09	0,19	,963
		4	0,81	0,28	,029
	2	1	-0,36	0,21	,344
		3	-0,27	0,21	,573
		4	0,45	0,30	,433
	3	1	-0,09	0,19	,963
		2	0,27	0,21	,573
		4	0,72	0,28	,058
	4	1	-0,81	0,28	,029
		2	-0,45	0,30	,433
		3	-0,72	0,28	,058
miR-1275	1	2	1,16	2,04	,941
		3	1,65	1,79	,792
		4	4,53	2,67	,337
	2	1	-1,16	2,04	,941

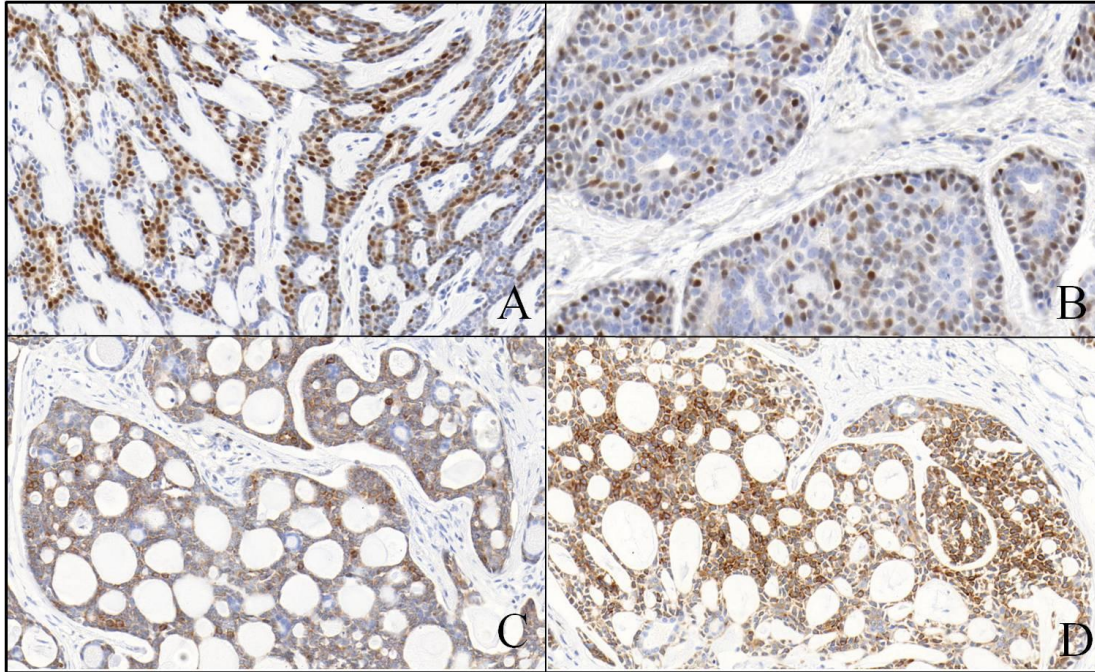
		3	0,49	1,99	,995
		4	3,37	2,81	,630
	3	1	-1,65	1,79	,792
		2	-0,49	1,99	,995
		4	2,87	2,63	,696
	4	1	-4,53	2,67	,337
		2	-3,37	2,81	,630
		3	-2,87	2,63	,696
miR-23b	1	2	-12,76	5,09	,072
		3	2,27	4,46	,957
		4	11,04	6,66	,357
	2	1	12,76	5,09	,072
		3	15,03	4,97	,021
		4	23,80	7,01	,007
	3	1	-2,27	4,46	,957
		2	-15,03	4,97	,021
		4	8,77	6,57	,545
	4	1	-11,04	6,66	,357
		2	-23,80	7,01	,007
		3	-8,77	6,57	,545
miR-17	1	2	79,97	30,04	,050
		3	-22,34	26,35	,831
		4	97,93	39,29	,075
	2	1	-79,97	30,04	,050
		3	-102,32	29,35	,006
		4	17,95	41,37	,972
	3	1	22,34	26,35	,831
		2	102,32	29,35	,006
		4	120,27	38,77	,017
	4	1	-97,93	39,29	,075
		2	-17,95	41,37	,972
		3	-120,27	38,77	,017
miR-195	1	2	3,75	21,95	,998
		3	2,82	19,81	,999
		4	-42,10	28,71	,466
	2	1	-3,75	21,95	,998
		3	-0,92	21,95	1,000
		4	-45,84	30,22	,436
	3	1	-2,82	19,81	,999
		2	0,92	21,95	1,000
		4	-44,92	28,71	,409
	4	1	42,10	28,71	,466
		2	45,84	30,22	,436

