

**INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

Praca doktorska

Zróźnicowanie profilu ekspresji mikroRNA w osoczu i wybranych tkankach w przerzutującym i nieprzerzutującym raku gruczołu sutkowego

mgr inż. Joanna Paulina Banach

Promotor: Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk

Drugi promotor: Prof. dr hab. n.med. Rafał Matkowski

Promotor pomocniczy: dr inż. Dagmara Kłopotowska

Zakład Onkologii Doświadczalnej

Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej

WROCLAW 2021

„Mądrość zależy od trzech rzeczy: osobowości, wiedzy, samokontroli.”

Sokrates

PODZIĘKOWANIA

Z całego serca chciałabym podziękować:

Pani Profesor dr hab. Joannie Wietrzyk – za okazane zaufanie, wsparcie oraz cierpliwość podczas realizacji badań i przygotowania niniejszej rozprawy.

Panu Profesorowi dr hab. n. med. Rafałowi Matkowskiemu – za możliwość poznania klinicznego świata, okazane wsparcie oraz cenne uwagi podczas przygotowywania niniejszej rozprawy

Pani dr inż. Dagmarze Kłopotowskiej – za okazane wsparcie, doradztwo i cenne wskazówki

Koleżankom i Kolegom z Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej
– dziękuję Wam za doradztwo, cenne wskazówki oraz dzielenie się swoją wiedzą i doświadczeniem

cudownym Przyjaciółom za obecność, troskę oraz niezawodność.

moim Rodzicom i Siostrze – za miłość, wiarę i nieprzerwane wsparcie i nieocenioną pomoc w każdy możliwy sposób.

Badania przeprowadzone zostały w ramach projektu pt. „Farmakoterapia śródbłonna naczyniowego i aktywacji płytek krwi zależna od prostacykliny, tlenku azotu i tlenku węgla – nowa strategia w zapobieganiu przerzutowości nowotworowej” finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Program Strategiczny **STRATEGMED**.



STRESZCZENIE

Przeprowadzone badania miały na celu wytypowanie mikroRNA jako potencjalnego markera pozwalającego na rozpoznanie przerzutującego raka gruczołu sutkowego. W tym celu wykonano wstępne badania *in vivo* przy wykorzystaniu dwóch modeli mysiego raka gruczołu sutkowego – modelu nieprzerzutującego 67NR oraz przerzutującego 4T1. Następnie poziom ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA oznaczono w lizatach komórkowych mysich i ludzkich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego o różnych podtypach molekularnych oraz w osoczu i guzie nowotworowym uzyskanym od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego. Dodatkowo oszacowano poziom ekspresji kluczowych markerów dla przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT) – E-kadheryny oraz N-kadheryny. W celu poznania funkcji wybranej cząsteczki mikroRNA – miR-31-5p, wyciszono lub zwiększono jej ekspresję, następnie wykonano testy adhezji oraz przeprowadzono ocenę ekspresji wybranych białek regulowanych przez miR-31-5p.

Podtypy molekularne raka gruczołu sutkowego różnią się między sobą m. in. obecnością receptora estrogenowego α , receptora progesteronowego, HER2, dzięki lub zmutowanej formy białka p53. Uzyskane wyniki badań wskazują, że ekspresja mikroRNA, białek docelowych oraz wybranych markerów dla procesu EMT jest ściśle uzależniona od podtypu molekularnego raka gruczołu sutkowego. Co ciekawe, nadekspresję badanej cząsteczki miR-31-5p zaobserwowano w liniach komórkowych z nadekspresją HER2 – JIMT-1 i SKBR-3, natomiast obniżenie ekspresji w pozostałych liniach komórkowych, niezależnie od podtypu molekularnego. Nadekspresja badanej cząsteczki zwiększa adhezję komórek do fibronektyny niezależnie od podtypu molekularnego, natomiast obniżenie ekspresji powoduje obniżenie adhezji badanych linii komórkowych do fibronektyny. Pomimo wstępnych założeń dotyczących pro-przerutowej funkcji miR-31-5p, dalsze badania wykonane na liniach komórkowych raka gruczołu sutkowego mogą wskazywać na jej przeciwprzerutowe właściwości.

Przeprowadzone badania sugerują, że miR-31-5p może być regulatorem procesu EMT – nadekspresja miR-31-5p powoduje obniżenie ekspresji białka FAK i wzrost adhezji do fibronektyny w linii o podtypie TNBC - MDA-MB-468 oraz w linii o podtypie luminalnym A - MCF-7, co może świadczyć o wspomnianych właściwościach przeciwprzerutowych tej cząsteczki mikroRNA.

SUMMARY

The conducted research was aimed at selecting microRNA as a potential marker for the diagnosis of metastatic cancer of the mammary gland. For this purpose, preliminary *in vivo* studies were performed with the use of two murine mammary carcinoma models – the non-metastatic 67NR and the metastatic 4T1 model. Then, the expression level of selected microRNA molecules was determined in cell lysates of murine and human breast cancer cell lines of various molecular subtypes, as well as in plasma and tumor obtained from patients diagnosed with breast cancer. Additionally, the expression level of key markers for the epithelial-mesenchymal transition (EMT) - E-cadherin and N-cadherin was estimated. In order to learn about the function of the selected microRNA molecule - miR-31-5p, its expression was suppressed or increased, then adhesion tests were performed and the expression of selected proteins regulated by miR-31-5p was assessed.

The molecular subtypes of mammary gland cancer differ, for example in the presence of the estrogen α receptor, the progesterone receptor, HER2, wild or mutant form of the p53 protein. The obtained research results indicate that the expression of microRNA, target proteins and selected markers for the EMT process is strictly dependent on the molecular subtype of breast cancer. Interestingly, overexpression of the tested miR-31-5p molecule was observed in HER2 overexpressing cell lines - JIMT-1 and SKBR-3, while lowered expression in other cell lines regardless of the molecular subtype. Overexpression of the studied molecule increases cell adhesion to fibronectin, regardless of the molecular subtype. On the other hand, lowering the expression reduces the adhesion of the tested cell lines to fibronectin. Despite of the initial assumption about protumorigenic function of miR-31-5p, further studies carried on breast cancer cell lines showed that miR-31-5p can play a role as antimetastatic molecule.

The conducted research suggests that miR-31-5p may be a regulator of the EMT process - overexpression of miR-31-5p reduces the expression of the FAK protein and increases adhesion to fibronectin in the TNBC subtype - MDA-MB-468 and in the luminal A subtype - MCF-7, which may indicate the mentioned antimetastatic properties of this microRNA molecule.

SPIS TREŚCI:

STRESZCZENIE	5
SUMMARY	6
WYKAZ SKRÓTÓW	9
I WSTĘP	14
1.1 Epidemiologia nowotworów piersi na świecie i w Polsce	14
1.2 Rak gruczołu sutkowego	19
1.3 Budowa gruczołu sutkowego	22
1.4 Klasyfikacja histologiczna nowotworu piersi.....	23
1.5 Diagnostyka molekularna nowotworów piersi.....	25
1.6 Definicja i znaczenie cząsteczek mikroRNA	29
1.7 Biogeneza mikroRNA	30
1.8. Mechanizmy odpowiedzialne za nieprawidłowości w ekspresji mikroRNA w ludzkich nowotworach	31
1.9 MikroRNA i jego rola w nowotworach piersi.....	32
1.10 MikroRNA jako biomarker	35
1.11 Przejście nabłonkowo – mezenchymalne – EMT – (ang. epithelial to mesenchymal transition)	37
1.12 Charakterystyka wybranych cząsteczek mikroRNA	40
miR-31-5p	40
miR-147-3p	49
miR-223-3p	50
II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	52
III. MATERIAŁY I METODY	53
3.1 Hodowle komórkowe	53
3.2 Eksperyment <i>in vivo</i>	58
3.3 Badania z udziałem pacjentek	59
METODY	60
3.4 Izolacja całkowitego RNA oraz mikroRNA z osocza	60
3.5 Izolacja mikroRNA oraz całkowitego RNA z tkanek i lizatów komórkowych	62
3.6 Izolacja mikroRNA oraz całkowitego RNA z bloczków parafinowych	63
3.7 Odwrotna transkrypcja	63
3.8 Preamplifikacja cDNA	64
3.9 Real-Time PCR	65
3.10 Analiza ekspresji białek przy użyciu metody Western blott	69

3.11 Test adhezji.....	72
3.12 Przejściowa transfekcja: inhibitorem miR-31-5p (ang. miR-31-5p inhibitor) oraz mimetykiem miR-31-5p (ang. miR-31-5p mimic)	73
3.13 Analiza ekspresji wybranych białek przy użyciu metody ELISA	74
IV. WYNIKI.....	76
4.1 Analiza poziomu ekspresji mikroRNA w materiale pochodzenia mysiego – badania przesiewowe.....	76
4.2 Szczegółowa analiza ilościowa poziomu ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA w materiale pochodzenia mysiego, oraz w lizatach linii komórkowych mysiego raka gruczołu sutkowego.....	78
4.3 Analiza poziomu ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA w osoczu i guzie nowotworowym uzyskanym od pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem piersi.....	82
4.4 Analiza poziomu ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA w lizatach linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego.	84
4.5 Ocena poziomu ekspresji wybranych białek uczestniczących w przejściu nabłonkowo mezenchymalnym w lizatach ludzkich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego: E- kadheryny, N-kadheryny.....	86
4.6 Porównanie zdolności adhezji do fibronektyny dzikich komórek ludzkich linii raka gruczołu sutkowego, komórek z wyciszoną ekspresją miR-31-5p oraz z jego nadekspresją.....	87
4.7 Ocena ekspresji białek regulowanych przez wybraną cząsteczkę miR-31-5p w komórkach ludzkich linii raka gruczołu sutkowego typu dzikiego oraz liniach transfekowanych.....	88
V. DYSKUSJA.....	94
Badania przesiewowe ekspresji mikroRNA.....	94
miR-147.....	97
miR-223-3p	100
miR-31-5p	101
VI WNIOSKI.....	108
VII. BIBLIOGRAFIA	109
VIII. SPIS TABEL I RYCIN.....	132
XI. SUPLEMENT.....	135

WYKAZ SKRÓTÓW

ABCB1 (*ang. ATP-dependent translocase ABCB1*) – zależna od ATP translokaza ABC

ABCC1 (*ang. ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1, MRP1 multidrug resistance-associated protein 1*) – białko związane z opornością wielolekową

ABCG2 (*ang. Road substrate specificity ATP-binding cassette transporter ABCG2*) - transporter kasetowy wiążący ATP o szerokiej specyficzności substratowej

AGO1-4 (*ang. Argonaute proteins 1-4*) – białka argonauta 1-4

AJCC (*ang. American Joint Committee on Cancer*) – Amerykański Wspólny Komitet ds. Raka

ALM (*ang. acute myeloid leukemia*) – ostra białaczka mieloblastyczna

AKT (*ang. AKT*) – kinaza serynowo-treoninowa AKT

APS (*ang. Ammonium persulfate*) – nadsiarczan amonu

AR (*ang. androgen receptor*) – receptor androgenowy

B-CLL (*ang. B chronic lymphocytic leukemia*) – przewlekła białaczka limfocytowa wywodząca się z limfocytów B

BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) – białko BCL-2, antyapoptotyczne

BLBL (*ang. basal-like breast cancer*) – podtyp podstawny raka gruczoła sutkowego

BL-1,2 (*ang. Basal-like 1,2*) – podtyp TNBC basal-like 1,2

BMI-1 (*ang. Polycomb complex protein BMI-1*) – kompleksowe białko Polycomb 1

BRAF1 (*ang. Serine/threonine-protein kinase B-raf*) – kinaza białkowa serynowo-treoninowa B-raf

BRCA1 (*ang. breast cancer 1*) – ludzki gen supresorowy nowotworu piersi zlokalizowany na chromosomie 17

BRCA2 (*ang. breast cancer 2*) – ludzki gen supresorowy nowotworu piersi zlokalizowany na chromosomie 13

cDNA (*ang. complementary DNA*) – komplementarny DNA

ctDNA (*ang. circulating tumor DNA*) – krążące nowotworowe DNA

CAMK1G – (*ang. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1G*) – kinaza białkowa zależna od wapnia/kalmoduliny

CBS (*ang. Calf Bovine Serum*) – płodowa surowica cielęca

CCL2,5 – (*ang. C-C motif chemokine 2 or 5*) – chemokina 2 lub 5 zawierająca motyw C-C

CCR2 (*ang. C-C chemokine receptor type 2*) – receptor dla chemokiny typu 2

CDH1 (*ang. cadherin 1*) – gen kodujący białko E-kadherynę

CDH2 (*ang. cadherin 2*) – gen kodujący białko N-kadherynę

CDKN2A (*ang. Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) – inhibitor kinazy zależnej od cyklin 2A

CDKN2B (*ang. Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*) – inhibitor kinazy zależnej od cyklin 2B

C/EBPβ (*ang. CCAAT/enhancer-binding protein beta*) – białko wiążące sekwencje CCAAT

CXCR4 (*ang. C-X-C chemokine receptor type 4*) – receptor dla chemokiny typu 4 zawierający motyw C-X-C

CTCs (*ang. circulating tumor cells*) – krążące komórki nowotworowe

CTNNA1 (*ang. catenin alpha 1*) – białko kodowane przez gen *CTNNA1*

CTNND1 (*ang. catenin delta 1*) – białko kodowane przez gen *CTNND1*

DCIS (*ang. ductal carcinoma in situ*) – rak przewodowy *in situ*

DCO (*ang. Wrocław Comprehensive Cancer Center*) – Dolnośląskie Centrum Onkologii we Wrocławiu

DDX18 (*ang. ATP-dependent RNA helicase DDX18*) – helikaza RNA DDX18 zależna od ATP

DFS (*ang. disease free survival*) – przeżycie wolne od choroby

DGCR8 (*ang. Microprocessor complex subunit DGCR8*) – kompleks mikroprocesorowy

DNA (*ang. deoxyribonucleic acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy

DR-3 (*ang. death receptor 3*) – receptor śmierci 3

EBV (*ang. Epstein-Barr Virus*) – wirus Epsteina-Barr

ECM (*ang. extracellular matrix*) – macierz wewnątrzkomórkowa

EDTA (*ang. ethylenediaminetetraacetic acid*) – kwas etylenodiaminotetraoctowy

EGF (*ang. epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu

EGFR (*ang. epidermal growth factor receptor*) – naskórkowy receptor czynnika wzrostu

EF1 (*ang. Elongation factor 1-alpha*) –czynnik wydłużenia 1 alfa

ELK-1(*ang. ETS domain-containing protein Elk-1*) – białko ELK zawierające domenę ETS

E2H2 (*ang. Enhancer of zeste homolog 2*) – enzym N-metylotransferazy

EMT (*ang. epithelial to mesenchymal transition*) – przejście nabłonkowo-mezenchymalne

ER α (*ang. estrogen receptor α*) – receptor estrogenowy alfa

ER β (*ang. Estrogen receptor β*) – receptor estrogenowy beta

ESL-1 (*ang. E-selectin ligand-1*) – ligand 1 dla E-selektyny

Exp5 (*ang. exportin 5*) – eksportyna 5

FAK (*ang. Focal Adhesion Kinase*) –kinaza adhezji ogniskowej

FAM (*ang. 6 – carboxyfluorescein*) – 6 – karboksylfluoresceina

FBS (*ang. Fetal Bovine Serum*) – płodowa surowica bydlęca

FSP-1 (*ang. fibroblast specific protein 1*) – białko charakterystyczne dla fibroblastów

GC (*ang. gastric cancer*) – rak żołądka

GLOBOCAN (*ang. Global Cancer Observatory*) – światowa statystyka nowotworów

GATA3/4 – (*ang. Transcription factor GATA-3,4*) – czynnik transkrypcyjny GATA3/4

GM-CSF (*ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

GSK3 – (*ang. Glycogen synthase kinase-3 beta*) – kinaza syntazy glikogenu 3- β

HBV (*ang. hepatitis B virus*) – wirus zapalenia wątroby typu B

HCC (*ang. hepatocellular carcinoma*) – rak wątrobowokomórkowy

HIF (*ang. hypoxia-inducible factor 1*) – czynnik indukowany hipoksją

HER2 (*ang. human epidermal growth factor receptor 2*) – receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu

HGF (*ang. hepatocyte growth factor*) – czynnik wzrostu hepatocytów

HGFR (*ang. Hepatocyte growth factor receptor*) – receptor czynnika wzrostu hepatocytów

HIV (*ang. human immunodeficiency virus*) – ludzki wirus niedoboru odporności

HPV (*ang. hepatitis papilloma virus*) – wirus brodawczaka ludzkiego

HRP (*ang. Horseradish peroxydase*) – peroksydaza chrzanowa

HS (*ang. Horse Serum*) – surowica końska

HUWE1 – (*ang. E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1*) - ligaza białkowa ubikwityny E3 HUWE1

IAP (*ang. Inhibitor of Apoptosis*) – białka hamujące apoptozę

ICC (*ang. intrahepatic cholangiocarcinoma*) – wewnątrzwątrobowym rakiem dróg żółciowych

IGF (*ang. insulin-like growth factor*) – insulino-podobny czynnik wzrostu

IGF1R (*ang. Insulin-like growth factor 1 receptor*) – receptor insulिनowego czynnika wzrostu 1

IL-1,6,8,10 (*ang. Interleukin 1,6,8,10*) – interleukina 1,6,8,10

ITGA5 (*ang. integrin alpha 5*) – integryna α 5

JNK (*ang. c-Jun N-terminal kinases*) – kinaza c-Jun zaiwerająca N-koniec

LCIS (*ang. Lobular carcinoma in situ*) – rak zrazikowy *in situ*

LPS (*ang. Lipopolysaccharide*) – lipopolisacharyd

KRAS (*ang. Kirsten rat sarkoma 2 viral oncogene homolog*) – białko wiążące GTPazy

LOH (*ang. loss of heterozygosity*) – utrata heterozygotyczności

miRNA, miR (*ang. micro RNA*) – mikroRNA

MAP2K4 (*ang. dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4*) – podwójnie specyficzna aktywowana przez mitogen kinaza białkowa 4

MAPK13 (*ang. Mitogen-activated protein kinase 13*) – aktywowana mitogenem kinaza 13

MDC1 (*ang. Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) – białko kontrolne 1 pośredniczące w naprawie uszkodzeń DNA

MET (*ang. mesenchymal to epithelial transition*) – przejście mezenchymalno-nabłonkowe

NFKBIA (*ang. NF-kappa-B inhibitor alpha*) – inhibitor czynnika transkrypcyjnego NFKB

NK (*ang. natural killer*) – komórki układu odpornościowego posiadające właściwości dotyczące naturalnej cytotoksyczności

NF1,2 (*ang. Neurofibromin 1,2*) – białko odpowiedzialne za nerwiakowłóknikowatość typu I,II

NF-IA (*ang. Nuclear factor 1 A-type*) - typ A czynnika jądrowego 1

NNAT (*ang. Neuronatin*) - neuronatyna

NS1 (*ang. Non-structural protein 1*) – niestrukturalne białko 1

NST (*ang. no special type*) – bez określonego typu, dawniej przewodowy rak piersi

OS (*ang. overall survival*) – całkowity czas przeżycia

PAM50 (*ang. Prediction Analysis of Microarray 50*) – PAM50 (Prosigna[®]) analiza 50 genów przy użyciu mikromacierzy.

PCNA (*ang. Proliferating cell nuclear antygen*) – komórkowy jądrowy antygen proliferacji.

Pri-miRNA (*ang. primary microRNA*) – pierwotne mikroRNA

preAMP (*ang. Preamplification*) – preamplifikacja

PBL (*ang. CLL chronic lymphocytic leukemia*) – przewlekła białaczka limfocytowa

PDCA (*ang. Pancreatic ductal adenocarcinoma*) – gruczolakorak przewodowy trzustki

PDGFRA (*ang. Platelet-derived growth factor receptor alpha*) – receptor płytkowego czynnika wzrostu alfa

PIK3CA (*ang. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform*) - 3-kinaza fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu

PKC ϵ (*ang. Protein Kinase C epsilon*) – kinaza białkowa C

PRA (*ang. progesterone receptor alpha*) – receptor progesteronowy alfa

PRB (*ang. Progesterone receptor beta*) – receptor progesteronowy beta

PMA (*ang. Phorbol 12-myristate 13-acetate*) – octan forbolu

PTEN (*ang. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN*) – białko kodowane przez gen supresorowy *PTEN*

PTK2,6 (*ang. Protein Tyrosine Kinase 2,6*) – białkowa kinaza tyrozynowa 2,6

RA (*ang. retinoic acid*) – kwas retinowy

RAN (*ang. RAs-related Nuclear protein*) – białko jądrowe wiążące GTP

RASA1 (*ang. Ras GTPase-activating protein 1*) – białko Ras aktywujące GTP-azę 1

RISC (*ang. RNA-induced silencing complex*) – kompleks indukujący wyciszenie RNA

RB1 (*ang. Retinoblastoma-associated protein*) – białko retinoblastoma 1

RhoA (*ang. Transforming protein RhoA*) – transformujące białko RhoA

ROCK (*ang. Rho-associated protein kinase*) – kinaza białkowa związana z rodziną białek Rho

SAPK (*ang. Stress-activated protein kinases*) – kinazy białkowe aktywowane stresem

SEPT6 (*ang. Septin 6*) – gen kodujący septynę 6

SMAD4 (*ang. Mothers against decapentaplegic homolog 4*) – białko należące do rodziny SMAD

SNAI 1 (SNAIL, SNAIL1, *ang. Snail Family Transcriptional Repressor 1*) – represor transkrypcyjny 1 należący do rodziny Snail

SNAI 2 (SLUG, SNAIL2 *ang. Snail Family Transcriptional Repressor 2*) – represor transkrypcyjny 2 należący do rodziny Snail

STAT4 (*ang. Signal transducer and activator of transcription 4*) – przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 4, należący do rodziny białek STAT

STAT1 α (*ang. Signal transducer and activator of transcription 1 α*) - przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 1 α , należący do rodziny białek STAT

STMN-1 (*ang. Stathmin1*) – statmina 1, metablastyna, onkoproteina

TAA (*ang. tumor associated antigens*) – antygeny związane z nowotworem

TAMs (*ang. Tumor associated macrophages*) – makrofagi towarzyszące rozwojowi guza nowotworowego

TET (*ang. ten eleven translocation*) – dioksygenaza metylocytozyny

TGF- β (*ang. transforming growth factor β*) – transformujący czynnik wzrostu beta

TGF β R2 (*ang. tumor growth factor beta receptor 2*) – receptor transformującego czynnika wzrostu beta 2

TLR2,3,4 (*ang. Toll like receptor 2,3,4*) – receptor Toll-like 2,3,4

TNBC (*ang. triple negative breast cancer*) – potrójnie ujemny rak piersi

TNF- α (*ang. Tumor necrosis factor*) czynnik martwicy nowotworu alfa

TOP2B (*ang. topoisomerase 2-beta*) -topoizomeraza DNA 2- β

TP53 (*ang. tumor protein 53*) – gen kodujący białko p53

TSA (*ang. tumor specific antigens*) – specyficzne antygeny nowotworowe

UBE2N (*ang. Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N*) – enzym E 2N sprzężony z ubikwitiną

UTX (*ang. Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome*) – transkrybowane powtórzenie tetratricopeptydowe, chromosom X – białko kodowane u ludzi przez gen KDM6A

UV (*ang. ultraviolet*) – promieniowanie ultrafioletowe

VEGF (*ang. vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu nabłonka naczyniowego

VEGFR (*ang. vascular endothelial growth factor receptor*) – receptor czynnika wzrostu nabłonka naczyniowego

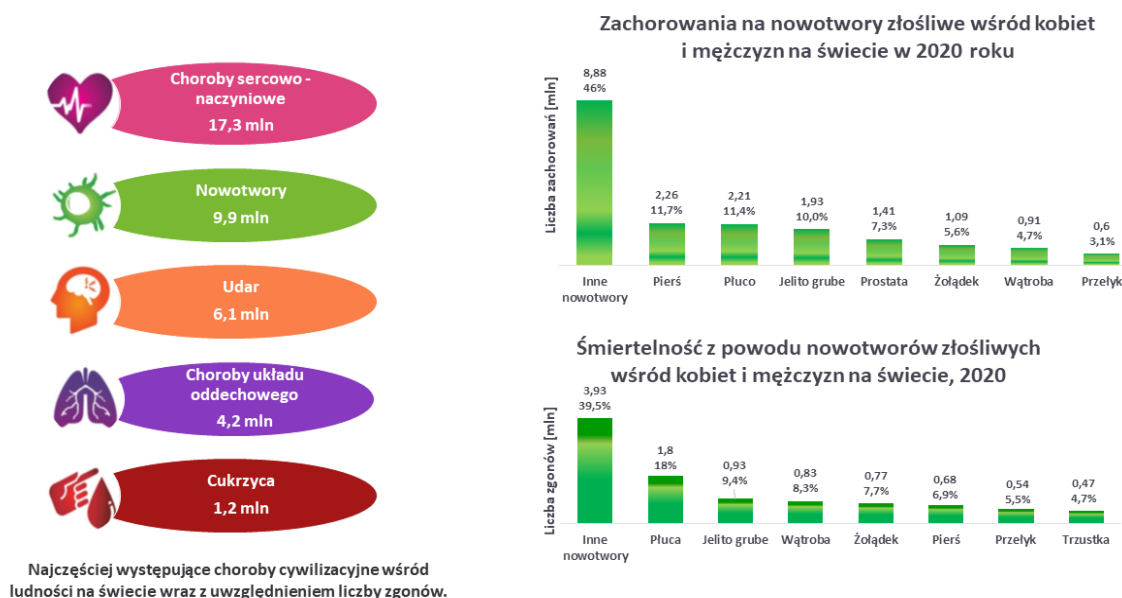
WHO (*ang. World Health Organization*) – Światowa Organizacja Zdrowia

ZEB1/2 (*ang. Zinc finger E-box-binding homeobox 1*) – czynnik transkrypcyjny ZEB1/2 o domenie palca cynkowego

I WSTĘP

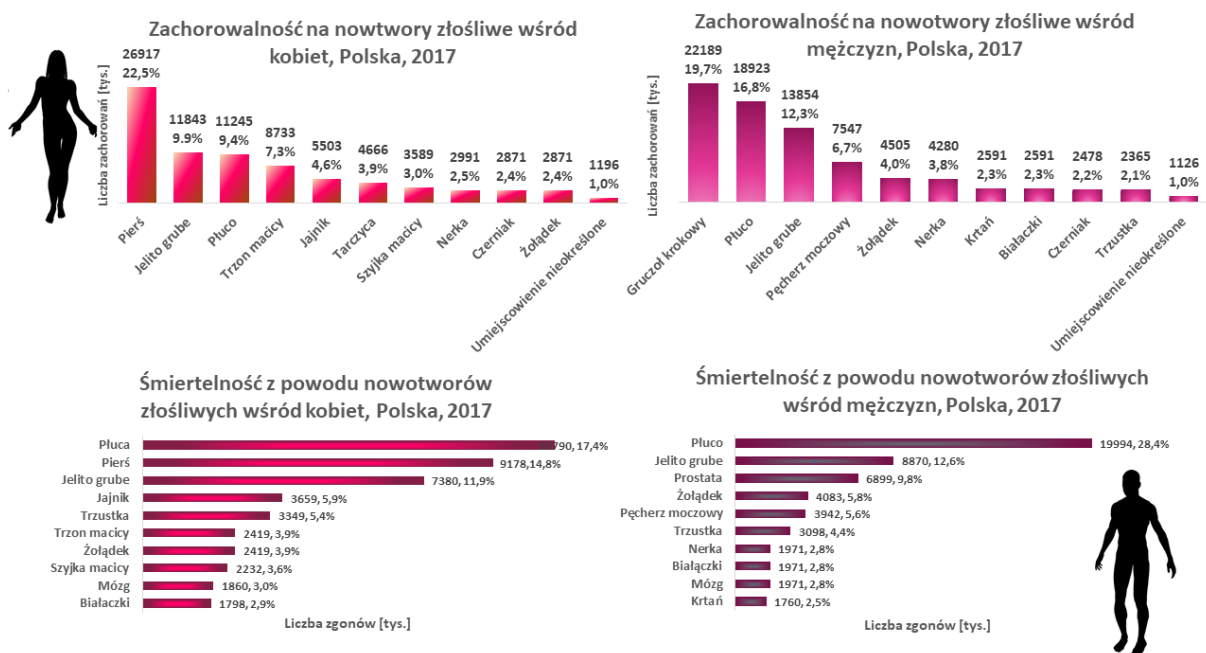
1.1 Epidemiologia nowotworów piersi na świecie i w Polsce

Nowotwory stanowią coraz większy odsetek pod względem przyczyn zachorowań i umieralności w większości krajów świata. Globalny wzrost liczby zachorowań na nowotwory jest ściśle związany ze zmianami w stylu życia, starzeniem się populacji oraz rozwojem socjoekonomicznym¹. Do najczęstszych czynników etiologicznych nowotworów należą: palenie tytoniu, nieodpowiednia dieta, zakażenia, czynniki zawodowe, zachowania seksualne, dieta, alkohol i zanieczyszczenia środowiska. Zaobserwowano, że najczęstsze zachorowania na nowotwory odnotowuje się w krajach wysokorozwiniętych, dlatego według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. World Health Organization), nowotwory zalicza się, obok chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycy czy otyłości, do grupy schorzeń określanych jako choroby cywilizacyjne²⁻⁵. Zgodnie z informacjami zgromadzonymi w interaktywnej bazie danych GLOBOCAN (ang. Global Cancer Observatory) w 2020 roku nowotwory były przyczyną zachorowalności ponad 19,3 mln osób oraz są odpowiedzialne za 9,9 mln zgonów na całym świecie (Ryc. 1). Dodatkowo 5-letni wskaźnik przeżycia utrzymuje się na poziomie 80% w Wielkiej Brytanii i 90% w Stanach Zjednoczonych⁶.



Rycina 1. Liczba zachorowań oraz liczba zgonów z powodu nowotworów złośliwych na świecie wśród populacji kobiet i mężczyzn w 2020 roku. Spośród wszystkich odnotowanych przypadków zachorowań i zgonów, nowotwór piersi i nowotwór płuc (odpowiednio) jest jednym z najczęściej występujących na świecie w obu populacjach. Wykresy przygotowano na podstawie danych statystycznych dostępnych na portalu GLOBOCAN (ang. Global Cancer Observatory) Światowej Organizacji Zdrowia (opracowanie własne).

Sytuację epidemiologiczną w Polsce monitoruje od 1952 roku Krajowy Rejestr Nowotworów. Na podstawie zarejestrowanych tam przypadków zachorowań i zgonów z powodu nowotworów złośliwych można wywnioskować, że podobnie w Polsce jak i na świecie stanowią one poważny problem zdrowotny oraz społeczno-ekonomiczny polskiego społeczeństwa. Wagę powyższego problemu przedstawia liczba zachorowań - ponad 164 tys. przypadków oraz liczba zgonów – 100 tys. zgonów zarejestrowanych w 2017 roku w Krajowym Rejestrze Nowotworów. Na podstawie analizy struktury zachorowań na nowotwory złośliwe, wśród kobiet, największy odsetek zachorowań dotyczy nowotworów złośliwych piersi, natomiast w populacji mężczyzn – raka gruczołu krokowego – oba nowotwory stanowią ok. 1/5 wszystkich przypadków zachorowań i jednocześnie zajmują odpowiednio drugie i trzecie miejsce w strukturze zgonów. Najczęstszym nowotworem prowadzącym do zgonów zarówno w populacji kobiet jak i mężczyzn jest nowotwór płuc⁷ (Ryc. 2).



Rycina 2 Liczba zachorowań oraz liczba zgonów u kobiet i mężczyzn w populacji polskiej. Wśród kobiet w 2017 roku najczęściej występującym nowotworem był nowotwór piersi stanowi on 1/5 wszystkich zachorowań. W przypadku populacji mężczyzn jest to nowotwór złośliwy gruczołu krokowego. Zarówno w populacji kobiet jak i mężczyzn nowotwór płuc jest najczęstszą przyczyną zgonów. II miejsce zajmuje w przypadku populacji kobiet rak gruczołu sutkowego, natomiast w populacji mężczyzn rak jelita grubego. Wykresy zostały przygotowane na podstawie danych statystycznych uzyskanych z Krajowego Rejestru Nowotworów (opracowanie własne).

Nowotwory rozwijają się zazwyczaj w tkankach, których komórki nie utraciły zdolności do proliferacji. Nie powstają natomiast z dojrzałych neuronów czy kardiomiocytów tj. komórek mięśnia sercowego, ponieważ komórki te zatraciły już umiejętność do namnażania się. W 2011 roku Douglas Hanahan i Robert A. Weinberg, dwaj amerykańscy biologowie opublikowali artykuł zatytułowany „*Hallmarks of cancer: the next generation*” w którym opisali sześć istotnych zmian w fizjologii komórki, które determinują złośliwy fenotyp komórek nowotworowych. Jednocześnie są one przejawem różnorodności wśród nowotworów. Do cech komórek nowotworowych, które odróżniają je od komórek prawidłowych zalicza się: nieograniczony potencjał replikacyjny, umiejętność wytwarzania własnych czynników wzrostowych, zakłócenie mechanizmów apoptotycznych prowadzących do namnażania się komórek pomimo błędów genetycznych, zdolność do inwazji w przypadku komórek raka inwazyjnego, tworzenie własnej sieci naczyń krwionośnych (angiogeneza), indukowanie stanu zapalnego czy zdolność do przerzutowania w przypadku komórek raka^{8,9}. Powołując się na słowa amerykańskiego onkologa Berta Vogelsteina: „*Cancer is, in essence, a genetic disease*”, główną przyczyną prowadzącą do rozwoju nowotworu są zmiany genetyczne, powstałe w wyniku mutacji, które mogą pojawić się na różnym etapie osobniczego rozwoju człowieka. Na komórki organizmu człowieka w każdym momencie oddziałują różne czynniki (tzw. mutageny), które mogą przyczynić się do zaburzenia informacji genetycznej zawartej w komórkowym DNA. Czynniki rakotwórcze, inaczej mutageny, można podzielić na: czynniki fizyczne (np. promieniowanie jonizujące lub promieniowanie UV), chemiczne (np. azbest, związki z grupy cyklicznych węglowodorów aromatycznych, związki chromu, żelaza, arsenu, dioksyny) lub biologiczne (np. zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu B i C (HBV i HCV), wirusem Epsteina – Baara (EBV), wirusem HIV czy wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV). Aby doszło do transformacji nowotworowej warunkiem koniecznym jest zadziałanie czynnika uszkodzającego o takiej sile, która nie doprowadzi do śmierci komórki, a spowoduje uszkodzenie genów kluczowych dla następujących procesów: proliferacji, apoptozy czy dojrzewania komórkowego. Do grupy tych genów zalicza się: protoonkogeny, geny supresorowe (inaczej antyonkogeny) oraz geny odpowiedzialne za regulację apoptozy (Tabela 1)¹⁰:

Tabela 1 Charakterystyka kluczowych genów dla inicjacji transformacji nowotworowej. Informacje w tabeli przygotowano na podstawie: Jassema, Kordek i wsp. ¹⁰.

Nazwa genu	Funkcja	Sposób inaktywacji funkcji genu
Protoonkogen	Geny odpowiedzialne za pobudzenie wzrostu i podziałów komórkowych lub hamujące apoptozę w warunkach fizjologicznych. Onkogeny powstają w wyniku mutacji z protoonkogenu; wysyłają one niefizjologiczny sygnał promujący podział komórki i hamujący apoptozę.	Mutacja punktowa: skutkiem jest nadmiernie aktywne białko; Amplifikacja genu: białko o prawidłowej aktywności produkowane w dużej ilości; Translokacja chromosomów: białko o prawidłowej aktywności produkowane w dużej ilości, białko fuzyjne produkowane w dużej ilości lub nadmiernie aktywne.
Gen supresorowy (antyonkogen)	Geny kodują białka odpowiedzialne w warunkach fizjologicznych za powstrzymywanie wzrostu komórek lub chronią komórkę przed mutacjami	Mutacje punktowe powodujące inaktywację białka; Rozległe delecje powodujące utratę całego lub dużych fragmentów genu; Zmiany epigenetyczne: gen nie ulega mutacji ani delecji lecz jego transkrypcja jest uszkodzona np. poprzez hipermetylację cytozyny w promotorze
Geny odpowiedzialne za regulację apoptozy	Geny odpowiedzialne za usuwanie komórek niepotrzebnych, uszkodzonych lub zawierających mutacje.	Translokacja chromosomów: białko o prawidłowej aktywności produkowane w dużej ilości, białko fuzyjne produkowane w dużej ilości lub nadmiernie aktywne.

Proces przekształcania się komórki prawidłowej w komórkę nowotworową, zwany kancerogenezą jest procesem wieloetapowym w którym wyróżnia się następujące etapy:

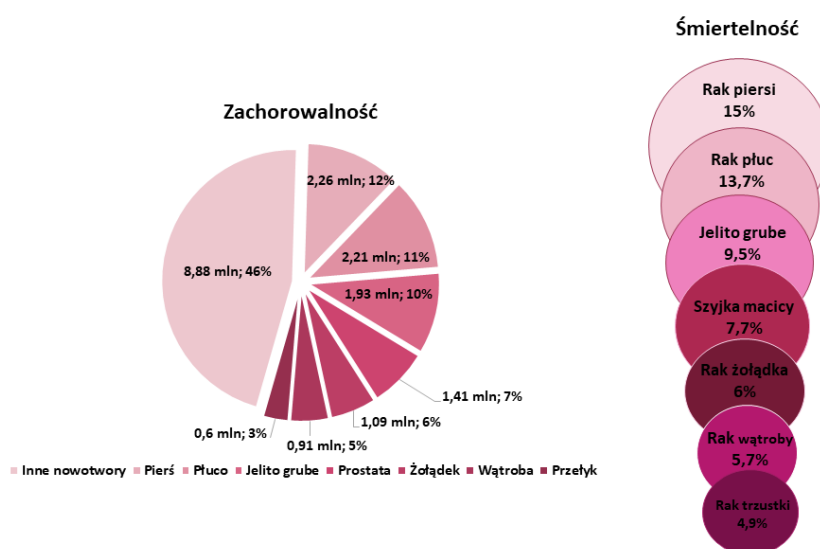
- Preinicjacja – czas narażenia na działanie czynników kancerogennych, które mogą prowadzić do inicjacji nowotworu, może trwać całe życie;
- Inicjacja - W komórce zachodzi pierwsza mutacja, która jest przekazywana kolejnym komórkom;
- Promocja - na tym etapie dochodzi do rozwoju klonu komórkowego zawierającego mutację nabytą w procesie inicjacji. Głównym mechanizmem tego etapu jest zaburzona ekspresja genów, spowodowana kumulacją jednej lub więcej mutacji prowadząca do zaburzenia procesów komórki oraz zwiększonej proliferacji;

- Progresja - jest nieodwracalnym etapem prowadzącym do powstania nowotworu. Na tym etapie dochodzi do kolejnych zaburzeń molekularnych – głównie zmian w kariotypie. Komórka nabywa nowych właściwości typowych dla komórki nowotworowej, takich jak niepoohamowana proliferacja oraz w wyniku nagromadzenia się mutacji - zdolności do inwazji, naciekania i przerzutowania.

1.2 Rak gruczołu sutkowego

Rak gruczołu sutkowego zwany potocznie rakiem piersi jest powszechnie występującym nowotworem złośliwym wśród kobiet na całym świecie. Jak podaje Światowa Organizacja Zdrowia w 2020 roku odnotowano ponad 2 mln zachorowań z powodu nowotworu piersi. Szacuje się, że liczba nowych przypadków zachorowań wzrośnie do 3,2 mln przed 2030 rokiem. Niewątpliwie rak piersi stanowi globalne wyzwanie dla publicznych służb zdrowia. Nowotwór ten w 2020 roku był przyczyną ponad 684 tysięcy zgonów na całym świecie¹¹.

Epidemiologia nowotworów wśród kobiet, świat, 2020



Rycina 3 Epidemiologia nowotworów złośliwych u kobiet. Wykresy przygotowano na podstawie danych statystycznych uzyskanych z bazy danych GLOBOCAN 2020. Jak się okazuje nowotwór piersi zajmuje 1 miejsce pod względem zachorowalności i śmiertelności wśród kobiet na całym świecie. Opracowanie własne.

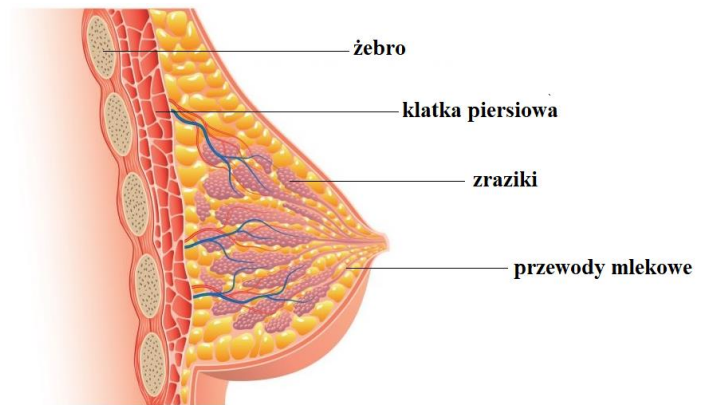
Najczęściej rejestrowanymi nowotworami złośliwymi w Krajowym Rejestrze Nowotworów (KRN) wśród populacji kobiet w Polsce są: rak gruczołu sutkowego oraz nowotwór płuca. Mniejszy odsetek zachorowań stanowią: nowotwór trzonu macicy, rak okrężnicy, rak jajnika, rak tarczycy i rak szyjki macicy. Na podstawie zarejestrowanych w KRN danych, rak gruczołu sutkowego jest główną przyczyną zachorowalności wśród kobiet w wieku między 50 a 74 rokiem życia. W 2017 roku zarejestrowano ponad 16 tys. zachorowań z powodu nowotworu piersi, co stanowi 22,5% wszystkich odnotowanych przypadków w Polsce wśród kobiet. Struktura zachorowań kobiet na nowotwory złośliwe powiela jeden wzorzec – we wszystkich województwach pierwsze miejsce zajmuje nowotwór złośliwy piersi z udziałem od 18% (województwo podkarpackie) do 26% (województwo łódzkie). Rak gruczołu sutkowego jest odpowiedzialny za ok. 14,8% wszystkich zgonów wśród kobiet, co stawia go na drugim

miejszu zaraz po nowotworze płuc (Struktura zgonów Polsce)¹². Przyczyna większości zachorowań na raka gruczołu sutkowego jest dotąd niepoznana. Szacuje się, że jednym z najważniejszych czynników ryzyka raka gruczołu sutkowego jest starszy wiek, w dalszej kolejności nosicielstwo mutacji niektórych genów (m. in. *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CHECK2*), rodzinne występowanie raka gruczołu sutkowego (szczególnie w młodym wieku), ekspozycja na endogenne estrogeny jak np. wczesna pierwsza miesiączka i menopauza w późnym wieku, długotrwała hormonalna terapia zastępcza zawierająca estrogeny i progesteron, hormonalna terapia zastępcza preparatami estrogenów rozpoczynająca się okołomenopauzalnie, spożywanie alkoholu, późny wiek pierwszego porodu zakończonego urodzeniem żywego dziecka i brak porodów, brak karmienia piersią, brak lub niska aktywność fizyczna, nadwaga i otyłość po menopauzie, ekspozycja na działanie promieniowania jonizującego i pola magnetycznego (zwłaszcza w okresie rozwoju piersi), niektóre zmiany rozrostowe uważane za łagodne (nietypowa hiperplazja, rak zrazikowy piersi). Indywidualne ryzyko zachorowania na raka gruczołu sutkowego można ocenić przy użyciu dostępnych metod, wśród których najbardziej znana jest skala Gaila. Uwzględnia ona wiek pierwszej miesiączki, ilość wykonanych biopsji, obecność atypowej hiperplazji w materiale z biopsji, wiek pierwszego porodu zakończonego urodzeniem żywego dziecka oraz zachorowanie na nowotwory u krewnych pierwszego stopnia. Metoda ta jest szczególnie pomocna w klasyfikacji kobiet z wysokim ryzykiem zachorowania na raka gruczołu sutkowego jako działanie zapobiegawcze^{13,14}. Dane z Krajowego Rejestru Nowotworów zostały uwzględnione w ogólnosiwiatowym programie CONCORD-3. Celem projektu było czasowe porównanie skuteczności leczenia pacjentów i ocena efektywności funkcjonowania publicznej służby zdrowia. Wyniki programu uwzględniały dane zebrane z 322 rejestrów nowotworów z 71 krajów dla 18 najczęściej występujących nowotworów: przełyku, żołądka, okrężnicy, odbytnicy, wątroby, trzustki, płuc, piersi (u kobiet), szyjki macicy, jajnika, prostaty, czerniaka, mózgu, białaczki i chłoniaki u dorosłych jak i u dzieci. Wymienione nowotwory stanowią 75% wszystkich zdiagnozowanych nowotworów każdego roku na świecie. Program obejmował trzy 5-letnie okresy diagnozy: 2000-2004; 2005-2009; 2010-2014. Dla większości nowotworów 5-letni wskaźnik przeżycia pozostaje wśród najwyższych w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Australii, Nowej Zelandii, Finlandii, Islandii, Norwegii i Szwecji. W przypadku nowotworu piersi wymienione kraje wykazują najwyższy 5-letni wskaźnik przeżycia na poziomie 85% lub wyższym w porównaniu do pozostałych krajów. Pomimo znacznego postępu efektów leczenia nowotworów w Polsce ich wyniki są nadal gorsze niż w pozostałych krajach członkowskich Unii Europejskiej. Polska zajmuje ostatnie miejsce w rankingu

skuteczności leczenia. Wskaźniki przeżyć na nowotwory piersi są o ok. 12 pp.(punktów procentowych) niższe niż w kraju o najwyższym wskaźniku. 5-letni wskaźnik przeżycia utrzymuje się na poziomie 70-79%. Na przestrzeni 20 lat tj. od 1995 – 2014 roku 5-letni wskaźnik przeżycia poprawił się w zakresie od 4-7 pp.¹⁵. Największe różnice w efektywności leczenia dotyczą: czerniaka, nowotworów gruczołu krokowego, nowotworów odbytnicy oraz żołądka.

1.3 Budowa gruczołu sutkowego

Gruczoł sutkowy jest wyjątkowym organem, który nie jest w pełni rozwinięty po urodzeniu. Kobięca piersć jest zbudowana z dwóch rodzajów tkanek: gruczołowej, odpowiedzialnej za wytwarzanie mleka oraz tłuszczowej, od której uzależniona jest wielkość piersi. Część piersi odpowiedzialna za wytwarzanie

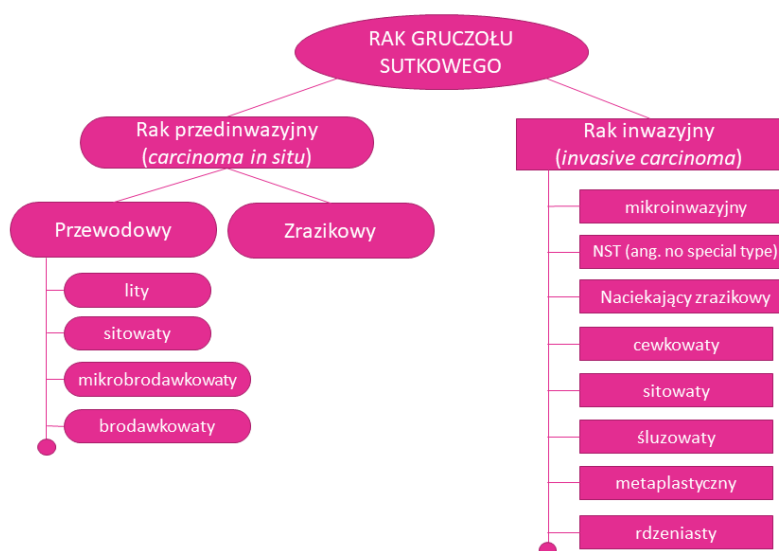


Rycina 4 Gruczoł sutkowy zbudowany jest z elementów funkcjonalnych takich jak zraziki i przewody piersiowe. Poza wymienionymi strukturami piersć zawiera również naczynia krwionośne, limfatyczne oraz węzły chłonne.

mleka jest podzielona od 15-20 części zwanych płatami. W obrębie każdego płata znajdują się mniejsze struktury zwane zrazikami, które odpowiadają za produkcję mleka. Powstałe mleko przepływa przez sieć maleńkich rurek zwanych przewodami, których ujście kończy się w brodawce sutkowej. Zarówno przewody jak i zraziki zbudowane są z komórek nabłonka, którego większość stanowią komórki nabłonkowo-mięśniowe. Komórki nabłonkowo-mięśniowe w wyniku działania oksytocyny kurczą się powodując przepływ mleka ze zrazików do przewodów piersiowych. Układ hormonalny, w tym hormony uwalniane przez jajniki – estrogen i progesteron odgrywają istotną rolę w rozwoju gruczołu sutkowego. Oprócz hormonów uwalnianych przez jajniki, kluczową rolę we wzroście gruczołu sutkowego i procesie laktacji odgrywają hormony uwalniane przez przysadkę mózgową, takie jak hormon wzrostu czy prolaktyna. Receptory hormonów steroidowych uwalnianych przez jajniki ulegają ekspresji na wczesnych etapach rozwoju gruczołu sutkowego, szczególnie zostają pobudzone przed okresem dojrzewania. Receptor estrogenowy jest obecny w jądrach komórek nabłonkowych wyściełających przewody piersiowe. Komórki wykazujące obecność ER α znajdują się we wszystkich przewodach oraz w zrazikach, podczas gdy ER β jest obecny w całej piersi. Ekspresja receptora progesteronowego A (PRA) następuje na różnych etapach rozwoju gruczołu sutkowego, a receptor progesteronu B (PRB) jest obecny głównie w strukturach gruczołów pęcherzykowych (zrazików) oraz w czasie ciąży. Poza wymienionymi elementami budowy, piersć zawiera naczynia krwionośne, naczynia limfatyczne i węzły chłonne. Tkanka łączna oraz więzadła wspierają piersć oraz nadają jej kształt¹⁶⁻¹⁸.

1.4 Klasyfikacja histologiczna nowotworu piersi

Diagnostyka patomorfologiczna jest niezbędnym narzędziem służącym do rozpoznawania raka gruczołu sutkowego. Pozwala ona na określenie stopnia zaawansowania nowotworu, ocenę nawrotu choroby oraz dobór najbardziej skutecznej metody leczenia systemowego.



Rycina 5 Klasyfikacja histologiczna raka gruczołu sutkowego. Pierwsza grupa obejmuje raki przedinwazyjne przewodowe do których zalicza się raki lity, sitowate, mikrobrodawkowe oraz brodawkowe. Druga grupa obejmuje raki inwazyjne obejmują – raki mikroinwazyjne, NST, naciekający zrazikowy, cewkowaty, sitowaty, śluzowaty, metaplastyczny oraz rdzeniasty. Opracowanie własne.

Rak gruczołu sutkowego jest nowotworem złośliwym, który tworzy się w tkankach piersi zwykle w przewodach mlekowych lub zrazikach i może on przerzutować do węzłów chłonnych oraz narządów odległych na zaawansowanym etapie rozwoju. Według Światowej Organizacji Zdrowia raki gruczołu sutkowego dzieli się na dwie kategorie: raki przedinwazyjne – niezagrożające przerzutami (*carcinoma in situ*) oraz naciekające – zagrożające przerzutami (*invasive carcinoma*). Raki przedinwazyjne – nienaciekające obejmują raki zrazikowe *in situ* oraz raki wewnątrzprzewodowe (przewodowe *in situ*). Do grupy raków naciekających należą raki naciekające bez określenia typu (NST, ang. *no special type*), dawniej przewodowe, raki zrazikowe oraz postaci specjalne¹⁰. Ocena typu histologicznego nowotworu piersi jest warunkiem koniecznym do rozpoczęcia leczenia systemowego. Badanie to określa następujące cechy komórek nowotworowych:

- typ histologiczny - odpowiada na pytanie, z których tkanek piersi powstał nowotwór (przewodowy lub zrazikowy) oraz czy jest naciekający czy przedinwazyjny;
- stopień złośliwości - odpowiada na pytanie, jak bardzo komórki nowotworowe różnią się od komórek prawidłowych piersi oraz jak szybko rosną.

Obecnie ocenę stopnia złośliwości histologicznej dokonuje się na podstawie klasyfikacji Blooma-Richardsona-Scarffa zalecanej przez WHO i Amerykański Wspólny Komitet ds. Raka – AJCC (ang. American Joint Committee on Cancer). Do oceny stopnia złośliwości histologicznej bierze się pod uwagę następujące cechy komórek nowotworowych: zdolność do formowania cewek i gruczołów, stopień atypii jąder komórkowych oraz liczbę figur podziału komórek raka. Ostateczna ocena obejmuje zsumowanie powyższych wyników. Stopień złośliwości odzwierciedla się w 3-stopniowej skali. Im wyższy stopień tym bardziej agresywny nowotwór. Dodatkowym uzupełnieniem mikroskopowego rozpoznania nowotworu jest chirurgiczna ocena stopnia zaawansowania, która opiera się na badaniu usuniętej tkanki podczas zabiegu chirurgicznego. Stopień zaawansowania nowotworu opisuje się przy użyciu sekwencji liter i liczb - w przypadku raka gruczołu sutkowego stosuje się V-stopniową skalę oceny stopnia zaawansowania (im niższe stadium tym lepsze rokowanie). System TNM uwzględnia:

- Rozmiar guza (T);
- Obecność przerzutów w węzłach chłonnych (N);
- Obecność wtórnych ognisk nowotworowych (M);

Badanie prowadzące do rozpoznania raka przewodowego *in situ* (DCIS), powinno dodatkowo uwzględniać informację o stopniu atypii jądrowej (niska, pośrednia, wysoka; NG1, NG2, NG3), podanie typu histologicznego, wymiaru zmiany, szerokości marginesów chirurgicznych oraz obecności martwicy. W VIII edycji klasyfikacji AJCC-TNM zrezygnowano z określenia kategorii „T” w odniesieniu do raka zrazikowego *in situ* (LCIS). W przypadku raków nienaciekających, około 85% raków piersi powstaje z komórek przewodów (rak przewodowy) pozostałe 15% rozpoczyna się w komórkach wyściełających zraziki (rak zrazikowy). W grupie raków naciekających ponad 80% stanowią raki NST, natomiast raki zrazikowe to ok. 10% chorych. Postaci specjalne, które charakteryzują się zazwyczaj lepszym rokowaniem stanowią również ok. 10% przypadków zachorowań^{10,13}.

1.5 Diagnostyka molekularna nowotworów piersi

Nowotwór piersi obejmuje heterogenną i fenotypowo zróżnicowaną grupę chorób, spośród której można wyróżnić kilka biologicznych podtypów, które różnią się rokowaniem i odpowiedzią na leczenie. Określenie biologicznego podtypu jest niezbędne w przypadku wstępnego lub pooperacyjnego leczenia systemowego nowotworu piersi. Strategia leczenia nowotworów piersi jest ściśle uzależniona od zdiagnozowanego podtypu biologicznego. W 2001 roku Therese Sørlie oraz Charles M. Perou i wsp. w swojej pracy wyróżnili 5 biologicznych podtypów raka gruczołu sutkowego na podstawie zmian we wzorze ekspresji genów i skorelowali je z parametrami klinicznymi badanych pacjentek. Zmiany we wzorze ekspresji genów odzwierciedlają różnorodność biologiczną, a powiązanie badanych parametrów biologicznych z parametrami klinicznymi pozwala na zrozumienie zachodzących zmian w ekspresji. W swojej pracy określili następujące podtypy raka gruczołu sutkowego luminalny A, luminalny B, podstawny, „typu normalnej piersi” oraz z ekspresją HER2, które obecnie w praktyce klinicznej zastępuje się ich surogatami opartymi na rutynowo ocenianych kryteriach patologicznych (Tabela 2)^{13,19}. Zastosowana przez autorów klasyfikacja podtypów raka gruczołu sutkowego zmieniała podejście klinicznego leczenia nowotworów piersi – z opartego na leczeniu chirurgicznym na podejście skoncentrowane na biologii guza.

Cecha	Luminalny A	Luminalny B	HER2 - dodatni rak piersi		Rak trójjujemny
			Luminalny HER2+	Nieluminalny HER2+	
ER	+	+	+	-	-
PgR	+	każdy	każdy	-	-
HER2	-	-	+	+	-
Ki67	<20%	≥20%	każdy	każdy	każdy

Tabela 2 Obecnie stosowany podział podtypów raka piersi w praktyce klinicznej. Opracowanie własne na podstawie Jassem, Krzakowski i wsp.¹³.

Obecnie w praktyce klinicznej, na podstawie oceny ekspresji genów: receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu HER2+ (ang. human epidermal growth factor receptor 2), receptorów hormonalnych: estrogenowego oraz progesteronowego oraz oceny ekspresji markera komórkowej proliferacji – Ki67, wyróżnia się 5 podtypów nowotworu piersi. Luminalny A (ang. luminal A) jest najczęściej występującym podtypem nowotworu piersi i stanowi od 50-60% wszystkich zdiagnozowanych przypadków. Podtyp ten charakteryzuje się obecnością receptora estrogenowego, obecnością lub brakiem receptora progesteronowego i niską ekspresją białka – Ki67, które jest wskaźnikiem proliferacji komórkowej (zwane

również indeksem mitotycznym). Dodatkowo cechuje go powolny wzrost i dobre rokowanie. U pacjentek ze zdiagnozowanym podtypem luminalnym A, wskaźnik nawrotu choroby jest niższy niż w pozostałych podtypach nowotworu. Podtyp luminalny B stanowi od 15 do 20% wszystkich zdiagnozowanych przypadków nowotworu piersi. Podtyp ten charakteryzuje się bardziej agresywnym fenotypem, wyższym stopniem histologicznym, oraz wyższą ekspresją białka Ki67 i tym samym nieco gorszą prognozą. Rozróżniamy dwa rodzaje podtypów z nadekspresją HER2: typu nieluminalnego oraz luminalnego. Pierwszy z nich wykazuje się brakiem ekspresji receptora estrogenowego i progesteronowego oraz ekspresją receptora HER2. W leczeniu tego podtypu nowotworu piersi można zastosować chemioterapię i leczenie celowane z użyciem przeciwciał anti-HER2. Podtyp HER2+ typu luminalnego stanowi 15-20% wszystkich podtypów nowotworu piersi. Ten podtyp nowotworu charakteryzuje się wysoką ekspresją genu HER2 i innych genów związanych ze szlakiem sygnałowym HER2 lub z amplikonem HER2 zlokalizowanym na chromosomie 17 *locus* q12. Podtyp HER2 + luminalny cechuje się wysoką ekspresją białka Ki67, z dodatnim statusem receptorów hormonalnych. Potrójnie ujemny rak gruczołu sutkowego, (TNBC, ang. triple negative breast cancer) charakteryzuje się brakiem ekspresji trzech receptorów – estrogenowego, progesteronowego oraz HER-2. Badania epidemiologiczne pokazały, że TNBC występuje u większości kobiet przed menopauzą, poniżej 40 roku życia, które stanowią ok. 15-20% wszystkich pacjentów z nowotworem piersi. W porównaniu z innymi podtypami raka gruczołu sutkowego czas przeżycia pacjentów z TNBC jest krótszy, a wskaźnik śmiertelności jest na poziomie 40% w ciągu pierwszych 5 lat od momentu diagnozy. TNBC jest podtypem silnie inwazyjnym, ok. 46% zdiagnozowanych pacjentów wykazuje odległe przerzuty. Z powodu jego fenotypu TNBC (braku receptorów ER, PR oraz HER2), nie jest wrażliwy na terapię hormonalną oraz molekularną terapię celowaną. W większości krajów, w terapii tego nowotworu zastosowano bevicizumab w połączeniu z lekami chemioterapeutycznymi, jednak czas przeżycia pacjentów nie wzrósł znacząco, dlatego opracowanie nowego schematu leczenia i nowych celów terapeutycznych stanowi obecnie wyzwanie dla naukowców. W 2014 roku Lehmann i wsp. przeprowadzili analizę ekspresji genów przy użyciu testów PAM 50 (ang. Prediction Analysis of Microarray), które służą do analizy 50 genów w 587 próbkach tkanki guza uzyskanych od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego o podtypie TNBC. Na podstawie analizy ekspresji genów, TNBC podzielono na 6 podtypów: basal-like 1 (BL1), basal-like 2 (BL2), mesenchymal (M), mesenchymal-stem like (MSL), immunomodulatory (IM) i luminal androgen receptor (LAR)²⁰⁻²⁴.

Tabela 3 Charakterystyka podtypów ludzkiego potrójnie ujemnego raka piersi (TNBC) wraz z odpowiednikami ludzkich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego. Przygotowano na podstawie: Lehmann i wsp. ²³

Podtypy potrójnie ujemnego raka gruczołu sutkowego	Nieprawidłowości genetyczne	Linie komórkowe	Mutacje
BL1 (Basal-like 1)	Cykl komórkowy, Replikacja DNA Sygnalizacja uszkodzeń DNA (szlak ATR/BRCA)	HCC2157	BRCA1; STAT4; UTX
		HCC1599	BRCA2; TP53;
		HCC1937	CTNND1; TOP2B;
		HCC1143	CAMK1G
		HCC3153	BRCA1; TP53;
		MDA-MB-468	MAPK13; MDC1 TP53
		HCC38	BRCA1 PTEN; RB1; SMAD4; TP53 CDKN2A; TP53
BL2 (Basal-like 2)	Szlaki sygnalizacyjne EGF, NGF, MET, Wnt β -katenina, IGF1R Glikoliza, glukoneogeneza ekspresja mioepitelialnych markerów	SUM149PT	BRCA1
		CAL-851	RB1; TP53
		HCC70	PTEN; TP53
		HCC1806	CDKN2A; TP53; UTX
		HDQ-P1	TP53
IM (Immunomodulatory)	Szlaki sygnalizacyjne komórek B, T, DC, NK, Th1/Th2 Szlaki sygnalizacyjne NF κ B, TNF, JAK/ STAT, ATR/BRCA	HCC1187	TP53; CTNNA1;
		DU4475	DDX18; HUWE1; NFKBIA APC; BRAF; MAP 2 K4; RB1
M (mesenchymal)	Ruchliwość komórek Różnicowanie i wzrost komórek EMT	BT-549	PTEN; RB1; TP53
		CAL-51	PIK3CA
		CAL-120	TP53
MSL (mesenchymal stem-like)	Podobne do M Niska proliferacja Geny odpowiedzialne za angiogenezę.	HS578T	CDKN2A; HRAS; TP53
		MDA-MB-157	NF1; TP53 PIK3CA; TP53 HRAS
		SUM159PT	BRCA1; TP53
		MDA-MB-436	BRCA1; TP53
		MDA-MB-231	BRAF; CDKN2A; KRAS; NF2; TP53; PDGFRA
LAR (luminal androgen receptor)	Gen receptora androgenowego Luminalny wzór ekspresji genów Apokryny podtyp molekularny	MDA-MB-453	PIK3CA; CDH1; PTEN;
		SUM185PE	PIK3CA
		HCC2185	PIK3CA; RB1; TP53;
		CAL-148	PTEN
		MFM-223	PIK3CA; TP53

Na podstawie analizy ekspresji genów, porównano linie komórkowe ludzkiego raka gruczołu sutkowego oraz sklasyfikowano je na 6 różnych podtypów, aby móc zapewnić odpowiedni model komórkowy do badań nad leczeniem nowotworu piersi o podtypie potrójnie

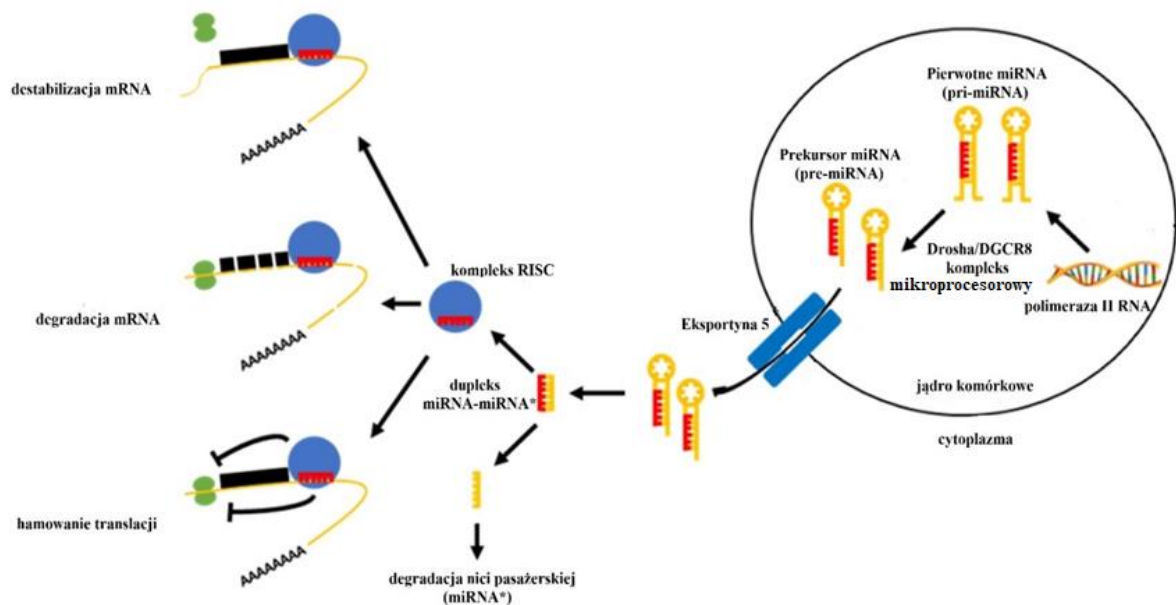
ujemnym. Podtypy te różnią się między sobą mutacją poszczególnych genów zaangażowanych w ważne procesy biologiczne w TNBC. Szczegóły dotyczące różnic między podtypami TNBC zestawiono w Tabeli 3.

1.6 Definicja i znaczenie cząsteczek mikroRNA

Odkrycie pierwszych cząsteczek mikroRNA przez grupę Ambros'a i Ruvkuna'a w 1993 roku zrewolucjonizowało dziedzinę biologii molekularnej. Rola wspomnianych cząsteczek w regulacji procesów biologicznych była dotąd pomijana, ponieważ błędnie założono, że nie zawierają one ważnych informacji. Cząsteczki mikroRNA (miRNA, miRs) należą do grupy małych, endogennych, jednoniciowych cząsteczek niekodujących RNA, zbudowane są od 19 do 24 nukleotydów. Obecnie, według informacji zawartych w oficjalnej bazie danych dla mikroRNA (miRBase v.22), genom ludzki koduje około 2654 dojrzałych cząsteczek mikroRNA²⁵. Cząsteczki mikroRNA są podzielone na różne grupy zwane rodzinami mikroRNA. Kryterium podziału rodzin stanowi: dojrzałe mikroRNA, sekwencja i/lub struktura genu pre-miRNA. Około 73% genów dla mikroRNA w bazie miRBase jest przypisanych do 1543 rodzin mikroRNA. Co więcej przynależność cząsteczek mikroRNA do danej rodziny, informuje o sekwencji ich genów oraz funkcji²⁶. Precyzyjne przypisanie wpływu mikroRNA na ekspresję genów może być trudne, ze względu na fakt, że często każda cząsteczka mikroRNA może kontrolować ekspresję kilkuset genów bezpośrednio lub pośrednio, podczas gdy pojedynczy gen kodujący białko może być regulowany przez więcej niż jedną cząsteczkę mikroRNA. W rzeczywistości uważa się, że ponad 50% ludzkiego genomu regulowane jest na etapie translacji przez cząsteczki mikroRNA, dlatego uważane są one za ważne regulatory kluczowych procesów biologicznych takich jak: proliferacja, różnicowanie komórkowe, inwazja, przerzutowanie, angiogeneza, czy apoptoza^{27,28}. Jednoniciowe, dojrzałe cząsteczki mikroRNA powstają z dwuniciowych prekursorów przy aktywnym udziale polimerazy RNA II, kompleksu mikroprocesorowego złożonego z dwóch białek DGCR8 i Drosha oraz Dicer prowadzącego do uwolnienia funkcjonalnej cząsteczki mikroRNA. Cząsteczki te są wydzielane do płynów pozakomórkowych. Pozakomórkowe mikroRNA są szeroko opisywane jako potencjalne biomarkery, które mogą stać się przydatnym narzędziem diagnostycznym wykorzystywanym do szybkiej diagnozy, oceny stopnia zaawansowania choroby, szacowania czasu przeżycia oraz doboru terapii do indywidualnych potrzeb chorego. Mogą jednocześnie służyć jako cząsteczki sygnałowe pośredniczące w komunikacji między komórkami^{29,30}.

1.7 Biogeneza mikroRNA

Geny dla mikroRNA są usytuowane w eksonach, intronach jak i w regionach niepodlegających ekspresji³¹. Taki układ jednostki transkrypcyjnej może prowadzić do jednoczesnego powstania transkryptów mikroRNA oraz mRNA³². Co więcej, geny mikroRNA są zorganizowane w sposób charakterystyczny dla działania polimerazy II oraz III, odpowiadających za transkrypcję genów małych RNA^{33,34}. Biogeneza mikroRNA rozpoczyna się od transkrypcji genów mikroRNA w wyniku której powstaje pierwotny transkrypt mikroRNA – pri-miRNA (ang. primary microRNA)³⁵. Pierwotne transkrypty miRNA tworzą połączone struktury spinki do włosów, poliadenylowane na końcu 3' oraz mające czapkę na końcu 5'.



Rycina 6 Biogeneza dojrzałej, funkcjonalnej cząsteczki miRNA. Powstawanie pierwotnego transkryptu – pri-miRNA oraz jego obróbka i geneza pre-mikroRNA odbywają się w jądrze komórkowym, natomiast ostatni etap – powstawanie funkcjonalnej cząsteczki mikroRNA odbywa się w cytoplazmie. Zmodyfikowano wg Humphries i wsp.³⁷

Cząsteczki pri-miRNA mogą mieć kilka kilo par zasad. W wyniku dalszej obróbki dwuniciowa struktura pri-miRNA ulega przekształceniu do pre-miRNA przy aktywnym udziale kompleksu mikroprocesorowego, składającego się z białka jądrowego wiążącego RNA – DGCR8 (ang. Di George syndrome critical region gene 8), u bezkręgowców zwane Pasha oraz enzymu rybonukleazy III o nazwie Drosha³⁶. Rybonukleaza Drosha przyłącza się do jednoniciowych końców pri-miRNA, w taki sposób, aby mogła uwalniać struktury spinek do włosów pre-miRNA (Rycina 6³⁷). Prowadzi to do powstania dwunukleotydowych nawisów na końcu 3' pre-miRNA. Następnie cząsteczki pre-miRNA są transportowane

do cytoplazmy przy udziale białkowego kompleksu – eksportyny 5 (Exp5) – EXP5, który do prawidłowego funkcjonowania potrzebuje energii. Jest ona pozyskiwana z GTP związanego z białkiem RAN³⁸. Za dalszą obróbkę pre-miRNA jest odpowiedzialna rybonukleaza III Drosha. Obróbka pre-miRNA obejmuje usunięcie pętli końcowej, w wyniku czego powstaje dojrzały dupleks miRNA-miRNA*. Jedna z nici dupleksu nazywana jest nicią wiodącą, druga zaś nicią pasażerską i jest oznaczona gwiazdką. Do niedawna uważano, że nić pasażerska jest degradowana, jednak badania wykazały, że obie nici mogą być funkcjonalne. Kierunkowość nici mikroRNA określa nazwę dojrzałej formy mikroRNA - nić 5p powstaje z końca 5' spinki do włosów pre-miRNA, podczas gdy nić 3p pochodzi z końca 3'³⁹. Aktywna postać mikroRNA to ssmiRNA (ang. single strand miRNA), który jest wbudowany w kompleks RISC, składający się z wielu białek wśród których najważniejszą funkcję pełni białko Ago (Argonaute), u ludzi AGO1-4. Dzięki nim możliwa jest degradacja docelowego mRNA lub represja translacji^{40,41}.

1.8. Mechanizmy odpowiedzialne za nieprawidłowości w ekspresji mikroRNA w ludzkich nowotworach

Liczne badania wykazały, że nieprawidłowości w ekspresji mikroRNA są obserwowane w większości typów raka, jednak podstawowe mechanizmy odpowiedzialne za rozregulowanie ekspresji wspomnianych cząsteczek nie są do końca poznane. Coraz więcej badań wskazuje na to, że nieprawidłowości na etapie transkrypcji, biogenezy mikroRNA oraz zmiany epigenetyczne i zmiany w liczbie kopii DNA mogą przyczyniać się samodzielnie lub, co bardziej prawdopodobne, razem do rozregulowania ekspresji mikroRNA w ludzkich nowotworach⁴². Ponadto, na zmianę ekspresji mikroRNA mogą wpływać inne cząsteczki miRNA, tworząc w ten sposób złożoną sieć wzajemnych interakcji i regulacji⁴³. Regulacja transkrypcji jest jednym z ważnych mechanizmów kontroli ekspresji mikroRNA. Wykazano, że cząsteczki mikroRNA należące do rodziny miR-34a mogą być bezpośrednio indukowane przez gen supresorowy *TP53*, a jego inaktywacja obniża poziom miR-34 w ludzkich nowotworach⁴⁴. Onkogen *c-Myc* i czynnik transkrypcyjny HIF wykazują wyraźny wzrost ekspresji w kilku ludzkich nowotworach, co może przyczyniać się do podwyższenia ekspresji miR-17-92 i miR-210 (odpowiednio)^{45,46}. Podsumowując, nieprawidłowości w ekspresji mikroRNA mogą być wynikiem zwiększonej lub zmniejszonej transkrypcji genów spowodowanej zmianą aktywności czynnika transkrypcyjnego. Podobnie do genów kodujących białka, obecnie pojawiają się informacje dotyczące mutacji i polimorfizmu mikroRNA

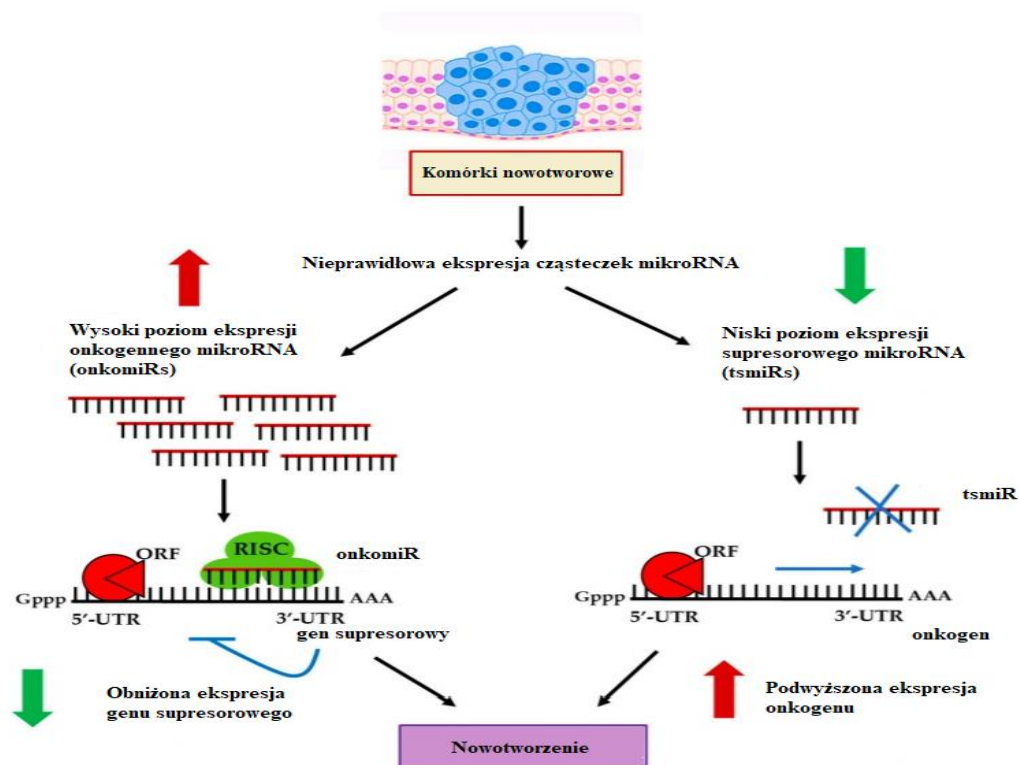
w nowotworach. Np. stwierdzono, że odziedziczone mutacje w pierwotnych transkryptach - miR-15a i miR-16-1 są odpowiedzialne za zmniejszoną ekspresję dwóch cząsteczek mikroRNA zarówno *in vitro* jak i *in vivo* w przewlekłej białaczce limfocytowej⁴⁷. Inne badania sugerują, że polimorfizm miRNA może być związany z rozwojem raka wątroby (HCC) lub raka gruczołu sutkowego. Dane te pokazały, że genetyczne zmiany przyczyniają się do nieprawidłowości w ekspresji mikroRNA podobnie jak ma to miejsce w przypadku innych genów kodujących białka. Ponadto zmiany liczby kopii DNA w genie mikroRNA, często występują w nowotworach i mogą częściowo odpowiadać za nieprawidłowości w ekspresji mikroRNA. Przykładowo, utratę genów miR-16-1 i miR-15a zaobserwowano u 50% pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową PBL przy jednoczesnym zmniejszeniu ekspresji u ~ 65% pacjentów⁴⁸. Kolejne badanie wykazało, że w zaawansowanych nowotworach jajnika utrata kopii genu może odpowiadać za obniżenie ekspresji około 15% cząsteczek mikroRNA⁴⁹. Co więcej, niektóre kluczowe białka dla biogenezy miRNA mogą być pozbawione funkcji lub rozregulowane w nowotworach, a tym samym mogą jeszcze bardziej nasilać rozwój guzów. Na przykład warunkowa delecja genu *Dicer1* nasilała rozwój guza w mysim modelu raka płuc, indukowanego genem K-Ras⁵⁰. Jednak mechanizm ten może być tkankowo lub nowotworowo specyficzny, ponieważ inne badanie wykazało, że w raku jajnika Droscha i Dicer nie zmieniają poziomu ekspresji zarówno na poziomie mRNA jak i białka⁴⁹. Dlatego zastosowanie funkcjonalnych testów może mieć ważne znaczenie w badaniu aktywności wspomnianych białek. Ponadto, podobnie jak w przypadku genów kodujących białka, ekspresja mikroRNA może być również modulowana przez mechanizmy epigenetyczne, takie jak metylacja DNA i acetylacja histonów.

1.9 MikroRNA i jego rola w nowotworach piersi

Nieprawidłowości w ekspresji mikroRNA są obserwowane w różnych typach nowotworów. Około 50% genów mikroRNA jest zlokalizowanych w miejscach łamliwych genomu tzw. fragile sites. Mutacje w tych miejscach genomu, są często powiązane z powstawaniem nowotworów, co wskazuje na ważną rolę mikroRNA w tym procesie. Miejsca łamliwe definiuje się jako obszary, w których dochodzi z dużą częstotliwością do utraty czy przegrupowania fragmentów chromosomów. Takie zmiany są często obserwowane w komórkach nowotworowych, skutkiem tego jest zaburzona ekspresja genów mikroRNA zlokalizowanych w pobliżu tych regionów. Przykładem mogą być geny miR-15a i miR-16-1 znajdujące się na długim ramieniu chromosomu 13 w obszarze 14.2, gdzie często dochodzi

do delecji. Zmniejszony poziom lub całkowity brak ekspresji miR-15a i miR-16-1 stwierdza się u wielu chorych z przewlekłą białaczką limfocytową B, rakiem prostaty, chłoniakiem komórek płaszczka i szpiczakiem mnogim⁵¹.

Nieprawidłowości w ekspresji ok. 200 cząsteczek mikroRNA obserwuje się w wielu typach nowotworów. Pierwsza praca opisująca wykorzystanie cząsteczek mikroRNA do rozpoznawania ludzkiego nowotworu piersi powstała w 2005 roku, jednocześnie sugerując zaangażowanie tych cząsteczek w rozwój tego nowotworu⁵². Autorzy pracy zbadali poziom ekspresji mikroRNA we fragmencie prawidłowej i objętej nowotworem tkance piersi. Badanie to pozwoliło im na zidentyfikowanie 29 cząsteczek mikroRNA wykazujących nieprawidłową ekspresję w tkankach objętych nowotworem piersi. Dzięki niemu można niemal ze 100% dokładnością rozróżnić tkanki prawidłowe od nowotworowych. Spośród 29 cząsteczek mikroRNA, miR-10b, miR-125b i miR-145 miały obniżoną ekspresję, natomiast miR-21 i miR-155 wykazywały podwyższoną ekspresję, co sugeruje, że mikroRNA mogą odgrywać



Rycina 7 Mechanizmy regulacyjne onkogennych i supresorowych mikroRNA w przypadku zdarzeń nowotworowych. Zwiększona ekspresja onkogennych miRNA w komórkach nowotworowych hamuje geny supresorowe guza. Zmniejszona ekspresja miRNA supresorowych guza potencjalnie zwiększa ekspresję onkogenów. Zmodyfikowano wg Loh i wsp.²⁵

zarówno rolę genów supresorowych jak i onkogenów⁵³. Onkogenne cząsteczki mikroRNA inaczej „onkomiRs”, charakteryzują się wysokim poziomem ekspresji podczas rozwoju nowotworu i zazwyczaj sprzyjają jego progresji w wyniku hamowania genów supresorowych

i/lub genów związanych z procesem odpowiedzialnym za kontrolę różnicowania komórek lub regulację procesu apoptozy. Do drugiej grupy cząsteczek zalicza się cząsteczki mikroRNA, które wykazują obniżoną ekspresję mikroRNA, są rozważane jako geny supresorowe mikroRNA, inaczej nazywane „TSmiRs” regulują rozwój nowotworu hamując onkogeny i/lub geny odpowiedzialne za różnicowanie komórek lub regulację procesu apoptozy (Rycina 7). Wykorzystanie cząsteczek mikroRNA może znaleźć zastosowanie w klasyfikowaniu podtypów molekularnych raka gruczołu sutkowego – luminalnego A, luminalnego B, potrójnie ujemnego (TNBC), czy z nadekspresją HER2⁵⁴. Ponadto stwierdzono, że ekspresja cząsteczek mikroRNA należących do rodziny let-7, jest związana z podtypem molekularnym nowotworu piersi, statusem receptorów ER oraz PR, czy stopniem zaawansowania nowotworu. Co ciekawe Volinia i wsp. zidentyfikowali następujące cząsteczki mikroRNA: let-7d, miR-210 oraz miR-221, które są związane z rozwojem nowotworu ze stadium przedinwazyjnego przewodowego raka gruczołu sutkowego w stan inwazyjny przewodowego raka gruczołu sutkowego, jako kluczowe regulatory w progresji nowotworu⁵⁵. Shimono i wsp. wykazali, że indukowana ekspresja cząsteczki miR-200c hamuje proces powstawania nowotworu piersi *in vivo*⁵⁶. Co więcej, obniżona ekspresja cząsteczki let-7 jest ważna dla prawidłowego funkcjonowania nowotworowych komórek macierzystych w linii SKBR-3. Indukowana ekspresja let-7 hamuje proces powstawania guza, podczas gdy obniżony poziom ekspresji let-7 hamuje różnicowanie komórek, bez wpływu na proliferację komórek raka gruczołu sutkowego. Zaobserwowano, że ekspresja miR-10b u pacjentek z nieprzerzutującym rakiem gruczołu sutkowego jest obniżona. U ponad 50% pacjentek z przerzutami, wykryto podwyższenie ekspresji miR-10b. Indukowany przez czynnik transkrypcyjny TWIST, miR-10b hamuje translację mRNA kodującego białko homeobox D10, powodując wzrost ekspresji pro-przerzutowego genu RHOC, prowadząc w ten sposób do inwazji komórek nowotworowych i przerzutów⁵⁷.

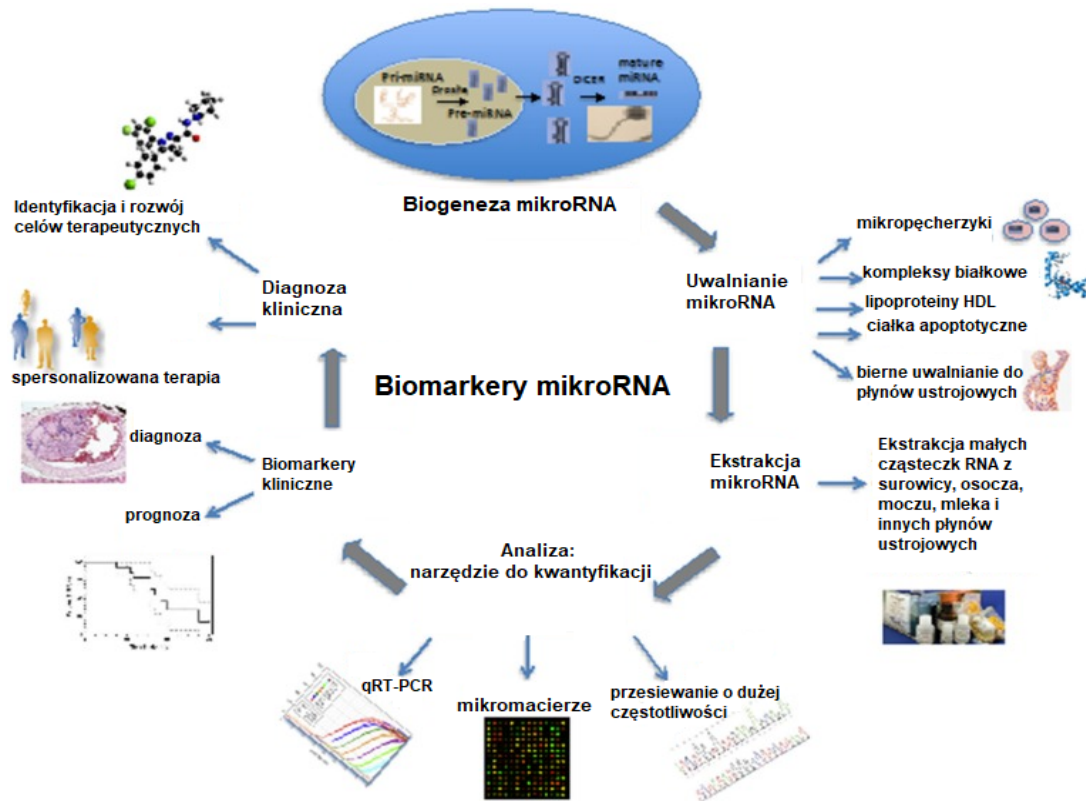
U około 40% pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego, które pozytywnie odpowiadają na leczenie tamoksyfenem i innymi terapiami hormonalnymi, stwierdza się nawroty nowotworu. Mechanizmy odpowiadające za nabytą oporność na hormonoterapię, pomimo ekspresji receptora estrogenowego α (ER α) są złożone. Jak dotąd niewielu badaczy zbadało rolę cząsteczek mikroRNA w oporności na hormonoterapię. mikroRNA-221/222 ulegają nadekspresji w linii komórkowej MCF-7, odpornej na tamoksyfen, fulwestrant i czynnik martwicy nowotworu (TNF, ang. tumor necrosis factor) oraz w guzach ER α ujemnych. Ponieważ miR-221/222 jest negatywnym regulatorem inhibitora cyklu

komórkowego i supresora nowotworu p27^{kip1}, a komórki raka gruczołu sutkowego odporne na tamoksyfen, wykazują zwiększoną ekspresję wspomnianych cząsteczek mikroRNA i znaczne obniżenie poziomu ekspresji p27^{kip1}, to uważa się, że miR-221/222 reguluje wrażliwość na tamoksyfen poprzez bezpośrednią regulację genu p27^{kip1}⁵⁸⁻⁶¹. Dowiedziono, że nieprawidłowości w ekspresji mikroRNA mogą być związane z regulacją epigenetyczną, taką jak stan metylacji genów mikroRNA, co skutkuje zmianami w poziomie ich ekspresji⁶². Przykłady metylowanych genów mikroRNA obejmują miR-127 w komórkach raka pęcherza i miR-9-1 w komórkach raka gruczołu sutkowego^{63,64}. Oporność na chemioterapię i leki ukierunkowane molekularnie jest poważnym problemem przed którym stoją obecnie naukowcy. Mechanizmy leżące u podstaw nabywania oporności wielolekowej można ogólnie podzielić na dwie kategorie obejmujące: nadprodukcję transporterów ABC oraz aktywację szlaków antyapoptotycznych i przeżycia komórek. W raku gruczołu sutkowego miR-451 i miR-326 zwiększają chemowrażliwość komórek na doksorubicynę poprzez bezpośrednią regulację genów ABCB1 i ABCC1^{65,66}. Podobnie mikroRNA-487a reguluje chemowrażliwość komórek raka gruczołu sutkowego na mitoksantron poprzez bezpośrednią regulację genu ABCG2⁶⁷. Bockhorn i wsp. donieśli, że miR-30c obniża ekspresję interleukiny-11 i przyczynia się do zwiększenia oporności raka gruczołu sutkowego na paklitaksel i doksorubicynę poprzez bezpośrednią regulację białka wiążącego aktyne - twinfilinę 1, co sprzyja fenotypowi EMT⁶⁸. Wiele cząsteczek mikroRNA zidentyfikowano jako biomarkery i/lub scharakteryzowano jako niezbędne regulatory zarówno w prawidłowym rozwoju gruczołu sutkowego, jak i w rozwoju raka gruczołu sutkowego, w tym w inicjacji przerzutów i oporności na terapię. Cząsteczki mikroRNA mają potencjał do zastosowania ich w terapii genowej. Według najnowszych doniesień, wiele cząsteczek mikroRNA jest na zaawansowanym etapie badań klinicznych, m.in. miR-34a z potencjalnym zastosowaniem do leczenia wielu typów nowotworów. Pozostałe cząsteczki mikroRNA są związane z leczeniem chorób serca, nerek, wątroby czy chłoniaków⁶⁹.

1.10 MikroRNA jako biomarker

Biomarker jest terminem obejmującym różne typy obiektywnych wskaźników zdrowia lub choroby. Biomarkerami mogą być: kwasy nukleinowe, lipidy, białka oraz inne metabolity lub całe komórki guza, które również można znaleźć we krwi CTCs (ang. circulating tumor cells)⁷⁰. Pod względem pochodzenia, biomarkery nowotworowe można podzielić na dwa rodzaje. Pierwszy z nich to antygeny uwalniane przez komórki nowotworu - antygeny swoiste dla nowotworów, czyli TSA (ang. tumor specific antigens). Drugi rodzaj obejmuje antygeny,

które są uwalniane przez komórki prawidłowe w odpowiedzi na patologiczne zmiany w środowisku, są określane jako TAA (ang. tumor associated antigens)⁷¹. Do grupy tzw. biomarkerów inwazyjnych, obecnie stosowanych w diagnostyce raka gruczołu sutkowego, należą: ER, PR, HER2, Ki-67, p53. Wymienione markery są oznaczane technikami immunohistochemicznymi, których analiza wymaga przeprowadzenia biopsji lub pobrania



Rycina 8 Krążące mikroRNA jako biomarkery: schematyczny diagram przedstawiający biogenezę miRNA, miejsca wydzielania do płynów ustrojowych, ekstrakcję RNA i oszacowanie ilościowe. W przyszłości decyzje kliniczne mogą być podejmowane na podstawie poziomów ekspresji miRNA. Steer i Subramanian.⁷⁸

fragmentu tkanki podczas operacji. Zaletą tego rodzaju biomarkerów jest ich wysoka swoistość, dlatego są powszechnie stosowane do dokładnej diagnostyki oraz prognozowania przebiegu choroby. Dotychczas wykorzystywane „standardowe” biomarkery raka gruczołu sutkowego nie znajdują zastosowania w badaniach przesiewowych. Jedną z głównych przyczyn są ich niewielkie stężenia w rakach niezaawansowanych (*in situ*) oraz niska czułość i swoistość we wczesnych stadiach choroby. Markery te, służą do ewentualnego monitorowania nawrotu choroby podczas leczenia, jak również po jego zakończeniu⁷². Niestety, jak dotąd nie odkryto markerów, które pozwalałyby na ocenę ryzyka wystąpienia przerzutów u pacjentek z niezawansowanym nowotworem. Z tego powodu trwają intensywne badania w poszukiwaniu biomarkerów o potencjalnym zastosowaniu we wczesnej diagnostyce chorób nowotworowych oraz identyfikacji przerzutów na wczesnym etapie ich powstawania⁷³. W ostatnich latach

najintensywniejsze badania prowadzi się nad cząsteczkami mikroRNA pod kątem ich użyteczności diagnostyczno-rokowniczej^{74 75 76 25,77}.

Zarówno cząsteczki mikroRNA jak i idealny biomarker muszą charakteryzować się kilkoma cechami - muszą być łatwo dostępne co charakteryzuje cząsteczki mikroRNA, które – można łatwo ekstrahować za pomocą płynnych biopsji z krwi, moczu i innych płynów ustrojowych⁷⁵ (Rycina 8⁷⁸). Ponadto cząsteczki mikroRNA mogą być stosowane do dokładnej diagnozy oraz ukierunkowanego leczenia i oceny reakcji na leczenie. Wczesne wykrycie nowotworu piersi jest najistotniejsze dla poprawy jego rokowania. Nieprawidłowości w poziomie ekspresji mikroRNA są często utożsamiane z powstawaniem wielu nowotworów, w tym nowotworu piersi. MikroRNA pozwala na rozróżnienie tkanek prawidłowych od tych zmienionych nowotworowo. Cząsteczki mikroRNA mogą być ekstrahowane z materiału, którego pobranie nie wymaga ingerencji chirurgicznej, tym samym nie jest to uciążliwe i obciążające dla pacjenta. Warto jednak podkreślić, że markery te oceniane są w materiale nienowotworowym co powoduje, że cechy takie jak czułość oraz swoistość pozostają dyskusyjne^{79,80}. Dlatego trwają poszukiwania takich cząsteczek miRNA, które byłyby charakterystyczne dla konkretnego nowotworu na wczesnym etapie rozwoju.

1.11 Przejście nabłonkowo – mezenchymalne – EMT – (ang. epithelial to mesenchymal transition)

Indukcja przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego jest kluczowym procesem niezbędnym do rozpoczęcia przerzutowania. Przerzutowanie, jest wieloetapowym procesem wpływającym na agresywność nowotworów, co więcej przerzuty są przyczyną ponad 90% zgonów wśród pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem przerzutującym piersi. Główny etap powstawania przerzutów rozpoczyna się od rozległego unaczynienia w pierwotnym miejscu guza, komórki następnie wykazują utratę adhezji w trakcie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego oraz nabierają inwazyjnego fenotypu, co prowadzi do ich późniejszego oderwania i mobilizacji. Wskutek procesu EMT, komórki mają zwiększoną ruchliwość i inwazyjność. Po wnikięciu do naczyń krwionośnych wraz z krążeniem komórki guza docierają do nowych tkanek i osiedlają się w odległych miejscach, tworząc wtórne ogniska nowotworu. Kolonizacja komórek guza i powstanie przerzutów nowotworu w nowym miejscu wymaga przejścia przez komórkę nowotworową odwrotnego procesu do EMT, czyli MET (ang. mesenchymal to epithelial transition).

Większość diagnozowanych nowotworów jest pochodzenia nabłonkowego. Zbudowane są z tkanki nabłonkowej, której komórki w warunkach fizjologicznych ściśle przylegają do błony podstawnej i sąsiadujących komórek. Procesem, w wyniku którego komórki nabłonkowe nabywają zwiększonej ruchliwości i zdolności do migracji jest przejście nabłonkowo – mezenchymalne – EMT (ang. *epithelial to mesenchymal transition*). Konsekwencją indukcji procesu EMT jest zakłócenie połączeń między komórkami, co w efekcie prowadzi do utraty polarności przez komórki i tym samym zaburzenia uporządkowania charakterystycznego dla tkanki nabłonkowej. Podczas procesu EMT dochodzi do zmiany tempa syntezy poszczególnych białek, w tym białek odpowiedzialnych za kontakty międzykomórkowe (np. E-kadheryna) i oddziaływanie z macierzą zewnątrzkomórkową (integryny, białka ECM (ang. extracellular matrix), białka z rodziny FAK oraz za rearanżację cytoszkieletu komórki (białka z rodziny Rho). Proces EMT powoduje utratę zdolności komórek do adhezji komórkowej oraz prowadzi do zaburzeń podziałów komórkowych i procesów różnicowania. Ostatecznie, w wyniku tego procesu, komórki zaczynają zmieniać swój fenotyp na mezenchymalny stają się bardziej ruchliwe i zdolne do migracji i inwazji. Najbardziej charakterystycznymi markerami, których synteza wzrasta w wyniku procesu EMT są białka związane z adhezją i ruchem komórek – wimentyna (białko cytoszkieletu komórki), Nkadheryna, czynniki transkrypcyjne – Snail1, SLUG (Snail2), Twist, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2, i/lub E47, FSP-1 (białko charakterystyczne dla fibroblastów), α -SMA (α aktyna mięśni gładkich), zaś obniża się poziom E-kadheryny⁸¹⁻⁸⁴.

Tabela 4 Szlaki sygnałowe pośredniczące w przejściu nabłonkowo-mezenchymalnym w różnych podtypach nowotworu piersi. Poniższe informacje przygotowano na podstawie Singh, S. i wsp.⁸⁵.

Podtyp nowotworu piersi	Zaangażowane geny	Zaangażowane szlaki sygnałowe
Luminalny A i B	SLUG, BCL2, BMI1, TGF- β , TWIST, ZEB1/2, ETS1, VEGFR	ER, TGF- β , EGFR-, IGFR-, MAPK-dependent, MEK-ERK HER2+, TGF, TWIST1, PTK-6
HER2+	TGF- β , TWIST1, PTK-6	TGF- β , AKT, HER2/EGFR
Potrójnie ujemny (TNBC)	TGF- β , GLI1, SNAIL, SLUG, TWIST1, ZEB1, Δ NP63, GSK3 β	PI3K/AKT, Notch, Hedgehog, Wnt

Molekularne powiązanie między EMT a mikroRNA opisali Gregory i wsp., którzy stwierdzili, że miR-205 i pięć cząsteczek mikroRNA należących do rodziny miR-200, mianowicie

miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 i miR-429, wykazuje obniżenie ekspresji w komórkach nerki psa Madin-Darby, podczas procesu EMT. Ekspresja cząsteczek mikroRNA z rodziny miR-200 hamuje proces EMT indukowany przez transformujący czynnik wzrostu TGF- β (ang. transforming growth factor β), poprzez bezpośrednią regulację genów czynników transkrypcyjnych ZEB1 i ZEB2 odpowiedzialnych za represję E-kadheryny⁸⁶. Z drugiej strony ZEB1 hamuje transkrypcję miR-141 i miR-200c. Wymienione cząsteczki są silnymi induktorami różnicowania komórek nabłonkowych. Ponadto, fenotyp EMT jest ściśle regulowany przez wzajemne oddziaływanie między rodziną miR-200 a czynnikiem transkrypcyjnym ZEB1⁸⁷. Proces EMT może być również indukowany przez miR-103/107 w komórkach raka gruczołu sutkowego. Martello i wsp. stwierdzili, że miR-103/107 osłabia biosyntezę miRNA poprzez bezpośrednią regulację genu kodującego białko Dicer, co skutkuje obniżeniem miR-103/107 oraz cząsteczek mikroRNA należących do rodziny miR-200. Skutkuje to inicjacją procesu EMT i w efekcie końcowym nabywaniem przez komórki rakowe przerzutującego fenotypu⁸⁸. Ostatnio Song i wsp. dowiedli, że poziom ekspresji cząsteczek mikroRNA z rodziny miR-200 jest epigenetycznie regulowany przez cząsteczkę miR-22 pośredniczącą w wyciszeniu białek TET (ang. ten eleven translocation), które indukują demetylację DNA poprzez konwersję 5-metylocytozyny do 5-hydroksycytozyny. Z uwagi na to, że rodzina TET jest zaangażowana w demetylację promotora genu miR-200, a miR-22 hamuje ekspresję TET, to w efekcie promuje nabywanie fenotypu nabłonkowego poprzez wyciszenie cząsteczek mikroRNA z rodziny miR-200⁸⁹. Cząsteczka mikroRNA-9, odpowiada za bezpośrednią regulację genu *CDHI* kodującego E-kadherynę, a indukowana przez czynniki transkrypcyjne MYC/MYCN, prowadzi do zwiększonej ruchliwości/inwazyjności komórek raka gruczołu sutkowego⁹⁰. Nadekspresja miRNA-9, w nieprzerzutujących komórkach raka gruczołu sutkowego indukowała mikroprzerzuty w płucach myszy, natomiast wyciszenie miR-9 w wysoce złośliwych komórkach raka gruczołu sutkowego hamowało przerzuty⁹⁰. W niedrobnokomórkowym raku płuca, miR-30a hamuje EMT poprzez bezpośrednią regulację czynnika transkrypcyjnego SNAIL, represora transkrypcji genu *CDHI*⁹¹. W nabłonku barwnikowym siatkówki miR-204 odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu funkcji bariery nabłonkowej i fizjologii komórki poprzez bezpośrednią regulację TGF β R2 i czynnika transkrypcyjnego SNAIL2⁹². Tavazoie i wsp. zidentyfikowali cząsteczki mikroRNA - miR-126, miR-206 i miR-335 jako potencjalne supresory przerzutującego raka gruczołu sutkowego, dowiedziono, że przywrócenie ekspresji miR-126 zmniejsza proliferację komórek i wzrost guza, podczas gdy ekspresja miR-206 i miR-335 hamuje inwazję komórek raka gruczołu sutkowego. miR-335 hamuje przerzutowanie raka gruczołu sutkowego poprzez

supresję genów kodujących czynnik transkrypcyjny SOX4 i składnik macierzy zewnątrzkomórkowej tenascynę C⁹³. Kim i wsp., wykazali, że miR-34a, który reguluje transkrypcję genu *TP53*⁹⁴, hamuje inwazyjność komórek raka gruczołu sutkowego poprzez represję EMT i czynnika transkrypcyjnego Snail⁹⁵. Jak opisano powyżej, równowaga między poziomami ekspresji miR-22 i rodziny miR-200 reguluje również fenotyp nabłonkowy w raku gruczołu sutkowego^{86,89}; w związku z tym uważa się, że mikroRNA są ważnymi czynnikami kontrolującymi początkowy etap przerzutowania. Ponadto Chou i wsp. wykazali, że czynnik transkrypcyjny GATA3 hamuje przerzuty raka gruczołu sutkowego poprzez wzrost ekspresji cząsteczki miR-29b⁹⁶. Czynnik transkrypcyjny GATA3 jest niezbędny do różnicowania komórek nabłonka w gruczole sutkowym, a utrata ekspresji miR-29b jest skorelowana ze złym rokowaniem u chorych na raka gruczołu sutkowego⁹⁷⁻⁹⁹. Mir-29b hamuje przerzuty raka gruczołu sutkowego poprzez hamowanie sieci pro-przerzutowych regulatorów związanych z angiogenezą, przebudową kolagenu i proteolizą⁹⁶. Ryu i wsp. podali, że miR-708 hamuje migrację komórek raka gruczołu sutkowego i przerzuty poprzez działanie na neuronatynę, białko siateczki śródplazmatycznej, które reguluje wewnątrzkomórkowy poziom jonów Ca²⁺. Supresja genu kodującego neuronatynę (NNAT) przez miR-708 powoduje nieprawidłową regulację poziomu Ca²⁺, powodując inaktywację białek związanych z migracją komórek, takich jak kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym ERK i kinaza adhezji ogniskowej FAK¹⁰⁰.

1.12 Charakterystyka wybranych cząsteczek mikroRNA

miR-31-5p

Gen dla cząsteczki miR-31-5p jest zlokalizowany na chromosomie 9p21.3, tylko trochę ponad 500 kb poza lokalizacją dobrze znanych genów dla supresorów nowotworu *CDKN2A* oraz *CDKN2B*, kodujących białkowe inhibitory cyklu komórkowego p15 oraz p16. Miejsce to jest często nazywane „gorącym punktem” utraty genomu w różnych typach nowotworów. Ze względu na bliskie położenie genu miR-31-5p i genów *CDKN2A* oraz *CDKN2B*, można przypuszczać, że mógłby on zostać utracony wraz z *CDKN2A* w różnych typach nowotworów. Poza tym, wielu badaczy wykazało, że delecja genu miR-31-5p występuje m.in. w czerniaku¹⁰¹, międzybłoniaku¹⁰², różnych typach białaczek^{103,104} oraz w raku urotelialnym¹⁰⁵. Co więcej wykazano, że hipermetylacja promotora jest odpowiedzialna za niską ekspresję miR-31-5p w raku prostaty¹⁰⁶ oraz w raku gruczołu sutkowego o podtypie potrójnie ujemnym¹⁰⁷.

Co ciekawe w czerniaku obserwuje się występowanie obu wspomnianych mechanizmów, ponieważ gen dla miR-31-5p jest często dezaktywowany albo w wyniku delecji albo w wyniku metylacji histonów¹⁰⁴.

Ekspresja cząsteczki miR-31-5p jest najczęściej zmieniana w ludzkich nowotworach, a poziom jej ekspresji został oznaczony w wielu typach nowotworów. Może być on zarówno obniżony jak i podwyższony. Obniżenie ekspresji miR-31-5p zaobserwowano w raku gruczołu sutkowego oraz w kilku innych nowotworach, takich jak rak pęcherza moczowego, rak wątroby, jajnika i prostaty, a także w glejaku (Tabela 5). Obniżenie ekspresji miR-31-5p we wspomnianych nowotworach, jest często związane z określonym typem komórek lub stopniem zaawansowania choroby. Na przykład w inwazyjnym raku pęcherza moczowego wykryto niską ekspresję miR-31-5p¹⁰⁸, która w tym nowotworze jest związana z progresją guza i złym rokowaniem u pacjentów¹⁰⁹. Podobnie w raku prostaty i międzybłoniaku, obniżona ekspresja miR-31-5p była związana z zaawansowanym stadium rozwoju nowotworu i jego agresywnym fenotypem^{110,102,106}. W linii komórkowej raka przełyku zaobserwowano obniżenie ekspresji miR-31-5p w komórkach opornych na promieniowanie¹¹¹. Ponadto to samo badanie wykazało, że ekspresja miR-31-5p była obniżona w pierwotnych guzach przełyku, wykazując jednocześnie słabą odpowiedź na chemioradioterapię¹¹¹. Jak się okazuje, cząsteczka miR-31-5p jest ciekawym przedmiotem do badań, z uwagi na zmiany w poziomie jej ekspresji uzależnione od danego typu nowotworu. Nadekspresję miR-31-5p obserwuje się m.in. w raku jelita grubego, raku płuc i raku trzustki, raku płaskonabłonkowym głowy i szyi (ang. head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) oraz raku dróg żółciowych (Tabela 6). W badaniach nad rakiem przełyku dowiedziono, że nadekspresja miR-31-5p jest odpowiedzialna za inicjację onkogenezy jak i jej rozwój. Nadekspresję miR-31-5p zaobserwowano w polipach przednowotworowych raka okrężnicy, co sugeruje, że jest on zaangażowany w rozwój nowotworu we wczesnych jego stadiach¹¹². Jak się okazuje, nadekspresja miR-31-5p była związana z zaawansowanym stadium guza, zwiększoną inwazją oraz słabym zróżnicowaniem^{113,114}. Co ciekawe, w raku trzustki zaobserwowano interesujący, dualistyczny wzorzec ekspresji miR-31-5p – w większości linii komórkowych: Hs007T, HupT4, AsPC-1, HPAF-II, CFPAC-1, Capan-2, HPAC, SW1990, Panc-1 oraz Hs766T obserwowano silną nadekspresję miR-31-5p, podczas gdy pozostałe linie komórkowe: BxPC-3, SU.86.86, DanG, HupT3, MiaPaCa-2, Capan-1 oraz prawidłowa tkanka wykazywały brak ekspresji miR-31-5p¹¹⁵.

Cząsteczka miR-31-5p jest zdolna do interakcji z szeregiem docelowych cząsteczek mRNA, zaangażowanych w różne szlaki sygnałowe odpowiedzialne m.in. za regulację takich procesów jak: proliferacja, apoptoza, migracja, inwazja czy radio i chemiowrażliwość (Tabela 5 i 6).

Tabela 5 Obniżona ekspresja miR-31-5p w różnych typach nowotworów.

Nowotwór	miR-31-5p	Gen	Szlak sygnałowy	Funkcja	Odniesienie
Rak jajnika	↓	<i>E2F2</i>	cykl komórkowy(E2F)		116
		<i>CEBPA</i>		anty-proliferacyjna	
		<i>STK40</i>	P53		
Rak wątroby	↓	<i>MET</i>	PI3K/AKT	Chemiowrażliwość	117
		<i>HDAC2</i>	cykl komórkowy (E2F)	anty-proliferacyjna	118
Rak prostaty	↓	<i>CDK2</i>	P53		
		<i>E2F1</i>	cykl komórkowy (E2F)		106
		<i>E2F2</i>			
		<i>EXO1</i>		anty-proliferacyjna	
		<i>FOXM1</i>			
Rak jamy nosowo-gardłowej	↓	<i>MCM2</i>	AR		
		<i>MCM2</i>	cykl komórkowwy	anty-proliferacyjna	119
		<i>FIH</i>	P53	anty-migracyjna	
Rak przełyku	↓	<i>PARP1</i>	szlaki naprawy DNA		111
		<i>SMUG1</i>			
		<i>MLH1</i>		Radiowrażliwość	
		<i>MMS19</i>			
Rak żołądka	↓	<i>RhoA</i>	Rho/ROCK	anty-migracja	120-123
		<i>ITGA5</i>	PI3K/AKT	anty-migracja	
		<i>Smad4</i>	TGF	anty-proliferacyjna	
		<i>SGPP2</i>	STAT3	anty-migracja, apoptoza	
		<i>E2F2</i>	cykl komórkowy (E2F)	anty-proliferacyjna	
Glejak	↓	<i>DOCK1</i>	NF-κB	anty-migracja	124
	↓	<i>PRKCE</i>	NF-κB	Apoptoza chemio/radiowrażliwość	125
Rak piersi	↑	<i>Smad3</i>	TGF-β		126
		<i>Smad4</i>			
		<i>Axin1</i>	WNT	Proliferacja	
		<i>Dkk1</i>			
		<i>Gsk3β</i>			

Jak się okazuje, oznaczanie poziomu ekspresji miR-31-5p, może okazać się przydatnym narzędziem w diagnostyce, ponieważ może pomóc w odzyskaniu chemio- czy radiowrażliwości lub przyczyni się do zdiagnozowania stopnia złośliwości nowotworu. Podwójna funkcja (supresorowa lub onkogenna) badanej cząsteczki mikroRNA może wynikać z dwóch przyczyn: typu nowotworu oraz jej docelowych cząsteczek mRNA.

Tabela 6 Podwyższona ekspresja miR-31-5p w różnych typach nowotworów.

Nowotwór	miR-31-5p	Gen	Szlak sygnałowy	Funkcja	Odniesienie
Rak jelita grubego	↑	<i>SATB2</i>	MEK5/ERK5	Proliferacja	127
				Migracja	
		<i>RASA1</i>	RAS/MARK	Proliferacja	128
		<i>Tima1</i>	Rac1	Migracja	129
		<i>Smad3</i>	TGF-β/BMP	Proliferacja	130,131
		<i>Smad4</i>		anty-apoptotyczna	
		<i>Bmpr1a</i>	WNT	Radiooporność	
		<i>Axin1</i>			
		<i>Dkk1</i>			
		<i>Gsk3β</i>			
Rak dróg żółciowych	↑	<i>Rasa1</i>	RAS/ MARK/ ERK1/2	Proliferacja	132
Rak trzustki	↑	<i>RASA1</i>	RAS/ MARK/ ERK1/2	Migracja	133
Rak głowy i szyi	↑	<i>FIH</i>	HIF	Proliferacja	134
				Migracja	
Rak przełyku	↑	<i>LATS2</i>	Hippo	Onkogeneza	135
		<i>STK40</i>	NF-κB	Proliferacja	136
Rak płuc	↑	<i>RASA1</i>	RAS/ MARK/ ERK1/2	Proliferacja, migracja	137
		<i>SPRED1</i>			
		<i>SPRED2</i>			
		<i>SPRY1</i>			
		<i>SPRY3</i>			
		<i>SPRY4</i>			
		<i>PPP2R2A</i>	Hippo		138–140
		<i>DICER1</i>			
		<i>LATS2</i>			
		<i>SATB2</i>	TGF-β	Migracja	141

Zaobserwowano, że z jednej strony miR-31-5p hamował progresję guzów w raku przełyku, raku żołądka i prostaty. Z drugiej strony w raku kolczystokomórkowym skóry, raku płaskonabłonkowym jamy ustnej, raku przełyku, raku płaskonabłonkowym głowy i szyi

i w raku szyjki macicy, miR-31-5p promował proces rozwoju nowotworu. Co ciekawe w przypadku raka przełyku, funkcja jaką pełni badana cząsteczka mikroRNA zależy od zdiagnozowanego typu patologicznego nowotworu^{136,142-145}. Nawet regulacja tego samego szlaku sygnałowego może wywołać przeciwne efekty. Na przykład miR-31-5p jest zaangażowany w regulację szlaku sygnałowego NF- κ B w raku gruczołu sutkowego, glejaku i raku przełyku. Jednak powoduje apoptozę w raku gruczołu sutkowego, uniemożliwia migrację w glejaku, a w raku przełyku indukuje proliferację^{124,136,146}. Co więcej, cząsteczka miR-31-5p nawet w różnych typach nowotworów, może wykazywać podobną funkcję, jeśli odpowiada za regulację tych samych białek docelowych. Na przykład, miR-31-5p odpowiada za regulację następujących genów: Axin, Dkk1, Gsk3 β w raku gruczołu sutkowego typu podstawnego jak i w raku jelita grubego. W rezultacie w tych dwóch przypadkach pełni on funkcję onkogenną^{126,130}. Jak się okazuje, indukowane obniżenie lub nadekspresja miR-31-5p, w zależności od danego typu nowotworu powodowała ten sam efekt – uwrażliwienie komórek nowotworowych na chemioterapeutyki. Na przykład, w raku okrężnicy hamowanie wysokiej endogennej ekspresji miR-31-5p uwrażliwiało komórki raka okrężnicy na 5-FU (5- fluorouracyl), chemioterapeutyk powszechnie stosowany w leczeniu różnego rodzaju nowotworów¹⁴⁷. Z drugiej strony w raku przełyku, prostaty i jajnika o niskiej endogennej ekspresji miR-31-5p, nadekspresja miR-31-5p uwrażliwiała komórki wymienionych nowotworów na chemio i radioterapię^{110,111,117}.

Cząsteczka miR-31-5p wykazuje zdolność do plejotropowej regulacji docelowych cząsteczek mRNA, które są zaangażowane w różne procesy komórkowe istotne dla ogólnego stanu adhezji komórkowej. Cząsteczka ta jest odpowiedzialna .in.. za regulację następujących białek – RhoA, FAK oraz ITGA5 (Tabela 7).

Tabela 7 Częsteczki docelowe regulowane przez cząsteczkę miR-31-5p w różnych typach nowotworów.

Gen docelowy	Funkcja	Nowotwór	Odniesienie
ATN1	ujemna regulacja transkrypcji	rak okrężnicy	148
CCL5	cytokina	fibroblaasty związane z rakiem jajnika	149
CEBPA	czynnik transkrypcyjny	rak jajnika	116
DACT3	ujemna regulacja szlaku Wnt	rak płuc	150
DKK1	ujemna regulacja szlaku Wnt	rak płuc	150
E2F1	czynnik transkrypcyjny	rak prostaty	106
E2F2	czynnik transkrypcyjny	rak jajnika	116
E2F2	czynnik transkrypcyjny	rak prostaty	106
E2F6	czynnik transkrypcyjny	rak prostaty	110
EXO1	egzonukleaza	rak prostaty	106
EZH2	ujemna regulacja transkrypcji	czerniak	101
FAT4	transdukcja sygnału	mięsak Kaposiego	151
FIH4	hipoksja	rak głowy i szyi	142
FOXM1	czynnik transkrypcyjny	rak prostaty	106
ITGA2	adhezja komórkowa	rak piersi	152
ITGA5	adhezja komórkowa	rak piersi	152
ITGAV	adhezja komórkowa	rak piersi	152
ITGA3	adhezja komórkowa	rak piersi	152
LATS2	kinaza serynowo-treoninowa	rak płuc	139
MAP3KI4	kinaza białkowa	białaczka	104
MCM2	replikacja DNA	rak prostaty	106
MLHI	naprawa DNA	rak przełyku	111
MLHI	naprawa DNA	rak płuc	153
MMS19	naprawa DNA	rak przełyku	111
PARP1	transferaza poly-ADP, modyfikacja białek	rak przełyku	111
PPP2R2A	podjednostka fosfatazy serynowo-treoninowej	rak płuc	139
RASA1	aktywacja GTP-azy	rak okrężnicy	128
RDX	reorganizacja cytoszkieletu	glejak	154
RHOA	GTP-aza	rak jamy ustnej	155
RHOBTBI	GTP-aza	rak okrężnicy	156
SATB2	regulacja transkrypcji, remodelowanie chromatyny	fibroblasty związane z rakiem endometrium	157
SLC26A3	białko transbłonowe, transport jonowy	rak okrężnicy	148
SMUG1	naprawa DNA	rak przełyku	111
STK40	kinaza serynowo-treoninowa	rak jajnika	116
TIAM	aktywacja GTP-azy	rak okrężnicy	129
WAVE3	reorganizacja cytoszkieletu	rak piersi	158
PTK2 (FAK)	adhezja komórkowa	rak płuc	159

Białko RhoA należy do rozległej nadrodziny Ras, które jako GTP-azy przemieszczają się pomiędzy nieaktywnymi formami związanymi z GDP i aktywnymi związkami z GTP. Ta dynamiczna forma pozwala tym białkom działać jako przełączniki molekularne po aktywacji przez receptory obecne na powierzchni komórki, co prowadzi do aktywacji transkrypcji, reorganizacji cytoszkieletu i migracji komórek. Białko to jest zaangażowane w kontrolę kilku krytycznych funkcji komórkowych, w tym regulacji cytoszkieletu aktynowego, onkogenezy, przeżycia, inwazji, migracji i przerzutowania oraz pośredniczy w regulacji adhezji komórkowej, ponieważ oddziałuje z różnymi regulatorami i efektorami, które modulują jego aktywność. Autorzy wielu prac pokazują, że aktywność białka RhoA jest rozregulowana w wielu nowotworach, co więcej białko to jest zaangażowane we wszystkie etapy rozwoju nowotworu¹⁶⁰. Nadekspresja RhoA w raku gruczołu sutkowego jest skorelowana ze wzrostem proliferacji, inwazji i rozwojem angiogenezy. Okazuje się, że wyciszenie białka RhoA przy użyciu siRNA powodowało zahamowanie wzrostu komórek i rozwoju angiogenezy w ludzkiej linii komórkowej raka gruczołu sutkowego – MDA-MB-231^{161,162}. Ponadto nadekspresję białka RhoA obserwuje się również w tkankach i liniach komórkowych raka żołądka, co więcej ma ono kluczowe znaczenie dla przejścia komórek w fazę G1-S cyklu komórkowego¹⁶³. W badaniach Korourian i wsp. zbadano korelację miR-31-5p oraz białka RhoA. Badania wykazały, że ekspresja cząsteczki miR-31-5p jest obniżona w liniach komórkowych raka żołądka w porównaniu do tkanek nieobjętych nowotworem. Co więcej miR-31-5p oddziałuje z końcem 3'UTR genu RhoA, hamując jego ekspresję, co skutkuje obniżeniem ekspresji białka ROCK, która w efekcie przyczynia się do akumulacji fosforylowanego lekkiego łańcucha miozyny, prowadząc do zahamowania inwazji komórek raka żołądka¹⁶⁴. Z uwagi na to, że oba białka ulegają ekspresji w wielu nowotworach złośliwych i indukują proces nowotworzenia, dlatego miR-31-5p może zapobiegać rozprzestrzenianiu się komórek raka żołądka przynajmniej częściowo poprzez regulację szlaku RhoA/ROCK. W przypadku raka przetyku, w badaniach Chang i wsp. nadekspresja miR-31-5p (zarówno nici pasażerskiej jak i wiodącej) przyczyniała się do obniżenia poziomu białka RhoA, co więcej promowała rozwój onkogenezy¹⁵⁵. Regulacja procesu adhezji komórkowej oraz tworzenie ognisk adhezji (miejsca przyczepu komórki do ECM) są zależne od aktywności białka RhoA i jednoczesnego wyciszenia aktywności białka Rac1. Aktywacja RhoGTP-az w sygnalizacji adhezji komórkowej jest powiązana z aktywacją integryn, kompleksu białek FAK-Src oraz samych GTP-az z rodziny Rho^{165,166}.

Adhezja komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej jest ważnym ogniwem procesu przeżycia komórek. W przypadku gdy komórka nie otrzymuje sygnału do adhezji ulega apoptozie z powodu braku przylegania (anoikis). Aktywność kinazy adhezji ogniskowej FAK (ang. focal adhesion kinase) jest niezbędna dla przetrwania komórki, ponieważ powoduje odporność na anoikis. Co więcej wzrost fosforylacji tego białka zaobserwowano w miejscach kontaktów ogniskowych^{167,168}. Wspomniane białko FAK jest niereceptorową białkową kinazą tyrozynową, która pośredniczy w sygnalizacji zależnej od czynnika wzrostu i adhezji przez kilka dalszych szlaków sygnałowych prowadzących do migracji komórek, inwazji, progresji cyklu komórkowego i przeżycia, zarówno podczas rozwoju jak i progresji nowotworu. Ludzki gen kodujący FAK, nazywany *PTK2*, znajduje się na chromosomie 8 *locus* q24.3 i jest wysoce konserwatywny z ponad 90% identycznością sekwencji aminokwasów u różnych gatunków, w tym człowieka, myszy, kury domowej i żaby szponiastej (*Xenopus*). Aktywowany szlak sygnałowy FAK-Src promuje ruchliwość komórek, progresję cyklu komórkowego i przeżycie komórek, prowadząc do wzrostu guza i przerzutów. Na przykład szlak sygnałowy Src-FAK sprzyja internalizacji E-kadheryny podczas progresji raka, ułatwiając w ten sposób przejście EMT i zwiększając ruchliwość komórek nowotworowych. Chociaż nie wykazano, że sam FAK jest onkogenem, opisywano nadekspresję i aktywację FAK w guzach inwazyjnych i przerzutowych, w tym tarczycy, prostaty, raka jelita grubego i jajnika, a także międzybłoniaka złośliwego¹⁶⁹. Co więcej kluczową funkcją białka FAK jest przekazywanie sygnału pochodzącego z receptorów integrynowych, biorących udział w adhezji, do wewnątrzkomórkowej kaskady białek^{170,171}, dlatego białko FAK pełni ważną rolę w regulacji integryn. Integryny są zbudowane z podjednostek α oraz β , są również niereceptorowymi kinazami, które do transdukcji sygnału potrzebują partnera kinazy. Takim partnerem okazuje się być białko FAK, którego rekrutacja wpływa na regulację wewnątrzkomórkowej sygnalizacji w której pośredniczą integryny¹⁷². Ludzkie integryny są heterodimerami utworzonymi z dwóch podjednostek: α i β . Znane są 24 podjednostki α oraz 9 podjednostek β . Co więcej ekspresja integryn jest różna w zależności od typu komórek oraz rodzaju tkanki. Integryna α_5 heterodimeryzuje z integryną β_1 tworząc receptor specyficzny dla fibronektyny - $\alpha_5\beta_1$ ¹⁷³, podczas gdy $\alpha_5\beta_3$ wiąże szeroką gamę białek włóknistych, takich jak fibronektyna, fibrynogen i witronektyna. Podczas progresji nowotworu i przerzutowania, profile ekspresji integryn są zmieniane w sposób, który nasila inwazję i migrację komórek. Ponadto integryny sprzyjają inwazji i przerzutom raka poprzez interakcje z innymi typami komórek, takimi jak komórki śródbłonna i fibroblasty w mikrośrodowisku guza¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. W raku gruczołu sutkowego integryna

α_5 (kodowana przez gen ITGA5) pośredniczy w procesie adhezji komórek nowotworowych, w migracji kierunkowej wzdłuż fibronektyny regulowanej przez macierz zewnątrzkomórkową oraz w przeżywalności komórek nowotworowych *in vitro*^{173,177-180}. ITGA5 – pośredniczy również w przerzutowaniu do płuc w mysich modelach zwierzęcych raka gruczołu sutkowego^{181,182}. Co więcej w pracy Deng'a i wsp. dowiedziono, że nadekspresja białka ITGA5 promuje proliferację, migrację, inwazję i progresję raka płaskonabłonkowego jamy ustnej poprzez inicjację procesu EMT¹⁷⁶. Integryny mogą również wpływać na regulację następujących szlaków sygnałowych – PI3K/AKT, MAPK/ERK, JNK oraz SAPKs¹⁸³. Jak się okazuje miR-31-5p w raku gruczołu sutkowego został zidentyfikowany jako główny regulator ekspresji integryn. Co więcej eksperymenty wykonane na liniach komórkowych raka gruczołu sutkowego i raka prostaty wykazały, że miR-31-5p może bezpośrednio regulować integrynę α_2 , α_5 , α_v i β_3 , a pośrednio regulować podjednostkę β_1 . Co więcej obniżenie ekspresji integryny α_5 w wyniku indukowanej nadekspresji miR-31-5p, hamuje rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych¹⁵². Podobny efekt obserwuje się w raku żołądka – tam cząsteczka miR-31-5p, prowadzi do obniżenia ekspresji integryny α_5 za pośrednictwem szlaku sygnałowego PI3K/AKT, przyczyniając się do zahamowania inwazji i migracji komórek nowotworowych¹²¹.

miR-147-3p

Gen dla cząsteczki miR-147 znajduje się na chromosomie 15 *locus* q21.1, jest zaangażowany w potranskrypcyjną regulację ekspresji genów, wpływając zarówno na stabilność jak i translację docelowych cząsteczek mRNA. Ludzkim homologiem mysiej cząsteczki miR-147-3p jest miR-147b (*hsa-miR-147b*)¹⁸⁴. Nieprawidłowości w ekspresji miR-147 obserwuje się w wielu nowotworach, dlatego cząsteczka ta może pełnić ważną rolę w procesie nowotworzenia¹⁸⁵. Jak się okazuje cząsteczka ta może pełnić różną rolę zarówno onkogenną jak i supresorową w zależności od danego typu nowotworu. Podwyższony poziom ekspresji tej cząsteczki zaobserwowano w raku żołądka¹⁸⁶ i wątroby¹⁸⁷, natomiast obniżony w raku gruczołu sutkowego¹⁸⁸ i płuc¹⁸⁹. Lee i wsp. odkryli, że ekspresja miR-147b indukowała proces MET oraz zatrzymanie cyklu komórkowego w komórkach raka okrężnicy i płuc¹⁹⁰. Ponadto stwierdzono, że ekspresja cząsteczki miR-147b ma podobną aktywność funkcjonalną do cząsteczki miR-201, który bierze udział w rozwoju niewydolności serca¹⁹¹. Co więcej w badaniach Xu i wsp. dowiedziono, że ekspresja cząsteczki miR-147b jest znacznie podwyższona u pacjentów z miażdżycą¹⁹². W innych badaniach przeprowadzonych przez Zhang i wsp. dowiedziono, że miR-147 inicjuje odwracalny stan tolerancji na ozymertynib - inhibitor receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. epidermal growth factor receptor) w niedrobnokomórkowym raku płuca. Dzięki analizie miRNA-seq stwierdzono, że nadekspresja miR-147 występuje w komórkach raka płuc tolerujących ozymertynib oraz w komórkach raka płuc z mutacją genu EGFR^{189,193}. Przeprowadzone badania w raku żołądka wykazały wzrost ekspresji miR-147, zarówno w tkance guza jak i w ludzkich liniach komórkowych. Co więcej wyciszenie wspomnianej cząsteczki mikroRNA powodowało obniżenie proliferacji komórek raka żołądka *in vitro*. Dowiedziono, że obniżenie ekspresji miR-147 w komórkach raka żołądka *in vitro* prowadzi do wzrostu chemowrażliwości na 5-fluorouracyl (5-FU)¹⁸⁶. W raku gruczołu sutkowego miR-147 obniża proliferację komórek *in vitro* poprzez regulację szlaku sygnałowego AKT/mTOR¹⁸⁸.

miR-223-3p

Gen kodujący cząsteczkę miR-223 jest transkrybowany z niezależnego promotora. Promotor ten wykazuje charakterystyczny wzór ekspresji w układzie krwiotwórczym^{184,194,195}. W przypadku cząsteczki miR-223-3p, jej ekspresja jest również zależna od badanego typu nowotworu. Na przykład, wysoki poziom ekspresji obserwuje się w raku prostaty¹⁹⁶ a obniżony w raku wątroby¹⁹⁷. Wysoki poziom ekspresji obserwuje się w komórkach linii mieloidalnej, przy czym najwyższy poziom ekspresji cząsteczki miR-223 obserwowany jest w granulocytach¹⁹⁸. Ponadto, zaobserwowano, że poziom ekspresji miR-223 wzrasta pod wpływem indukowanego kwasem retinowym (RA, ang. retinoic acid) różnicowania komórek białaczki promielocytowej NB4 i HL-60, a także w komórkach pierwotnych białaczki. Jest to spowodowane indukcją ekspresji genu miR-223 przez mieloidalne czynniki transkrypcyjne PU.1 i C/EBP β – białko wiążące się z sekwencją CCAAT^{199,200}. Co więcej czynnik transkrypcyjny I-A (NFI-A, ang. nuclear factor I-A) może odpowiadać za utrzymanie niższych poziomów ekspresji miR-223 i stabilizować niezróżnicowany stan komórek prekursorowych, ponieważ konkuruje o wiązanie z czynnikiem transkrypcyjnym C/EBP α – silnym induktorem transkrypcji miR-223^{199,201}. Nadekspresję cząsteczki miR-223-3p zaobserwowano podczas procesu granulopoezy. Jest ona koordynowana przez działanie różnych mieloidalnych czynników transkrypcyjnych. Znaczenie cząsteczki miR-223 w procesie różnicowania szpiku kostnego wykazano również wykonując badania z użyciem antagomiRa miR-223, zahamowanie miR-223 niweluje indukowane przez czynnik GM-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów) różnicowanie monocytów oraz niweluje indukowane przez ester forbolu (PMA, ang. phorbol 12-myristate 13 acetate) różnicowanie komórek THP-1. Co więcej badania wykazały, że mikropęcherzyki zawierające cząsteczkę miR-223, wydzielane przez zróżnicowane makrofagi są wystarczające do indukowania różnicowania monocytów²⁰².

Oprócz poznanej funkcji miR-223-3p w komórkach układu hematopoetycznego, coraz więcej badań wskazuje na istotną rolę wspomnianej cząsteczki mikroRNA w niehematologicznych nowotworach złośliwych. Zaobserwowano, że w przerzutującym raku jajnika wykryto wyższy poziom miR-223-3p niż w pierwotnym raku jajnika²⁰³. Wykazano również, że poziom ekspresji miR-223-3p jest podwyższony w przerzutującym raku żołądka co sprzyja inwazji i przerzutom wywołanym przez czynnik transkrypcyjny Twist. Nadekspresja miR-223-3p w komórkach raka żołądka sprzyja inwazji, podczas gdy wyciszenie miR-223-3p

powodowało zahamowanie inwazji komórek *in vitro* i *in vivo*²⁰⁴. Dodatkowo zbadano funkcję miR-223-3p w raku prostaty. Nadekspresja miR-223-3p w liniach komórkowych raka prostaty sprzyjała proliferacji, hamowała apoptozę i promowała inwazję komórek. W pracy Wei i wsp. dowiedziono, że cząsteczka miR-223 odpowiada za regulację białka Septin 6 (SEPT6). Wykazano, że nadekspresja białka SEPT6 w komórkach raka prostaty osłabiała proliferację i inwazję komórek²⁰⁵. Oprócz udziału w promowaniu inwazji i proliferacji komórek rakowych, miR-223-3p pełni również funkcje supresyjne w nowotworach. W raku wątroby (HCC) miR-223-3p ulegał represji w liniach komórkowych i guzach HCC w porównaniu z prawidłową, nieobjętą rakiem, tkanką wątroby. Nadekspresja miR-223-3p w komórkach Hep3B, HKCL i HKCL-C3 powodowała obniżenie żywotności komórek w wyniku bezpośredniej regulacji białka statminy 1 (STMN1, ang. Stathmin 1)¹⁹⁷. Funkcja cząsteczki miR-223-3p w regulacji cyklu komórkowego została potwierdzona w modelu z nadekspresją miR-223-3p w komórkach HeLa. Nadekspresja miR-223-3p skutkowała obniżeniem proliferacji komórek względem komórek niemodyfikowanych *in vitro* oraz *in vivo* w modelu myszy szczepu nude. Supresja ta może być spowodowana obniżeniem ekspresji receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF1R, ang. insulin-like growth factor 1 receptor) oraz sygnalizacji AKT/mTOR/p70S6K regulowanych przez cząsteczkę miR-223-3p, co również zaobserwowano w białaczkach i liniach komórkowych raka wątroby²⁰⁶.

Masciarelli i wsp. wykazali, że zmutowane białko p53 powoduje represję promotora miR-223 we współpracy z czynnikiem transkrypcyjnym ZEB1 w liniach komórkowych raka okrężnicy i raka gruczołu sutkowego. Może to odgrywać ważną rolę w lekooporności, ponieważ egzogenna ekspresja miR-223 zwiększa wrażliwość na czynniki uszkadzające DNA. Autorzy przypisali ten efekt białku STMN1, regulowanemu przez miR-223, ponieważ knockdown tego białka za pośrednictwem siRNA ma taki sam efekt jak nadekspresja miR-223. Zatem zmutowane białko p53 powoduje obniżenie ekspresji miR-223, co z kolei prowadzi do nadekspresji STMN1 i zwiększonej chemooporności²⁰⁷. Dodatkowo w badaniach Sun i wsp. dowiedziono, że miR-223-3p zwiększa wrażliwość nowotworowych komórek macierzystych raka gruczołu sutkowego na ligand indukujący apoptozę związany z TNF (ang. TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRIAL) poprzez regulację białka HAX-1²⁰⁸

II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Obecnie jedną z największych przeszkód w diagnozowaniu przerzutującego raka gruczołu sutkowego jest brak czułych i specyficznych biomarkerów, które pozwoliłyby na rozpoznanie przerzutów na wczesnym etapie ich powstawania. Aktualnie stosowane markery w rozpoznawaniu raka gruczołu sutkowego (ER, PR, HER2, Ki67, p53) są oznaczane w materiale pooperacyjnym, dlatego wymagają ingerencji chirurgicznej. Naukowcy dużą uwagę skupiają wokół badań nad cząsteczkami mikroRNA, ponieważ właśnie one mogą okazać się doskonałym narzędziem do rozpoznawania przerzutującego raka gruczołu sutkowego. Cząsteczki te można łatwo oznaczyć i pozyskać z takich tkanek jak: krew (osocze), ślina czy płwocina. Dodatkowo biorą one udział w kluczowych procesach takich jak: apoptoza, proliferacja czy różnicowanie komórek. Nieprawidłowości w ekspresji tych cząsteczek mogą być przyczyną wielu chorób, w tym nowotworów^{84,85}. Dlatego głównym celem badań było poszukiwanie cząsteczki mikroRNA, która pozwalałaby na rozpoznanie ludzkiego przerzutującego raka gruczołu sutkowego. Wstępne badania przesiewowe wykonano na dwóch modelach mysiego raka gruczołu sutkowego – nieprzerzutującego 67NR oraz przerzutującego 4T1. Poniżej przedstawiono pozostałe pośrednie cele badań:

- zbadanie poziomu ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA – miR-31-5p, miR-147-3p oraz miR-223-3p w komórkach ludzkich i mysich linii raka gruczołu sutkowego oróżnych podtypach molekularnych;
- zbadanie poziomu ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA – miR-31-5p, miR-147-3p oraz miR-223-3p w tkankach uzyskanych od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego;
- ocena wpływu miR-31-5p na adhezję komórkową oraz ocena poziomu ekspresji białek docelowych dla miR-31-5p w komórkach linii ludzkiego raka gruczołu sutkowego po wyciszeniu lub nadekspresji miR-31-5p;
- ocena poziomu ekspresji markerów charakterystycznych dla przejścia nabłonkowo mezenchymalnego (E-kadheryna, N-kadheryna) w komórkach linii ludzkiego raka gruczołu sutkowego.

III. MATERIAŁY I METODY

3.1 Hodowle komórkowe

Charakterystyka wybranych linii komórkowych raka gruczołu sutkowego wykorzystywanych do przeprowadzenia badań została przedstawiona w tabeli 8 oraz 9. Charakterystykę linii ludzkich uzupełniono dodatkowo o podtyp molekularny nowotworu piersi.

a) Ludzkie linie komórkowe raka gruczołu sutkowego

Tabela 8 Charakterystyka linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego pod względem obecności poszczególnych markerów.

Linia komórkowa	ER	PR	HER2+	Ki67	Podtyp	BRCA1	p53*	Referencje
BT-474	+	+/-	+	wysoka	luminalny B	WT	MUT	209,210,211
SKBR-3	-	-	+	wysoka	HER2+	WT	MUT	209
MCF-7	+	+/-	-	niska	luminalny A	WT	WT	209
MDA-MB-231	-	-	-	wysoka	TNB - claudin low	WT	MUT	209
MDA-MB-468	-	-	-	wysoka	TNB - bazalny	WT	MUT	209
JIMT-1	-	-	+	wysoka	HER2+	WT	MUT	209,210,212
T47D	+	+/-	-	niska	luminalny A	WT	MUT	209
MCF10A	Spontanicznie unieśmiertelniona linia komórkowa wyprowadzona z prawidłowego nabłonka gruczołu sutkowego. Nie jest tumorigenna i nie wykazuje ekspresji receptora estrogenowego (ER α). Jest szeroko wykorzystywana jako model do badań <i>in vitro</i> , m.in. do badania funkcji i zmian prawidłowej tkanki piersi ²¹³ .							

*dane dotyczące statusu białka p53 w ludzkich liniach komórkowych raka gruczołu sutkowego uzyskano z bazy danych IARC (ang. International Agency for Research on Cancer).

b) Mysie linie komórkowe raka gruczołu sutkowego

Tabela 9 Charakterystyka mysich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego

Lp.	Symbol linii komórkowej,	Charakterystyka linii komórkowych
1.	Eph4 Ev ATCC	Linia komórkowa uzyskana w wyniku transfekcji linii rodzicielskiej Eph4 - mysiej linii komórek sutka z pustym wektorem ekspresyjnym niosącym gen oporności na puromycynę. Morfologiczne i funkcjonalne cechy komórek linii Eph4 Ev, typowe dla prawidłowych komórek nabłonkowych sutka ²¹⁴ .
2.	168 FARN	Linia komórkowa 168 FARN, po ortotopowym wszczepieniu myszom szczepu BALB/c, linia ta przerzutuje do węzłów chłonnych, nie zaś do krwi i narządów odległych ²¹⁵⁻²¹⁷ .
3.	B-MEKDD 116	Linia komórkowa uzyskana w wyniku transfekcji wektorem zawierającym mutantą MEK1 miejsca fosforylacji znakowanego epitemem Glu-Glu (MEKDD), rodzicielskiej linii Eph4 Ev. Cechują ją tumorogenność i dlatego może być wykorzystana w badaniach <i>in vivo</i> jako model mysiego nowotworu piersi ²¹⁸ .
4.	NF 639	Linia komórkowa uzyskana z guza nowotworowego myszy transgenicznym (transgen: MMTV-c-neu). Linię cechuje nadekspresja EGFR2/HER2/ErbB2/neu związana ze znacznym wzrostem aktywności kinazy Erk/MAPK w nowotworze piersi ²¹⁹ .
5.	67NR	Linia 67NR nie przerzutuje po ortotopowym wszczepieniu myszom szczepu BALB/c ²²⁰ .
6.	4T1	Linia komórkowa mysiego raka gruczołu sutkowego początkowo wyizolowana przez Freuda Millera i współpracowników w Instytucie Karmana. Jest szeroko wykorzystywana w laboratoriach badawczych jako model do badań <i>in vivo</i> , z powodu wysokiej zdolności do przerzutowania do kości i innych tkanek/narządów np. płuc, wątroby, mózgu. Linia ta stanowi doskonały model badawczy dla zaawansowanego raka gruczołu sutkowego po ortotopowym podaniu myszom ²²⁰ .
7. 8	EO771 EO771.LMB	Linie komórkową EO771 wyizolowano ze spontanicznie rosnącego guza raka gruczołu sutkowego u myszy szczepu C57BL/6. Rodzicielska linia EO771 z wczesnego pasażu została poddana transdukcji wektorem pMSCV (Murine Stem Cell Virus) - retrowirusowy wektor wykazujący ekspresję m_Cherry (czerwonego białka fluorescencji). Linie EO771.LMB wyprowadzono z przerzutu do płuc raka sutka wywołanego podaniem linii rodzicielskiej (EO771). Generalnie, z płuc pobranych od myszy zaszczepionych transdukowanymi komórkami linii EO771 wyodrębniono w trakcie sortowania cytometrycznego populację m_Cherry +, którą następnie ortotopowo wszczepiono myszom szczepu C57BL/6. Z widocznych w płucach przerzutów wyprowadzono następnie linię EO771.LMB ^{221,222} .
9. 10. 11.	Eph4 1424 Eph4 1424.1 Eph4 1424.2	Linie komórkową Eph4 1424 i jej podtypy wyizolowano ze szczepu myszy BALB/c, ortotopowo zaszczepionych komórkami linii Eph4, transfekowanych wektorem wykazującym ekspresję mutantą MEK1 w miejscu fosforylacji Glu-Glu znakowanym epitemem (MEKDD). Wszystkie podtypy linii Eph4 1424 charakteryzują się tumorogennością i mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako model w badaniach <i>in vivo</i> ^{223,224} .

Wykorzystane w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej linie komórkowe pochodzą z jednego z trzech banków komórkowych: Europejskiej Kolekcji Zatwierdzonych Hodowli Komórkowych (ECACC, ang. European Collection of Authenticated Cell Culture), z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ATCC, ang. American Type Culture Collection) oraz z Niemieckiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (DSMZ, ang. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Linię komórkową 67NR otrzymano z Karmanos Cancer Institute (Stany Zjednoczone) a linie EO771 i EO771.LMB z QIMR Berghofer Medical Research Institute (Australia). Komórki hodowano w inkubatorze zapewniając standardowe warunki (5% dwutlenku węgla (CO₂), 37°C oraz 95% wilgotności powietrza). Szczegółowy skład mediów hodowlanych dedykowanych dla badanych linii komórkowych przedstawiono w tabeli 10 oraz 11.

Tabela 10 Skład mediów hodowlanych dla komórek poszczególnych ludzkich linii raka gruczołu sutkowego wykorzystywanych w badaniach in vitro.

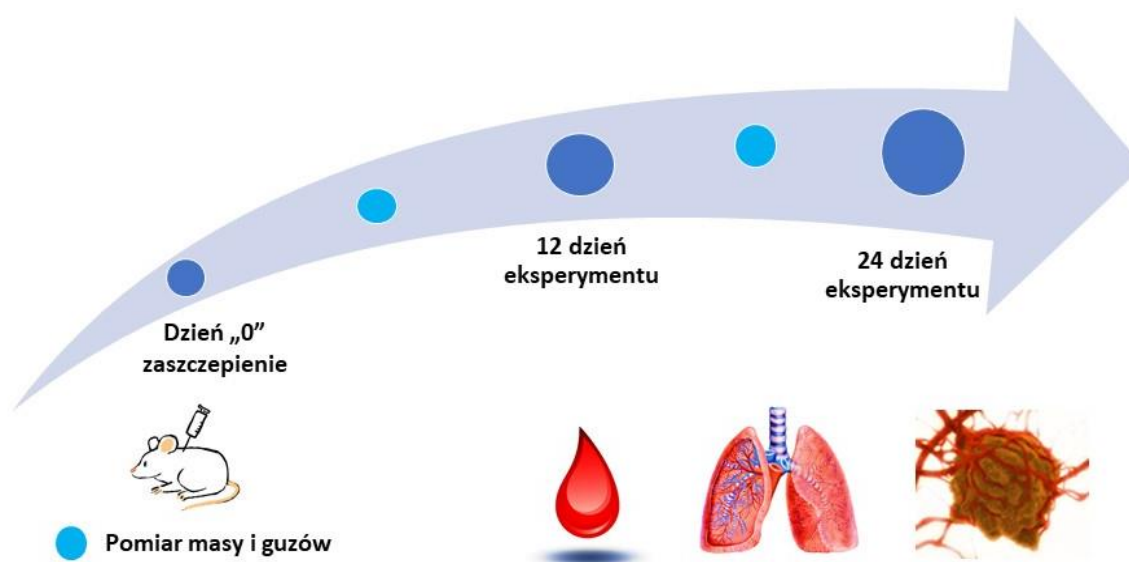
Lp.	Symbol linii komórkowej	Skład medium hodowlanego
1	MCF 10A, ATCC	Medium Ham's F12 (ang. Ham's F12 Medium, Corning, Nowy Jork, Stany Zjednoczone), Surowica końska, (ang. Horse Serum, HS, Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), insulina 10 µg/ml (Merck, Darmstadt, Niemcy), streptomycyna 0,1 mg/ml i penicylina 100 U/ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska), nabłonkowy czynnik wzrostu 20 ng/ml, (ang. Epidermal Growth Factor, EGF, Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), hydrokortyzon 0,5 µg/ml (Merck, Darmstadt, Niemcy), toksyna cholery 0,05 µg/ml (Merck, Darmstadt, Niemcy)
2	BT-474, ATCC	Medium HybriCare (ang. HybriCare Medium, Manassas, Wirginia, Stany Zjednoczone), Płodowa surowica bydlęca 10% (ang. Fetal Bovine Serum, FBS, Merck, Darmstadt, Niemcy), streptomycyna 0,1 mg/ml i penicylina 100 U/ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)
3	SKBR-3, ATCC MCF-7, EACC	Płyn Eagle'a (PChO IITD PAN Wrocław, Polska), Płodowa surowica bydlęca 10%, (ang. Fetal Bovine Serum, FBS, Merck, Darmstadt, Niemcy), L-glutamina 2mM (Merck, Darmstadt, Niemcy), aminokwasy 1% (Merck, Darmstadt, Niemcy), insulina 8 µg/ml (Merck, Darmstadt, Niemcy), streptomycyna 0,1 mg/ml i penicylina 100 U/ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)
4	MDA-MB-231, ATCC	Płyn RPMI 1640 (PChO, IITD PAN Wrocław, Polska), Płodowa surowica bydlęca 10% (ang. Fetal Bovine Serum, FBS, Merck, Darmstadt, Niemcy), L-glutamina 2 mM (Merck, Darmstadt, Niemcy), streptomycyna 0,1 mg/ml i penicylina 100 U/ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)
5	MDA-MB-468, ATCC	RPMI + G.MAX (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), Płodowa surowica bydlęca 20%, (ang. Fetal Bovine Serum, FBS, Merck, Darmstadt, Niemcy), streptomycyna 0,1 mg/ml i penicylina 100 U/ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)
6	JIMT-1, DSMZ	Płyn Dulbecco (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), Płodowa surowica bydlęca 10%, (ang. Fetal Bovine Serum, FBS HyClone, GE Healthacre, Chicago, Illinois, Stany Zjednoczone), L-Glutamina 2 mM (Merck, Darmstadt, Niemcy), streptomycyna 0,1 mg/ml i penicylina 100 U/ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)
7	T47D, EACC	OptiMEM, RPMI 1640 + HEPES (PChO, IITD PAN, Wrocław, Polska), Płodowa Surowica Bydlęca 5%, (ang. Fetal Bovine Serum, FBS HyClone, GE Healthacre, Chicago, Illinois, Stany Zjednoczone), insulina 8 µg/ml (Merck, Darmstadt, Niemcy), streptomycyna 0,1 mg/ml i penicylina 100 U/ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)

Tabela 11 Skład mediów hodowlanych dla komórek poszczególnych mysich linii raka gruczołu sutkowego.

Lp.	Symbol linii komórkowej	Skład medium hodowlanego
1.	Eph4 Ev, ATCC	Płyn Dulbecco (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), Płodowa surowica cielęca 10%, (ang. Calf Bovine Serum, CBS, ATCC, Manassas, Stany Zjednoczone), L-Glutamina 4 mM (Merck, Darmstadt, Niemcy), puromycyna 1,2 µg/ml (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), streptomycyna 0,1 mg/ml i penicylina 100 U/ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)
2.	168 FARN, ATCC	Płyn Dulbecco (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), Płodowa surowica cielęca 10%, (ang. Calf Bovine Serum, CBS, ATCC, Manassas, Wirginia, Stany Zjednoczone), L-Glutamina 2 mM (Merck, Darmstadt, Niemcy), aminokwasy 1% (Merck, Darmstadt, Niemcy), streptomycyna 0,1 mg/ml i penicylina 100 U/ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)
3.	B-MEKDD 116, ATCC	Płyn Dulbecco (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), Płodowa surowica cielęca 10%, (ang. Calf Bovine Serum, CBS, ATCC, Manassas, Wirginia, Stany Zjednoczone), gentamycyna 200 µg/ml (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), streptomycyna 0,1 mg/ml i penicylina 100 U/ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)
4.	NF 639, ATCC	Płyn Dulbecco (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), Płodowa surowica cielęca 10%, (ang. Calf Bovine Serum, CBS, ATCC, Manassas, Wirginia, Stany Zjednoczone), L-Glutamina 4 mM (Merck, Darmstadt, Niemcy), streptomycyna 0,1 mg/ml i penicylina 100 U/ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)
5.	67NR, Karmanos Cancer Institute	Płyn Dulbecco (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), Płodowa surowica cielęca 10%, CBS, ATCC, Manassas, Wirginia, Stany Zjednoczone), L-Glutamina 2 mM (Merck, Darmstadt, Niemcy), aminokwasy 1% (Merck, Darmstadt, Niemcy), streptomycyna 0,1 mg/ml i penicylina 100 U/ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska).
6.	4T1, ATCC	RPMI G.MAX (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), Płodowa surowica bydlęca 10%, (ang. Fetal Bovine Serum, FBS, Merck, Darmstadt, Niemcy), glukoza 3,5 g/L (Merck, Darmstadt, Niemcy), streptomycyna 0,1 mg/ml i penicylina 100 U/ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)
7.	E0771 E0771.LMB, QIMR Berghofer Medical Research Institute	Płyn Dulbecco (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), Płodowa surowica bydlęca 10%, (ang. Fetal Bovine Serum, FBS, GE Healthacre, Chicago, Illinois, Stany Zjednoczone), L-Glutamina 2 mM (Merck, Darmstadt, Niemcy), imipenem 2,5 µg/ml (Fresenius Kabi, Bad Hamburg, Hessen, Niemcy)
8.	Eph4 1424, ATCC Eph4 1424.1, ATCC Eph4 1424.2, ATCC	Płyn Dulbecco (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), Płodowa surowica cielęca 10%, (ang. Calf Bovine Serum, CBS, ATCC, Manassas, Wirginia, Stany Zjednoczone), gentamycyna 200 µg/ml (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), streptomycyna 0,1 mg/ml i penicylina 100 U/ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)

3.2 Eksperyment *in vivo*

Eksperyment *in vivo* został przeprowadzony na 6 tygodniowych myszach (ok. 20 g) szczepu BALB/c w oparciu o zaopiniowany pozytywnie przez LKE (Lokalną Komisję Etyczną do spraw Doświadczeń na Zwierzętach) we Wrocławiu wniosek o numerze 44/2016. Wszystkie doświadczenia wykonano zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej nr 2010/63 w sprawie wykorzystywania zwierząt do celów naukowych. Myszy pozyskano z Zakładu Zwierząt Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Myszy utrzymywano w warunkach 12-godzinnej cyklu dzień/noc z nieograniczonym dostępem do jedzenia i wody pitnej. Do przeprowadzenia eksperymentów wykorzystano dwa modele mysiego raka gruczołu sutkowego – model nieprzerzutujący (67NR) oraz jego przerzutujący odpowiednik (4T1). W toku prowadzonych doświadczeń myszy zaszczepiono ortotopowo, w podściółkę tłuszczową drugiego sutka, komórkami z hodowli *in vitro* (dzień „0” eksperymentu). Hodowlę komórek zawieszono w płynie Hanksa (PChO,



Rycina 9. Schemat eksperymentu *in vivo*. Eksperyment rozpoczęto od ortotopowego zaszczepienia myszy szczepu BALB/c (dzień „0” eksperymentu). Do badania wykorzystano dwa modele mysiego raka gruczołu sutkowego: model nieprzerzutujący 67NR oraz jego przerzutujący odpowiednik 4T1. Podczas sekcji, które przeprowadzono w 12 oraz 24 dniu eksperymentu pobierano każdorazowo osocze, płuca oraz guz nowotworowy. Pomiędzy sekcjami, w częstotliwości co 2 dni, wykonywano pomiary masy ciała i guzów. Opracowanie własne.

IITD PAN, Wrocław, Polska) i w objętości końcowej 50 μ l w stężeniu 10^5 i 10^4 komórek, odpowiednio dla modelu 67NR oraz 4T1 wszczepiono myszom. Materiał (krew, płuca oraz guz nowotworowy) pobierano każdorazowo podczas sekcji w 12 oraz 24 dniu eksperymentu (Rycina 9). Podczas sekcji w 24 dniu eksperymentu uśmiercono również myszy zdrowe (nieobarczone nowotworem). W celu pobrania krwi do dalszych badań myszom podano podskórnie buprenorfinę w ilości 20 μ l/g masy ciała, igłą o średnicy nieprzekraczającej 25-26

G (KD Medical GmbH Hospital Products, Berlin, Niemcy), po upływie 15 minut, zwierzęta zostały poddane znieczuleniu ogólnemu – wziewnie, za pomocą izofluranu (Baxter, Deerfield, Stany Zjednoczone). Następnie od nieprzytomnych myszy pobrano próbkę krwi obwodowej z zatoki żyłnej oka do probówek zawierających EDTA-EDTA 1000A (KABELABORTECHNIK, Nümbrecht, Niemcy). W toku dalszej procedury - zgodnie z protokołem producenta próbki krwi zarówno mysie jak i ludzkie wirowano przy 1900 x g przez 10' w 4°C. Następnie osocze przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf i wirowano ponownie przy 16 000 x g przez 10' w 4°C w celu usunięcia pozostałości komórek. Uzyskane osocze w objętości 50 µl i 200 µl zawieszono w 5-krotnej objętości 250 µl i 1000 µl (odpowiednio) odczynnika lizującego – QIAzol[®] Lysis Reagent (QIAGEN[®] Hilden, Niemcy) następnie próbki osocza przechowywano w -80°C do dalszych analiz. Różnice w objętości zabezpieczonego osocza wynikają z ograniczonej ilości krwi pełnej uzyskanej od myszy. Po uśmierceniu zwierząt pobrano narządy do dalszych analiz. W płucach policzono przerzuty, w 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1, liczba przerzutów w płucach u myszy, wahała się między 15 a 35, w porównaniu do tkanki płuc zdrowej, nieobjętej nowotworem²²⁵. Fragmenty tkanek – płuc, guza nowotworowego oraz listwy mlecznej zabezpieczono w probówkach zawierających 1 ml odczynnika lizującego - QIAzol[®] Lysis Reagent (QIAGEN[®] Hilden, Niemcy). Następnie próbki poddano homogenizacji przy użyciu homogenizatora. Dokładny opis procedury znajduje się w rozdziale 3.5 a). Kontrolę eksperymentu *in vivo* stanowił materiał pochodzący od zdrowych myszy (nieobarczonych nowotworem) – krew (osocze), płuca oraz fragment listwy mlecznej.

3.3 Badania z udziałem pacjentek

Badania z wykorzystaniem materiału ludzkiego przeprowadzono za zgodą o numerach 71/2017 oraz 286/2017 wydaną przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu oraz po uzyskaniu świadomej zgody chorych na raka piersi. Materiał – krew oraz fragment tkanki wraz z utkaniem nowotworowym potwierdzonym przez patomorfologa – utrwalony w bloczku parafinowym, pobrano od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego leczonych w Dolnośląskim Centrum Onkologii (DCO) we Wrocławiu. Krew pełną pobierano od pacjentek ze zlokalizowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego (50 pacjentek) oraz z rozsianym (przerzutującym) rakiem gruczołu sutkowego (10 pacjentek) z żyły pośrodkowej łokcia do probówek zawierających EDTA-S-Monovette (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Niemcy). W przypadku krwi, kontrolę eksperymentu stanowiła grupa kobiet zdrowych (ochotniczki),

u których wykluczono obecność raka gruczołu sutkowego (7 ochotniczek). Bloczki parafinowe uzyskano łącznie od 36 pacjentek z czego grupę badaną stanowiło 31 pacjentek ze zdiagnozowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego oraz 5 pacjentek z rozsiałym (przerzutującym) rakiem gruczołu sutkowego. Liczba zebranych próbek osocza różni się od liczby zebranych bloczków parafinowych – jeśli guz nie przekraczał 2 cm to rezygnowano z jego pobierania z uwagi na konieczność zabezpieczenia odpowiedniej ilości materiału pooperacyjnego do diagnostycznego badania histopatologicznego. Kontrolę eksperymentu dla tkanki guza stanowiło komercyjnie dostępne spulowane całkowite RNA (Total RNA, BioChain Institute, Newark, Stany Zjednoczone) wyizolowane ze zdrowej tkanki piersi uzyskanej od 5 dawczyń w wieku od 21 do 81 lat.

METODY

3.4 Izolacja całkowitego RNA oraz mikroRNA z osocza

a) Osocze z próbek mysich i ludzkich

Procedurę izolacji mikroRNA oraz całkowitego RNA wykonano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu – miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN®, Hilden, Niemcy) zgodnie z protokołem producenta. Próbkę osocza zarówno mysie jak i ludzkie zabezpieczone w odczynniku lizującym rozmrożono w temperaturze pokojowej (ang. room temperature, RT). Następnie do każdej z nich dodano 3,5 µl miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control - w celu monitorowania ilości wyizolowanego RNA oraz wydajności odwrotnej transkrypcji (QIAGEN®, Hilden, Niemcy). Następnie do próbek osocza dodano chloroformu w celu rozdziału faz w objętości 50 µl i 200 µl (odpowiednio). Próbkę osocza wymieszano przez worteksowanie przez 15'' i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2-3', następnie wirowano je przy 12 000 x g przez 15' w 4°C. Po wirowaniu każda próbka osocza została rozdzielona na trzy fazy: górną - bezbarwną zawierającą RNA, środkową – białą, zawierającą białka oraz dolną – czerwoną warstwę organiczną. Fazę górną zawierającą RNA przeniesiono do probówek typu Eppendorf, następnie dodano 1,5 objętości 100 % etanolu – 225 µl i 900 µl (odpowiednio). Próbkę w objętości 700 µl przeniesiono na kolumnę – RNeasy MinElute spin column, wirowano przy 8000 x g przez 15'' w RT – czynność tą powtórzono wykorzystując pozostałość próbki, przesącz odrzucano. W kolejnym etapie kolumnę płukano buforami: RWT w objętości 700 µl, następnie RPE w objętości 500 µl za każdym razem wirując próbki przy 8000 x g przez 15'' w RT, przesącz odrzucano. Następnie kolumnę płukano 80 % etanolem w objętości 500 µl, przygotowanym w odpowiedniej proporcji z 99,8 % etanolu oraz wody wolnej od RNaz, próbki wirowano przy 8000 x g przez 2' w RT. W celu wysuszenia membrany

próbki wirowano przy największych obrotach przez 5' w RT. Elucję całkowitego RNA oraz mikroRNA przeprowadzono w objętości 14 μ l w wodzie wolnej od RNAz, próbki wirowano przy największych obrotach przez 1' w RT.

3.5 Izolacja mikroRNA oraz całkowitego RNA z tkanek i lizatów komórkowych

a) Przygotowanie lizatów z tkanek pochodzenia mysiego

Uzyskane fragmenty tkanek od myszy (płuca, guz) zawieszono w 1 ml odczynnika lizującego QIAzol[®] (QIAGEN[®], Hilden, Niemcy). Próbkę homogenizowano 2-krotnie przy ustawieniach CY 24x2, 5,5 m/s, t=40s za pomocą homogenizatora FastPrep (MP Biomedicals LLC, Santa Ana, Stany Zjednoczone), następnie zamrożono w -80°C gdzie przechowywano je do dalszych analiz.

b) Przygotowanie lizatów z hodowli komórkowych

Komórki wysiano w ilości 2 mln na szalkę o średnicy 10 cm. Po upływie 48 godzin z szalki usunięto medium hodowlane i komórki płukano przy użyciu 1 ml PBS (PChO IITD PAN Wrocław, Polska). Po odrzuceniu PBS, dodano 1 ml odczynnika lizującego - QIAzol[®] (QIAGEN[®], Hilden, Niemcy) i zebrano komórki przy użyciu skrobaczki, następnie próbki zamrożono w -80°C, gdzie przechowywano je do dalszych analiz.

Izolację mikroRNA oraz całkowitego RNA z tkanek mysich oraz lizatów komórkowych wykonano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu – miRNeasy Mini Kit (QIAGEN[®], Hilden, Niemcy). Lizaty komórkowe oraz tkanki zabezpieczone w odczynniku lizującym rozmrożono w temperaturze pokojowej. Następnie do każdej próbki dodano 200 µl chloroformu (Avantor, Gliwice, Polska). Próbkę energicznie wymieszano przez worteksowanie przez 15'' i inkubowano je przez 2-3' w RT. Po upływie inkubacji próbki wirowano w 4°C przez 15' przy 12 000 x g. Następnie górną – wodną fazę zawierającą RNA przeniesiono do 2 ml probówek typu Eppendorf. Kolejno do każdej próbki dodano 1,5 objętości 100% etanolu (900 µl) (Avantor, Gliwice, Polska). Próbkę w objętości 700 µl przeniesiono na kolumnę – RNeasy Mini spin column, wirowano w RT przy 8000 x g przez 15'', przesącz odrzucono. Czynność tę powtórzono wykorzystując pozostałość próbki, przesącz każdorazowo odrzucano. Następnie kolumnę płukano następującymi buforami: 1-krotnie – RWT oraz 2-krotnie RPE w objętości 700 µl i 500 µl (odpowiednio) każdorazowo odrzucając przesącz. Elucję całkowitego RNA oraz mikroRNA przeprowadzono w objętości 35 µl w wodzie wolnej od RNAz, w tym celu próbki wirowano przez 1' przy 8000 x g w RT.

3.6 Izolacja mikroRNA oraz całkowitego RNA z bloczków parafinowych

Izolację mikroRNA i całkowitego RNA z bloczków parafinowych z utrwalonym fragmentem guza wykonano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu miRNeasy FFPE Kit (QIAGEN[®], Hilden, Niemcy). Fragment tkanki nowotworowej potwierdzony przez patomorfologa pocięto na drobne kawałki przy użyciu skalpela i przeniesiono do 2 ml probówki typu Eppendorf. Następnie dodano 320 µl odczynnika do deparafinizacji – Deparaffinization Solution (QIAGEN[®], Hilden, Niemcy). Inkubowano w temperaturze 56°C przez 3', kolejno próbki schłodzono w temperaturze pokojowej. W kolejnym kroku dodano 240 µl buforu PKD, wymieszano przez worteksowanie. Próbkę zwirowano przez 1' przy 11 000 x g. Następnie do każdej próbki dodano 10 µl proteinazy, próbki wymieszano przez pipetowanie. Inkubowano w 56°C przez 15', następnie w 80°C przez kolejne 15'. Po zakończonej inkubacji dolną jasną fazę przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf inkubowano na lodzie przez 3', następnie wirowano przy 20 000 x g przez 15'. Po odwirowaniu supernatant przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf, dodano 25 µl buforu wzmacniającego DNAzę – DNase Booster Buffer, i 10 µl DNAzy – DNase I stock solution. Inkubowano przez 15' w RT. Po inkubacji do każdej próbki dodano 500 µl buforu RBC, następnie 1750 µl 100% etanolu. 700 µl próbki przeniesiono na RNeasy MinElute spin column, wirowano przy 8000 x g przez 15'', przesącz odrzucano. Czynność tą powtórzono wykorzystując pozostałość próbki. W kolejnych krokach kolumnę płukano 2-krotnie buforem RPE w objętości 500 µl za każdym razem wirując przy 8000 x g przez 15'' następnie przez 2'. W celu wysuszenia membrany próbki wirowano przy największych obrotach przez 5' w RT. Elucję całkowitego RNA oraz mikroRNA przeprowadzono w objętości 14 µl wody wolnej od RNAz, próbki wirowano przy największych obrotach przez 1' w RT.

Pomiar stężenia całkowitego RNA wykonano każdorazowo w spektrofotometrze NanoDrop 2000 UV-Vis, (ThermoFischer Scientific, Wilmington DE, USA).

3.7 Odwrotna transkrypcja

Odwrotną transkrypcję (R-T, ang. Reverse transcription,) wykonano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu miScript II RT Kit (QIAGEN[®], Hilden, Niemcy). Dla próbek z tkanek mysich i lizatów komórkowych odwrotną transkrypcję przeprowadzono w objętości

końcowej 20 μ l, natomiast w przypadku materiału z ograniczoną ilością wyjściowego RNA tj. próbek z osocza i bloczków parafinowych, przed wykonaniem reakcji preamplifikacji (ang. preamplification, PreAMP) reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w połowie objętości końcowej, czyli w 10 μ l. (Tabela 12)

Tabela 12 Mieszaninę reakcyjną do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji przeprowadzono zgodnie z poniższą tabelą.

Nazwa składnika	Objętości dla reakcji R-T	Objętości dla reakcji PreAMP
	Tkanki mysie, lizaty komórkowe	Osocze, bloczki parafinowe
5x miScript HiSpec Buffer	4 μ l	2 μ l
10x miScript Nucleics Mix	2 μ l	1 μ l
RNase free water	zmienna	zmienna
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 μ l	1 μ l
Matryca RNA	150 ng	20 ng
Objętość końcowa	20 μl	10 μl

Odwrotną transkrypcję przeprowadzono w termocyklerze Veritii 9902 (Life Technologies, Carlsbad CA, Stany Zjednoczone) w następujących warunkach:

- ✓ 60' w 37°C
- ✓ 5' w 95°C w celu inaktywacji enzymu.

Próbki po przeprowadzeniu odwrotnej transkrypcji przechowywano w -20°C.

3.8 Preamplifikacja cDNA

Dla próbek z ograniczoną ilością wyjściowego RNA (osocze, bloczki parafinowe) preamplifikację cDNA przeprowadzono po wykonaniu odwrotnej transkrypcji. Wykonano ją przy użyciu zestawu miScript PreAMP PCR Kit (QIAGEN®, Hilden, Niemcy). Uzyskane 10 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej cDNA po odwrotnej transkrypcji rozcieńczono w 40 μ l w wodzie wolnej od RNaz. Mieszaninę reakcyjną do przeprowadzenia preamplifikacji przygotowano zgodnie z poniższą tabelą:

Tabela 13 Mieszaninę reakcyjną do przeprowadzenia reakcji preamplifikacji przygotowano według poniższej tabeli.

Odczynnik	Objętość
5x miScript PreAMP Buffer	5 μ l
HotStarTaq DNA Polymerase	2 μ l
miScript PreAMP Primer Mix	5 μ l
RNase free water	7 μ l
miScript PreAMP Universal Primer	1 μ l
Diluted template cDNA	5 μ l
Całkowita objętość	25 μl

Reakcję preamplifikacji cDNA wykonano w termocyklerze Veriti (Life Technologies, Carlsbad CA, USA) w następujących warunkach:

Etap 1. Inicjacja – wstępna aktywacja polimerazy HotStarTaq DNA

- ✓ 15' w 95°C – 12 cykli

Etap 2: denaturacja, wydłużanie (odpowiednio)

- ✓ 30'' w 94°C
- ✓ 3' w 60°C

3.9 Real-Time PCR

Eksperymenty z wykorzystaniem techniki Real – Time PCR zostały podzielone na dwa etapy:

W pierwszym etapie przeprowadzono badania przesiewowe poziomu ekspresji dojrzałych cząsteczek mikroRNA w materiale uzyskanym od myszy – w osoczu, płucach oraz guzie nowotworowym, przy użyciu komercyjnie dostępnych płytek 96 – dołkowych – Pathway Focused miScript miRNA PCR Array (QIAGEN[®], Hilden, Niemcy) zawierających 84 różne startery dla dojrzałych cząsteczek mikroRNA, obecnych w osoczu lub surowicy, związanych z zaburzeniami układu immunologicznego i uczestniczących w regulacji szlaków związanych z nowotworowymi komórkami macierzystymi. W poniższych tabelach (Tab.14, 15 oraz 16) zaprezentowano charakterystykę cząsteczek mikroRNA:

Tabela 14. Charakterystyka cząsteczek mikroRNA obecnych w osoczu i surowicy.

miScript miRNA PCR Serum&Plasma MIMM-106Z
Analiza ekspresji próbek z osocza

Choroby (inne niż nowotworowe)	<u>Niewydolność serca:</u> miR-1a-3p, miR-133a-3p, miR-423-5p, miR-499-5p <u>Niewydolność wątroby:</u> miR-122-5p, miR-192-5p
	<u>Miażdżyca:</u> miR-150-5p
	<u>Cukrzyca:</u> miR-124-3p, miR-146a-5p, miR-29a-3p, miR-30d-5p, miR-34a-5p, miR-375-3p, miR-9-5p
	<u>Choroby serca:</u> miR-133a-3p
	<u>Choroby wątroby:</u> miR-146a-5p, miR-215-5p, miR-224-5p, miR-574-3p, miR-92a-3p
Nowotwory	<u>Gruzołowy:</u> miR-29a-3p, miR-92a-3p
	<u>Piersi:</u> let-7a-5p, miR-106a-5p, miR-10b-5p, miR-141-3p, miR-155-5p, miR-195a-5p, miR-21a-5p, miR-34a-5p
	<u>Okreźnicy:</u> miR-134-5p, miR-146a-5p, miR-17-3p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-23a-3p, miR-29a-3p, miR-92a-3p
	<u>Żołądka:</u> let-7a-5p, miR-1a-3p, miR-106a-5p, miR-106b-5p, miR-17-5p, miR-17-3p, miR-20a-5p, miR-21a-5p, miR-27a-3p, miR-34a-5p, miR-423-5p
	<u>Białaczki i chłoniak z limfocytów T:</u> miR-155-5p, miR-21a-5p, miR-210-3p.
	<u>Wątroby:</u> miR-122-5p, miR-199a-5p, miR-21a-5p, miR-223-3p
	<u>Płuc:</u> miR-134-5p, miR-146a-5p, miR-17-3p, miR-21a-5p, miR-210-3p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-223-3p, miR-23a-3p, miR-25-3p
	<u>Jajnika:</u> miR-126-3p, miR-141-3p, miR-200a-3p, miR-200b-3p, miR-200c-3p, miR-203-3p, miR-205-5p, miR-21a-5p, miR-214-3p, miR-29a-3p, miR-92a-3p, miR-93-5p
	<u>Trzustki:</u> miR-196a-5p, miR-200a-3p, miR-200b-3p, miR-21a-5p, miR-210-3p
	<u>Prostaty:</u> miR-100-5p, miR-125b-5p, miR-141-3p, miR-143-3p, miR-18a-5p, miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-20a-5p, miR-21a-5p, miR-296-5p, miR-375-3p
	<u>Nerki:</u> miR-124-3p
Inne cząsteczki mikroRNA związane z nowotworami	<u>Mięsak prążkowanokomórkowy:</u> miR-1a-3p, miR-133a-3p, miR-133b-3p let-7c-5p, miR-107-3p, miR-10a-5p, miR-128-3p, miR-130b-3p, miR-145a-5p, miR-148a-3p, miR-15a-5p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-184-3p, miR-193a-3p, miR-204-5p, miR-206-3p, miR-211-5p, miR-26b-5p, miR-30e-5p, miR-31-5p, miR-34c-5p, miR-376c-3p, miR-7a-5p, miR-96-5p.
Rutynowo oznaczane w surowicy	miR-103-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-191-5p, miR-22-3p, miR-24-3p, miR-26a-5p

Tabela 15 Charakterystyka cząsteczek mikroRNA związanych z chorobami układu immunologicznego

miScript miRNA PCR Immunopathology MIMM-104Z
Analiza ekspresji próbek z płuc

Białaczki i chłoniaki	<p><u>Chłoniak Hodgkina:</u> miR-129-5p, miR-130a-3p, miR-132-3p, miR-134-5p, miR-135a-5p, miR-135b-5p, miR-138-5p, miR-140-5p, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-145a-5p, miR-147-3p, miR-15b-5p, miR-181a-5p, miR-183-5p, miR-185-5p, miR-200a-3p, miR-205-5p, miR-20b-5p, miR-21a-5p, miR-23b-3p, miR-26a-5p, miR-26b-5p, miR-27a-3p, miR-28a-5p, miR-29b-3p, miR-30c-5p, miR-31-5p, miR-325-3p, miR-335-5p, miR-34a-5p, miR-34c-5p, miR-9-5p.</p> <p><u>Inne:</u> miR-15a-5p</p> <p><u>Pierwotny chłoniak wysiękowy:</u> miR-103-3p, miR-106a-5p, miR-140-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-152-3p, miR-16-5p, miR-182-5p, miR-186-5p, miR-191-5p, miR-194-5p, miR-19a-3p, miR-210-3p, miR-23b-3p, miR-26a-5p, miR-29b-3p, miR-30e-5p, miR-320-3p, miR-34a-5p</p> <p><u>Białaczka z limfocytów T:</u> miR-106a-5p, miR-132-3p, miR-18b-5p, miR-19b-3p, miR-20b-5p</p>
Choroby autoimmunologiczne	<p><u>Idiopatyczna plamica małopłytkowa:</u> miR-196a-5p, miR-214-3p, miR-298-5p, miR-383-5p, miR-409-3p</p> <p><u>Toczeń rumieniowaty układowy:</u> miR-142-3p, miR-184-3p, miR-196a-5p, miR-21a-5p, miR-298-5p, miR-383-5p, miR-409-3p</p>
Reakcje zapalne	<p><u>Odpowiedź zapalna wywołana przez IL-1:</u> let-7g-5p, miR-146a-5p, miR-146b-5p, miR-195a-5p, miR-26b-5p, miR-299a-3p</p> <p><u>Mediatory zapalenia:</u> miR-155-5p, miR-203-3p</p> <p><u>Odpowiedź zapalna wywołana przez makrofagi:</u> miR-132-3p, miR-155-5p</p> <p><u>Stan zapalny naczyń:</u> miR-155-5p, miR-21a-5p</p> <p><u>Inne:</u> miR-125a-5p</p>
Wrodzona odpowiedź immunologiczna indukowana w monocytach przez LPS	<p>miR-105, miR-146a-5p, miR-146b-5p, miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-299a-3p</p>
Komórki odpornościowe	<p>let-7e-5p, miR-132-3p, miR-146a-5p, miR-146b-5p, miR-155-5p, miR-187-3p, miR-9-5p</p> <p><u>Różnicowanie limfocytów B:</u> miR-150-5p</p> <p><u>Rozwój komórek NK:</u> miR-155-5p, miR-150-5p</p> <p><u>Limfocyty:</u> let-7e-5p, miR-125a-5p, miR-125b-5p, miR-126-3p, miR-142-5p, miR-145a-5p, miR-146a-5p, miR-148a-3p, miR-195a-5p, miR-207, miR-223-3p, miR-451a, miR-493-3p, miR-574-3p</p> <p><u>Monocytopoeza:</u> miR-106a-5p, miR-20a-5p</p> <p><u>Regulatorowe limfocyty T:</u> miR-103-3p, miR-142-5p, miR-149-5p, miR-150-5p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-191-5p, miR-19a-3p, miR-21a-5p, miR-214-3p, miR-223-3p, miR-26a-5p, miR-27b-3p, miR-29c-3p, miR-30b-5p, miR-30c-5p, miR-30e-5p</p>
Regulacja istotnych genów	<p><u>Cytokiny:</u> miR-98-5p</p> <p><u>Interferony i Receptory:</u> miR-146a-5p, miR-223-3p</p> <p><u>Interleukiny:</u> miR-106a-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-15a-5p, miR-181a-5p, miR-223-3p</p> <p><u>STAT3:</u> miR-18a-5p, miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-20a-5p</p> <p><u>TNF α:</u> miR-155-5p</p>
Transdukcja sygnału	<p><u>Szlak sygnałowy IL6 / STAT3:</u> let-7a-5p, let-7c-5p, let-7d-5p, miR-21a-5p</p> <p><u>Szlak sygnałowy NFkB:</u> miR-146a-5p, miR-155-5p</p>

Tabela 16 Charakterystyka cząsteczek mikroRNA uczestniczących w regulacji szlaków związanych z nowotworowymi komórkami macierzystymi

miScript miRNA PCR Cancer Stem Cells – MIMM-118Z
Analiza ekspresji próbek z guza

Pluripotencja & Różnicowanie	let-7b-5p, miR-122-5p, miR-125b-5p, miR-134-5p, miR-135b-5p, miR-137-3p, miR-141-3p, miR-145a-5p, miR-146a-5p, miR-181b-5p, miR-182-5p, miR-184-3p, miR-185-5p, miR-200b-3p, miR-296-5p, miR-31-5p, miR-320-3p, miR-34a-5p, miR-96-5p
Samoodnowa I proliferacja	miR-135b-5p, miR-141-3p, miR-142-3p, miR-183-5p, miR-184-3p, miR-185-5p, miR-200b-3p, miR-200c-3p, miR-205-5p, miR-221-3p, miR-299a-5p, miR-31-5p, miR-451a, miR-96-5p, miR-96-5p, miR-302a-3p
Migracja I przerzutowanie	let-7b-5p, let-7c-5p, let-7d-5p, let-7e-5p, let-7f-5p, let-7g-5p, let-7i-5p, miR-103-3p, miR-17-5p, miR-181a-5p, miR-181c-5p, miR-200b-3p, miR-200c-3p, miR-203-3p, miR-25-3p
Onkogeneza i supresja nowotworu	let-7b-5p, let-7c-5p, let-7d-5p, let-7e-5p, let-7f-5p, let-7g-5p, let-7i-5p, miR-103-3p, miR-181c-5p
Cząsteczki mikroRNA o różnej ekspresji	Podwyższony poziom ekspresji: miR-105, miR-106b-5p, miR-132-3p, miR-146b-5p, miR-150-5p, miR-155-5p, miR-16-2-3p, miR-193a-3p, miR-199a-5p, miR-199b-5p, miR-20a-5p, miR-214-3p, miR-21a-5p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-223-3p, miR-29b-3p, miR-365-3p, miR-409-3p, miR-423-5p, miR-455-3p, miR-455-5p, miR-494-3p, miR-744-5p Obniżony poziom ekspresji: miR-10a-5p, miR-128-3p, miR-130a-3p, miR-151-3p, miR-15a-5p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-193b-3p, miR-196a-5p, miR-200a-3p, miR-210-3p, miR-215-5p, miR-22-3p, miR-425-5p, miR-429-3p, miR-486-5p, miR-9-5p Norma: miR-107-3p, miR-142-5p, miR-151-5p, miR-34a-5p

Kolejny – drugi etap obejmował wybór trzech dojrzałych cząsteczek mikroRNA, które charakteryzowały się największymi różnicami w ekspresji między linią nieprzerzutującą a przerzutującą na różnym etapie rozwoju nowotworu. Badania z wybranymi cząsteczkami mikroRNA przeprowadzono w osoczu i tkankach pochodzenia mysiego oraz ludzkiego i w komórkach mysich i ludzkich linii raka gruczołu sutkowego.

Tkanki pochodzenia mysiego – płuca, guz, lizaty komórkowe

W celu badania poziomu ekspresji mikroRNA przy wykorzystaniu metody Real – Time PCR, 20 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej (cDNA) po odwrotnej transkrypcji rozcieńczono w 200 µl wody wolnej od RNAz. Następnie w próbówce przygotowano mieszaninę reakcyjną zawierającą: 1375 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 275 µl 10x miScript Universal Primer, 1000 µl wody wolnej od RNAz oraz 100 µl rozcieńczonej matrycy cDNA. Mieszaninę reakcyjną nałożono na płytkę 96-dółkową w ilości 25 µl na dółek.

Mysie i ludzkie osocze, bloczki parafinowe

Mieszaninę reakcyjną (25 μ l) zawierającą cDNA po preamplifikacji rozcieńczono zgodnie z następującym algorytmem:

$$DF \text{ (dilution factor)} = ng \text{ cDNA} * 20 - \text{krotność/ng}$$

oszacowanym na podstawie wyjściowej ilości materiału – cDNA do reakcji preamplifikacji (jeśli ilość materiału wyjściowego do odwrotnej transkrypcji to 20 ng cDNA w objętości 10 μ l, co skutkuje 2 ng/ μ l materiału wyjściowego do reakcji preamplifikacji, oznacza to, że mieszaninę reakcyjną po preamplifikacji należy rozcieńczyć 40-krotnie – DF = 40). cDNA otrzymane po preamplifikacji rozcieńczono 40-krotnie w wodzie wolnej od RNAz – (25 μ l cDNA + 975 μ l wody). Mieszaninę reakcyjną do reakcji PCR przygotowano w taki sam sposób jak w przypadku tkanek pochodzenia mysiego i lizatów komórkowych. Dla każdego materiału wykonano 4 niezależne powtórzenia. Ekspresja cząsteczek mikroRNA została oszacowana przy użyciu metody $\Delta\Delta C_t$ czyli różnicy różnic wartości C_t . Dane analizowano przy użyciu programu GeneGlobe Data Analysis Center (QIAGEN[®], Hilden, Niemcy). Wykonano trzy niezależne izolacje całkowitego RNA z tkanek mysich (osocza, guza oraz płuc) oraz lizatów komórkowych. W przypadku ludzkiego osocza i materiału z bloczków parafinowych, każda pacjentka stanowiła niezależne powtórzenie.

3.10 Analiza ekspresji białek przy użyciu metody Western blott

Komórki w liczbie 3 mln wysiewano na szalkę o średnicy 10 cm. Po upływie 48 godzin komórki płukano 2-krotnie w roztworze PBS (PChO IITD, Wrocław, Polska) i zabezpieczono w 100 μ l buforu lizującego RIPA (Merck, Darmstadt, Niemcy) zawierającego inhibitory proteaz oraz fosfataz. Komórki inkubowano na lodzie przez 30 minut, następnie przechowywano w -80°C do dalszych analiz.

Oznaczanie stężenia białka:

Przed oznaczeniem stężenia białka, próbki po lizie wirowano w 4°C, przy obrotach 8000 x g przez 10 minut. Następnie supernatant przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf. Oznaczenie białka wykonano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu do oznaczania stężenia białka DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Stany Zjednoczone). Powyższe oznaczenie stężenia białka oparte jest na kolorymetrycznej metodzie Lowry'ego w której przygotowano krzywą wzorcową wraz ze standardem, którą stanowiła albumina bydlęca BSA (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Krzywą wzorcową przygotowano w następującym szeregu rozcieńczeń:

- ✓ 20 µl [2 mg/ml]
- ✓ 10 µl + 10 ul RIPA [1 mg/ml]
- ✓ 10 µl + 10 ul RIPA [0,5 mg/ml]
- ✓ 10 µl + 10 ul RIPA [0,250 mg/ml]
- ✓ 10 µl + 10 ul RIPA [0,125 mg/ml]
- ✓ 10 µl RIPA [0 mg/ml]

Próbki zostały rozcieńczone 30-krotnie (przygotowane w duplikatach) (1 µl próbki oraz 29 µl buforu RIPA). Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali 650 nm przy użyciu czytnika Synergy H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski VT, Stany Zjednoczone). Na podstawie pomiaru absorbancji obliczono stężenie białka w każdej próbce.

Elektroforeza

Do próbek zawierających 50 µg białka dodano buforu obciążającego – 4x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Stany Zjednoczone) z dodatkiem β - merkaptoetanolu (BME) (Merck, Darmstadt, Niemcy) i ogrzewano przez 5 minut w 95 °C. Następnie tak przygotowane próbki nanoszono na 12 % żel poliakrylamidowy. Do przygotowania żelu rozdzielającego wykorzystano następujące odczynniki: bufor Tris-HCl o pH 8,8 z dodatkiem siarczanu dodecylosodu (45,4 g Tris-HCl, 1 g SDS) (oba odczynniki: Merck, Darmstadt, Niemcy) w 500 ml wody MilliQ, 30 % roztworu akrylamidu (AppliChem GmbH, Darmstadt, Niemcy), nadsiarczan amonu – APS, (Merck, Darmstadt, Niemcy), TEMED (N,N,N',N'-czterometylo-1,2-diaminometanu, BioShop Canada Inc., Burlington, Kanada). Żel zagęszczający przygotowano w następujący sposób: bufor Tris-HCl o pH 6,8 z dodatkiem siarczanu dodecylosodu (15,1 g Tris-HCl, 1 g SDS; oba odczynniki: Merck,

Darmstadt, Niemcy), w 500 ml wody MilliQ z pozostałymi składnikami akrylamidem, APS oraz TEMED jak w warstwie rozdzielającej. Próbki poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu przeprowadzając elektroforezę pionową w aparacie do elektroforezy pionowej przez 60' w buforze do elektroforezy, który przygotowano w 1L wody destylowanej dodając kolejno: 3 g Trizma-Base (Merck, Darmstadt, Niemcy), 14,4 g glicyny (Merck, Darmstadt, Niemcy) oraz 1 g SDS, (Merck, Darmstadt, Niemcy). Do identyfikacji wielkości białek wykorzystano marker wielkości białek PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Stany Zjednoczone). Po zakończeniu elektroforezy, żełe z rozdzielonymi białkami inkubowano przez 10 minut w buforze do transferu przygotowanego w następujący sposób: do 400 ml wody dejonizowanej MilliQ dodano 3 g Trizma Base (Merck, Darmstadt, Niemcy), 7,2 g glicyny (Merck, Darmstadt, Niemcy) oraz 100 ml metanolu (Avantor, Gliwice, Polska).

Transfer

Po zakończeniu inkubacji, żełe z rozdzielonymi próbkami transferowano na membranę PVDF, którą wcześniej aktywowano w roztworze 100% metanolu (Avantor, Gliwice, Polska) przez 10'' a następnie płukano w wodzie dejonizowanej MilliQ (PChO IITD, Wrocław, Polska) oraz w buforze do transferu przez 10 minut. Transfer przeprowadzono przez 1 h przy użyciu aparatu do półsuchego transferu Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cells (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Stany Zjednoczone). Po przeprowadzeniu transferu, membranę blokowano przez 1h w temperaturze pokojowej w 5% odczynniku blokującym (Membrane Blocking Agent; GE Healthcare, Amersham) przygotowanego w PBS (PChO IITD, Wrocław, Polska). Po upływie godziny membrany płukano 3-krotnie przez 10 minut w roztworze 0,5 % PBS + Tween 20 (Merck, Darmstadt, Niemcy), następnie inkubowano z pierwszorzędowymi przeciwciałami króliczymi: anty E-kadheryna (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, Stany Zjednoczone), anty-N-kadheryna (Abcam, Cambridge, Wielka Brytania) przez całą noc w 4°C rozcieńczonym w stosunku 1:1 000, oraz 1:5 000 oraz anty β -aktyna (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Teksas, Stany Zjednoczone) rozcieńczona w stosunku 1:10 000. Po upływie czasu inkubacji, membrany płukano 3-krotnie przez 10 minut w 1% roztworze PBS-Tween i inkubowano przez 1h z drugorzędowymi przeciwciałami antykróliczymi skoniugowanym z peroksydazą chrzanową rozcieńczonymi w stosunku 1:10 000. Po zakończonej inkubacji membrany płukano 3-krotnie przez 10 minut w roztworze 1% PBS-Tween.

Detekcja

W celu detekcji prążków przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z następujących składników: luminolu (Merck, Darmstadt, Niemcy), kwasu p-kumarynowego (Merck, Darmstadt, Niemcy), 1M Tris-HCl (PChO IITD, Wrocław, Polska), wody dejonizowanej MilliQ (PChO IITD, Wrocław, Polska) oraz nadtlenu wodoru (Avantor, Gliwice, Polska) dodawanego tuż przed wywoływaniem. Wizualizację prążków wykonano za pomocą aparatu do wizualizacji żeli i blotów. ChemiDoc MP Imaging System (Herkules, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Analiza densytometryczna została wykonana przy użyciu oprogramowania ImageJ 1.46r (National Institutes of Health, Bethesda, MA, Stany Zjednoczone). W części wynikowej zamieszczono reprezentatywny wynik z wykonanych badań.

3. 11 Test adhezji

Dobę przed rozpoczęciem testu adhezji, 96 płytkę dołkową (Nunc MaxiSorp™ flat-bottom, ThermoFischer Scientific, Wilmington DE, Stany Zjednoczone) opłaszczono roztworem fibronektyny (Merck, Darmstadt, Niemcy) w stężeniu końcowym 10 µg/µl. Roztwór przygotowano w wodzie dejonizowanej MilliQ (PChO IITD, Wrocław, Polska), następnie nałożono na płytkę w ilości 100 µl na dołek. Tak przygotowaną płytkę inkubowano w temperaturze 4°C przez całą noc. Po upływie czasu inkubacji płytkę płukano 2-krotnie w buforze TSM (PChO IITD, Wrocław, Polska), następnie blokowano w 1% roztworze BSA-TSM, przez 30 minut w temperaturze 37°C. W czasie inkubacji komórki zdjęto z płytki 12 - dołkowej przy użyciu nieenzymatycznego odczynnika Accutase Solution (Merck, Darmstadt, Niemcy) i policzono. Po zakończeniu inkubacji płytkę płukano 2-krotnie w roztworze TSM (PChO, IITD, Wrocław, Polska). Komórki zwirowano i zawieszono w 0,5% roztworze BSA- TSM, następnie nałożono na po 50 000 komórek w 100 µl na dołek płytki 96- dołkowej. Płytkę inkubowano przez 60' w temperaturze 37°C. Po zakończeniu inkubacji niezwiązane komórki odciągnięto przy użyciu pipety wielokanałowej i płukano 3-krotnie w buforze TSM (PChO IITD, Wrocław, Polska). Następnie komórki barwiono 0,2% roztworem fioletu krystalicznego przygotowanym w 20% metanolu (Avantor, Gliwice, Polska) w objętości 50 µl na dołek i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 4°C. Po upływie czasu inkubacji komórki płukano 3-krotnie w buforze TSM (PChO IITD, Wrocław, Polska) i zawieszono w 80% roztworze metanolu (Avantor, Gliwice, Polska) w objętości 100 µl na dołek. Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali 570 nm przy użyciu czytnika Synergy H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski VT, Stany Zjednoczone).

Test wykonano w czterech niezależnych powtórzeniach. Dla komórek transfekowanych wynik przedstawiono jako procent komórek ulegających adhezji względem komórek kontrolnych, dla których przyjęto 100%.

3.12 Przejściowa transfekcja: inhibitorem miR-31-5p (ang. miR-31-5p inhibitor) oraz mimetykiem miR-31-5p (ang. miR-31-5p mimic)

W celu przeprowadzenia przejściowej transfekcji, komórki wysiano na 12 dołkowej płytce w ilości $3 \cdot 10^5$ komórek w medium hodowlanym dla określonej linii komórkowej. Po upływie 24 godzin medium wymieniono na świeże. Następnie 750 ng syntetycznego inhibitora/mimetyku oraz kontroli negatywnej dedykowanej dla inhibitora/mimetyku (Tabela 17)

Tabela 17 Zestawienie odczynników używanych do przeprowadzenia przejściowej transfekcji.

	Nazwa odczynnika	Firma	Numer katalogowy
inhibitor	hsa-miR-31-5p miRCURY LNA miRNA Inhibitor	QIAGEN®, Hilden, Niemcy	YI04102559- ADC
kontrola inhibitora	miRCURY LNA miRNA Inhibitor Control		YI00199006- ADC
mimetyk	hsa-miR-31-5p miRCURY LNA miRNA Mimic		YM00472582- ADB
kontrola mimetyku	miRCURY LNA miRNA Mimic Control		YM00479902- ADB

znakowanych na końcu 5' barwnikiem 6 – FAM (6 – karboksylodifluoresceina) rozpuszczono w 100 µl odpowiedniego medium niezawierającego surowicy, kolejno dodano 12 µl odczynnika do transfekcji – HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN®, Hilden, Niemcy) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5-10' w celu utworzenia kompleksów transfekcyjnych. Po zakończeniu inkubacji, utworzone kompleksy dodawano kroplami bezpośrednio na komórki. Po 24h inkubacji medium hodowlane usunięto z nad komórek, następnie komórki przepłukano 2-krotnie PBS (PChO IITD, Wrocław, Polska) i dodano 35 µl odczynnika lizującego RIPA (wraz z koktajlem inhibitorów proteaz i fosfataz), inkubowano 30' w temperaturze 4°C, komórki zebrano i przechowywano w -80°C do dalszych badań. Dodatkowo przeprowadzono testy adhezji do fibronektyny zgodnie z opisem w podrozdziale 3.12. Wydajność transfekcji sprawdzono przy użyciu cytometrii przepływowej oraz Real-Time

PCR. W przypadku cytometrii przepływowej, wynik przedstawiono w postaci histogramów, które umieszczono w Suplemencie na rycinie 22. Kontrola negatywna zastosowana w przeprowadzonym eksperymencie, miała na celu sprawdzenie, czy uzyskane wyniki są specyficzne. Dodatkowo poziom wyciszenia i nadekspresji sprawdzono przy użyciu techniki Real-Time PCR, wynik przedstawiono za pomocą wykresów i umieszczono w suplemencie na rycinie 24.

3.13 Analiza ekspresji wybranych białek przy użyciu metody ELISA

Oznaczanie poziomu ekspresji białek: PTK2 (ang. Protein Tyrosine Kinase 2), znane również jako białko FAK (ang. Focal Adhesion Kinase), RhoA oraz ITGA5 (ang. Integrin alfa 5) wykonano przy użyciu komercyjnie dostępnych testów ELISA z firmy EIAab Science, Wuchan, Chiny. Wszystkie etapy wykonano zgodnie z zaleceniami producenta.

RhoA i FAK, ITGA5

Krzywą standardową w przypadku wyżej wymienionych białek przygotowano dodając do każdego standardu dla oznaczanych białek, odpowiednio po 1 ml i 2 ml rozcieńczalnika – Sample Diluent, odpowiednio. Rozcieńczenia standardu przygotowano w następujący sposób:

- ✓ RhoA – 10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,312 – 0,156 – 0 [ng/ml]
- ✓ FAK – 100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,12 – 1,56 – 0 [ng/ml]
- ✓ ITGA5 – 10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,312 – 0,156 – 0 [ng/ml]

Badane próbki i standard dodano w ilości 100 µl na opłaszczoną przeciwciałem wobec badanych białek płytkę 96 – dołkową. Płytkę inkubowano przez 120' w 37°C. Po upływie czasu inkubacji, roztwór dokładnie usunięto i natychmiast dodano po 100 µl odczynnika A i inkubowano przez 60' w 37°C. Po upływie czasu inkubacji roztwór dokładnie usunięto, płukano 3-krotnie po 300 µl roztworem płuczącym Wash Buffer. Po dokładnym osuszeniu płytki dodano po 100 µl odczynnika B. Płytkę inkubowano przez 60' w 37°C. Po upływie czasu inkubacji, zawartość płytki usunięto i płukano 5-krotnie po 300 µl w roztworze płuczającym Wash Buffer. Następnie dodano po 90 µl substratu i inkubowano przez 15-20' w 37°C, chroniąc płytkę przed dostępem do światła. Po zakończeniu inkubacji dodano 50 µl roztworu Stop Solution w celu zatrzymania reakcji. Intensywność absorbancji

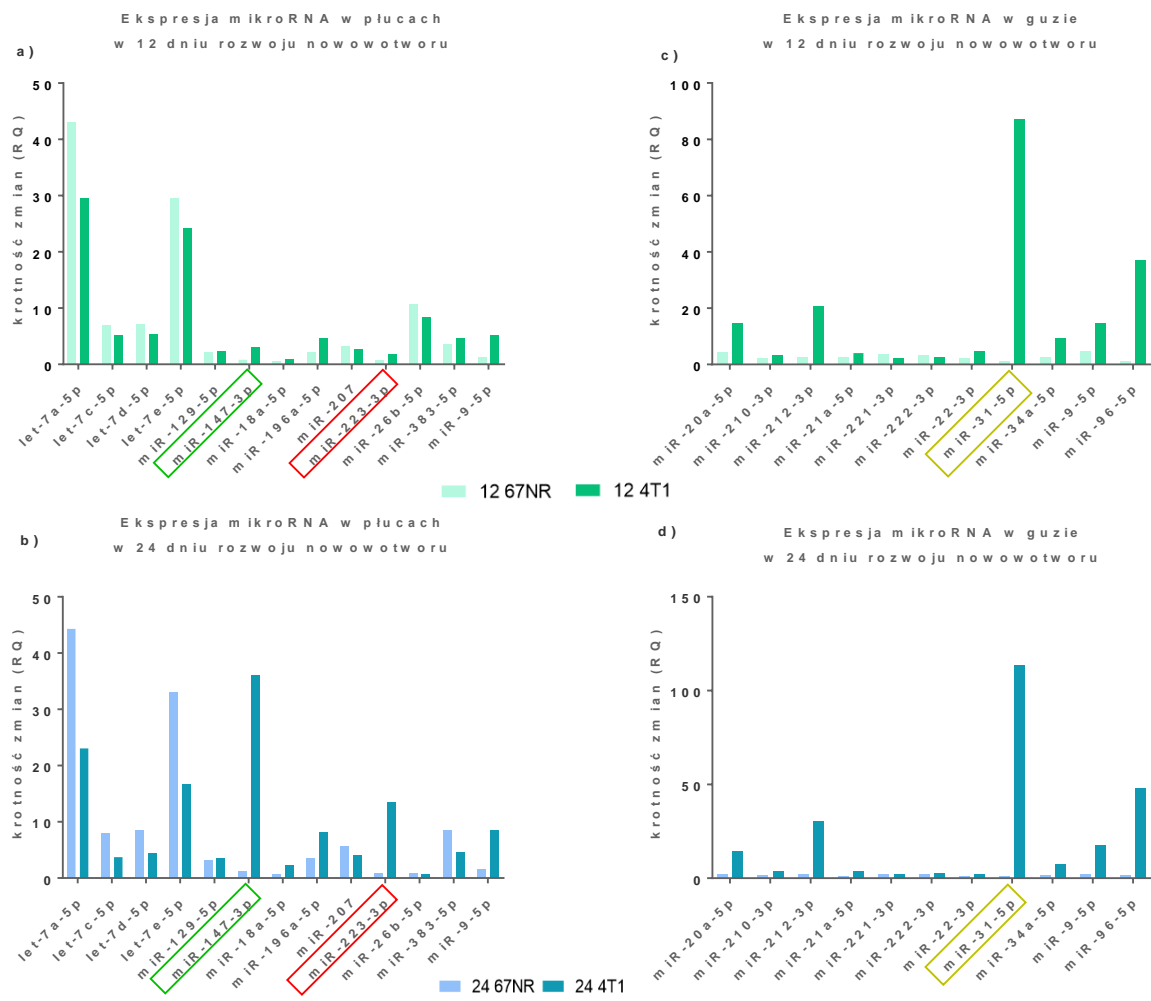
mierzone przy długości fali 450 nm za pomocą czytnika Synergy H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski VT, Stany Zjednoczone). Na podstawie pomiaru absorbancji sporządzono krzywą standardową przy użyciu oprogramowania Curve Expert (Hyams, D. G., CurveExpert software, <http://www.curveexpert.net>, 2010). Na podstawie wyznaczonej krzywej oszacowano poziom białka w badanych próbkach.

IV. WYNIKI

Badania wykonane w ramach niniejszej pracy zostały podzielone na kilka etapów. W pierwszym etapie zostały przeprowadzone badania przesiewowe prowadzące do wyboru trzech dojrzałych cząsteczek mikroRNA do dalszych badań. W tym celu przeprowadzono eksperymenty *in vivo* uwzględniające dwa modele mysiego raka gruczołu sutkowego – model nieprzerzutujący – 67NR oraz jego przerzutujący odpowiednik – 4T1. Poziom ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA określono w osoczu, płucach, guzie nowotworowym oraz w lizatach linii komórkowych mysiego raka gruczołu sutkowego. Drugi etap badań obejmował badania przeprowadzone na komórkach ludzkiego raka gruczołu sutkowego o różnych podtypach molekularnych. Poziom ekspresji cząsteczek mikroRNA zbadano w próbkach osocza oraz w guzie utrwalonym w bloczkach parafinowych, które uzyskano od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego. Na podstawie analizy wyników uzyskanych z przeprowadzonych badań wybrano jedną cząsteczkę mikroRNA – miR-31-5p, której funkcję zbadano przeprowadzając przejściową transfekcję w liniach komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego, następnie zbadano poziom wybranych białek regulowanych przez wybraną cząsteczkę mikroRNA.

4.1 Analiza poziomu ekspresji mikroRNA w materiale pochodzenia mysiego – badania przesiewowe.

Badania przesiewowe przeprowadzono wykorzystując materiał uzyskany od myszy – krew (osocze), płuca, guz nowotworowy, dla których w publikacji Papiernik i wsp. opisano proces wzrostu guza i przerzutowania²²⁵. Poziomą ekspresję 84 różnych cząsteczek mikroRNA zbadano wykorzystując komercyjnie dostępne zestawy 96-dołkowych płytek ze starterami dla dojrzałych cząsteczek mikroRNA. W przypadku osocza wykorzystano zestaw miScript miRNA PCR Serum&Plasma, dla płuc miScript miRNA PCR Immunopathology, natomiast dla tkanki guza miScript miRNA PCR Cancer Stem Cells. Największe różnice w poziomie ekspresji mikroRNA między linią nieprzerzutującą a przerzutującą zaobserwowano w płucach – dla cząsteczek – miR-147-3p i miR-223-3p (Ryc.10, wykres a i b) oraz w guzie nowotworowym dla cząsteczki miR-31-5p (Ryc.10, wykres c i d), w 12 i 24 dniu rozwoju nowotworu. Płuca myszy obarczone komórkami 4T1 w 12 dniu rozwoju nowotworu cechowały się ponad 3-krotnie wyższą ekspresją miR-147-3p w stosunku do linii nieprzerzutującej 67NR,



Rycina 10. Poziom wybranych cząstek mikroRNA, które wykazywały największe różnice w ekspresji w płucach oraz guzie pierwotnym obciążonych komórkami 67NR oraz 4T1. a) i b) wybrane cząsteczki mikroRNA dla tkanki płuc; c) i d) wybrane cząsteczki mikroRNA dla tkanki guza. Wybrane cząsteczki mikroRNA do dalszych badań zaznaczono w ramkach pod wykresem. Kontrolę eksperymentu stanowił materiał pochodzący od myszy zdrowych (nieobciążonych nowotworem) – wyizolowane całkowite RNA z osocza, płuc oraz z fragmentu listwy mlecznej.

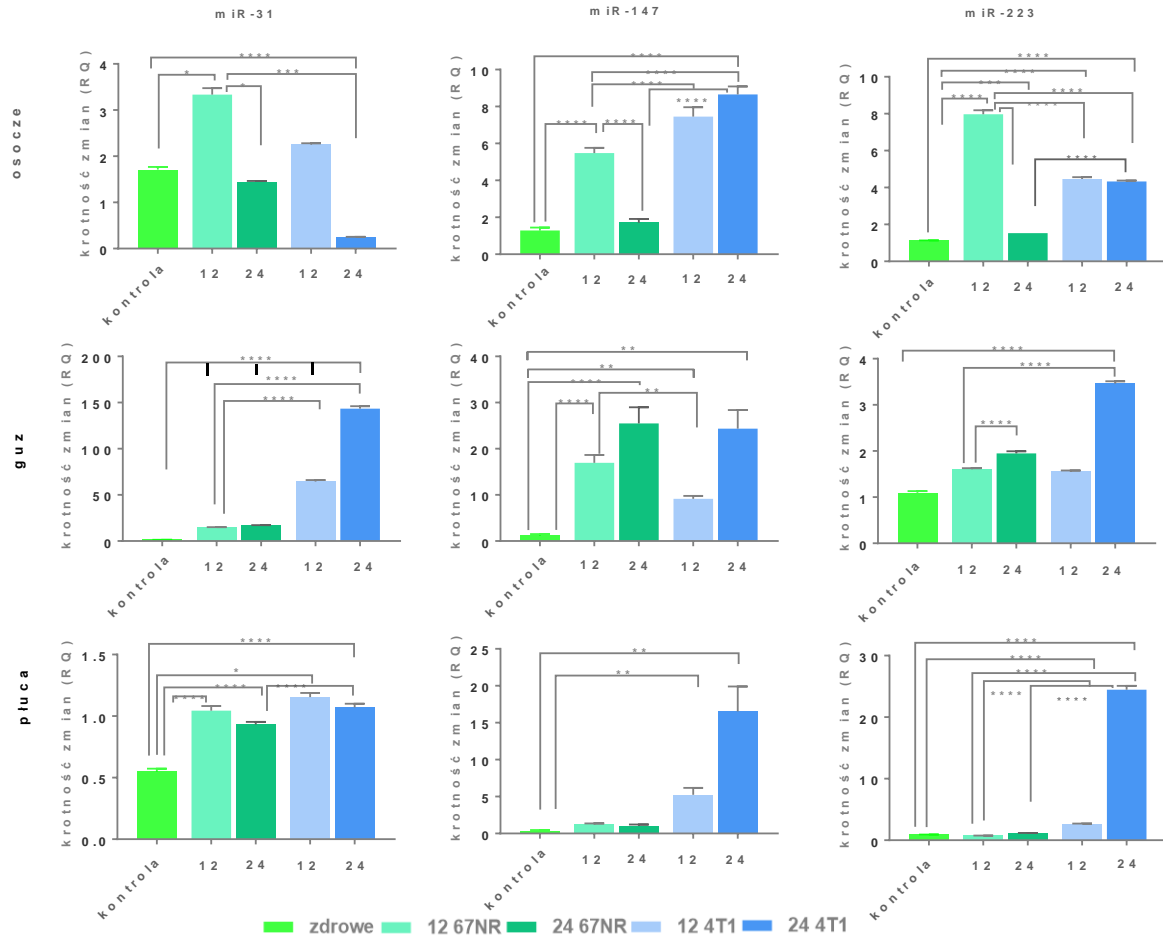
natomiast w 24 dniu rozwoju tego nowotworu zaobserwowano prawie 30-krotnie wyższą ekspresję tej cząsteczki w porównaniu do linii 67NR. Z kolei w 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1 odnotowano ponad 17-krotnie wyższą ekspresję cząsteczki miR-223-3p w płucach w porównaniu do jego nieprzerzutującego odpowiednika. Najwyższą ekspresję miR-31-5p zaobserwowano w 24 dniu eksperymentu. We wspomnianym dniu eksperymentu zaobserwowano ponad 100-krotnie wyższą ekspresję tej cząsteczki w guzach linii 4T1 niż w linii nieprzerzutującej 67NR. W przypadku osocza nie zaobserwowano dużych różnic między myszami obciążonymi komórkami 67NR, a 4T1 w 12 i 24 dniu rozwoju nowotworu (Rycina 23, wykres a i b, zamieszczone w Suplemencie). Na podstawie tej analizy do dalszych badań zostały wybrane trzy wyżej scharakteryzowane cząsteczki mikroRNA – miR-147-3p, miR-223-3p oraz miR-31-5p.

4.2 Szczegółowa analiza ilościowa poziomu ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA w materiale pochodzenia mysiego, oraz w lizatach linii komórkowych mysiego raka gruczołu sutkowego.

Osocze

U myszy zdrowych, nieobarczonych nowotworem wykryto 2-krotnie niższy poziom ekspresji badanej cząsteczki miR-31-5p niż w osoczu pochodzącym od myszy obarczonych komórkami 67NR w 12 dniu eksperymentu. Różnica ta była istotna statystycznie (Ryc. 11 wykres a). Siedmiokrotnie niższą ekspresję cząsteczki miR-31-5p w porównaniu do grupy myszy zdrowych, zaobserwowano w 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1. Różnica ta była istotna statystycznie (Ryc. 11 wykres a). W osoczu pochodzącym od myszy obarczonych komórkami 67NR w 24 dniu rozwoju nowotworu wykryto 2-krotnie niższą ekspresję miR-31-5p niż w 12 dniu rozwoju tego nowotworu (Ryc.11, wykres a). Zaobserwowano, że poziom ekspresji miR- 31-5p w osoczu w 24 dniu eksperymentu był 9-krotnie niższy niż w 12 dniu rozwoju nowotworu 4T1. W 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1 zaobserwowano 6-krotnie niższą ekspresję cząsteczki miR-31-5p w porównaniu do jego nieprzerzutującego odpowiednika 67NR w tym samym dniu eksperymentu (Ryc.11, wykres a). U myszy zdrowych, nieobarczonych nowotworem obserwowano 6-krotnie niższą ekspresję miR-147-3p w porównaniu do 12 dnia rozwoju nowotworu nieprzerzutującego 67NR. Różnica ta była istotna statystycznie (Ryc.11, wykres b). Podobną tendencję obserwowano w porównaniu do grupy myszy obarczonych komórkami 4T1 zarówno w 12 jak i w 24 dniu eksperymentu, wykryto wówczas 8-krotnie niższy poziom ekspresji miR-147-3p u myszy zdrowych, nieobarczonych nowotworem w stosunku do grupy myszy z nowotworem 4T1 (Ryc.11, wykres b). Różnice te były istotne statystycznie. W 24 dniu eksperymentu u myszy obarczonych komórkami 67NR obserwowano 5-krotne obniżenie ekspresji miR-147-3p w porównaniu do 12 dnia rozwoju tego nowotworu. W 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1 wykryto 8-krotnie wyższą ekspresję miR-147-3p niż w 24 dniu rozwoju nowotworu 67NR (Ryc.11, wykres b). W przypadku cząsteczki miR-223-3p, u myszy zdrowych, nieobarczonych nowotworem zaobserwowano 8-krotnie niższy poziom ekspresji miR-223-3p w porównaniu do 12 dnia rozwoju nowotworu 67NR. Czterokrotnie wyższą ekspresję miR-223-3p wykryto w grupie myszy obarczonych komórkami 4T1, zarówno w 12 jak i 24 dniu rozwoju nowotworu w porównaniu do grupy myszy zdrowych, nieobarczonych nowotworem. Różnica ta była istotna statystycznie (Ryc.11, wykres c). W 24 dniu rozwoju nowotworu 67NR zaobserwowano 8-krotne obniżenie ekspresji w porównaniu do 12 dnia rozwoju tego nowotworu. Czterokrotnie wyższy poziom ekspresji

miR-223-3p zaobserwowano w 12 i 24 dniu eksperymentu w grupie myszy obciążonych komórkami 4T1 w porównaniu do 24 dnia rozwoju nowotworu nieprzerzutującego 67NR. Różnice te były istotne statystycznie (Ryc.11, wykres c).



Rycina 11. Poziom ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA w materiale pochodzenia mysiego w osoczu – wykresy – a), b) i c) w guzie nowotworowym wykresy – d), e) i f) oraz tkance płuc – wykresy – g), h) oraz i). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu ANOVA oraz Kruskal – Wallis’a dla porównań wielokrotnych. * $p < 0,05$. Kontrolę eksperymentu stanowiło mikroRNA wyizolowane z osocza i tkanek – z fragmentu płuc oraz z fragmentu listwy mlecznej uzyskanych od myszy zdrowych – nieobciążonych nowotworem, 12, 24 – dzień eksperymentu, 67NR oraz 4T1 – model nowotworu piersi.

Guz

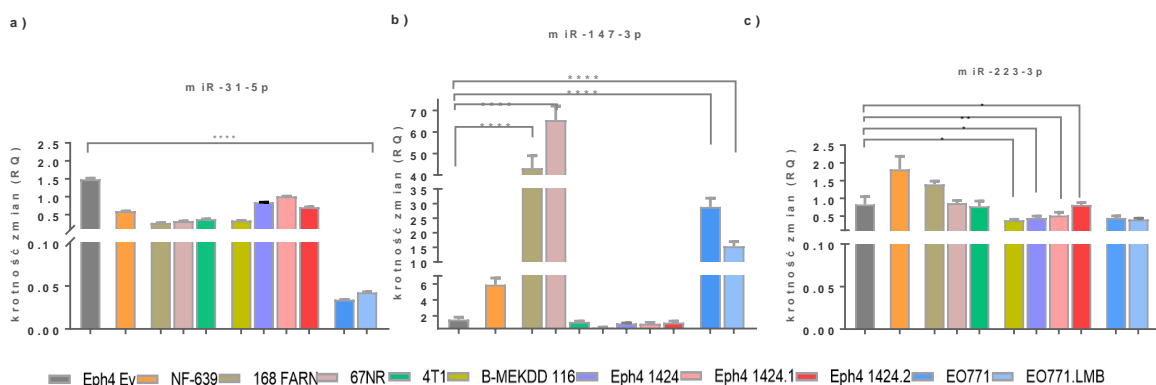
U myszy zdrowych, nieobarczonych nowotworem, wykryto 14 i 17-krotnie niższą ekspresję miR-31-5p w porównaniu do 12 i 24 dnia rozwoju nowotworu 67NR (odpowiednio). W 12 i 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1 wykryto 64 i 144-krotnie wyższy poziom ekspresji miR-31-5p w porównaniu do myszy zdrowych, nieobarczonych nowotworem. Opisanie różnice w ekspresji miR-31-5p w porównaniu do grupy myszy zdrowych, były istotne statystycznie (Ryc.11, wykres d). Ponad 2-krotny wzrost ekspresji miR-31-5p wykryto w 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1 w porównaniu do 12 dnia rozwoju tego nowotworu. W grupie myszy obarczonych komórkami 4T1 w 12 dniu eksperymentu obserwowano 4-krotnie wyższy poziom ekspresji miR-31-5p niż w 12 dniu rozwoju nowotworu 67NR. Natomiast w 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1 wykryto 8-krotnie wyższy poziom tej cząsteczki w porównaniu do 24 dnia rozwoju nowotworu 67NR. Różnice te były istotne statystycznie (Ryc.11, wykres d). W 12 i 24 dniu rozwoju nowotworu 67NR obserwowano 17 i 24-krotnie wyższą ekspresję miR-147-3p w porównaniu do myszy zdrowych nieobarczonych nowotworem (odpowiednio) (Ryc.11, wykres e). W przypadku nowotworu 4T1 wykryto 9 i 24-krotny wzrost ekspresji miR-147-3p w 12 i 24 dniu eksperymentu (odpowiednio) w porównaniu do myszy zdrowych. Różnice te były istotne statystycznie. W 12 dniu rozwoju nowotworu 4T1 zaobserwowano 2-krotnie niższy poziom ekspresji miR-147-3p w porównaniu do 12 dnia rozwoju nowotworu 67NR. Różnica ta była istotna statystycznie. U myszy zdrowych, nieobarczonych nowotworem wykryto 3-krotnie niższy poziom ekspresji miR-223-3p w porównaniu do 24 dnia rozwoju nowotworu 4T1. Natomiast w 24 dniu rozwoju nowotworu 67NR zaobserwowano 2-krotnie wyższą ekspresję miR-223-3p w porównaniu do myszy zdrowych. Różnice te były istotne statystycznie. W 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1 wykryto 2-krotnie wyższy poziom ekspresji miR-223-3p w porównaniu do 24 dnia rozwoju nowotworu 67NR. Różnice te były istotne statystycznie (Ryc.11, wykres f).

Pluca

Dwukrotnie wyższą ekspresję miR-31-5p w tkance płuc wykryto w 12 i 24 dniu rozwoju nowotworu 67NR oraz w 12 i 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1 w porównaniu do myszy zdrowych, nieobarczonych nowotworem. Różnice te były istotne statystycznie (Ryc.11, wykres g). W pozostałych grupach badanych nie obserwowano różnic w ekspresji badanej cząsteczki mikroRNA. W przypadku cząsteczki miR-147-3p obserwowano 5 i 15-krotnie wyższą ekspresję w 12 i 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1 (odpowiednio) w porównaniu do grupy

myszki zdrowych, nieobciążonych nowotworem. Różnice te były istotne statystycznie (Ryc.11, wykres h). W pozostałych grupach badanych nie obserwowano zmian w ekspresji miR-147-3p. W 12 i 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1 wykryto 2 i 24-krotnie wyższy poziom ekspresji miR-223-3p w porównaniu do myszy zdrowych, nieobciążonych nowotworem. Różnice te były znamienne statystycznie (Ryc.11, wykres i). U myszy obciążonych komórkami 4T1 w 12 dniu eksperymentu obserwowano 3-krotnie wyższy poziom ekspresji w porównaniu do 12 dnia rozwoju nowotworu 67NR. Natomiast w 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1 wykryto 24-krotnie wyższą ekspresję miR-223-3p w porównaniu do 24 dnia rozwoju nowotworu nieprzerzutującego 67NR. Różnice te były istotne statystycznie (Ryc.11, wykres i).

Poziom ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA zbadano również w lizatach linii komórkowych mysiego raka gruczołu sutkowego. Mysie linie komórkowe raka gruczołu sutkowego pogrupowano na podstawie ich pochodzenia i stopnia złośliwości. Pierwszą grupę stanowią linie wywodzące się z tego samego guza nowotworowego wyizolowanego od myszy szczepu BALB/c: 168 FARN, 67NR oraz 4T1. Linie z grupy 1 charakteryzują się różnym stopniem złośliwości – linia komórkowa 4T1 jest odzwierciedleniem IV stopnia zaawansowania ludzkiego raka gruczołu sutkowego, dlatego jest ona najczęściej wykorzystywanym modelem do badań *in vivo* wraz z jej nieprzerzutującym odpowiednikiem linią 67NR. Ponadto linia 168 FARN zgodnie z piśmiennictwem przerzutuje do węzłów chłonnych²²⁰. Do drugiej grupy należą: B-MEKDD 116, Eph4 1424, Eph4 1424.1 oraz Eph4 1424.2, każda z nich charakteryzuje się różną zdolnością do przerzutowania. Wszystkie linie Eph4 1424 zostały wyprowadzone z linii B-MEKDD 116. Trzecią grupę stanowią linie: EO771 oraz EO771.LMB. Linia komórkowa EO771.LMB charakteryzuje się zdolnością



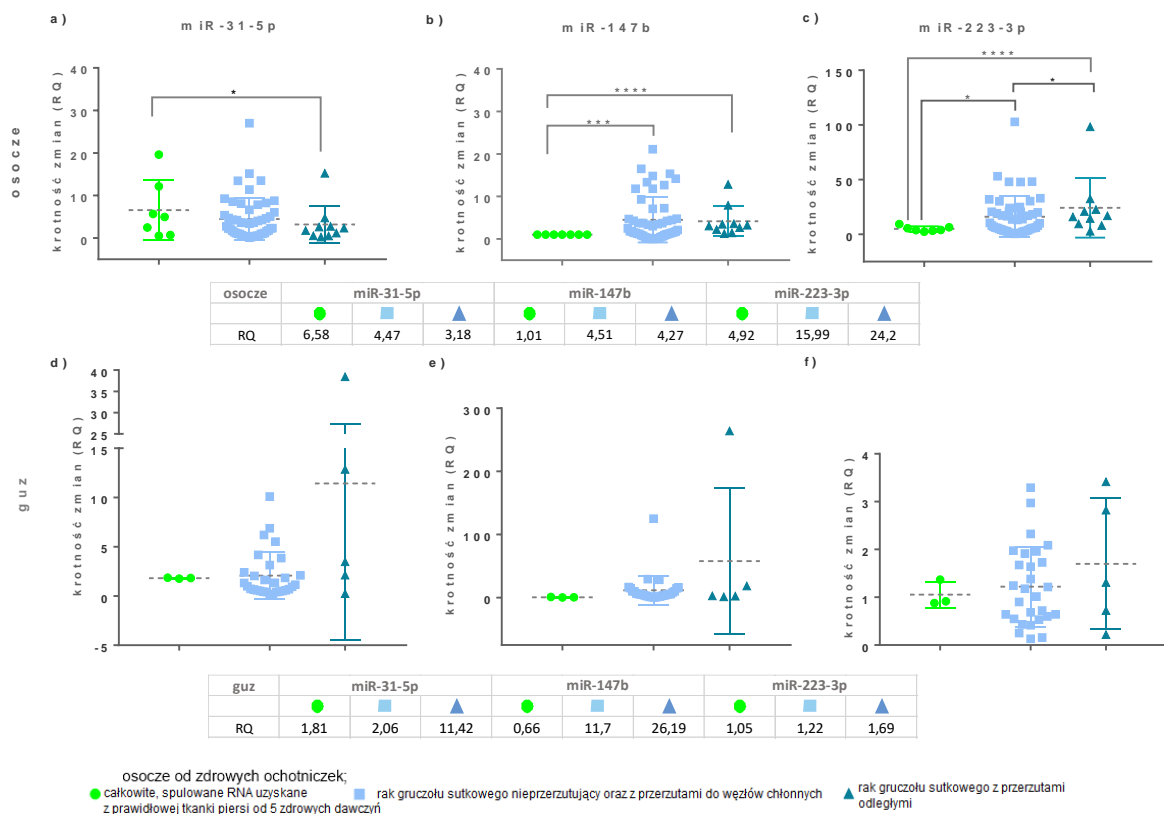
Rycina 12 Analiza profilu ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA w lizatach linii komórkowych mysiego raka gruczołu sutkowego. Linie komórkowe podzielono pod względem pochodzenia oraz stopnia złośliwości. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu ANOVA – dla wielokrotnych powtórzeń. * $p < 0,05$.

do indukowania przerzutów do płuc w mysim modelu *in vivo*, została wyprowadzona z linii EO771²²⁶. Linia komórkowa NF-639 nie została przydzielona do żadnej z grup. W przypadku linii komórkowych: EO771 oraz EO771.LMB odnotowano wyraźnie niższy poziom miR-31-5p w porównaniu do pozostałych linii komórkowych (Ryc.12, wykres a). Najwyższy poziom badanej cząsteczki wśród mysich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego zaobserwowano w linii komórkowej Eph4 1424.1, był on jednak nieco niższy niż w linii kontrolnej eksperymentu (komórki prawidłowego nabłonka gruczołu sutkowego myszy Eph4-Ev). Pozostałe linie komórkowe cechowały się podobnym poziomem ekspresji badanej cząsteczki. Z kolei linia 67NR charakteryzowała się najwyższą – ponad 60-krotnie wyższą ekspresją miR-147-3p w porównaniu do komórek prawidłowych Eph4 Ev (Ryc.12, wykres b). W linii komórkowej 168 FARN odnotowano ponad 30% niższą ekspresję miR-147-3p względem linii 67NR. Ponadto zaobserwowano, że linia komórkowa EO771.LMB cechuje się ok. 50% niższą ekspresją badanej cząsteczki niż linia EO771. Zauważono, że pozostałe linie komórkowe charakteryzują się poziomem ekspresji podobnym do komórek prawidłowych. Zaobserwowano, że linia komórkowa NF-639 charakteryzuje się najwyższą ekspresją miR-223-3p w porównaniu do kontroli (Eph4 Ev) (Ryc.12, wykres c). Ponadto zauważono, że poziom ekspresji badanego mikroRNA występuje na podobnym poziomie w pozostałych liniach komórkowych.

4.3 Analiza poziomu ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA w osoczu i guzie nowotworowym uzyskanym od pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem piersi.

Badania poziomu wybranych cząsteczek mikroRNA wykonano również w materiale pochodzenia ludzkiego – w osoczu i w guzie nowotworowym pochodzącym od chorych na inwazyjnego raka gruczołu sutkowego leczonych w Dolnośląskim Centrum Onkologii we Wrocławiu. Patrząc na wykres (Ryc. 13, wykres a) można stwierdzić, że najwyższy poziom miR-31-5p odnotowano w osoczu pochodzącym od osób zdrowych, natomiast u pacjentek z rozsianym (przerzutującym) nowotworem piersi zaobserwowano dwukrotnie niższy poziom ekspresji badanej cząsteczki w porównaniu do grupy zdrowej, wynik ten był istotny statystycznie. W grupie pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem nieprzerzutującym odnotowano nieco wyższy poziom ekspresji miR-31-5p w stosunku do grupy pacjentek z rozsianym nowotworem. Z danych wynika, że najwyższy poziom miR-147-3p obserwowano w grupie pacjentek z nowotworem nieprzerzutującym, w osoczu pacjentek z nowotworem nieprzerzutującym oraz rozsianym odnotowano 3-krotnie wyższy poziom miR-147-3p w stosunku do grupy zdrowych ochotniczek. (Ryc. 13, wykres b). Opiswane różnice ekspresji

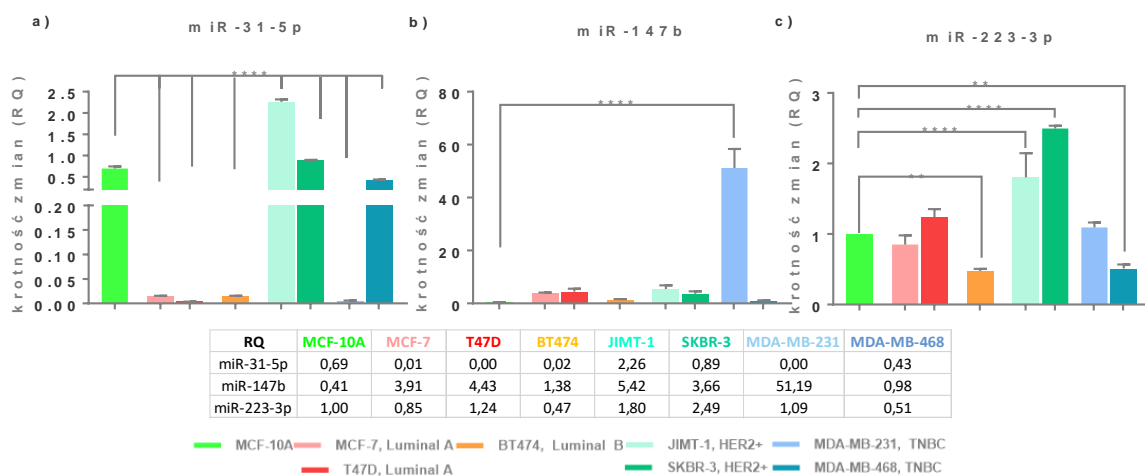
były znacznie statystycznie w porównaniu do grupy zdrowych ochotniczek. Najwyższy poziom miR-223-3p obserwowano w grupie pacjentek z nowotworem rozsiałym, natomiast nieco niższy poziom ekspresji odnotowano w grupie pacjentek z nowotworem miejscowym (Ryc. 13, wykres c). Zaobserwowano, że w tkance guza ekspresja wszystkich badanych cząsteczek mikroRNA była najwyższa u pacjentek z rozsiałym nowotworem. Największą różnicę: ponad 5-krotnie wyższą ekspresję miR-31-5p – w stosunku do grupy pacjentek z nowotworem miejscowym odnotowano u pacjentek z nowotworem rozsiałym (Ryc. 13, wykresy d, e, f).



Rycina 13 Poziom ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA zbadano również w osoczu i guzie nowotworowym uzyskanym od pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem piersi. Grupę kontrolną w przypadku osocza stanowiło osocze uzyskane od zdrowych dawczyń, natomiast w przypadku guza – całkowite spolowane RNA uzyskane z prawidłowej tkanki piersi od 5 zdrowych dawczyń. Osocze: grupa kontrolna – n = 7, rak gruczołu sutkowego nieprzerzutujący oraz z przerzutami do węzłów chłonnych – n=50, rak gruczołu sutkowego z przerzutami odległymi – n=10. Guz nowotworowy: grupa kontrolna – 3 techniczne powtórzenia, rak gruczołu sutkowego nieprzerzutujący oraz z przerzutami do węzłów chłonnych – n=30, rak gruczołu sutkowego z przerzutami odległymi – n=5. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu Kruskal-Wallis. *p<0,05.

4.4 Analiza poziomu ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA w lizatach linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego.

Analizę poziomu ekspresji mikroRNA wykonano również w lizatach linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego. Linie komórkowe zostały podzielone na podstawie występujących podtypów molekularnych raka gruczołu sutkowego. Linie podzielono w następujący sposób: MCF-7 i T47D - Luminal A, BT-474 – luminal B, JIMT-1, SKBR-3 – HER2+ oraz MDA-MB -231 i MDA-MB-468 – podtyp potrójnie ujemny. Kontrolę eksperymentu stanowiła linia MCF-10A – nieśmiertelny nabłonek gruczołu sutkowego. Zaobserwowano, że linie komórkowe: JIMT-1 oraz SKBR-3 o tym samym podtypie

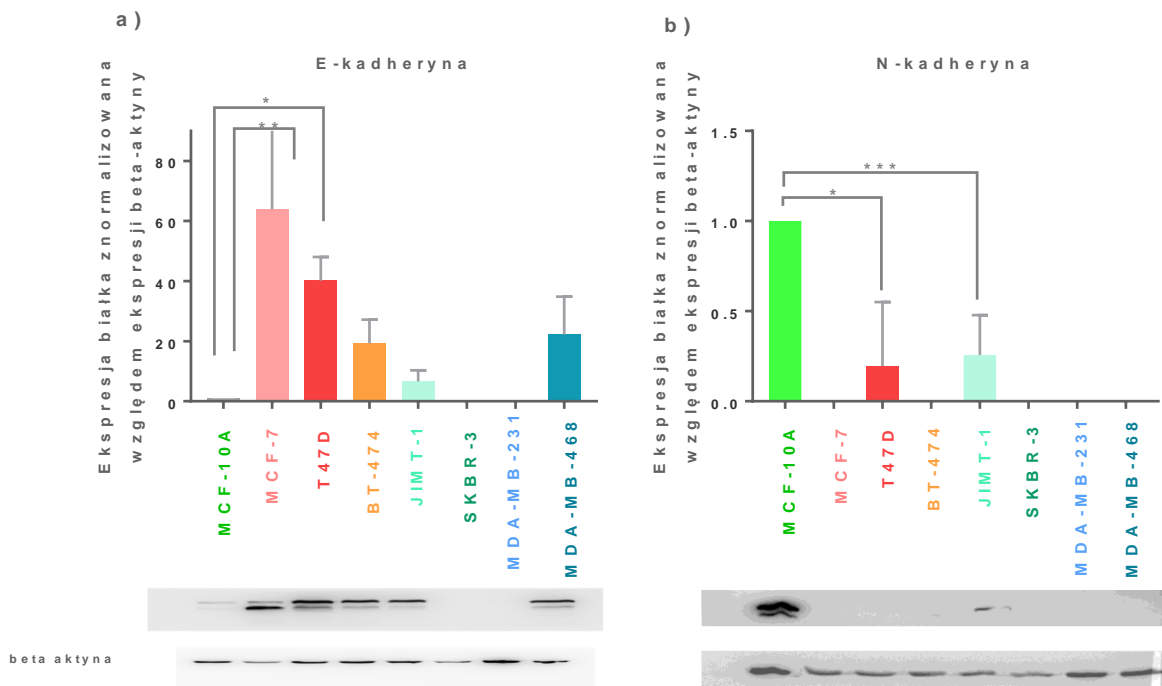


Rycina 14 Profil ekspresji dojrzałych cząsteczek mikroRNA w lizatach linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego, pogrupowanych pod względem występujących podtypów molekularnych nowotworu piersi. Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując test ANOVA oraz Kruskal-Wiliss'a dla powtórzeń wielokrotnych. * $p < 0,05$.

molekularnym raka gruczołu sutkowego – HER2+ cechowały się odmiennym wzorem ekspresji – linia komórkowa JIMT-1 charakteryzowała się ponad 2-krotnie wyższą ekspresją miR-31-5p w porównaniu do linii SKBR-3 (Ryc.14, wykres a). Dodatkowo zauważono, że linia JIMT-1 cechuje się jednocześnie ponad 3-krotnie wyższą ekspresją miR-31-5p w porównaniu do linii kontrolnej i najwyższą ekspresją badanego mikroRNA w porównaniu do pozostałych linii komórkowych, różnice te są znamienne statystycznie. Ponadto zaobserwowano, że linia komórkowa MDA-MB-468 charakteryzuje się podobnym poziomem ekspresji cząsteczki miR-31-5p w porównaniu do kontroli eksperymentu. Pozostałe linie badane nie wykazywały ekspresji badanej cząsteczki miR-31-5p. Linia komórkowa MDA-MB-231 charakteryzowała się najwyższą ekspresją miR-147-3p w porównaniu do kontroli eksperymentu i pozostałych linii badanych (Ryc.14, wykres b). Ponadto zauważono, że linie komórkowe o podtypie molekularnym luminalnym A oraz HER2+ cechują się podobną ekspresją badanej cząsteczki miR-147-3p. Linie komórkowe BT-474 oraz MDA-MB-468 cechują się ekspresją miR-147-3p

podobną do kontroli eksperymentu. Linia komórkowa SKBR-3 charakteryzuje się najwyższym poziomem ekspresji miR-223-3p w stosunku do linii kontrolnej i pozostałych linii badanych (Ryc.14, wykres c). Różnica w poziomie ekspresji między linią badaną – SKBR-3, a kontrolą eksperymentu jest znamienne statystycznie. Linie komórkowe - BT-474 i MDA-MB-468 oraz MCF-7 i MDA-MB-231 o odmiennym podtypie molekularnym posiadają podobny wzór ekspresji cząsteczki miR-223-3p, z kolei linia T47D cechowała się 2-krotnie wyższą ekspresją miR-223-3p w porównaniu do kontroli eksperymentu.

4.5 Ocena poziomu ekspresji wybranych białek uczestniczących w przejściu nabłonkowo mezenchymalnym w lizatach ludzkich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego: E- kadheryny, N-kadheryny.



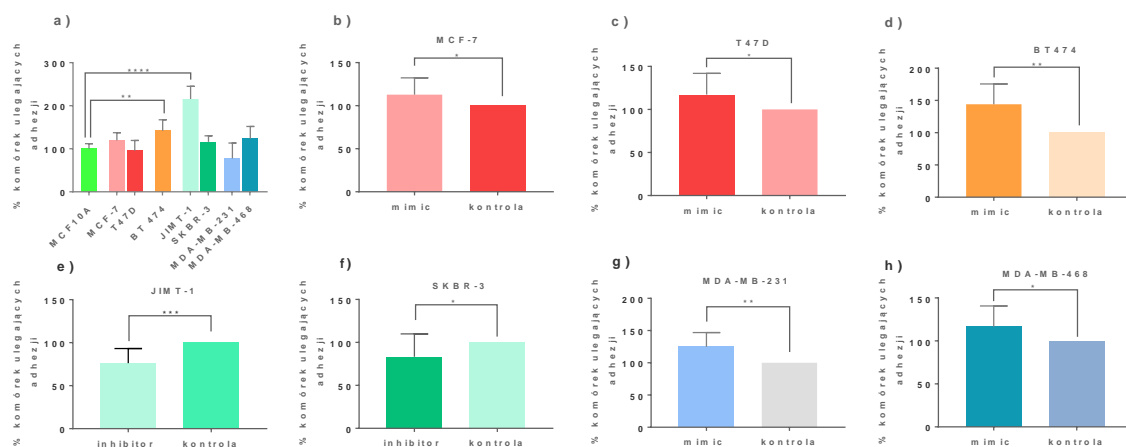
Rycina 15 Poziom wybranych białek uczestniczących w przejściu nabłonkowo mezenchymalnym zbadano w lizatach linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego. Linie podzielono pod względem podtypów molekularnych nowotworu piersi. Dodatkowo pod wykresem dla każdego z badanych białek zestawiono po 1 reprezentatywnym wyniku z Western Blott dla badanego białka i dla β - aktyny. Wyniki pozostałych powtórzeń znajdują się w Suplemencie. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu testu ANOVA dla powtórzeń wielokrotnych. * $p < 0,05$.

W lizatach linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego zbadano poziom wybranych białek uczestniczących w przejściu nabłonkowo-mezenchymalnym. Z danych wynika, że najwyższy poziom E-kadheryny odnotowano w linii MCF-7 (Ryc.15, wykres a). Ponadto zauważono, że linia komórkowa T47D o takim samym podtypie molekularnym jak linia MCF-7 charakteryzuje się niższym o 30% poziomem badanego białka w stosunku do linii MCF-7. Różnice w poziomie ekspresji w obu liniach komórkowych w porównaniu do kontroli eksperymentu – linii MCF-10A są znamienne statystycznie. Najniższy poziom E- kadheryny zaobserwowano w linii JIMT-1. Linie komórkowe – BT-474 oraz MDA-MB-468 o różnych podtypach molekularnych cechują się podobnym poziomem ekspresji badanego białka (Ryc.15, wykres a). Jak można zauważyć na wykresie (Ryc.15, wykres a) linie komórkowe – SKBR-3 oraz MDA-MB-231 nie wykazują ekspresji E-kadheryny. W przypadku N-kadheryny linie komórkowe o różnych podtypach molekularnych – T47D oraz SKBR-3 cechują się ekspresją badanego białka na podobnym poziomie (Ryc.15, wykres b). Różnice

w ekspresji w porównaniu do kontroli eksperymentu są znamienne statystycznie. Pozostałe linie komórkowe nie wykazują ekspresji N-kadheryny. Oznaczenie wyżej wymienionych białek wykonano w czterech niezależnych powtórzeniach. Powyżej przedstawiono reprezentatywny wynik z przeprowadzonego eksperymentu. Trzy pozostałe powtórzenia zamieszczono w Suplemencie na rycinie 21.

4.6 Porównanie zdolności adhezji do fibronektyny dzikich komórek ludzkich linii raka gruczołu sutkowego, komórek z wyciszoną ekspresją miR-31-5p oraz z jego nadekspresją.

Profil ekspresji wybranej cząsteczki mikroRNA w liniach komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego okazał się pomocny do przeprowadzenia przejściowej transfekcji (Ryc.16, wykres a). Linie komórkowe, które cechowały się wysoką ekspresją badanej cząsteczki mikroRNA - JIMT-1 oraz SKBR-3 poddano transfekcji przy użyciu inhibitora miR-31-5p, którego celem jest obniżenie poziomu badanego mikroRNA. Natomiast w pozostałych liniach



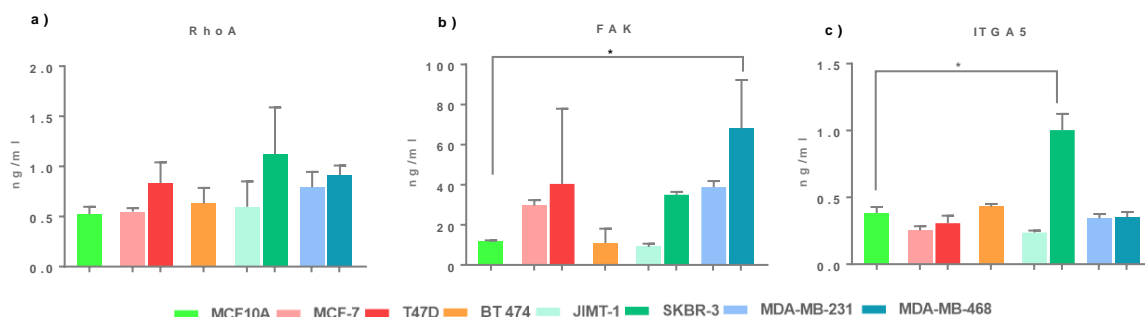
Rycina 16. Porównanie zdolności adhezji do fibronektyny w liniach dzikich ludzkiego raka gruczołu sutkowego – wykres a), kontrolę eksperymentu stanowiła linia MCF 10A oraz w liniach w których przeprowadzono przejściową transfekcję wykresy b) -h). kontrolę eksperymentu w przypadku linii transfekowanych stanowiła kontrola negatywna. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu ANOVA dla powtórzeń wielokrotnych, testu T – Studenta oraz testu Wilcoxon. * $p < 0,05$.

komórkowych, które charakteryzowały się niską ekspresją badanej cząsteczki mikroRNA, przeprowadzono transfekcję z użyciem mimetyku miR-31-5p, którego celem jest zwiększenie ilości miR-31-5p w komórkach. Porównując zdolność adhezji do fibronektyny komórek badanych linii raka gruczołu sutkowego typu dzikiego, stwierdzono, że największą zdolnością adhezji do fibronektyny charakteryzowała się linia komórkowa JIMT-1 - zaobserwowano ponad 100% wyższą adhezję do fibronektyny w stosunku do linii kontrolnej – MCF-10A. O ponad 40% wyższą zdolnością adhezji w stosunku do linii kontrolnej charakteryzowała

się linia BT-474 (Ryc.16, wykres a). Przedstawione różnice zdolności adhezji do fibronektyny wymienionych linii w porównaniu do kontroli eksperymentu były znamienne statystycznie. Linie komórkowe MCF-7, SKBR-3 oraz MDA-MB-468 o odmiennych podtypach molekularnych cechowały się nieco wyższą zdolnością adhezji niż linia kontrolna, natomiast linie komórkowe MDA-MB-231 oraz T47D charakteryzowały się niższą zdolnością adhezji do fibronektyny w porównaniu do linii kontrolnej. Różnice te nie były znamienne statystycznie. Zaobserwowano, że linie komórkowe, które zostały poddane transfekcji przy użyciu mimetyku miR-31 cechowały się zwiększoną zdolnością adhezji do fibronektyny w stosunku do kontroli (Ryc.16, wykresy b, c, d, g, h), natomiast linie u których przeprowadzono transfekcję przy użyciu inhibitora charakteryzowały się obniżoną zdolnością adhezji do fibronektyny w stosunku do kontroli eksperymentu (Ryc.16, wykres e, f).

4.7 Ocena ekspresji białek regulowanych przez wybraną cząsteczkę miR-31-5p w komórkach ludzkich linii raka gruczołu sutkowego typu dzikiego oraz liniach transfekowanych.

Poziom wybranych białek regulowanych przez cząsteczkę miR-31-5p zbadano również w lizatach dzikich linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego. Z wykresu (Ryc.17, wykres a) wynika, że linie komórkowe: MCF-7, BT-474 oraz JIMT-1 o różnych podtypach

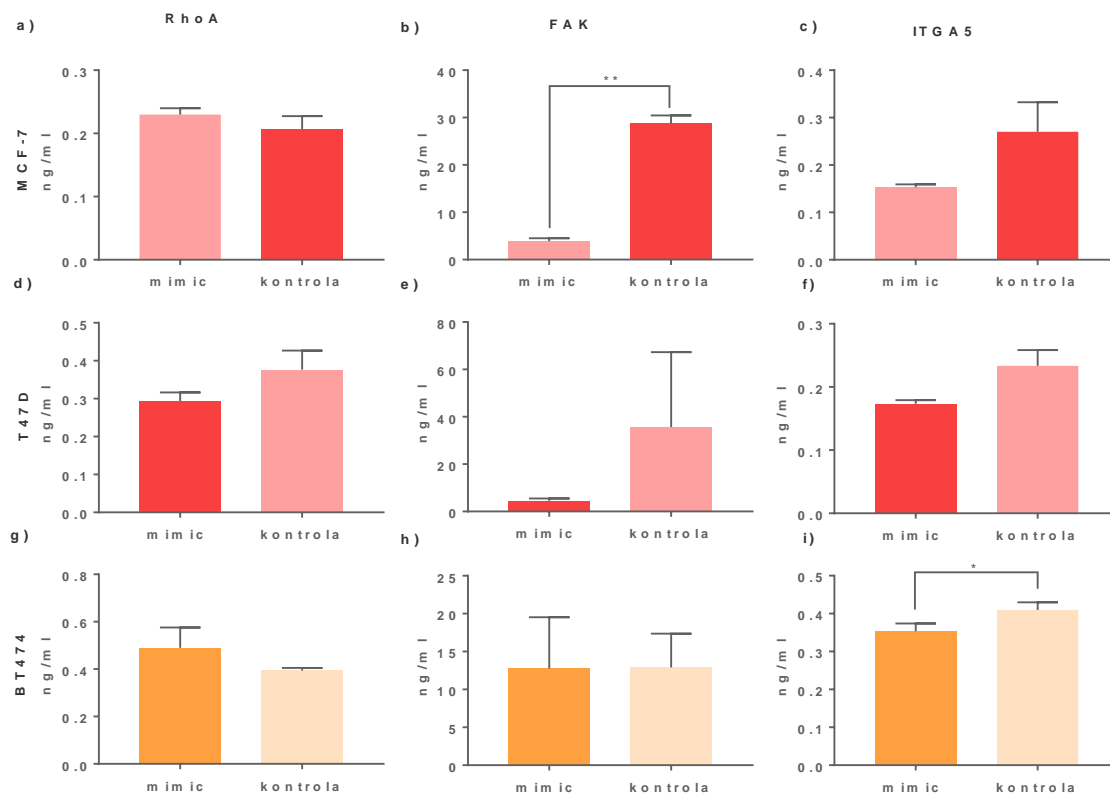


Rycina 17 Poziom wybranych białek – RhoA, FAK i ITGA5 regulowanych przez cząsteczkę miR-31-5p w lizatach dzikich linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego oznaczony za pomocą techniki ELISA. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu ANOVA dla powtórzeń wielokrotnych * $p < 0,05$. Kontrolę eksperymentu stanowiła linia MCF10A.

molekularnych cechują się podobnym stężeniem białka RhoA w porównaniu do kontroli eksperymentu. Najwyższym – 2-krotnie większym stężeniem badanego białka w porównaniu do kontroli eksperymentu charakteryzowała się linia SKBR-3. Z kolei zaobserwowano, że linie komórkowe: T47D, MDA-MB-231 oraz MDA-MB-468 wykazywały podobny poziom ekspresji badanego białka. Patrząc na wykres (Ryc. 17, wykres b) można wywnioskować, że linie komórkowe BT-474 oraz JIMT-1 cechują się podobnym stężeniem białka FAK w porównaniu do kontroli eksperymentu. Z danych wynika, że linia komórkowa MDA-MB-468 charakteryzuje się najwyższym - ponad 6-krotnie wyższym stężeniem badanego białka

w porównaniu do linii kontrolnej. Zaobserwowano, że linie komórkowe: T47D, SKBR-3 oraz MDA-MB-231 wykazują podobny poziom badanego białka – ponad 4-krotnie wyższy w porównaniu do kontroli. Różnice w poziomie stężenia badanego białka w linii SKBR-3 oraz MDA-MB-231 w stosunku do kontroli eksperymentu były znamienne statystycznie. Dwukrotnie wyższe stężenie badanego białka w stosunku do kontroli eksperymentu zaobserwowano w linii komórkowej T47D. Różnica ta również była znamienna statystycznie. Dane na wykresie (Ryc.17, wykres c) wskazują, że linia komórkowa SKBR-3 cechuje się najwyższym stężeniem białka ITGA5 – 2-krotnie wyższym w porównaniu do linii kontrolnej. Różnica ta jest znamienna statystycznie. Najniższym stężeniem w porównaniu do kontroli eksperymentu cechują się linie MCF-7 oraz JIMT-1. Ponadto zaobserwowano, że linie komórkowe MDA-MD-231 oraz MDA-MB-468 cechują się takim samym stężeniem badanego białka, natomiast linia BT-474 cechuje się nieco wyższym stężeniem badanego białka w stosunku do linii kontrolnej.

W lizatach linii komórkowych poddanych transfekcji zmierzono poziom poszczególnych białek – RhoA, FAK i ITGA5 regulowanych przez cząsteczkę miR-31-5p przy użyciu testów ELISA. Kontrolę eksperymentu stanowiła kontrola negatywna przejściowej transfekcji.



Rycina 18. Poziom regulowanych przez cząsteczkę miR-31-5p białek – RhoA, FAK i ITGA5 oznaczony za pomocą techniki ELISA w liniach komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego o podtypie luminalnym A – MCF-7, T47D oraz o podtypie luminalnym B – linii BT-474 transfekowanych mimetykiem miR-31 względem kontroli (kontrolę stanowiła transfekcja kontrolą mimetyka). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu T – Studenta oraz testu Wilcoxon'a. * $p < 0,05$.

MCF-7

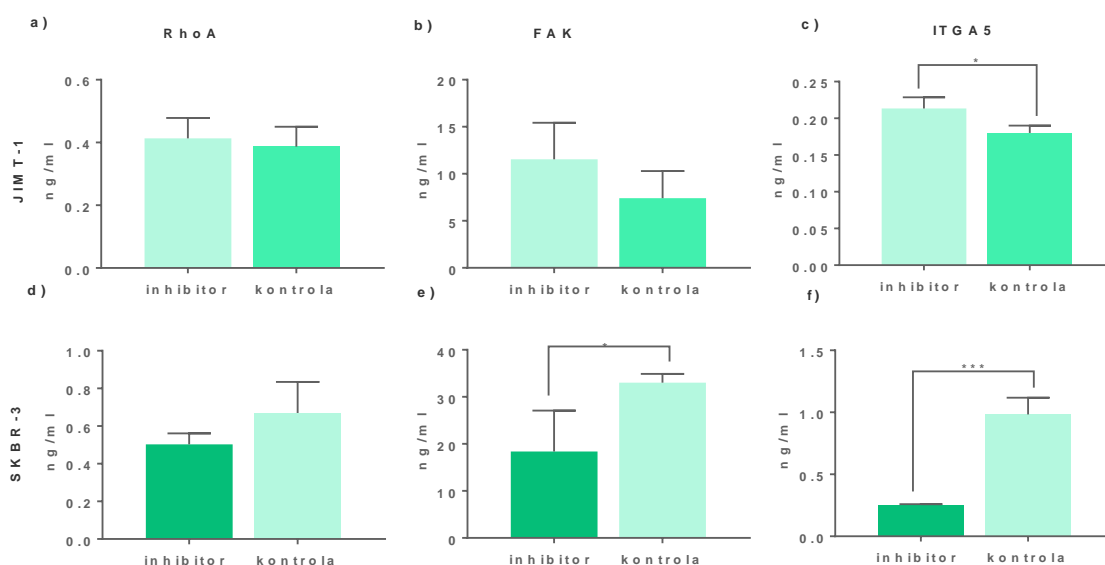
Zaobserwowano, że poziom białka RhoA w lizatach linii komórkowej MCF-7 poddanej transfekcji był nieco wyższy w stosunku do kontroli (Ryc.18, wykres a). Z kolei linia ta charakteryzowała się ponad pięciokrotnym obniżeniem stężenia białka FAK w stosunku do kontroli negatywnej. Różnica ta była znamienna statystycznie (Ryc.18, wykres b). Z danych wynika, że linia transfekowana charakteryzowała się dwukrotnym obniżeniem stężenia białka - ITGA5 w stosunku do kontroli (Ryc.18, wykres c).

T47D

Linia T47D poddana transfekcji charakteryzowała się obniżeniem stężenia białka RhoA o 22% w stosunku do kontroli negatywnej (Ryc.18, wykres d). Podobną tendencję obserwowano w przypadku białka ITGA5 linia ta charakteryzowała się obniżeniem stężenia badanego białka o 17% w porównaniu do kontroli negatywnej eksperymentu (Ryc.18, wykres e). Z danych wynika, że stężenie białka FAK było prawie 6-krotnie niższe w linii transfekowanej niż w kontroli eksperymentu (Ryc.18 wykres f).

BT474

Linia BT-474 poddana transfekcji cechowała się ok. 20% wzrostem stężenia białka RhoA w stosunku do kontroli negatywnej (Ryc.18, wykres g). Z danych wynika, że stężenie białka FAK w linii transfekowanej jak i kontroli oscylowało na podobnym poziomie (Ryc.18, wykres h). Ponadto zaobserwowano 15% spadek stężenia białka ITGA5 w linii transfekowanej w stosunku do kontroli eksperymentu (Ryc.18, wykres i). Podane Różnica w ekspresji białka ITGA5 była znamienna statystycznie.



Rycina 19 Poziom wybranych białek – RhoA, FAK i ITGA5 regulowanych przez cząsteczkę miR-31-5p oznaczony za pomocą techniki ELISA w liniach komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego o podtypie HER2+ – JIM T-1 oraz SKBR-3 transfekowanych inhibitorem miR-31 względem kontroli (kontrolę stanowiła transfekcja kontrolą inhibitora). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu T – Studenta oraz testu Wilcoxon’a. * $p < 0,05$.

JIMT-1

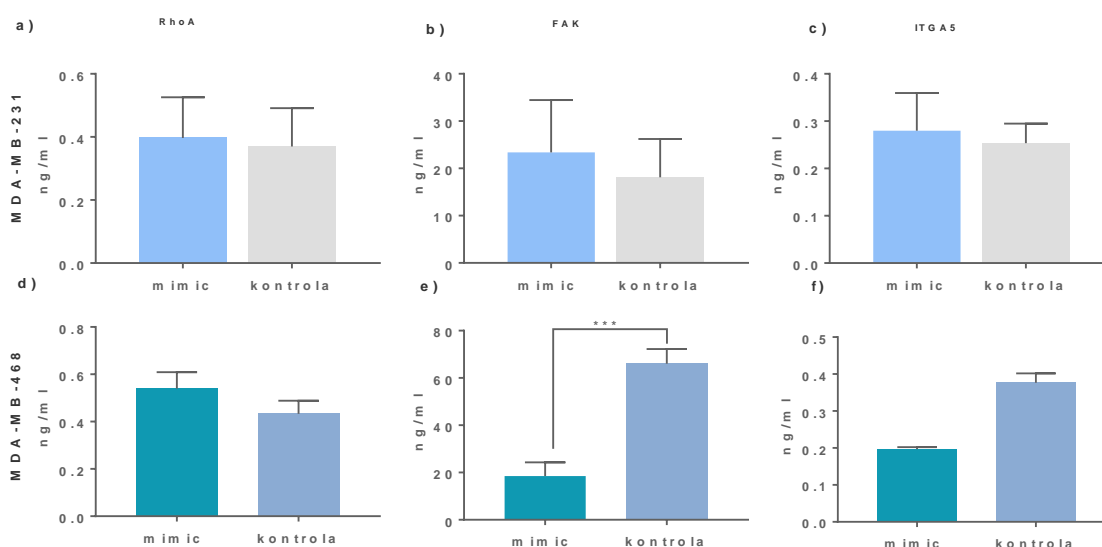
Linia transfekowana charakteryzowała się nieco wyższym stężeniem białka RhoA w stosunku do kontroli negatywnej eksperymentu (Ryc. 19, wykres a). Z wykresu (Ryc. 19, wykres b) wynika, że linia poddana transfekcji cechowała się ponad 1,5 – krotnym wzrostem stężenia białka FAK w stosunku do kontroli eksperymentu. Zaobserwowano, że stężenie białka ITGA5 w linii transfekowanej jest o 15% wyższe w porównaniu do kontroli eksperymentu. Różnica ta jest znamienna statystycznie (Ryc. 19, wykres c).

SKBR-3

Wyniki niniejszego eksperymentu wskazują, że linia poddana transfekcji charakteryzowała się obniżonym poziomem badanego białka RhoA o 20% w stosunku do linii kontrolnej (Ryc. 19, wykres d). Podobną tendencję zauważono w białku FAK – obserwowano obniżenie poziomu badanego białka w linii transfekowanej o ok. 50% w stosunku do kontroli negatywnej (Ryc. 19, wykres e). Stężenie białka ITGA5 było 4-krotnie obniżone w linii transfekowanej w porównaniu do kontroli (Ryc. 19, wykres f).

MDA-MB-231

Zaobserwowano, że poziom badanych białek w linii poddanej transfekcji oscylował na poziomie takim samym jak w linii kontrolnej lub nieco wyższym. Analiza statystyczna wykazała, że różnice te nie są znamienne statystycznie (Ryc. 20, wykres a, b i c).



Rycina 20 Poziom wybranych białek – RhoA, FAK i ITGA5 regulowanych przez cząsteczkę miR-31-5p oznaczony za pomocą techniki ELISA w liniach komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego o podtypie TNBC – MDA -MB-231 oraz MDA-MB-468 transfekowanych mimetykiem miR-31 względem kontroli (kontrolę stanowiła transfekcja kontrolną mimetyka). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu T – Studenta oraz testu Wilcoxon'a. * $p < 0,05$.

MDA-MB-468

Patrząc na wykres (Ryc. 20, wykres d) można zauważyć wzrost stężenia badanego białka RhoA o ok. 20% w stosunku do linii kontrolnej. Najwyższe ponad trzykrotne obniżenie stężenia białka FAK cechowało linie poddaną transfekcji w porównaniu do kontroli eksperymentu (Ryc. 20, wykres e). Różnica ta była znamienna statystycznie. 2-krotnie obniżenie stężenia białka ITGA5 obserwowano w linii poddanej transfekcji (Ryc. 20, wykres f).

ANALIZA STATYSTYCZNA

Analizę statystyczną wykonano w programie GraphPad Prism 7.1. Do rozkładu analizy danych, wykorzystano test normalności Shapiro-Wilk'a. Testy statystyczne wykorzystane do analizy danych zostały przedstawione w legendach rycin. Za istotne statystycznie uznano różnice między grupami, dla których $p < 0,05$.

V. DYSKUSJA

Rak gruczołu sutkowego zdiagnozowany jako nieprzerzutujący, na wczesnym etapie rozwoju jest wyleczalny u 70-80% pacjentek, natomiast zaawansowany nowotwór piersi z przerzutami do narządów odległych jest uznawany za nieuleczalny przy użyciu aktualnie dostępnych opcji terapeutycznych. Dlatego dąży się do tego, aby przyszłe koncepcje terapeutyczne były oparte na terapii personalizowanej. Obecnie, badacze skupiają się na poszukiwaniu biomarkerów, które pozwolą na diagnozę nowotworu na wczesnym etapie jego rozwoju^{17,227}. Obiecującą grupą cząsteczek do poszukiwań biomarkerów okazują się być mikroRNA. Zgodnie z piśmiennictwem cząsteczki mikroRNA są zaangażowane w regulację kluczowych procesów w naszym organizmie dlatego nieprawidłowości w profilu ich ekspresji mogą być przyczyną wielu chorób, w tym nowotworów²²⁸. Przeprowadzone badania z wykorzystaniem cząsteczek mikroRNA sugerują, że mogą okazać się one przydatnym narzędziem diagnostycznym w rozpoznawaniu nowotworów piersi – szczególnie o charakterze złośliwym na wczesnym etapie przerzutowania. Z tego powodu wielu badaczy rozpoczęło badania kliniczne nad wykorzystaniem cząsteczek mikroRNA w leczeniu wielu typów nowotworów.

Dlatego głównym celem niniejszej pracy było wykonanie badań mających na celu wytypowanie mikroRNA jako markera pozwalającego na rozpoznanie przerzutującego raka gruczołu sutkowego.

Badania przesiewowe ekspresji mikroRNA

Badania rozpoczęto od wykonania przesiewowych eksperymentów *in vivo* na mysich modelach raka gruczołu sutkowego - modelu nieprzerzutującego 67NR oraz jego przerzutującego odpowiednika 4T1 w celu wytypowania trzech cząsteczek mikroRNA do dalszych badań. Wymienione modele mysiego raka gruczołu sutkowego są często stosowane w badaniach nad przerzutującym nowotworem piersi. Model 4T1 jest jednym z nielicznych modeli raka gruczołu sutkowego zdolnych do przerzutowania do miejsc, do których przerzutuje ludzki rak piersi – do płuc, wątroby, węzłów chłonnych czy mózgu²²⁰. Co więcej, stanowi on odpowiednik IV stadium zaawansowania ludzkiego raka gruczołu sutkowego, a autorzy niektórych prac przypuszczają, że linia komórkowa 4T1 jest linią o podtypie potrójnie ujemnym^{221,229}.

Podobne badania z wykorzystaniem ilościowego oszacowania ekspresji mikroRNA w mysim modelu raka gruczołu sutkowego 4T1 *in vivo* wykonali Pillar i wsp., którzy oszacowali poziom ekspresji mikroRNA w tkance guza pierwotnego oraz w mikroprzerzutach uzyskanych z tkanki płuc. Pillar i wsp. w celu zidentyfikowania cząsteczek mikroRNA na wczesnych stadiach powstawania przerzutów przeanalizowali dane NanoString pod kątem cząsteczki mikroRNA, która spełnia następujące kryteria: wykazuje wysoką ekspresję badanej cząsteczki mikroRNA, w co najmniej jednej z grup z przerzutami do płuc, które są istotne statystycznie oraz krotnością zmian większą niż 2. Połączenie tych trzech kryteriów, zaowocowało wytypowaniem następujących cząsteczek mikroRNA: miR-96, miR-100, miR-223 oraz miR-210, następnie eksperyment powtórzono przy użyciu techniki PCR, gdzie dowiedziono, że tylko miR-96 i miR-100 wykazywały takie same wzory ekspresji, natomiast miR-223 i miR-210 niestety nie²³⁰. W przeprowadzonych badaniach własnych również zaobserwowano podwyższenie ekspresji cząsteczki miR-96 w tkance guza u myszy obciążonych komórkami przerzutującej linii 4T1 - zarówno w 12 jak i 24 dniu rozwoju tego nowotworu w stosunku do guzów od myszy obciążonych komórkami linii nieprzerzutującej 67NR oraz kontroli eksperymentu. Cząsteczka ta nie została wybrana do dalszych badań z powodu małych różnic w ekspresji między 12 a 24 dniem rozwoju nowotworu 4T1. Kolejną cząsteczką, której ekspresja również została zaobserwowana w badaniach własnych była cząsteczka miR-223. W przeciwieństwie do badań Pillara i wsp. ekspresja cząsteczki miR-223 w przeprowadzonych własnych badaniach przesiewowych została potwierdzona w eksperymencie wykonanym na pojedynczych tkankach płuc uzyskanych od myszy - oszacowany poziom ekspresji w tkance płuc był znacznie podwyższony w 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1 w porównaniu do 12 dnia i kontroli eksperymentu. Cząsteczka ta została wybrana do dalszych badań. W kolejnych badaniach, Phua i wsp. zidentyfikowali m.in. cząsteczkę miR-31-5p, której wyższą ekspresję zaobserwowano w badanych mysich nowotworach w porównaniu do prawidłowych mysich komórek nabłonka sutka. Poziom miR-31 oznaczono również w ludzkich liniach komórkowych raka gruczołu sutkowego. Zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji miR-31-5p w liniach komórkowych o podtypie TNBC: MDA-MB-231 i MDA-MB-468 oraz o podtypie luminalnym A: MCF-7 oraz T47D, co było zgodne z przeprowadzonymi badaniami własnymi²³¹.

Ilościowe oszacowanie ekspresji mikroRNA wykorzystano również w badaniach nad ludzkim rakiem okrężnicy gdzie autorzy badali poziom ekspresji mikroRNA w tkankach uzyskanych od pacjentów. Przeprowadzone badania pozwoliły na zidentyfikowanie ekspresji

23 cząsteczek mikroRNA. Ponad 2/3 badanych cząsteczek wykazywało nadekspresję – co mogło wskazywać na ich właściwości onkogenne - wśród nich zidentyfikowano następujące cząsteczki mikroRNA wykazujące nadekspresję w tkance objętej nowotworem, są to: miR-182, miR-183, miR-18a, miR-21, miR-224 i miR-96-5p²³². W raku żołądka (GC, ang. gastric cancer) zidentyfikowano łącznie 24 cząsteczki mikroRNA z rozregulowaną ekspresją między prawidłową tkanką nieobjętą nowotworem a tkanką raka żołądka. Spośród nich 22 cząsteczki mikroRNA (miR-223, miR-106b, miR-147, miR-34a, miR-130b, miR-106a, miR-18a, miR-17, miR-98, miR-616, miR-181a-2, miR-185, miR-1259, miR-601, miR-196a, miR-221, miR-302f, miR-340, miR-337-3p, miR-520c-3p, miR-575 i miR-138) były znacząco podwyższone w GC ($P < 0,05$), podczas gdy tylko miR-638 oraz miR-378 były znacząco obniżone w GC ($P < 0,05$) w porównaniu z tkanką żołądka nieobjętą nowotworem²³³. W przeprowadzonych badaniach własnych, w tkance płuc w 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1 również zaobserwowano wzrost ekspresji cząsteczki miR-147-3p, który został potwierdzony w dalszych badaniach z wykorzystaniem pojedynczych tkanek mysich. Został on wybrany do dalszych badań. U młodych mężczyzn ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu krokowego uzyskano inny wzorzec ekspresji niż w prawidłowej nieobjętej nowotworem tkance gruczołu krokowego i tkance raka gruczołu krokowego uzyskanego od starszych mężczyzn. Dziewięć cząsteczek mikroRNA (miR-140-5p, miR-146a, miR-29b, miR-9, miR-124-3p, let-7f-5p, miR-184, miR-373, miR-146b-5p) wykazywało różnice w ekspresji w porównaniu z tkanką guza uzyskaną od starszych mężczyzn. Czternaście cząsteczek mikroRNA uległo nadekspresji (miR-1973, miR-663a, miR-575, miR-93-5p, miR-630, miR-600, miR-494, miR-150-5p, miR-137, miR-25-3p, miR-375, miR-489, miR-888-5p, miR-142-3p), podczas gdy u 9 stwierdzono obniżenie ekspresji (miR-21-5p, miR-363-3p, miR-205-5p, miR-548a, miR-3195, miR-145-5p, miR-143-3p, miR-222-3p, miR-221-3p) porównując młodą tkankę raka gruczołu krokowego z prawidłową, nieobjętą nowotworem²³⁴. W badaniach własnych nadekspresję miR-9 w tkance płuc zaobserwowano w 12 oraz 24 dniu rozwoju nowotworu 4T1 w porównaniu do zdrowej, nieobjętej nowotworem tkanki płuc oraz do 67NR. Cząsteczka ta nie została wybrana do dalszych badań z uwagi na małe różnice w ekspresji między badanymi modelami nowotworu.

W przeprowadzonych badaniach własnych poziom ekspresji cząsteczek mikroRNA został oszacowany w trzech materiałach pochodzenia mysiego:

- w łatwym do pozyskania w sposób nieinwazyjny osoczu gdzie nieprawidłowości w ekspresji mogą już świadczyć o stanie chorobowym,

- w tkance płuc jako najczęstszym miejscu przerzutów zaawansowanego raka gruczołu sutkowego, które może służyć do badania niszy premetastatycznej,
- w tkance guza w celu zbadania jak mikrośrodowisko guza wpływa na zmiany w ekspresji cząsteczek mikroRNA.

Największe różnice w ekspresji mikroRNA między linią 67NR a 4T1 na różnym etapie rozwoju i przerzutowania nowotworu zaobserwowano dla następujących cząsteczek mikroRNA: miR-31-5p w tkance guza oraz miR-147-3p i miR-223-3p w tkance płuc. Wymienione cząsteczki mikroRNA zostały wytypowane do dalszych badań.

miR-147

Badania przeprowadzone przez Liu i wsp. wykazały, że ekspresja cząsteczki miR-147-3p jest indukowana w mysich makrofagach po stymulacji LPS-em receptorów TLR2, TLR3 oraz TLR4. Indukcja ekspresji miR-147-3p odbywa się w wyniku przyłączenia do promotora genu dwóch czynników transkrypcyjnych NF- κ B oraz STAT1 α . Wyniki tych badań pokazują, że miR-147-3p bierze udział w pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego, która jest zdolna do hamowania prozapalnej odpowiedzi makrofagów na wiele ligandów TLR²³⁵. Swoiste dla nowotworów makrofagi TAMs (ang. Tumor Associated Macrophages) są komórkami zróżnicowanymi pod względem fenotypowym oraz czynnościowym. Makrofagi mogą ulegać charakterystycznemu, fenotypowemu przekształceniu pod wpływem wydzielanych przez komórki nowotworowe cytokin IL-10 i TGF- β (polaryzacji komórkowej z M1 do M2). Mogą one wydzielać cytokiny prozapalne, co jest charakterystyczne dla klasy M1 oraz cytokiny przeciwzapalne i immunosupresyjne, co jest charakterystyczne dla fenotypu M2. Zatem, nadekspresja miR-147-3p w tkance guza u myszy obarczonych komórkami 4T1 może być spowodowana ucieczką nowotworu spod nadzoru układu immunologicznego, co skutkuje niekontrolowanym wzrostem guza nowotworowego i wiąże się ze wzrostem ekspresji badanej cząsteczki mikroRNA (Ryc.11, wykres e). Co więcej oszacowany poziom ekspresji miR-147-3p w mysich tkankach guza, niezależnie od badanego typu nowotworu – 67NR lub 4T1, był wyższy w stosunku do prawidłowej tkanki gruczołu sutkowego. Podobna tendencja ekspresji miR-147-3p została zaobserwowana w tkance guza u pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego. Ekspresja miR-147-3p była podwyższona zarówno w grupie ze zdiagnozowanym nieprzerzutującym jak i przerzutującym rakiem gruczołu sutkowego w porównaniu do prawidłowej tkanki piersi pobranej od kilku ochotniczek (Ryc. 13, wykres e).

Mysi rak gruczołu sutkowego 4T1 na zaawansowanym etapie rozwoju spontanicznie przerzutuje m.in. do płuc, co zostało potwierdzone w pracach Tao i wsp.²²⁰ oraz Aslakson'a i Miller'a²¹⁶. W niniejszej pracy eksperyment *in vivo* został przeprowadzony na tkankach pochodzących od myszy opisanych w pracy Papiernik i wsp.²²⁵. W przytoczonej pracy policzono liczbę przerzutów w płucach myszy z nowotworem 4T1 w 24 dniu eksperymentu. Badania wykazały, że w 24 dniu eksperymentu u myszy z nowotworem 4T1 liczba przerzutów w płucach wahała się od 15 do 35²²⁵. Można zatem przypuszczać, że wysoka ekspresja miR-147-3p obserwowana w tkance płuc u myszy obciążonych komórkami 4T1 w 24 dniu eksperymentu może być związana z przerzutami na tym etapie rozwoju nowotworu (Ryc.11, wykres h). Co więcej, na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że nadekspresja wspomnianej cząsteczki mikroRNA w tkance płuc u myszy może również odgrywać ważną rolę w tworzeniu niszy premetastatycznej. Przypuszczenie to jednak wymaga dalszych badań, ponieważ jak dotąd nie opisano zaangażowania tej cząsteczki w regulację tego procesu. Co ciekawe wysoki poziom ekspresji miR-147b zaobserwowano również w tkance raka płuc w porównaniu do prawidłowej tkanki płuc u pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem płuc²³⁶.

W przypadku pacjentek, oszacowany poziom ekspresji miR-147b w osoczu i guzie nowotworowym – szczególnie w grupie pacjentek ze zdiagnozowanym przerzutującym rakiem gruczołu sutkowego - był wyższy w porównaniu do kontroli eksperymentu (Rycina 13, wykresy b, e). Co więcej, w przypadku tkanki guza w badaniach własnych obserwuje się tendencję wzrostową ekspresji badanej cząsteczki mikroRNA, jednak jej poziom ekspresji w przeciwieństwie do poziomu ekspresji w osoczu nie jest istotny statystycznie. Jak się okazuje poziom ekspresji miR-147b może być podwyższony lub obniżony w zależności od danego typu nowotworu. Podwyższony poziom obserwuje się w tkance raka wątroby u pacjentów w porównaniu do tkanki zdrowej (nieobjętej nowotworem)¹⁸⁷, natomiast niższy poziom ekspresji miR-147b zaobserwowano w tkance nowotworowej u pacjentów z innym typem nowotworu - niedrobnokomórkowym rakiem płuc (NSCLC) - w stosunku do zdrowej tkanki (nieobciążonej nowotworem). Ponadto stwierdzono, że niska ekspresja miR-147b u pacjentów z NSCLC była związana z nieprawidłowymi parametrami klinicznymi takimi jak przerzuty do węzłów chłonnych (ang. Lymph Node Metastasis, LNM) czy zaawansowanym stadium rozwoju nowotworu, co może wskazywać na zaangażowanie miR-147 w patogenezę tego nowotworu¹⁸⁹.

Dalsze badania z udziałem miR-147b przeprowadzono w lizatach ludzkich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego w celu sprawdzenia jak jego ekspresja zmienia się w zależności od podtypów molekularnych raka gruczołu sutkowego (Ryc. 14, wykres b). Jediną pracą opisującą zróżnicowanie ekspresji miR-147b w liniach komórkowych raka gruczołu sutkowego o różnych podtypach molekularnych była praca Zhanga i wsp¹⁸⁸. W tym celu autorzy pracy wykorzystali do badania linie o podtypie luminalnym A – MCF-7, z nadekspresją HER2 – SKBR-3 oraz potrójnie ujemną – MDA-MB-231. Zauważyli, że wzór ekspresji miR-147b jest zależny od podtypu molekularnego raka gruczołu sutkowego. Co więcej zaobserwowali, że w linii komórkowej o podtypie potrójnie ujemnym jest on znacznie obniżony w stosunku do kontroli (linii MCF-10A), natomiast linie o podtypie luminalnym A i z nadekspresją HER2, wykazują wyższy poziom ekspresji w stosunku do kontroli - linii komórkowej MCF-10A. W przeprowadzonych badaniach własnych poziom ekspresji w liniach komórkowych MCF-7 oraz SKBR-3 jest porównywalny, a jego ekspresja jest wyższa od kontroli eksperymentu – linii komórkowej MCF-10A, co jest zgodne z wynikami w pracy Zhang'a i wsp. Jediną różnicą w ekspresji wspomnianej cząsteczki mikroRNA, między przeprowadzonymi badaniami własnymi a badaniami Zhang'a i wsp. zaobserwowano w linii komórkowej o podtypie potrójnie ujemnym MDA-MB-231. W badaniach własnych, poziom ekspresji miR-147b w tej linii komórkowej był znacznie podwyższony w stosunku do kontroli eksperymentu – linii MCF-10A, natomiast w badaniach Zhang'a i wsp. znacznie obniżony. Co więcej, podwyższony poziom ekspresji miR-147b obserwowano również w liniach komórkowych i tkankach w raku żołądka¹⁸⁶ czy wątroby¹⁸⁷. Analizując dokładnie przytoczoną pracę z wynikami badań własnych, można przypuszczać, że różnice w ekspresji miR-147b w linii komórkowej MDA-MB-231, mogą wynikać z innych warunków prowadzenia hodowli, tej linii komórkowej. W badaniach własnych podstawą medium hodowlanego linii komórkowej MDA-MB-231 był płyn RPMI 1640 (PChO, IITD PAN Wrocław) oraz surowica firmy Merck (dawniej Sigma), natomiast w pracy Zhang'a i wsp. używano do hodowli płynu Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) oraz surowicy firmy Lanzhou National Hyclone Bio-engineering China.

miR-223-3p

Wysoki poziom ekspresji miR-223-3p w przeprowadzonych badaniach własnych zaobserwowano w tkance guza oraz w tkance płuc w grupie myszy obciążonych komórkami 4T1 w 24 dniu eksperymentu (Ryc. 11, wykres f, i). miR-223-3p znany jest z zaangażowania w różnicowanie komórek układu hematopoetycznego. Wysoki poziom ekspresji miR-223-3p obserwuje się w komórkach linii mieloidalnej, przy czym najwyższy poziom jego ekspresji wykazują granulocyty. Co więcej wysoki poziom ekspresji miR-223-3p obserwuje się również podczas polaryzacji makrofagów z klasy M1 do M2²³⁷. Jak już wcześniej wspomniano, swoiste dla guza nowotworowego makrofagi (TAMs) mogą ulegać polaryzacji pod wpływem różnych cytokin. Klasa M2, o której wspomniano, wydziela cytokiny przeciwzapalne i immunosupresyjne. Można przypuszczać, że wysoki poziom ekspresji miR-223-3p w tkance guza może być związany ze zwiększoną liczbą makrofagów klasy M2 w tkance guza i wydzielaniem przez nie cytokin przeciwzapalnych i immunosupresyjnych, co w konsekwencji skutkuje ucieczką nowotworu spod nadzoru układu immunologicznego i prowadzi do niekontrolowanego wzrostu guza.

Kowanetz i wsp. w swoich badaniach dowiedli, że nowotwory z wysokim potencjałem do przerzutowania są zdolne do zmian w mikrośrodowisku płuc, przynajmniej częściowo poprzez mobilizację komórek odpornościowych linii mieloidalnej o fenotypie CD11b⁺/Gr1⁺ ze szpiku kostnego. Co ciekawe, podwyższoną liczbę komórek tej populacji zaobserwowano w płucach w przypadku innych modeli przerzutującego raka gruczołu sutkowego: 4T07, 66c14, 4T1, LLC, MDA-MB-231 oraz mysiego modelu MMTV-PyMT spontanicznie rozwijającego raka gruczołu sutkowego, odzwierciedlającego progresję oraz morfologię ludzkiego nowotworu piersi²³⁸. Dalsze badania pozwoliły zaobserwować, że płuca były znacznie wzbogacone populacją granulocytów oraz w niewielkim stopniu monocytami i makrofagami²³⁹. Zatem wysoka ekspresja miR-223-3p w płucach na zaawansowanym etapie rozwoju nowotworu 4T1 w 24 dniu rozwoju nowotworu (Ryc. 11, wykres i) może wynikać z rekrutacji granulocytów do płuc. Może to również uzasadniać podwyższone parametry krwi obwodowej takie jak monocyty, granulocyty, czy leukocyty u myszy obciążonych komórkami 4T1 na zaawansowanym etapie rozwoju tego nowotworu, co zaobserwowano w pracy DuPré i wsp.²⁴⁰ oraz Papiernik i wsp.²²⁵.

W materiale pochodzącym od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego – w osoczu oraz w tkance guza wykryto podwyższony poziom ekspresji miR-223-3p

w stosunku do kontroli eksperymentu (Ryc.13, wykres c oraz f). Również w przypadku tej cząsteczki mikroRNA w tkance guza u pacjentów zaobserwowano tendencję wzrostową badanego poziomu ekspresji miR-223-3p, w przeciwieństwie do poziomu jej ekspresji w osoczu wynik ten nie był istotny statystycznie. Jak się okazuje, nadekspresję miR-223-3p obserwowano również w innym typie nowotworu – raku okrężnicy. Autorzy pracy Li i wsp. wykazali, że w porównaniu do pobliskich tkanek nienowotworowych, ekspresja miR-223-3p w tkance nowotworowej u pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem okrężnicy (ang. CRC, colorectal cancer) była znacznie podwyższona, a jego ekspresja była skorelowana ze stopniem TNM, przerzutami do węzłów chłonnych i przerzutami odległymi. Co więcej, pacjenci z podwyższoną ekspresją miR-223-3p wykazują gorsze przeżycie i rokowanie niż pacjenci z niższą ekspresją miR-223-3p²⁴¹.

W badaniach własnych w przypadku oszacowanego poziomu ekspresji miR-223-3p w liniach komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego nie zaobserwowano korelacji między ekspresją badanej cząsteczki miR-223-3p a podtypem molekularnym nowotworu piersi, jednak poziom ekspresji w niektórych spośród badanych linii komórkowych był podwyższony (JIMT-1, SKBR-3) w stosunku do kontroli eksperymentu, którą stanowiła linia komórkowa MCF-10A (Ryc. 14, wykres c). W pracy Sun i wsp. zaobserwowano, że nadekspresja miR-223-3p w liniach komórkowych raka okrężnicy może stymulować proliferację komórek przez regulację białka RASA1, co skutkuje aktywacją szlaku sygnałowego RAS/MAPK. Dodatkowo, przeprowadzone badania *in vivo* wykazały, że nadekspresja miR-223-3p może sprzyjać wzrostowi guza u myszy szczepu nude²⁴². Zhang i wsp. ujawnili, że proliferacja, migracja i inwazja komórek linii Colo320 i LoVo była znacznie obniżona po transfekcji z użyciem inhibitora miR-223-3p²⁴³.

miR-31-5p

Lv i wsp. przeprowadzili badania *in vivo* wykorzystując myszy model *MMTV-PyVT*. Wspomniany model jest najczęściej wykorzystywany do badania ludzkiego gruczolakoraka gruczołu sutkowego. W pracy tej zaobserwowano wyższą ekspresję miR-31-5p w guzach indukowanych PyVT w porównaniu do komórek gruczołu sutkowego myszy dzikich. Lv i wsp. wykonali również knockout genu miR-31-5p. Jak się okazuje, utrata genu dla miR-31-5p powoduje upośledzoną progresję guza oraz zmniejszenie liczby nowotworowych komórek macierzystych¹²⁶. W przeprowadzonych badaniach własnych obserwuje się wzrost poziomu

ekspresji miR-31-5p w guzie zarówno w modelu 4T1 jak i 67NR względem kontroli, co jest zgodne z wynikiem Lv i wsp.¹²⁶ oraz Phua i wsp.²³¹, ponadto ekspresja miR-31 rośnie wraz ze wzrostem guza 4T1 oraz jest znacznie wyższa w guzach 4T1 w porównaniu do 67NR (Ryc.11, wykres d), co sugeruje związek z procesem przerzutowania.

Wysoką ekspresję miR-31-5p zaobserwowano również w tkance płuc u myszy z nowotworem 4T1 i 67NR w 12 i 24 dniu eksperymentu w porównaniu do kontroli - zdrowej tkanki płuc (Ryc. 11, wykres g). W 24 dniu eksperymentu ekspresja tej cząsteczki mikroRNA była istotnie wyższa w guzach 4T1 w porównaniu do guzów 67NR. Okazuje się, że wysoki poziom ekspresji miR-31-5p obserwuje się w tkance guza raka płuc. Co więcej, jego nadekspresja jest związana ze słabym przeżyciem wśród pacjentów¹³⁷.

Poziom ekspresji miR-31-5p oszacowano również w osoczu oraz we fragmencie tkanki guza uzyskanego od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego. W osoczu obserwowano niższy poziom ekspresji miR-31-5p u pacjentek z rozsianym nowotworem w stosunku do kontroli eksperymentu, natomiast w tkance guza – tendencję wzrostową poziomu ekspresji badanej cząsteczki u pacjentek z rozsianym nowotworem w stosunku do kontroli eksperymentu (Ryc.13, wykres a i d). W przeciwieństwie do poziomu ekspresji miR-31-5p w osoczu wynik ten nie był istotny statystycznie. W większości prac – m.in. w pracach Yan i wsp.²⁴⁴ oraz Sossey-Alaoui i wsp.¹⁵⁸ - obserwuje się obniżenie ekspresji miR-31-5p w tkance guza u chorych na raka gruczołu sutkowego. Z kolei w badaniach Lu i wsp. wykazano brak różnic w ekspresji miR-31-5p między tkanką prawidłową a tą zmienioną nowotworowo. W przeprowadzonych badaniach własnych tendencja do podwyższonego poziomu ekspresji miR-31-5p obserwowanego w tkance guza w grupie pacjentek z nowotworem przerzutującym może wynikać z małej liczby pacjentek w tej grupie badanej. Poza tym podwyższony poziom ekspresji tej cząsteczki obserwuje się w tkankach guza innych nowotworów, m.in. w tkance raka jamy ustnej²⁴⁵ oraz w tkance raka płuc¹³⁷.

W badaniach własnych zaobserwowano podobny wzór ekspresji miR-31 w materiale pochodzącym zarówno od pacjentek jak i od myszy:

- w osoczu - obniżenie ekspresji (Ryc.11, wykres a),
- oraz w tkance guza - podwyższenie ekspresji (Ryc.11, wykres d),

ale tylko w przypadku raka gruczołu sutkowego przerzutującego 4T1 w 24 dniu eksperymentu. Co więcej, poziom ekspresji miR-31-5p w tkance guza w przeprowadzonych badaniach

przesiewowych jest zgodny z poziomem ekspresji oszacowanym w pojedynczych tkankach guza uzyskanych od myszy w tym eksperymencie.

Jak się okazuje odwrotną korelację wzoru ekspresji miR-31-5p zarówno w osoczu jak i w tkance guza, obserwuje się w przypadku innych typów nowotworów, m.in. w raku przełyku. Zaobserwowano, że poziom ekspresji oszacowany w osoczu uzyskany od pacjentów był podwyższony²⁴⁶, natomiast w tkance guza obniżony¹¹¹.

Dalsze badania z udziałem cząsteczki miR-31-5p wykonano w lizatach ludzkich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego o różnych podtypach molekularnych. Uzyskane wyniki ekspresji miR-31-5p wykazały znaczne obniżenie ekspresji badanej cząsteczki miR-31-5p w liniach komórkowych o podtypie luminalnym A (MCF-7 i T47D), luminalnym B (BT-474) oraz potrójnie ujemnym (MDA-MB-231) oraz niewielkie obniżenie ekspresji miR-31-5p w linii komórkowej o podtypie TNBC - MDA-MB-468 w stosunku do kontroli eksperymentu - linii komórkowej MCF-10A (Ryc.14). Wyniki przeprowadzonych badań własnych dla linii MCF-7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-468 oraz MCF-10A są zgodne z wynikami ekspresji badanej cząsteczki mikroRNA oszacowanych w wymienionych liniach komórkowych w pracy Phua i wsp.²³¹. Jak się okazuje, w przypadku drugiego modelu raka gruczołu sutkowego o podtypie potrójnie ujemnym - linii komórkowej MDA-MB-231 - obserwuje się brak ekspresji miR-31-5p, co zostało potwierdzone w piśmiennictwie m.in. w pracy Phua i wsp.²³¹ oraz Augoff i wsp.¹⁰⁷. Co więcej, w pracy Augoff i wsp. wyjaśniono, że brak ekspresji lub obserwowany jej niski poziom, może być związany z hipermetylacją promotora dla genu miR-31-5p¹⁰⁷. Wysoką nadekspresję miR-31-5p obserwuje się w linii komórkowej z nadekspresją HER2 – JIMT-1. Rola cząsteczki miR-31-5p w komórkach nowotworowych w kontekście procesu adhezji komórkowej nie jest do końca poznana, a cząsteczka miR-31-5p jest zaangażowana w regulację jednego z etapów w procesie przerzutowania. Dlatego poznanie roli tej cząsteczki w raku gruczołu sutkowego o różnych podtypach molekularnych może przyczynić się do poszerzenia wiedzy w tej dziedzinie. Dalsze badania polegały więc na przeprowadzeniu przejściowej transfekcji z wyciszeniem lub nadekspresją miR-31-5p. Dodatkowo w lizatach komórkowych oznaczono poziomy ekspresji białek mających wpływ na ogólny stan adhezji komórkowej – RhoA, FAK oraz ITGA5 jednocześnie regulowanych przez cząsteczkę miR-31-5p. Wykonano również test adhezji komórek do fibronektyny.

Badania korelacji między białkiem RhoA i miR-31-5p w kontekście raka gruczołu sutkowego przeprowadzili Hashemi i wsp. wykonując nadekspresję miR-31-5p w linii

komórkowej przerzutującej – MDA-MB-231 oraz linii nieprzerzutującej – MCF-7. Przeprowadzone badania wykazały, że cząsteczka miR-31-5p obniżała wskaźnik inwazji wskazując tym samym na wysoki potencjał miR-31-5p jako genu supresorowego. Wyniki uzyskane przez Hashemi i wsp. wskazują, że transfekcja mimetykiem miR-31 w wybranych liniach komórkowych obniżała poziom białka RhoA oraz prowadziła do znacznego obniżenia migracji i inwazji komórek²⁴⁷. Podobne badania korelacji miR-31-5p i białka RhoA w kontekście raka żołądka przeprowadzili Ge i wsp. którzy zaobserwowali, że obniżona ekspresja miR-31-5p w ludzkich liniach komórkowych raka żołądka była skorelowana z wysoką ekspresją białka RhoA. Co więcej nadekspresja miR-31-5p w tych liniach komórkowych prowadziła do zahamowania procesu inwazji i migracji poprzez obniżenie ekspresji białka RhoA²⁴⁸. W przeprowadzonych badaniach własnych poziom RhoA nie różnił się istotnie statystycznie w badanych liniach, a nadekspresja miR-31-5p nie wpływała na ekspresję badanego białka RhoA. Nadekspresja miR-31-5p powodowała zwiększenie adhezji komórek do fibronektyny, a zahamowanie miR-31-5p pod wpływem transfekcji inhibitorem miR-31-5p powodowało zmniejszenie adhezji komórek do fibronektyny.

Najwyższy poziom ekspresji białka FAK obserwuje się w linii komórkowej o podtypie potrójnie ujemnym - MDA-MB-468 w stosunku do kontroli eksperymentu. W liniach komórkowych MDA-MB-231, MCF-7, SKBR-3 oraz T47D obserwuje się podwyższony poziom ekspresji badanego białka FAK względem MCF-10A. Co więcej, wysoka ekspresja białka FAK jest skorelowana z niską ekspresją cząsteczki miR-31-5p dla linii komórkowych: MDA-MB-231, MCF-7 oraz T47D względem linii kontrolnej, a w przypadku linii JIMT-1 niska ekspresja FAK koreluje z wysokim poziomem miR-31-5p. Okazuje się, że nadekspresja białka FAK jest skorelowana z agresywnością nowotworu i złą prognozą, co potwierdzono w liniach komórkowych raka prostaty i gruczołu sutkowego^{249,250}. Poza tym w badaniach *in vivo* z wykorzystaniem wielu modeli raka gruczołu sutkowego dowiedziono, że wyciszenie ekspresji białka FAK, hamuje progresję guza i nabywanie przerzutowego fenotypu^{251–253}. Dowiedziono również, że białko FAK jest ważnym efektem przerzutów stymulowanych przez TGF- β w rozwijających się i postępujących rakach gruczołu sutkowego. Można zatem przypuszczać, że białko FAK jest odpowiedzialne za kontrolę morfologii komórek nabłonkowych oraz indukowaną przez TGF- β deregulację E-kadheryny, co skutkuje inicjacją procesu EMT²⁵⁴.

Co więcej, nadekspresja miR-31-5p w przeprowadzonych badaniach własnych w linii komórkowej o podtypie potrójnie ujemnym - MDA-MB-468 oraz luminalnym A - linii

komórkowej MCF-7 i T47D, powodowała obniżenie ekspresji białka FAK i wzrost adhezji komórek do fibronektyny. W przypadku wyciszenia cząsteczki miR-31-5p w linii komórkowej JIMT-1 obserwuje się tendencję wzrostową ekspresji białka FAK i obniżenie adhezji komórek do fibronektyny. Cząsteczka miR-31-5p może zatem odpowiadać za hamowanie procesu EMT poprzez regulację (obniżenie ekspresji) białka FAK i tym samym może zapobiegać powstawaniu przerzutów, jednak to przypuszczenie wymaga przeprowadzenia dalszych badań. Co ciekawe, podobny efekt zaobserwowano w przypadku innych cząsteczek mikroRNA, miR-4324 w komórkach raka płaskonabłonkowego przełyku. Indukowana nadekspresja tej cząsteczki powodowała obniżenie ekspresji białka FAK przyczyniając się do zahamowania inwazji i migracji komórek raka przełyku. Co więcej, nadekspresja badanej cząsteczki zapobiegała inicjacji procesu EMT²⁵⁵. Podobnie w przypadku raka gruczołu sutkowego, gdzie cząsteczka miR-7 hamuje inicjację procesu EMT za pośrednictwem białka FAK²⁵⁶.

Jak się okazuje, autorzy innych prac w swoich badaniach dowiedli, że cząsteczka miR-31-5p może być odpowiedzialna za inicjację procesu EMT w innych typach nowotworów. W badaniach przeprowadzonych przez Wang'a i wsp. dowiedziono, że nadekspresja miR-31-5p w raku szyjki macicy indukowała proces EMT poprzez regulację białka BAP-1 w komórkach raka szyjki macicy prowadząc do obniżenia ekspresji E-kadheryny i wzrostu ekspresji N-kadheryny²⁵⁷, a obniżona ekspresja miR-31-5p w raku przełyku stymuluje ekspresję LATS2 poprzez indukcję szlaku sygnałowego Hipp w wyniku czego promuje proces EMT¹³⁵.

Schaller w swojej pracy wyjaśnił, że nadekspresja białka FAK indukuje aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B oraz ekspresję innych białek antyapoptotycznych takich jak: c-IAP-1, c-IAP-2 oraz c-IAP, które są endogennymi inhibitorami kaspaz i w ten sposób blokują apoptozę komórek HL-60²⁵⁸. W ludzkich komórkach białaczki HL-60 aktywacja szlaku PI3K/Akt w wyniku nadekspresji białka FAK indukowała ekspresję inhibitora apoptozy (IAP) przez NF- κ B i chroniła komórki przed apoptozą wywołaną stresem oksydacyjnym²⁵⁹. W pracy Verma i wsp. zbadano poziom wymienionych białek antyapoptotycznych w osoczu uzyskanym od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego. Wysoki poziom ekspresji tych białek jest związany z agresywnością i rozwojem raka gruczołu sutkowego. Co interesujące sugeruje się, że ekspresja białek antyapoptotycznych IAP może indukować proces EMT²⁶⁰. Reasumując przypuszcza się, że cząsteczka miR-31-5p może odpowiadać za regulację procesu EMT za pośrednictwem białka FAK, które może prowadzić do aktywacji białek IAP

w komórkach raka gruczołu sutkowego o podtypie TNBC i może pełnić rolę markera w monitorowaniu przerzutowania nowotworów²⁶⁰.

Rozregulowanie ekspresji E-kadheryny w nowotworach jest związane z utratą kontaktu między komórkami, co sprzyja ich ruchliwości i predyspozycji do przerzutowania. W pracy Sawada i wsp. wyjaśniono jaki wpływ ma rozregulowanie ekspresji E-kadheryny na proces adhezji komórkowej w raku jajnika poprzez regulację ekspresji białka ITGA5. Uzyskane wyniki badań w tej pracy potwierdziły, że wyciszenie genu dla E-kadheryny wpływa na wzrost ekspresji integryny ITGA5 i indukuje adhezję komórek²⁶¹, a badania *in vitro* przeprowadzone przez Pantano i wsp. wykazały, że nadekspresja genu ITGA5 kodującego integrynę α_5 w linii komórkowej o podtypie luminalnym A – MCF-7 promuje adhezję komórek nowotworowych do fibronektyny¹⁷⁴. W przeprowadzonych badaniach własnych taką tendencję zaobserwowano tylko w przypadku linii komórkowej SKBR-3 z nadekspresją HER2 - brak ekspresji E-kadheryny korelował ze wzrostem ekspresji integryny ITGA5, prowadząc do niewielkiego wzrostu adhezji komórek do fibronektyny – (o 16%) w porównaniu do kontroli eksperymentu, linii MCF-10A. W linii komórkowej o tym samym podtypie molekularnym z nadekspresją HER2 - JIMT-1 niska ekspresja E-kadheryny korelowała z niską ekspresją białka ITGA5 w stosunku do kontroli eksperymentu i powodowała ponad 2-krotny wzrost adhezji do fibronektyny. W badaniach Hou i wsp. przeprowadzono transdukcję wektorem kodującym gen HER2 w linii komórkowej MDA-MB-231 oraz MCF-7, następnie wykonano testy adhezji z komórkami transdukowanymi. Zaobserwowano, że nadekspresja genu HER2 powoduje wzrost adhezji komórek do fibronektyny w porównaniu do kontroli eksperymentu (linii z pustym wektorem)²⁶². Co poniekąd uzasadnia większą adhezję do fibronektyny komórek linii SKBR-3 i JIMT-1 w stosunku do kontroli eksperymentu w badaniach własnych. Obniżenie interakcji komórek pozostałych linii badanych do fibronektyny lub podobny poziom adhezji komórek linii badanych do fibronektyny w stosunku do kontroli eksperymentu może wynikać z braku ekspresji genu HER2.

Białko ITGA5 jest regulowane przez miR-31-5p ponieważ obniżenie ekspresji miR-31-5p w linii komórkowej JIMT-1 powoduje wzrost jego ekspresji, a w przypadku indukowanej nadekspresji (np. w linii BT474) powoduje obniżenie poziomu badanego białka. Nie jest to zgodne dla linii komórkowych: MDA-MB-231 oraz SKBR-3. Co ciekawe, w pracy Augoff i wsp. przeprowadzono badania z nadekspresją cząsteczki miR-31-5p w linii komórkowej MDA-MB-231 (z fizjologicznie niskim poziomem ekspresji miR-31-5p). Badania wykazały obniżenie ekspresji integryny α_5 oraz podjednostki β_1 , z którą integryna α_5 tworzy

receptor dla fibronektyny¹⁵². W pracy tej udowodniono, że nadekspresja miR-31-5p powoduje zahamowanie rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych, co może tłumaczyć zwiększoną adhezję komórek pod wpływem indukowanej nadekspresji miR-31-5p do fibronektyny w przeprowadzonych badaniach własnych. Poza tym, wynik ten sugeruje, że cząsteczka miR-31-5p może wykazywać właściwości przeciwprzerzutowe. W przeprowadzonych badaniach własnych, nie zaobserwowano różnic w poziomie ekspresji badanego białka w linii komórkowej MDA-MB-231 pod wpływem indukowanej nadekspresji miR-31-5p. W przypadku innego modelu, linii komórkowej o podtypie TNBC - MDA-MB-468 – obserwowano tendencję spadkową ekspresji białka ITGA5 i wzrost adhezji komórek do fibronektyny. Ten sam efekt, co w pracy Augoff i wsp. uzyskano w przypadku linii komórkowej o podtypie luminalnym B – BT-474, obserwowano wówczas obniżenie ekspresji białka ITGA5 i wzrost adhezji komórek do fibronektyny. Natomiast indukowane obniżenie ekspresji miR-31-5p w linii komórkowej o podtypie HER2+ - JIMT-1 powodowało wzrost ekspresji białka ITGA5 oraz obniżenie adhezji komórek do fibronektyny, co może wskazywać na jej ważną rolę w procesie powstawania przerzutów.

Co więcej, zaobserwowano, że obniżanie ekspresji miR-31-5p w liniach komórkowych z nadekspresją HER2 - JIMT-1 oraz SKBR-3 powoduje obniżenie adhezji komórek do fibronektyny, natomiast nadekspresja miR-31-5p w liniach komórkowych raka gruczołu piersiowego – MCF-7, T47D, BT-474, MDA-MB-231 oraz MDA-MB-468, niezależnie od podtypu molekularnego powoduje wzrost adhezji komórek do fibronektyny. Zatem można stwierdzić, że cząsteczka miR-31-5p może być ważnym regulatorem adhezji komórkowej w procesie (kaskadzie) przerzutowania nowotworów.

Ze względu na szeroki zakres przeprowadzonych badań mogą one stanowić dobry początek do dalszych prac i zgłębiania wiedzy na temat cząsteczek mikroRNA w kontekście nowotworu piersi i ich roli w procesie przerzutowania.

VI WNIOSKI

- wyraźne obniżenie ekspresji miR-31-5p w osoczu w przerzutującym raku gruczołu sutkowego u myszy z nowotworem 4T1 oraz u pacjentek ze zdiagnozowanymi przerzutami odległymi sugeruje, że cząsteczka ta może pełnić istotną rolę w procesie przerzutowania raka gruczołu sutkowego;
- endogenna nadekspresja miR-31-5p w linii komórkowej o podtypie HER2 – JIMT-1 może wskazywać na szczególną rolę tej cząsteczki w tym podtypie raka gruczołu sutkowego, jednak szczegółowe poznanie jej funkcji wymaga dalszych badań;
- cząsteczka miR-31-5p jest regulatorem procesu adhezji komórkowej w procesie (kaskadzie) przerzutowania nowotworów – jej indukowana nadekspresja powoduje wzrost adhezji komórek do fibronektyny, natomiast indukowane obniżenie ekspresji prowadzi do zmniejszenia interakcji komórek nowotworowych z fibronektyną niezależnie od badanego podtypu molekularnego raka gruczołu sutkowego;
- Indukowana nadekspresja miR-31-5p w linii komórkowej MDA-MB-468 oraz MCF-7 powoduje obniżenie poziomu białka FAK i przyczynia się do zwiększenia adhezji komórek do fibronektyny. Białko to, może być zatem jedną z ważniejszych cząsteczek regulowanych przez miR-31-5p w kontekście jego wpływu na proces adhezji komórek do fibronektyny;
- na podstawie uzyskanych wyników trudno jest jednoznacznie określić funkcję miR-31-5p. Proprzerzutowa funkcja miR-31-5p jest widoczna podczas rozwoju nowotworu przerzutującego 4T1 w modelu mysim (jej ekspresja w guzach wzrasta, jest dużo wyższa w porównaniu do kontroli i nieprzerzutującego 67NR), podobną tendencję obserwuje się w przypadku pacjentek. Przeciwprzerzutową funkcję badanej cząsteczki mikroRNA obserwuje się w liniach komórkowych niezależnie od badanego podtypu nowotworu w regulacji adhezji komórkowej, jednak poznanie mechanizmu za to odpowiedzialnego wymaga dalszych badań.

VII. BIBLIOGRAFIA

- (1) Parks, R. M.; Derks, M. G. M.; Bastiaannet, E.; Cheung, K. L. Breast Cancer Epidemiology. In *Breast Cancer Management for Surgeons: A European Multidisciplinary Textbook*; Wyld, L., Markopoulos, C., Leidenius, M., Senkus-Konefka, E., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp 19–29. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56673-3_3.
- (2) Tao, Z.; Shi, A.; Lu, C.; Song, T.; Zhang, Z.; Zhao, J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem. Biophys.* **2015**, *72* (2), 333–338. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6>.
- (3) Choroby społeczne i cywilizacyjne wybrane zagadnienia. pod redakcją prof. dr hab. med. Leokadia Bąk-Romaniszyn - PDF Darmowe pobieranie <https://docplayer.pl/8279983-Choroby-spoleczne-i-cywilizacyjne-wybrane-zagadnienia-pod-redakcja-prof-dr-hab-med-leokadia-bak-romaniszyn.html> (accessed 2021 -01 -14).
- (4) Washbrook, E. Risk Factors and Epidemiology of Breast Cancer. *Womens Health Med.* **2006**, *3* (1), 8–14. <https://doi.org/10.1383/wohm.2006.3.1.8>.
- (5) Momenimovahed, Z.; Salehiniya, H. Epidemiological Characteristics of and Risk Factors for Breast Cancer in the World. *Breast Cancer Targets Ther.* **2019**, *11*, 151–164. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S176070>.
- (6) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68* (6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- (7) Wojciechowska Urszula, Didkowska Joanna. Zachorowania i Zgony Na Nowotwory Złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii Im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy. Dostępne Na Stronie [Http://Onkologia.Org.Pl/Raporty/](http://Onkologia.Org.Pl/Raporty/) Dostęp z Dnia 12/01/2021.
- (8) Sarkar, S.; Horn, G.; Moulton, K.; Oza, A.; Byler, S.; Kokolus, S.; Longacre, M. Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (10), 21087–21113. <https://doi.org/10.3390/ijms141021087>.
- (9) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- (10) Jacek Jassema; Radziśława Kordek. *Onkologia - Podręcznik Dla Studentów i Lekarzy*; VIA MEDICA.
- (11) Key, T. J.; Verkasalo, P. K.; Banks, E. Epidemiology of Breast Cancer. *Lancet Oncol.* **2001**, *2* (3), 133–140. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00254-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00254-0).
- (12) Didkowska, J.; Wojciechowska, U.; Czaderny, K.; Olasek, P.; Ciuba, A. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2017 roku | Cancer in Poland in 2017. 96.
- (13) Zalecenia_PTOK_tom1_05_Rak Piersi_20190214.Pdf.
- (14) Vogel, V. G. 15 - Epidemiology of Breast Cancer. 16.
- (15) Allemani, C.; Matsuda, T.; Carlo, V. D.; Harewood, R.; Matz, M.; Nikšić, M.; Bonaventure, A.; Valkov, M.; Johnson, C. J.; Estève, J.; Ogunbiyi, O. J.; Silva, G. A. e; Chen, W.-Q.; Eser, S.; Engholm, G.; Stiller, C. A.; Monnereau, A.; Woods, R. R.; Visser, O.; Lim, G. H.; Aitken, J.; Weir, H. K.; Coleman, M. P.; Bouzbid, S.; Hamdi-Chérif, M.; Zaidi, Z.; Meguenni, K.; Regagba, D.; Bayo, S.; Bougadari, T. C.; Manraj, S. S.; Bendahhou, K.; Fabowale, A.; Bradshaw, D.; Somdya, N. I. M.; Kumcher, I.; Moreno, F.; Calabrano, G. H.; Espinola, S. B.; Quintero, B. C.; Fita, R.; Diumenjo, M.

C.; Laspada, W. D.; Ibañez, S. G.; Lima, C. A.; Souza, P. C. F. D.; Pino, K. D.; Laporte, C.; Curado, M. P.; Oliveira, J. C. de; Veneziano, C. L. A.; Veneziano, D. B.; Latorre, M. R. D. O.; Tanaka, L. F.; Rebelo, M. S.; Santos, M. O.; Galaz, J. C.; Aravena, M. A.; Monsalve, J. S.; Herrmann, D. A.; Vargas, S.; Herrera, V. M.; Uribe, C. J.; Bravo, L. E.; Garcia, L. S.; Arias-Ortiz, N. E.; Morantes, D.; Jurado, D. M.; Chamorro, M. C. Y.; Delgado, S.; Ramirez, M.; Alvarez, Y. H. G.; Torres, P.; Martínez-Reyes, F.; Jaramillo, L.; Quinto, R.; Castillo, J.; Mendoza, M.; Cueva, P.; Yépez, J. G.; Bhakkan, B.; Deloumeaux, J.; Joachim, C.; Macni, J.; Carrillo, R.; Klincovstein, J. S.; Gomez, R. R.; Poquioma, E.; Tortolero-Luna, G.; Zavala, D.; Alonso, R.; Barrios, E.; Eckstrand, A.; Nikiforuk, C.; Noonan, G.; Turner, D.; Kumar, E.; Zhang, B.; McCrate, F. R.; Ryan, S.; MacIntyre, M.; Saint-Jacques, N.; Nishri, D. E.; McClure, C. A.; Vriends, K. A.; Kozie, S.; Stuart-Panko, H.; Freeman, T.; George, J. T.; Brockhouse, J. T.; O'Brien, D. K.; Holt, A.; Almon, L.; Kwong, S.; Morris, C.; Rycroft, R.; Mueller, L.; Phillips, C. E.; Brown, H.; Cromartie, B.; Schwartz, A. G.; Vigneau, F.; Levin, G. M.; Wohler, B.; Bayakly, R.; Ward, K. C.; Gomez, S. L.; McKinley, M.; Cress, R.; Green, M. D.; Miyagi, K.; Ruppert, L. P.; Lynch, C. F.; Huang, B.; Tucker, T. C.; Deapen, D.; Liu, L.; Hsieh, M. C.; Wu, X. C.; Schwenn, M.; Gershman, S. T.; Knowlton, R. C.; Alverson, G.; Copeland, G. E.; Bushhouse, S.; Rogers, D. B.; Jackson-Thompson, J.; Lemons, D.; Zimmerman, H. J.; Hood, M.; Roberts-Johnson, J.; Rees, J. R.; Riddle, B.; Pawlish, K. S.; Stroup, A.; Key, C.; Wiggins, C.; Kahn, A. R.; Schymura, M. J.; Radhakrishnan, S.; Rao, C.; Giljahn, L. K.; Slocumb, R. M.; Espinoza, R. E.; Khan, F.; Aird, K. G.; Beran, T.; Rubertone, J. J.; Slack, S. J.; Garcia, L.; Rousseau, D. L.; Janes, T. A.; Schwartz, S. M.; Bolick, S. W.; Hurley, D. M.; Whiteside, M. A.; Miller-Gianturco, P.; Williams, M. A.; Herget, K.; Sweeney, C.; Johnson, A. T.; Cheteri, M. B. K.; Santiago, P. M.; Blankenship, S. E.; Farley, S.; Borchers, R.; Malicki, R.; Espinoza, J. R.; Grandpre, J.; Wilson, R.; Edwards, B. K.; Mariotto, A.; Lei, Y.; Wang, N.; Chen, J. S.; Zhou, Y.; He, Y. T.; Song, G. H.; Gu, X. P.; Mei, D.; Mu, H. J.; Ge, H. M.; Wu, T. H.; Li, Y. Y.; Zhao, D. L.; Jin, F.; Zhang, J. H.; Zhu, F. D.; Junhua, Q.; Yang, Y. L.; Jiang, C. X.; Biao, W.; Wang, J.; Li, Q. L.; Yi, H.; Zhou, X.; Dong, J.; Li, W.; Fu, F. X.; Liu, S. Z.; Chen, J. G.; Zhu, J.; Li, Y. H.; Lu, Y. Q.; Fan, M.; Huang, S. Q.; Guo, G. P.; Zhaolai, H.; Wei, K.; Zeng, H.; Demetriou, A. V.; Mang, W. K.; Ngan, K. C.; Kataki, A. C.; Krishnatreya, M.; Jayalekshmi, P. A.; Sebastian, P.; Nandakumar, A.; Malekzadeh, R.; Roshandel, G.; Keinan-Boker, L.; Silverman, B. G.; Ito, H.; Nakagawa, H.; Sato, M.; Tobori, F.; Nakata, I.; Teramoto, N.; Hattori, M.; Kaizaki, Y.; Moki, F.; Sugiyama, H.; Utada, M.; Nishimura, M.; Yoshida, K.; Kurosawa, K.; Nemoto, Y.; Narimatsu, H.; Sakaguchi, M.; Kanemura, S.; Naito, M.; Narisawa, R.; Miyashiro, I.; Nakata, K.; Sato, S.; Yoshii, M.; Oki, I.; Fukushima, N.; Shibata, A.; Iwasa, K.; Ono, C.; Nimri, O.; Jung, K. W.; Won, Y. J.; Alawadhi, E.; Elbasmi, A.; Manan, A. A.; Adam, F.; Sanjaajmats, E.; Tudev, U.; Ochir, C.; Khater, A. M. A.; Mistiri, M. M. E.; Teo, Y. Y.; Chiang, C. J.; Lee, W. C.; Buasom, R.; Sangrajrang, S.; Kamsard, S.; Wiangnon, S.; Daoprasert, K.; Pongnikorn, D.; Leklob, A.; Sangkitipaiboon, S.; Geater, S. L.; Sriplung, H.; Ceylan, O.; Kög, I.; Dirican, O.; Köse, T.; Gurbuz, T.; Karaşahin, F. E.; Turhan, D.; Aktaş, U.; Halat, Y.; Yakut, C. I.; Altinisik, M.; Cavusoglu, Y.; Türkköylü, A.; Üçüncü, N.; Hackl, M.; Zborovskaya, A. A.; Aleinikova, O. V.; Henau, K.; Eycken, L. V.; Valerianova, Z.; Yordanova, M. R.; Šekerija, M.; Dušek, L.; Zvolský, M.; Storm, H.; Innos, K.; Mägi, M.; Malila, N.; Seppä, K.; Jégu, J.; Velten, M.; Cornet, E.; Troussard, X.; Bouvier, A. M.; Guizard, A. V.; Bouvier, V.; Launoy, G.; Arveux, P.; Maynadié, M.; Mounier, M.; Woronoff, A. S.; Daoulas, M.; Robaszekiewicz, M.; Clavel, J.; Goujon, S.; Lacour, B.; Baldi, I.; Pouchieu, C.; Amadeo, B.; Coureau, G.; Orazio, S.; Preux, P. M.; Rharbaoui, F.; Marrer, E.; Trétarre, B.; Colonna, M.; Delafosse, P.; Ligier, K.; Plouvier, S.; Cowppli-Bony, A.; Molinié, F.; Bara, S.; Ganry, O.; Lapôte-Ledoux, B.; Grosclaude, P.; Bossard, N.; Uhry, Z.; Bray, F.; Piñeros, M.; Stabenow, R.; Wilsdorf-Köhler, H.; Eberle, A.; Luttmann, S.; Löhden, I.; Nennecke, A. L.; Kieschke, J.; Sirri, E.; Emrich, K.; Zeissig, S. R.; Holleczeck, B.; Eisemann, N.; Katalinic, A.; Asquez, R. A.; Kumar, V.; Petridou, E.; Ólafsdóttir, E. J.; Tryggvadóttir, L.; Clough-Gorr, K.; Walsh, P. M.; Sundseth, H.; Mazzoleni, G.; Vittadello, F.; Coviello, E.; Cuccaro, F.; Galasso, R.; Sampietro, G.; Giacomini, A.; Magoni, M.; Ardizzone, A.; D'Argenzio, A.; Castaing, M.; Grosso, G.; Lavecchia, A. M.; Sardo, A. S.; Gola, G.; Gatti, L.; Ricci, P.; Ferretti, S.; Serraino, D.; Zucchetto, A.; Celesia, M. V.; Filiberti, R. A.; PannoZZo, F.; Melcarne, A.; Quarta, F.; Russo, A. G.;

Carrozzi, G.; Cirilli, C.; d'Oro, L. C.; Rognoni, M.; Fusco, M.; Vitale, M. F.; Usala, M.; Cusimano, R.; Mazzucco, W.; Michiara, M.; Sgargi, P.; Boschetti, L.; Borciani, E.; Seghini, P.; Maule, M. M.; Merletti, F.; Tumino, R.; Mancuso, P.; Vicentini, M.; Cassetti, T.; Sassatelli, R.; Falcini, F.; Giorgetti, S.; Caiazzo, A. L.; Cavallo, R.; Cesaraccio, R.; Pirino, D. R.; Contrino, M. L.; Tisano, F.; Fanetti, A. C.; Maspero, S.; Carone, S.; Mincuzzi, A.; Candela, G.; Scuderi, T.; Gentilini, M. A.; Piffer, S.; Rosso, S.; Barchielli, A.; Caldarella, A.; Bianconi, F.; Stracci, F.; Contiero, P.; Tagliabue, G.; Rugge, M.; Zorzi, M.; Beggiato, S.; Brustolin, A.; Berrino, F.; Gatta, G.; Sant, M.; Buzzoni, C.; Mangone, L.; Capocaccia, R.; Angelis, R. D.; Zanetti, R.; Maurina, A.; Pildava, S.; Lipunova, N.; Vincerževskienė, I.; Agius, D.; Calleja, N.; Siesling, S.; Larønningen, S.; Møller, B.; Dyzmann-Sroka, A.; Trojanowski, M.; Góźdź, S.; Mężyk, R.; Mierzwa, T.; Molong, L.; Rachtan, J.; Szewczyk, S.; Błaszczak, J.; Kępska, K.; Kościńska, B.; Tarocińska, K.; Zwierko, M.; Drosik, K.; Maksimowicz, K. M.; Purwin-Porowska, E.; Reca, E.; Wójcik-Tomaszewska, J.; Tukiendorf, A.; Grądalska-Lampart, M.; Radziszewska, A. U.; Gos, A.; Talerczyk, M.; Wyborska, M.; Didkowska, J. A.; Wojciechowska, U.; Bielska-Lasota, M.; Lacerda, G. F. de; Rego, R. A.; Bastos, J.; Silva, M. A.; Antunes, L.; Pontes, J. L.; Mayer-da-Silva, A.; Miranda, A.; Blaga, L. M.; Coza, D.; Gusenkova, L.; Lazarevich, O.; Prudnikova, O.; Vjushkov, D. M.; Egorova, A. G.; Orlov, A. E.; Kudyakov, L. A.; Pikalova, L. V.; Adamcik, J.; Diba, C. S.; Primic-Žakelj, M.; Zadnik, V.; Larrañaga, N.; Munain, A. L. de; Herrera, A. A.; Redondas, R.; Marcos-Gragera, R.; Gil, M. L. V.; Molina, E.; Perez, M. J. S.; Sureda, P. F.; Montserrat, M. R.; Chirlaque, M. D.; Navarro, C.; Ardanaz, E. E.; Guevara, M. M.; Fernández-Delgado, R.; Peris-Bonet, R.; Carulla, M.; Galceran, J.; Alberich, C.; Vicente-Raneda, M.; Khan, S.; Pettersson, D.; Dickman, P.; Avelina, I.; Staehelin, K.; Camey, B.; Bouchardy, C.; Schaffar, R.; Frick, H.; Herrmann, C.; Bulliard, J. L.; Maspoli-Conconi, M.; Kuehni, C. E.; Redmond, S. M.; Bordoni, A.; Ortelli, L.; Chiolero, A.; Konzelmann, I.; Matthes, K. L.; Rohrmann, S.; Broggio, J.; Rashbass, J.; Fitzpatrick, D.; Gavin, A.; Clark, D. I.; Deas, A. J.; Huws, D. W.; White, C.; Montel, L.; Rchet, B.; Turculet, A. D.; Stephens, R.; Chalker, E.; Phung, H.; Walton, R.; You, H.; Guthridge, S.; Johnson, F.; Gordon, P.; D'Onise, K.; Priest, K.; Stokes, B. C.; Venn, A.; Farrugia, H.; Thursfield, V.; Dowling, J.; Currow, D.; Hendrix, J.; Lewis, C. Global Surveillance of Trends in Cancer Survival 2000–14 (CONCORD-3): Analysis of Individual Records for 37 513 025 Patients Diagnosed with One of 18 Cancers from 322 Population-Based Registries in 71 Countries. *The Lancet* **2018**, *391* (10125), 1023–1075. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33326-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33326-3).

(16) Morris, E. A. The Normal Breast. In *Breast MRI: Diagnosis and Intervention*; Morris, E. A., Liberman, L., Eds.; Springer: New York, NY, 2005; pp 23–44. https://doi.org/10.1007/0-387-27595-9_4.

(17) Harbeck, N.; Penault-Llorca, F.; Cortes, J.; Gnant, M.; Houssami, N.; Poortmans, P.; Ruddy, K.; Tsang, J.; Cardoso, F. Breast Cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2019**, *5* (1), 1–31. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>.

(18) Subramani, R.; Lakshmanaswamy, R. Chapter Three - Pregnancy and Breast Cancer. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Lakshmanaswamy, R., Ed.; Approaches to Understanding Breast Cancer; Academic Press, 2017; Vol. 151, pp 81–111. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.006>.

(19) Sørlie, T.; Perou, C. M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M. B.; Rijn, M. van de; Jeffrey, S. S.; Thorsen, T.; Quist, H.; Matese, J. C.; Brown, P. O.; Botstein, D.; Lønning, P. E.; Børresen-Dale, A.-L. Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (19), 10869–10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>.

(20) Yin, L.; Duan, J.-J.; Bian, X.-W.; Yu, S. Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtyping and Treatment Progress. *Breast Cancer Res.* **2020**, *22* (1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>.

- (21) Lehmann, B. D.; Pietenpol, J. A.; Tan, A. R. Triple-Negative Breast Cancer: Molecular Subtypes and New Targets for Therapy. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book Am. Soc. Clin. Oncol. Annu. Meet.* **2015**, e31–39. https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2015.35.e31.
- (22) Pathmanathan, N.; Provan, P. J.; Mahajan, H.; Hall, G.; Byth, K.; Bilous, A. M.; Balleine, R. L. Characteristics of HER2-Positive Breast Cancer Diagnosed Following the Introduction of Universal HER2 Testing. *Breast Edinb. Scotl.* **2012**, *21* (6), 724–729. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2012.09.001>.
- (23) Lehmann, B. D.; Bauer, J. A.; Chen, X.; Sanders, M. E.; Chakravarthy, A. B.; Shyr, Y.; Pietenpol, J. A. Identification of Human Triple-Negative Breast Cancer Subtypes and Preclinical Models for Selection of Targeted Therapies. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121* (7), 2750–2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>.
- (24) Lehmann, B. D.; Pietenpol, J. A. Identification and Use of Biomarkers in Treatment Strategies for Triple-Negative Breast Cancer Subtypes. *J. Pathol.* **2014**, *232* (2), 142–150. <https://doi.org/10.1002/path.4280>.
- (25) Loh, H.-Y.; Norman, B. P.; Lai, K.-S.; Rahman, N. M. A. N. A.; Alitheen, N. B. M.; Osman, M. A. The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (19), 4940. <https://doi.org/10.3390/ijms20194940>.
- (26) Kamanu, T. K. K.; Radovanovic, A.; Archer, J. A. C.; Bajic, V. B. Exploration of MiRNA Families for Hypotheses Generation. *Sci. Rep.* **2013**, *3* (1), 2940. <https://doi.org/10.1038/srep02940>.
- (27) *MicroRNA Cancer Regulation: Advanced Concepts, Bioinformatics and Systems Biology Tools*; Schmitz, U., Wolkenhauer, O., Vera, J., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer Netherlands, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5590-1>.
- (28) Kupczyk, M.; Kuna, P. MicroRNAs — new biomarkers of respiratory tract diseases. *Adv. Respir. Med.* **2014**, *82* (2), 183–190. <https://doi.org/10.5603/PiAP.2014.0024>.
- (29) MacFarlane, L.-A.; Murphy, P. R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr. Genomics* **2010**, *11* (7), 537–561. <https://doi.org/10.2174/138920210793175895>.
- (30) Ardekani, A. M.; Naeini, M. M. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **2010**, *2* (4), 161–179.
- (31) Isik, M.; Korswagen, H. C.; Berezikov, E. Expression Patterns of Intronic MicroRNAs in *Caenorhabditis Elegans*. *Silence* **2010**, *1*, 5. <https://doi.org/10.1186/1758-907X-1-5>.
- (32) Shomron, N.; Levy, C. MicroRNA-Biogenesis and Pre-mRNA Splicing Crosstalk. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, *2009*, 594678. <https://doi.org/10.1155/2009/594678>.
- (33) Lee, Y.; Kim, M.; Han, J.; Yeom, K.-H.; Lee, S.; Baek, S. H.; Kim, V. N. MicroRNA Genes Are Transcribed by RNA Polymerase II. *EMBO J.* **2004**, *23* (20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>.
- (34) Borchert, G. M.; Lanier, W.; Davidson, B. L. RNA Polymerase III Transcribes Human MicroRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13* (12), 1097–1101. <https://doi.org/10.1038/nsmb1167>.
- (35) Peng, Y.; Croce, C. M. The Role of MicroRNAs in Human Cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2016**, *1* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>.
- (36) Ha, M.; Kim, V. N. Regulation of MicroRNA Biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15* (8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.

- (37) Humphries, B. A.; Wang, Z.; Yang, C. MicroRNA Regulation of the Small Rho GTPase Regulators—Complexities and Opportunities in Targeting Cancer Metastasis. *Cancers* **2020**, *12* (5). <https://doi.org/10.3390/cancers12051092>.
- (38) Treiber, T.; Treiber, N.; Meister, G. Regulation of MicroRNA Biogenesis and Its Crosstalk with Other Cellular Pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20* (1), 5–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>.
- (39) O'Brien, J.; Hayder, H.; Zayed, Y.; Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>.
- (40) Cai, Y.; Yu, X.; Hu, S.; Yu, J. A Brief Review on the Mechanisms of MiRNA Regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2009**, *7* (4), 147–154. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(08\)60044-3](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60044-3).
- (41) Gulyaeva, L. F.; Kushlinskiy, N. E. Regulatory Mechanisms of MicroRNA Expression. *J. Transl. Med.* **2016**, *14*. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0893-x>.
- (42) Deng, S.; Calin, G. A.; Croce, C. M.; Coukos, G.; Zhang, L. Mechanisms of MicroRNA Deregulation in Human Cancer. *Cell Cycle* **2008**, *7* (17), 2643–2646. <https://doi.org/10.4161/cc.7.17.6597>.
- (43) Iorio, M. V.; Croce, C. M. Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation. *Cancer J. Sudbury Mass* **2012**, *18* (3), 215–222. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318250c001>.
- (44) He, L.; He, X.; Lowe, S. W.; Hannon, G. J. MicroRNAs Join the P53 Network--Another Piece in the Tumour-Suppression Puzzle. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7* (11), 819–822. <https://doi.org/10.1038/nrc2232>.
- (45) Chang, T.-C.; Yu, D.; Lee, Y.-S.; Wentzel, E. A.; Arking, D. E.; West, K. M.; Dang, C. V.; Thomas-Tikhonenko, A.; Mendell, J. T. Widespread MicroRNA Repression by Myc Contributes to Tumorigenesis. *Nat. Genet.* **2008**, *40* (1), 43–50. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.30>.
- (46) Camps, C.; Buffa, F. M.; Colella, S.; Moore, J.; Sotiriou, C.; Sheldon, H.; Harris, A. L.; Gleadow, J. M.; Ragoussis, J. Hsa-MiR-210 Is Induced by Hypoxia and Is an Independent Prognostic Factor in Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (5), 1340–1348. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1755>.
- (47) Calin, G. A.; Liu, C.-G.; Sevignani, C.; Ferracin, M.; Felli, N.; Dumitru, C. D.; Shimizu, M.; Cimmino, A.; Zupo, S.; Dono, M.; Dell'Aquila, M. L.; Alder, H.; Rassenti, L.; Kipps, T. J.; Bullrich, F.; Negrini, M.; Croce, C. M. MicroRNA Profiling Reveals Distinct Signatures in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (32), 11755–11760. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404432101>.
- (48) Calin, G. A.; Dumitru, C. D.; Shimizu, M.; Bichi, R.; Zupo, S.; Noch, E.; Aldler, H.; Rattan, S.; Keating, M.; Rai, K.; Rassenti, L.; Kipps, T.; Negrini, M.; Bullrich, F.; Croce, C. M. Frequent Deletions and Down-Regulation of Micro-RNA Genes MiR15 and MiR16 at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (24), 15524–15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>.
- (49) Zhang, L.; Volinia, S.; Bonome, T.; Calin, G. A.; Greshock, J.; Yang, N.; Liu, C.-G.; Giannakakis, A.; Alexiou, P.; Hasegawa, K.; Johnstone, C. N.; Megraw, M. S.; Adams, S.; Lassus, H.; Huang, J.; Kaur, S.; Liang, S.; Sethupathy, P.; Leminen, A.; Simossis, V. A.; Sandaltzopoulos, R.; Naomoto, Y.; Katsaros, D.; Gimotty, P. A.; DeMichele, A.; Huang, Q.; Bützow, R.; Rustgi, A. K.; Weber, B. L.; Birrer, M. J.; Hatzigeorgiou, A. G.; Croce, C. M.; Coukos, G. Genomic and Epigenetic

Alterations Deregulate MicroRNA Expression in Human Epithelial Ovarian Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (19), 7004–7009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801615105>.

(50) Kumar, M. S.; Lu, J.; Mercer, K. L.; Golub, T. R.; Jacks, T. Impaired MicroRNA Processing Enhances Cellular Transformation and Tumorigenesis. *Nat. Genet.* **2007**, *39* (5), 673–677. <https://doi.org/10.1038/ng2003>.

(51) Calin, G. A.; Sevignani, C.; Dumitru, C. D.; Hyslop, T.; Noch, E.; Yendamuri, S.; Shimizu, M.; Rattan, S.; Bullrich, F.; Negrini, M.; Croce, C. M. Human MicroRNA Genes Are Frequently Located at Fragile Sites and Genomic Regions Involved in Cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (9), 2999–3004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307323101>.

(52) Iorio, M. V.; Ferracin, M.; Liu, C.-G.; Veronese, A.; Spizzo, R.; Sabbioni, S.; Magri, E.; Pedriali, M.; Fabbri, M.; Campiglio, M.; Ménard, S.; Palazzo, J. P.; Rosenberg, A.; Musiani, P.; Volinia, S.; Nenci, I.; Calin, G. A.; Querzoli, P.; Negrini, M.; Croce, C. M. MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65* (16), 7065–7070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1783>.

(53) Prat, A.; Perou, C. M. Deconstructing the Molecular Portraits of Breast Cancer. *Mol. Oncol.* **2011**, *5* (1), 5–23. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.003>.

(54) Blenkiron, C.; Goldstein, L. D.; Thorne, N. P.; Spiteri, I.; Chin, S.-F.; Dunning, M. J.; Barbosa-Morais, N. L.; Teschendorff, A. E.; Green, A. R.; Ellis, I. O.; Tavaré, S.; Caldas, C.; Miska, E. A. MicroRNA Expression Profiling of Human Breast Cancer Identifies New Markers of Tumor Subtype. *Genome Biol.* **2007**, *8* (10), R214. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-10-r214>.

(55) Volinia, S.; Galasso, M.; Sana, M. E.; Wise, T. F.; Palatini, J.; Huebner, K.; Croce, C. M. Breast Cancer Signatures for Invasiveness and Prognosis Defined by Deep Sequencing of MicroRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (8), 3024–3029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200010109>.

(56) Shimono, Y.; Zabala, M.; Cho, R. W.; Lobo, N.; Dalerba, P.; Qian, D.; Diehn, M.; Liu, H.; Panula, S. P.; Chiao, E.; Dirbas, F. M.; Somlo, G.; Pera, R. A. R.; Lao, K.; Clarke, M. F. Downregulation of MiRNA-200c Links Breast Cancer Stem Cells with Normal Stem Cells. *Cell* **2009**, *138* (3), 592–603. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.011>.

(57) Ma, L.; Teruya-Feldstein, J.; Weinberg, R. A. Tumour Invasion and Metastasis Initiated by MicroRNA-10b in Breast Cancer. *Nature* **2007**, *449* (7163), 682–688. <https://doi.org/10.1038/nature06174>.

(58) Miller, T. E.; Ghoshal, K.; Ramaswamy, B.; Roy, S.; Datta, J.; Shapiro, C. L.; Jacob, S.; Majumder, S. MicroRNA-221/222 Confers Tamoxifen Resistance in Breast Cancer by Targeting P27Kip1. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (44), 29897–29903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804612200>.

(59) Rao, X.; Di Leva, G.; Li, M.; Fang, F.; Devlin, C.; Hartman-Frey, C.; Burow, M. E.; Ivan, M.; Croce, C. M.; Nephew, K. P. MicroRNA-221/222 Confers Breast Cancer Fulvestrant Resistance by Regulating Multiple Signaling Pathways. *Oncogene* **2011**, *30* (9), 1082–1097. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.487>.

(60) Zhao, J.-J.; Lin, J.; Yang, H.; Kong, W.; He, L.; Ma, X.; Coppola, D.; Cheng, J. Q. MicroRNA-221/222 Negatively Regulates Estrogen Receptor Alpha and Is Associated with Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (45), 31079–31086. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806041200>.

(61) Di Leva, G.; Gasparini, P.; Piovan, C.; Ngankeu, A.; Garofalo, M.; Taccioli, C.; Iorio, M. V.; Li, M.; Volinia, S.; Alder, H.; Nakamura, T.; Nuovo, G.; Liu, Y.; Nephew, K. P.; Croce, C. M.

- MicroRNA Cluster 221-222 and Estrogen Receptor Alpha Interactions in Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2010**, *102* (10), 706–721. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq102>.
- (62) Han, L.; Witmer, P. D.; Casey, E.; Valle, D.; Sukumar, S. DNA Methylation Regulates MicroRNA Expression. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6* (8), 1284–1288. <https://doi.org/10.4161/cbt.6.8.4486>.
- (63) Saito, Y.; Liang, G.; Egger, G.; Friedman, J. M.; Chuang, J. C.; Coetzee, G. A.; Jones, P. A. Specific Activation of MicroRNA-127 with Downregulation of the Proto-Oncogene BCL6 by Chromatin-Modifying Drugs in Human Cancer Cells. *Cancer Cell* **2006**, *9* (6), 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.020>.
- (64) Lehmann, U.; Hasemeier, B.; Christgen, M.; Müller, M.; Römermann, D.; Länger, F.; Kreipe, H. Epigenetic Inactivation of MicroRNA Gene Hsa-Mir-9-1 in Human Breast Cancer. *J. Pathol.* **2008**, *214* (1), 17–24. <https://doi.org/10.1002/path.2251>.
- (65) Kovalchuk, O.; Filkowski, J.; Meservy, J.; Ilnytsky, Y.; Tryndyak, V. P.; Chekhun, V. F.; Pogribny, I. P. Involvement of MicroRNA-451 in Resistance of the MCF-7 Breast Cancer Cells to Chemotherapeutic Drug Doxorubicin. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7* (7), 2152–2159. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0021>.
- (66) Liang, Z.; Wu, H.; Xia, J.; Li, Y.; Zhang, Y.; Huang, K.; Wagar, N.; Yoon, Y.; Cho, H. T.; Scala, S.; Shim, H. Involvement of MiR-326 in Chemotherapy Resistance of Breast Cancer through Modulating Expression of Multidrug Resistance-Associated Protein 1. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79* (6), 817–824. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.10.017>.
- (67) Ma, M.-T.; He, M.; Wang, Y.; Jiao, X.-Y.; Zhao, L.; Bai, X.-F.; Yu, Z.-J.; Wu, H.-Z.; Sun, M.-L.; Song, Z.-G.; Wei, M.-J. MiR-487a Resensitizes Mitoxantrone (MX)-Resistant Breast Cancer Cells (MCF-7/MX) to MX by Targeting Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *Cancer Lett.* **2013**, *339* (1), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.016>.
- (68) Bockhorn, J.; Dalton, R.; Nwachukwu, C.; Huang, S.; Prat, A.; Yee, K.; Chang, Y.-F.; Huo, D.; Wen, Y.; Swanson, K. E.; Qiu, T.; Lu, J.; Park, S. Y.; Dolan, M. E.; Perou, C. M.; Olopade, O. I.; Clarke, M. F.; Greene, G. L.; Liu, H. MicroRNA-30c Inhibits Human Breast Tumour Chemotherapy Resistance by Regulating TWF1 and IL-11. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1393. <https://doi.org/10.1038/ncomms2393>.
- (69) Chakraborty, C.; Sharma, A. R.; Sharma, G.; Lee, S.-S. Therapeutic Advances of MiRNAs: A Preclinical and Clinical Update. *J. Adv. Res.* **2021**, *28*, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.08.012>.
- (70) Falasca, M. Cancer Biomarkers: The Future Challenge of Cancer. *Mol. Biomark. Diagn.* **2012**, *0* (0), 0–0. <https://doi.org/10.4172/2155-9929.S2-e001>.
- (71) Bhatt, A. N.; Mathur, R.; Farooque, A.; Verma, A.; Dwarakanath, B. S. Cancer Biomarkers - Current Perspectives. *Indian J. Med. Res.* **2010**, *132*, 129–149.
- (72) Pietrowska, M.; Marczak, L.; Polanska, J.; Behrendt, K.; Nowicka, E.; Walaszczyk, A.; Chmura, A.; Deja, R.; Stobiecki, M.; Polanski, A.; Tarnawski, R.; Widlak, P. Mass Spectrometry-Based Serum Proteome Pattern Analysis in Molecular Diagnostics of Early Stage Breast Cancer. *J. Transl. Med.* **2009**, *7* (1), 60. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-60>.
- (73) Hadi, N. I.; Jamal, Q. “OMIC” Tumor Markers for Breast Cancer: A Review. *Pak. J. Med. Sci.* **2015**, *31* (5), 1256–1262. <https://doi.org/10.12669/pjms.315.7627>.

- (74) Swellam, M.; Soliman, H. A.; Abdelmaksoud, M. D. E.; Nageeb, A. M.; El Arab, L. R. E.; Boshnak, H. Clinical Implications of Proteolytic Activity Imbalance in Breast Cancer Diagnosis. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers* **2014**, *14* (6), 409–417. <https://doi.org/10.3233/CBM-140428>.
- (75) Dave, V. P.; Ngo, T. A.; Pernestig, A.-K.; Tilevik, D.; Kant, K.; Nguyen, T.; Wolff, A.; Bang, D. D. MicroRNA Amplification and Detection Technologies: Opportunities and Challenges for Point of Care Diagnostics. *Lab. Invest.* **2019**, *99* (4), 452–469. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0143-3>.
- (76) Valinezhad Orang, A.; Safaralizadeh, R.; Kazemzadeh-Bavili, M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation <https://www.hindawi.com/journals/ijg/2014/970607/> (accessed 2021 -02 -09). <https://doi.org/10.1155/2014/970607>.
- (77) van Schooneveld, E.; Wildiers, H.; Vergote, I.; Vermeulen, P. B.; Dirix, L. Y.; Van Laere, S. J. Dysregulation of MicroRNAs in Breast Cancer and Their Potential Role as Prognostic and Predictive Biomarkers in Patient Management. *Breast Cancer Res. BCR* **2015**, *17*. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0526-y>.
- (78) Steer, C. J.; Subramanian, S. Circulating MicroRNAs as Biomarkers: A New Frontier in Diagnostics. *Liver Transpl.* **2012**, *18* (3), 265–269. <https://doi.org/10.1002/lt.23377>.
- (79) Song, N.; Sung, H.; Choi, J.-Y.; Han, S.; Jeon, S.; Song, M.; Lee, Y.; Park, C.; Park, S. K.; Lee, K.-M.; Yoo, K.-Y.; Noh, D.-Y.; Ahn, S.-H.; Lee, S.-A.; Kang, D. Preoperative Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) and Survival of Breast Cancer among Korean Women. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **2012**, *21* (8), 1371–1380. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0293>.
- (80) Zhou, G.; Lu, M.; Chen, J.; Li, C.; Zhang, J.; Chen, J.; Shi, X.; Wu, S. Identification of MiR-199a-5p in Serum as Noninvasive Biomarkers for Detecting and Monitoring Osteosarcoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **2015**, *36* (11), 8845–8852. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3421-3>.
- (81) Kalluri, R.; Weinberg, R. A. The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119* (6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.
- (82) Nisticò, P.; Bissell, M. J.; Radisky, D. C. Epithelial-Mesenchymal Transition: General Principles and Pathological Relevance with Special Emphasis on the Role of Matrix Metalloproteinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4* (2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011908>.
- (83) Larue, L.; Bellacosa, A. Epithelial–Mesenchymal Transition in Development and Cancer: Role of Phosphatidylinositol 3' Kinase/AKT Pathways. *Oncogene* **2005**, *24* (50), 7443–7454. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209091>.
- (84) Dongre, A.; Weinberg, R. A. New Insights into the Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition and Implications for Cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20* (2), 69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>.
- (85) Singh, S.; Chakrabarti, R. Consequences of EMT-Driven Changes in the Immune Microenvironment of Breast Cancer and Therapeutic Response of Cancer Cells. *J. Clin. Med.* **2019**, *8* (5), 642. <https://doi.org/10.3390/jcm8050642>.
- (86) Gregory, P. A.; Bert, A. G.; Paterson, E. L.; Barry, S. C.; Tsykin, A.; Farshid, G.; Vadas, M. A.; Khew-Goodall, Y.; Goodall, G. J. The MiR-200 Family and MiR-205 Regulate Epithelial to Mesenchymal Transition by Targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10* (5), 593–601. <https://doi.org/10.1038/ncb1722>.

- (87) Burk, U.; Schubert, J.; Wellner, U.; Schmalhofer, O.; Vincan, E.; Spaderna, S.; Brabletz, T. A Reciprocal Repression between ZEB1 and Members of the MiR-200 Family Promotes EMT and Invasion in Cancer Cells. *EMBO Rep.* **2008**, *9* (6), 582–589. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.74>.
- (88) Martello, G.; Rosato, A.; Ferrari, F.; Manfrin, A.; Cordenonsi, M.; Dupont, S.; Enzo, E.; Guzzardo, V.; Rondina, M.; Spruce, T.; Parenti, A. R.; Daidone, M. G.; Bicciato, S.; Piccolo, S. A MicroRNA Targeting Dicer for Metastasis Control. *Cell* **2010**, *141* (7), 1195–1207. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.017>.
- (89) Song, S. J.; Poliseno, L.; Song, M. S.; Ala, U.; Webster, K.; Ng, C.; Beringer, G.; Brikkak, N. J.; Yuan, X.; Cantley, L. C.; Richardson, A. L.; Pandolfi, P. P. MicroRNA-Antagonism Regulates Breast Cancer Stemness and Metastasis via TET-Family-Dependent Chromatin Remodeling. *Cell* **2013**, *154* (2), 311–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.026>.
- (90) Ma, L.; Young, J.; Prabhala, H.; Pan, E.; Mestdagh, P.; Muth, D.; Teruya-Feldstein, J.; Reinhardt, F.; Onder, T. T.; Valastyan, S.; Westermann, F.; Speleman, F.; Vandesompele, J.; Weinberg, R. A. MiR-9, a MYC/MYCN-Activated MicroRNA, Regulates E-Cadherin and Cancer Metastasis. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12* (3), 247–256. <https://doi.org/10.1038/ncb2024>.
- (91) Kumarswamy, R.; Mudduluru, G.; Ceppi, P.; Muppala, S.; Kozlowski, M.; Niklinski, J.; Papotti, M.; Allgayer, H. MicroRNA-30a Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Targeting Snai1 and Is Downregulated in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int. J. Cancer* **2012**, *130* (9), 2044–2053. <https://doi.org/10.1002/ijc.26218>.
- (92) Wang, F. E.; Zhang, C.; Maminishkis, A.; Dong, L.; Zhi, C.; Li, R.; Zhao, J.; Majerciak, V.; Gaur, A. B.; Chen, S.; Miller, S. S. MicroRNA-204/211 Alters Epithelial Physiology. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2010**, *24* (5), 1552–1571. <https://doi.org/10.1096/fj.08-125856>.
- (93) Tavazoie, S. F.; Alarcón, C.; Oskarsson, T.; Padua, D.; Wang, Q.; Bos, P. D.; Gerald, W. L.; Massagué, J. Endogenous Human MicroRNAs That Suppress Breast Cancer Metastasis. *Nature* **2008**, *451* (7175), 147–152. <https://doi.org/10.1038/nature06487>.
- (94) He, L.; He, X.; Lim, L. P.; de Stanchina, E.; Xuan, Z.; Liang, Y.; Xue, W.; Zender, L.; Magnus, J.; Ridzon, D.; Jackson, A. L.; Linsley, P. S.; Chen, C.; Lowe, S. W.; Cleary, M. A.; Hannon, G. J. A MicroRNA Component of the P53 Tumour Suppressor Network. *Nature* **2007**, *447* (7148), 1130–1134. <https://doi.org/10.1038/nature05939>.
- (95) Kim, N. H.; Kim, H. S.; Li, X.-Y.; Lee, I.; Choi, H.-S.; Kang, S. E.; Cha, S. Y.; Ryu, J. K.; Yoon, D.; Fearon, E. R.; Rowe, R. G.; Lee, S.; Maher, C. A.; Weiss, S. J.; Yook, J. I. A P53/MiRNA-34 Axis Regulates Snai1-Dependent Cancer Cell Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Cell Biol.* **2011**, *195* (3), 417–433. <https://doi.org/10.1083/jcb.201103097>.
- (96) Chou, J.; Lin, J. H.; Brenot, A.; Kim, J.; Provot, S.; Werb, Z. GATA3 Suppresses Metastasis and Modulates the Tumour Microenvironment by Regulating MicroRNA-29b Expression. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15* (2), 201–213. <https://doi.org/10.1038/ncb2672>.
- (97) Chou, J.; Provot, S.; Werb, Z. GATA3 in Development and Cancer Differentiation: Cells GATA Have It! *J. Cell. Physiol.* **2010**, *222* (1), 42–49. <https://doi.org/10.1002/jcp.21943>.
- (98) Asselin-Labat, M.-L.; Sutherland, K. D.; Barker, H.; Thomas, R.; Shackleton, M.; Forrest, N. C.; Hartley, L.; Robb, L.; Grosveld, F. G.; van der Wees, J.; Lindeman, G. J.; Visvader, J. E. Gata-3 Is an Essential Regulator of Mammary-Gland Morphogenesis and Luminal-Cell Differentiation. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9* (2), 201–209. <https://doi.org/10.1038/ncb1530>.

- (99) Kouros-Mehr, H.; Bechis, S. K.; Slorach, E. M.; Littlepage, L. E.; Egeblad, M.; Ewald, A. J.; Pai, S.-Y.; Ho, I.-C.; Werb, Z. GATA-3 Links Tumor Differentiation and Dissemination in a Luminal Breast Cancer Model. *Cancer Cell* **2008**, *13* (2), 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.01.011>.
- (100) Ryu, S.; McDonnell, K.; Choi, H.; Gao, D.; Hahn, M.; Joshi, N.; Park, S.-M.; Catena, R.; Do, Y.; Brazin, J.; Vahdat, L. T.; Silver, R. B.; Mittal, V. Suppression of MiRNA-708 by Polycomb Group Promotes Metastases by Calcium-Induced Cell Migration. *Cancer Cell* **2013**, *23* (1), 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.019>.
- (101) Asangani, I. A.; Harms, P. W.; Dodson, L.; Pandhi, M.; Kunju, L. P.; Maher, C. A.; Fullen, D. R.; Johnson, T. M.; Giordano, T. J.; Palanisamy, N.; Chinnaiyan, A. M. Genetic and Epigenetic Loss of MicroRNA-31 Leads to Feed-Forward Expression of EZH2 in Melanoma. *Oncotarget* **2012**, *3* (9), 1011–1025. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.622>.
- (102) Ivanov, S. V.; Goparaju, C. M. V.; Lopez, P.; Zavadil, J.; Toren-Haritan, G.; Rosenwald, S.; Hoshen, M.; Chajut, A.; Cohen, D.; Pass, H. I. Pro-Tumorigenic Effects of MiR-31 Loss in Mesothelioma. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (30), 22809–22817. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.100354>.
- (103) Usvasalo, A.; Ninomiya, S.; Rätty, R.; Hollmén, J.; Saarinen-Pihkala, U. M.; Elonen, E.; Knuutila, S. Focal 9p Instability in Hematologic Neoplasias Revealed by Comparative Genomic Hybridization and Single-Nucleotide Polymorphism Microarray Analyses. *Genes. Chromosomes Cancer* **2010**, *49* (4), 309–318. <https://doi.org/10.1002/gcc.20741>.
- (104) Yamagishi, M.; Nakano, K.; Miyake, A.; Yamochi, T.; Kagami, Y.; Tsutsumi, A.; Matsuda, Y.; Sato-Otsubo, A.; Muto, S.; Utsunomiya, A.; Yamaguchi, K.; Uchamaru, K.; Ogawa, S.; Watanabe, T. Polycomb-Mediated Loss of MiR-31 Activates NIK-Dependent NF-KB Pathway in Adult T Cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer Cell* **2012**, *21* (1), 121–135. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.015>.
- (105) Veerla, S.; Lindgren, D.; Kvist, A.; Frigyesi, A.; Staaf, J.; Persson, H.; Liedberg, F.; Chebil, G.; Gudjonsson, S.; Borg, A.; Månsson, W.; Rovira, C.; Höglund, M. MiRNA Expression in Urothelial Carcinomas: Important Roles of MiR-10a, MiR-222, MiR-125b, MiR-7 and MiR-452 for Tumor Stage and Metastasis, and Frequent Homozygous Losses of MiR-31. *Int. J. Cancer* **2009**, *124* (9), 2236–2242. <https://doi.org/10.1002/ijc.24183>.
- (106) Lin, P.-C.; Chiu, Y.-L.; Banerjee, S.; Park, K.; Mosquera, J. M.; Giannopoulou, E.; Alves, P.; Tewari, A. K.; Gerstein, M. B.; Beltran, H.; Melnick, A. M.; Elemento, O.; Demichelis, F.; Rubin, M. A. Epigenetic Repression of MiR-31 Disrupts Androgen Receptor Homeostasis and Contributes to Prostate Cancer Progression. *Cancer Res.* **2013**, *73* (3), 1232–1244. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2968>.
- (107) Augoff, K.; McCue, B.; Plow, E. F.; Sossey-Alaoui, K. MiR-31 and Its Host Gene LncRNA LOC554202 Are Regulated by Promoter Hypermethylation in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol. Cancer* **2012**, *11*, 5. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-5>.
- (108) Wszolek, M. F.; Rieger-Christ, K. M.; Kenney, P. A.; Gould, J. J.; Silva Neto, B.; Lavoie, A. K.; Logvinenko, T.; Libertino, J. A.; Summerhayes, I. C. A MicroRNA Expression Profile Defining the Invasive Bladder Tumor Phenotype. *Urol. Oncol.* **2011**, *29* (6), 794-801.e1. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2009.08.024>.
- (109) Wang, S.; Li, Q.; Wang, K.; Dai, Y.; Yang, J.; Xue, S.; Han, F.; Zhang, Q.; Liu, J.; Wu, W. Decreased Expression of MicroRNA-31 Associates with Aggressive Tumor Progression and Poor Prognosis in Patients with Bladder Cancer. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* **2013**, *15* (10), 849–854. <https://doi.org/10.1007/s12094-013-1014-4>.

- (110) Bhatnagar, N.; Li, X.; Padi, S. K. R.; Zhang, Q.; Tang, M. -s; Guo, B. Downregulation of MiR-205 and MiR-31 Confers Resistance to Chemotherapy-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Cell Death Dis.* **2010**, *1* (12), e105–e105. <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.85>.
- (111) Lynam-Lennon, N.; Reynolds, J. V.; Marignol, L.; Sheils, O. M.; Pidgeon, G. P.; Maher, S. G. MicroRNA-31 Modulates Tumour Sensitivity to Radiation in Oesophageal Adenocarcinoma. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **2012**, *90* (12), 1449–1458. <https://doi.org/10.1007/s00109-012-0924-x>.
- (112) Cekaite, L.; Rantala, J. K.; Bruun, J.; Guriby, M.; Agesen, T. H.; Danielsen, S. A.; Lind, G. E.; Nesbakken, A.; Kallioniemi, O.; Lothe, R. A.; Skotheim, R. I. MiR-9, -31, and -182 Deregulation Promote Proliferation and Tumor Cell Survival in Colon Cancer. *Neoplasia N. Y. N* **2012**, *14* (9), 868–879. <https://doi.org/10.1593/neo.121094>.
- (113) Wang, C.-J.; Zhou, Z.-G.; Wang, L.; Yang, L.; Zhou, B.; Gu, J.; Chen, H.-Y.; Sun, X.-F. Clinicopathological Significance of MicroRNA-31, -143 and -145 Expression in Colorectal Cancer. *Dis. Markers* **2009**, *26* (1), 27–34. <https://doi.org/10.3233/DMA-2009-0601>.
- (114) Schee, K.; Boye, K.; Abrahamsen, T. W.; Fodstad, Ø.; Flatmark, K. Clinical Relevance of MicroRNA MiR-21, MiR-31, MiR-92a, MiR-101, MiR-106a and MiR-145 in Colorectal Cancer. *BMC Cancer* **2012**, *12* (1), 505. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-505>.
- (115) Laurila, E. M.; Sandström, S.; Rantanen, L. M.; Autio, R.; Kallioniemi, A. Both Inhibition and Enhanced Expression of MiR-31 Lead to Reduced Migration and Invasion of Pancreatic Cancer Cells. *Genes. Chromosomes Cancer* **2012**, *51* (6), 557–568. <https://doi.org/10.1002/gcc.21941>.
- (116) Creighton, C. J.; Fountain, M. D.; Yu, Z.; Nagaraja, A. K.; Zhu, H.; Khan, M.; Olokpa, E.; Zariff, A.; Gunaratne, P. H.; Matzuk, M. M.; Anderson, M. L. Molecular Profiling Uncovers a P53-Associated Role for MicroRNA-31 in Inhibiting the Proliferation of Serous Ovarian Carcinomas and Other Cancers. *Cancer Res.* **2010**, *70* (5), 1906–1915. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3875>.
- (117) Mitamura, T.; Watari, H.; Wang, L.; Kanno, H.; Hassan, M. K.; Miyazaki, M.; Katoh, Y.; Kimura, T.; Tanino, M.; Nishihara, H.; Tanaka, S.; Sakuragi, N. Downregulation of MiRNA-31 Induces Taxane Resistance in Ovarian Cancer Cells through Increase of Receptor Tyrosine Kinase MET. *Oncogenesis* **2013**, *2* (3), e40–e40. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.3>.
- (118) Noh, J. H.; Jung, K. H.; Kim, J. K.; Eun, J. W.; Bae, H. J.; Xie, H. J.; Chang, Y. G.; Kim, M. G.; Park, W. S.; Lee, J. Y.; Nam, S. W. Aberrant Regulation of HDAC2 Mediates Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells by Deregulating Expression of G1/S Cell Cycle Proteins. *PLOS ONE* **2011**, *6* (11), e28103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028103>.
- (119) Cheung, C. C.-M.; Chung, G. T.-Y.; Lun, S. W.-M.; To, K.-F.; Choy, K.-W.; Lau, K.-M.; Siu, S. P.-K.; Guan, X.-Y.; Ngan, R. K.-C.; Yip, T. T.-C.; Busson, P.; Tsao, S.-W.; Lo, K.-W. MiR-31 Is Consistently Inactivated in EBV-Associated Nasopharyngeal Carcinoma and Contributes to Its Tumorigenesis. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 184. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-184>.
- (120) Korourian, A.; Roudi, R.; Shariftabrizi, A.; Madjd, Z. MicroRNA-31 Inhibits RhoA-Mediated Tumor Invasion and Chemotherapy Resistance in MKN-45 Gastric Adenocarcinoma Cells. *Exp. Biol. Med.* **2017**, *242* (18), 1842–1847. <https://doi.org/10.1177/1535370217728460>.
- (121) Zhang, X.-B.; Song, L.; Wen, H.-J.; Bai, X.-X.; Li, Z.-J.; Ma, L.-J. Upregulation of MicroRNA-31 Targeting Integrin A5 Suppresses Tumor Cell Invasion and Metastasis by Indirectly Regulating PI3K/AKT Pathway in Human Gastric Cancer SGC7901 Cells. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **2016**, *37* (6), 8317–8325. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4511-y>.

- (122) Nielsen, T. O.; Friis-Hansen, L.; Poulsen, S. S.; Federspiel, B.; Sorensen, B. S. Expression of the EGF Family in Gastric Cancer: Downregulation of HER4 and Its Activating Ligand NRG4. *PLOS ONE* **2014**, *9* (4), e94606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094606>.
- (123) Wang, H.; Zhang, X.; Liu, Y.; Ni, Z.; Lin, Y.; Duan, Z.; Shi, Y.; Wang, G.; Li, F. Downregulated MiR-31 Level Associates with Poor Prognosis of Gastric Cancer and Its Restoration Suppresses Tumor Cell Malignant Phenotypes by Inhibiting E2F2. *Oncotarget* **2016**, *7* (24), 36577–36589. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9288>.
- (124) Zhang, B.; Li, H.; Yin, C.; Sun, X.; Zheng, S.; Zhang, C.; Shi, L.; Liu, Y.; Lu, S. Dock1 Promotes the Mesenchymal Transition of Glioma and Is Modulated by MiR-31. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2017**, *43* (5), 419–432. <https://doi.org/10.1111/nan.12321>.
- (125) Körner, C.; Keklikoglou, I.; Bender, C.; Wörner, A.; Münstermann, E.; Wiemann, S. MicroRNA-31 Sensitizes Human Breast Cells to Apoptosis by Direct Targeting of Protein Kinase C Epsilon (PKCepsilon). *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (12), 8750–8761. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.414128>.
- (126) Lv, C.; Li, F.; Li, X.; Tian, Y.; Zhang, Y.; Sheng, X.; Song, Y.; Meng, Q.; Yuan, S.; Luan, L.; Andl, T.; Feng, X.; Jiao, B.; Xu, M.; Plikus, M. V.; Dai, X.; Lengner, C.; Cui, W.; Ren, F.; Shuai, J.; Millar, S. E.; Yu, Z. MiR-31 Promotes Mammary Stem Cell Expansion and Breast Tumorigenesis by Suppressing Wnt Signaling Antagonists. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 1036. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01059-5>.
- (127) Eberhard, J.; Gaber, A.; Wangefjord, S.; Nodin, B.; Uhlén, M.; Ericson Lindquist, K.; Jirström, K. A Cohort Study of the Prognostic and Treatment Predictive Value of SATB2 Expression in Colorectal Cancer. *Br. J. Cancer* **2012**, *106* (5), 931–938. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.34>.
- (128) Sun, D.; Yu, F.; Ma, Y.; Zhao, R.; Chen, X.; Zhu, J.; Zhang, C.-Y.; Chen, J.; Zhang, J. MicroRNA-31 Activates the RAS Pathway and Functions as an Oncogenic MicroRNA in Human Colorectal Cancer by Repressing RAS P21 GTPase Activating Protein 1 (RASA1). *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (13), 9508–9518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.367763>.
- (129) Cottonham, C. L.; Kaneko, S.; Xu, L. MiR-21 and MiR-31 Converge on TIAM1 to Regulate Migration and Invasion of Colon Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (46), 35293–35302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.160069>.
- (130) Clevers, H.; Loh, K. M.; Nusse, R. An Integral Program for Tissue Renewal and Regeneration: Wnt Signaling and Stem Cell Control. *Science* **2014**, *346* (6205). <https://doi.org/10.1126/science.1248012>.
- (131) Reynolds, A.; Wharton, N.; Parris, A.; Mitchell, E.; Sobolewski, A.; Kam, C.; Bigwood, L.; El Hadi, A.; Münsterberg, A.; Lewis, M.; Speakman, C.; Stebbings, W.; Wharton, R.; Sargen, K.; Tighe, R.; Jamieson, C.; Hernon, J.; Kapur, S.; Oue, N.; Yasui, W.; Williams, M. R. Canonical Wnt Signals Combined with Suppressed TGFβ/BMP Pathways Promote Renewal of the Native Human Colonic Epithelium. *Gut* **2014**, *63* (4), 610–621. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304067>.
- (132) Hu, C.; Huang, F.; Deng, G.; Nie, W.; Huang, W.; Zeng, X. MiR-31 Promotes Oncogenesis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma Cells via the Direct Suppression of RASA1. *Exp. Ther. Med.* **2013**, *6* (5), 1265–1270. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1311>.
- (133) Kent, O. A.; Mendell, J. T.; Rottapel, R. Transcriptional Regulation of MiR-31 by Oncogenic KRAS Mediates Metastatic Phenotypes by Repressing RASA1. *Mol. Cancer Res. MCR* **2016**, *14* (3), 267–277. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0456>.

- (134) Lu, W.-C.; Kao, S.-Y.; Yang, C.-C.; Tu, H.-F.; Wu, C.-H.; Chang, K.-W.; Lin, S.-C. EGF Up-Regulates MiR-31 through the C/EBP β Signal Cascade in Oral Carcinoma. *PLoS ONE* **2014**, *9* (9), e108049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108049>.
- (135) Gao, Y.; Yi, J.; Zhang, K.; Bai, F.; Feng, B.; Wang, R.; Chu, X.; Chen, L.; Song, H. Downregulation of MiR-31 Stimulates Expression of LATS2 via the Hippo Pathway and Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2017**, *36* (1), 161. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0622-1>.
- (136) Taccioli, C.; Garofalo, M.; Chen, H.; Jiang, Y.; Tagliacruzchi, G. M.; Di Leva, G.; Alder, H.; Fadda, P.; Middleton, J.; Smalley, K. J.; Selmi, T.; Naidu, S.; Farber, J. L.; Croce, C. M.; Fong, L. Y. Repression of Esophageal Neoplasia and Inflammatory Signaling by Anti-MiR-31 Delivery In Vivo. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107* (11). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv220>.
- (137) Edmonds, M. D.; Boyd, K. L.; Moyo, T.; Mitra, R.; Duszynski, R.; Arrate, M. P.; Chen, X.; Zhao, Z.; Blackwell, T. S.; Andl, T.; Eischen, C. M. MicroRNA-31 Initiates Lung Tumorigenesis and Promotes Mutant KRAS-Driven Lung Cancer. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126* (1), 349–364. <https://doi.org/10.1172/JCI82720>.
- (138) Li, X.; Cai, W.; Xi, W.; Sun, W.; Shen, W.; Wei, T.; Chen, X.; Sun, L.; Zhou, H.; Sun, Y.; Chen, W.; Gao, P.; Wang, H.; Li, Q. MicroRNA-31 Regulates Immunosuppression in Ang II (Angiotensin II)-Induced Hypertension by Targeting Ppp6C (Protein Phosphatase 6c). *Hypertension* **2019**, *73* (5), e14–e24. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12319>.
- (139) Liu, X.; Sempere, L. F.; Ouyang, H.; Memoli, V. A.; Andrew, A. S.; Luo, Y.; Demidenko, E.; Korc, M.; Shi, W.; Preis, M.; Dragnev, K. H.; Li, H.; Drenzo, J.; Bak, M.; Freemantle, S. J.; Kauppinen, S.; Dmitrovsky, E. MicroRNA-31 Functions as an Oncogenic MicroRNA in Mouse and Human Lung Cancer Cells by Repressing Specific Tumor Suppressors. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120* (4), 1298–1309. <https://doi.org/10.1172/JCI39566>.
- (140) Tan, X.; Qin, W.; Zhang, L.; Hang, J.; Li, B.; Zhang, C.; Wan, J.; Zhou, F.; Shao, K.; Sun, Y.; Wu, J.; Zhang, X.; Qiu, B.; Li, N.; Shi, S.; Feng, X.; Zhao, S.; Wang, Z.; Zhao, X.; Chen, Z.; Mitchelson, K.; Cheng, J.; Guo, Y.; He, J. A 5-MicroRNA Signature for Lung Squamous Cell Carcinoma Diagnosis and Hsa-MiR-31 for Prognosis. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17* (21), 6802–6811.
- (141) Meng, W.; Ye, Z.; Cui, R.; Perry, J.; Dedousi-Huebner, V.; Huebner, A.; Wang, Y.; Li, B.; Volinia, S.; Nakanishi, H.; Kim, T.; Suh, S.-S.; Ayers, L. W.; Ross, P.; Croce, C. M.; Chakravarti, A.; Jin, V. X.; Lautenschlaeger, T. MicroRNA-31 Predicts the Presence of Lymph Node Metastases and Survival in Patients with Lung Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2013**, *19* (19), 5423–5433. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0320>.
- (142) Liu, C.-J.; Tsai, M.-M.; Hung, P.-S.; Kao, S.-Y.; Liu, T.-Y.; Wu, K.-J.; Chiou, S.-H.; Lin, S.-C.; Chang, K.-W. MiR-31 Ablates Expression of the HIF Regulatory Factor FIH to Activate the HIF Pathway in Head and Neck Carcinoma. *Cancer Res.* **2010**, *70* (4), 1635–1644.
- (143) Hung, P.-S.; Tu, H.-F.; Kao, S.-Y.; Yang, C.-C.; Liu, C.-J.; Huang, T.-Y.; Chang, K.-W.; Lin, S.-C. MiR-31 Is Upregulated in Oral Premalignant Epithelium and Contributes to the Immortalization of Normal Oral Keratinocytes. *Carcinogenesis* **2014**, *35* (5), 1162–1171. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu024>.
- (144) Wang, N.; Zhou, Y.; Zheng, L.; Li, H. MiR-31 Is an Independent Prognostic Factor and Functions as an Oncomir in Cervical Cancer via Targeting ARID1A. *Gynecol. Oncol.* **2014**, *134* (1), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.04.047>.

- (145) Lin, N.; Zhou, Y.; Lian, X.; Tu, Y. MicroRNA-31 Functions as an Oncogenic MicroRNA in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Cells by Targeting RhoTBT1. *Oncol. Lett.* **2017**, *13* (3), 1078–1082. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5554>.
- (146) Körner, C.; Keklikoglou, I.; Bender, C.; Wörner, A.; Münstermann, E.; Wiemann, S. MicroRNA-31 Sensitizes Human Breast Cells to Apoptosis by Direct Targeting of Protein Kinase C ϵ (PKC ϵ)*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (12), 8750–8761. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.414128>.
- (147) Wang, C.-J.; Stratmann, J.; Zhou, Z.-G.; Sun, X.-F. Suppression of MicroRNA-31 Increases Sensitivity to 5-FU at an Early Stage, and Affects Cell Migration and Invasion in HCT-116 Colon Cancer Cells. *BMC Cancer* **2010**, *10* (1), 616. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-616>.
- (148) Mosakhani, N.; Lahti, L.; Borze, I.; Karjalainen-Lindsberg, M.-L.; Sundström, J.; Ristamäki, R.; Osterlund, P.; Knuutila, S.; Sarhadi, V. K. MicroRNA Profiling Predicts Survival in Anti-EGFR Treated Chemorefractory Metastatic Colorectal Cancer Patients with Wild-Type KRAS and BRAF. *Cancer Genet.* **2012**, *205* (11), 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2012.08.003>.
- (149) Mitra, A. K.; Zillhardt, M.; Hua, Y.; Tiwari, P.; Murmann, A. E.; Peter, M. E.; Lengyel, E. MicroRNAs Reprogram Normal Fibroblasts into Cancer-Associated Fibroblasts in Ovarian Cancer. *Cancer Discov.* **2012**, *2* (12), 1100–1108. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0206>.
- (150) Xi, S.; Yang, M.; Tao, Y.; Xu, H.; Shan, J.; Inchauste, S.; Zhang, M.; Mercedes, L.; Hong, J. A.; Rao, M.; Schrupp, D. S. Cigarette Smoke Induces C/EBP- β -Mediated Activation of MiR-31 in Normal Human Respiratory Epithelia and Lung Cancer Cells. *PLOS ONE* **2010**, *5* (10), e13764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013764>.
- (151) Wu, Y.-H.; Hu, T.-F.; Chen, Y.-C.; Tsai, Y.-N.; Tsai, Y.-H.; Cheng, C.-C.; Wang, H.-W. The Manipulation of MiRNA-Gene Regulatory Networks by KSHV Induces Endothelial Cell Motility. *Blood* **2011**, *118* (10), 2896–2905. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-330589>.
- (152) Augoff, K.; Das, M.; Bialkowska, K.; McCue, B.; Plow, E. F.; Sossey-Alaoui, K. MiR-31 Is a Broad Regulator of B1-Integrin Expression and Function in Cancer Cells. *Mol. Cancer Res. MCR* **2011**, *9* (11), 1500–1508. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0311>.
- (153) Zhong, Z.; Dong, Z.; Yang, L.; Chen, X.; Gong, Z. MicroRNA-31-5p Modulates Cell Cycle by Targeting Human MutL Homolog 1 in Human Cancer Cells. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **2013**, *34* (3), 1959–1965. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0741-z>.
- (154) Hua, D.; Ding, D.; Han, X.; Zhang, W.; Zhao, N.; Foltz, G.; Lan, Q.; Huang, Q.; Lin, B. Human MiR-31 Targets Radixin and Inhibits Migration and Invasion of Glioma Cells. *Oncol. Rep.* **2012**, *27* (3), 700–706. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1555>.
- (155) Chang, K.-W.; Kao, S.-Y.; Wu, Y.-H.; Tsai, M.-M.; Tu, H.-F.; Liu, C.-J.; Lui, M.-T.; Lin, S.-C. Passenger Strand MiRNA MiR-31* Regulates the Phenotypes of Oral Cancer Cells by Targeting RhoA. *Oral Oncol.* **2013**, *49* (1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.07.003>.
- (156) Xu, R.-S.; Wu, X.-D.; Zhang, S.-Q.; Li, C.-F.; Yang, L.; Li, D.-D.; Zhang, B.-G.; Zhang, Y.; Jin, J.-P.; Zhang, B. The Tumor Suppressor Gene RhoBTB1 Is a Novel Target of MiR-31 in Human Colon Cancer. *Int. J. Oncol.* **2013**, *42* (2), 676–682. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1746>.
- (157) Aprelikova, O.; Yu, X.; Palla, J.; Wei, B.-R.; John, S.; Yi, M.; Stephens, R.; Simpson, R. M.; Risinger, J. I.; Jazaeri, A.; Niederhuber, J. The Role of MiR-31 and Its Target Gene SATB2 in Cancer-Associated Fibroblasts. *Cell Cycle* **2010**, *9* (21), 4387–4398. <https://doi.org/10.4161/cc.9.21.13674>.
- (158) Sossey-Alaoui, K.; Downs-Kelly, E.; Das, M.; Izem, L.; Tubbs, R.; Plow, E. F. WAVE3, an Actin Remodeling Protein, Is Regulated by the Metastasis Suppressor MicroRNA, MiR-31, during the

Invasion-Metastasis Cascade. *Int. J. Cancer* **2011**, *129* (6), 1331–1343.
<https://doi.org/10.1002/ijc.25793>.

(159) Tennis, M. A.; New, M. L.; McArthur, D. G.; Merrick, D. T.; Dwyer-Nield, L. D.; Keith, R. L. Prostacyclin Reverses the Cigarette Smoke-Induced Decrease in Pulmonary Frizzled 9 Expression through MiR-31. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 28519. <https://doi.org/10.1038/srep28519>.

(160) Haga, R. B.; Ridley, A. J. Rho GTPases: Regulation and Roles in Cancer Cell Biology. *Small GTPases* **2016**, *7* (4), 207–221. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1232583>.

(161) Pillé, J.-Y.; Denoyelle, C.; Varet, J.; Bertrand, J.-R.; Soria, J.; Opolon, P.; Lu, H.; Pritchard, L.-L.; Vannier, J.-P.; Malvy, C.; Soria, C.; Li, H. Anti-RhoA and Anti-RhoC siRNAs Inhibit the Proliferation and Invasiveness of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2005**, *11* (2), 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.08.029>.

(162) Fritz, G.; Just, I.; Kaina, B. Rho GTPases Are Over-Expressed in Human Tumors. *Int. J. Cancer* **1999**, *81* (5), 682–687. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990531\)81:5<682::aid-ijc2>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990531)81:5<682::aid-ijc2>3.0.co;2-b).

(163) Liu, N.; Bi, F.; Pan, Y.; Sun, L.; Xue, Y.; Shi, Y.; Yao, X.; Zheng, Y.; Fan, D. Reversal of the Malignant Phenotype of Gastric Cancer Cells by Inhibition of RhoA Expression and Activity. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2004**, *10* (18 Pt 1), 6239–6247. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0242>.

(164) Chen, Z.; Liu, S.; Xia, Y.; Wu, K. MiR-31 Regulates Rho-Associated Kinase-Myosin Light Chain (ROCK-MLC) Pathway and Inhibits Gastric Cancer Invasion: Roles of RhoA. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2016**, *22*, 4679–4691. <https://doi.org/10.12659/MSM.898399>.

(165) Huveneers, S.; Danen, E. H. J. Adhesion Signaling - Crosstalk between Integrins, Src and Rho. *J. Cell Sci.* **2009**, *122* (Pt 8), 1059–1069. <https://doi.org/10.1242/jcs.039446>.

(166) Guilluy, C.; Garcia-Mata, R.; Burridge, K. Rho Protein Crosstalk: Another Social Network? *Trends Cell Biol.* **2011**, *21* (12), 718–726. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.08.002>.

(167) Wozniak, M. A.; Modzelewska, K.; Kwong, L.; Keely, P. J. Focal Adhesion Regulation of Cell Behavior. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1692* (2–3), 103–119. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.04.007>.

(168) Xu, L. H.; Owens, L. V.; Sturge, G. C.; Yang, X.; Liu, E. T.; Craven, R. J.; Cance, W. G. Attenuation of the Expression of the Focal Adhesion Kinase Induces Apoptosis in Tumor Cells. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **1996**, *7* (4), 413–418.

(169) Wörthmüller, J.; Rüegg, C. The Crosstalk between FAK and Wnt Signaling Pathways in Cancer and Its Therapeutic Implication. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (23). <https://doi.org/10.3390/ijms21239107>.

(170) Gabarra-Niecko, V.; Schaller, M. D.; Dunty, J. M. FAK Regulates Biological Processes Important for the Pathogenesis of Cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **2003**, *22* (4), 359–374. <https://doi.org/10.1023/a:1023725029589>.

(171) McLean, G. W.; Avizienyte, E.; Frame, M. C. Focal Adhesion Kinase as a Potential Target in Oncology. *Expert Opin. Pharmacother.* **2003**, *4* (2), 227–234. <https://doi.org/10.1517/14656566.4.2.227>.

- (172) Mitra, S. K.; Hanson, D. A.; Schlaepfer, D. D. Focal Adhesion Kinase: In Command and Control of Cell Motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6* (1), 56–68. <https://doi.org/10.1038/nrm1549>.
- (173) Desgrosellier, J. S.; Cheresch, D. A. Integrins in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10* (1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2748>.
- (174) Pantano, F.; Croset, M.; Driouch, K.; Bednarz-Knoll, N.; Iuliani, M.; Ribelli, G.; Bonnelye, E.; Wikman, H.; Geraci, S.; Bonin, F.; Simonetti, S.; Vincenzi, B.; Hong, S. S.; Sousa, S.; Pantel, K.; Tonini, G.; Santini, D.; Clézardin, P. Integrin Alpha5 in Human Breast Cancer Is a Mediator of Bone Metastasis and a Therapeutic Target for the Treatment of Osteolytic Lesions. *Oncogene* **2021**, *40* (7), 1284–1299. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01603-6>.
- (175) Gong, C.; Yang, Z.; Wu, F.; Han, L.; Liu, Y.; Gong, W. MiR-17 Inhibits Ovarian Cancer Cell Peritoneal Metastasis by Targeting ITGA5 and ITGB1. *Oncol. Rep.* **2016**, *36* (4), 2177–2183. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4985>.
- (176) Deng, Y.; Wan, Q.; Yan, W. Integrin A5/ITGA5 Promotes The Proliferation, Migration, Invasion And