		3	44,92	28,71	,409
miR-134	1	2	0,33	0,40	,849
		3	0,72	0,36	,203
		4	0,28	0,52	,950
	2	1	-0,33	0,40	,849
		3	0,40	0,40	,753
		4	-0,04	0,55	1,000
	3	1	-0,72	0,36	,203
		2	-0,40	0,40	,753
		4	-0,44	0,52	,832
	4	1	-0,28	0,52	,950
		2	0,04	0,55	1,000
3		0,44	0,52	,832	
miR-27b	1	2	-14,93	6,32	,099
		3	-2,04	5,70	,984
		4	10,88	8,27	,558
	2	1	14,93	6,32	,099
		3	12,90	6,32	,189
		4	25,81	8,70	,024
	3	1	2,04	5,70	,984
		2	-12,90	6,32	,189
		4	12,92	8,27	,410
	4	1	-10,88	8,27	,558
		2	-25,81	8,70	,024
3		-12,92	8,27	,410	
miR-206	1	2	1,93	1,54	,599
		3	2,70	1,39	,227
		4	2,73	2,02	,536
	2	1	-1,93	1,54	,599
		3	0,77	1,54	,959
		4	0,80	2,13	,982
	3	1	-2,70	1,39	,227
		2	-0,77	1,54	,959
		4	0,03	2,02	1,000
	4	1	-2,73	2,02	,536
		2	-0,80	2,13	,982
3		-0,03	2,02	1,000	
miR-24	1	2	38,08	121,92	,989
		3	141,93	110,05	,574
		4	133,92	159,48	,835
	2	1	-38,08	121,92	,989
		3	103,85	121,92	,829
		4	95,84	167,89	,940

	3	1	-141,93	110,05	,574
		2	-103,85	121,92	,829
		4	-8,01	159,48	1,000
	4	1	-133,92	159,48	,835
		2	-95,84	167,89	,940
		3	8,01	159,48	1,000
miR-379	1	2	6,79	6,07	,680
		3	9,44	5,48	,325
		4	9,00	7,94	,671
	2	1	-6,79	6,07	,680
		3	2,64	6,07	,972
		4	2,20	8,36	,994
	3	1	-9,44	5,48	,325
		2	-2,64	6,07	,972
		4	-0,44	7,94	1,000
	4	1	-9,00	7,94	,671
		2	-2,20	8,36	,994
		3	0,44	7,94	1,000
miR-382	1	2	1,08	1,07	,745
		3	2,15	0,97	,132
		4	1,30	1,40	,788
	2	1	-1,08	1,07	,745
		3	1,07	1,07	,749
		4	0,22	1,47	,999
	3	1	-2,15	0,97	,132
		2	-1,07	1,07	,749
		4	-0,85	1,40	,930
	4	1	-1,30	1,40	,788
		2	-0,22	1,47	,999
		3	0,85	1,40	,930
miR-1280	1	2	-21674,94	3521,27	,000
		3	1955,96	3178,54	,927
		4	2294,24	4606,15	,959
	2	1	21674,94	3521,27	,000
		3	23630,90	3521,27	,000
		4	23969,19	4849,00	,000
	3	1	-1955,96	3178,54	,927
		2	-23630,90	3521,27	,000
		4	338,29	4606,15	1,000
	4	1	-2294,24	4606,15	,959
		2	-23969,19	4849,00	,000
		3	-338,29	4606,15	1,000

6. cyclin D1 és Bcl-2 expresszió bACC-ban és sACC-ban

Cyclin D1 immunhisztokémiai reakció mikroszkópos képe bACC (A), sACC esetekben (B) valamint Bcl-2 reakció mikroszkópos képe bACC-ban (C) és sACC-ban (D) (cyclin D1, 1:120; Bcl-2, 1:50; eredeti 200x-os nagyítás; Panoramic 250 Flash II scan)



7. cyclin D1 és Bcl-2 expresszió bN és sN esetekben

Normál emlőből származó szövettani metszetek cyclin D1 (A) és Bcl-2 (B) immunhisztokémiai reakciójának valamint normál nyálmirigy szövetek cyclin D1 (C) és Bcl-2 (D) immunhisztokémiai reakciójának mikroszkópos képe (cyclin D1, 1:120; Bcl-2, 1:50; eredeti 200x-os nagyítás; Panoramic 250 Flash II scan)

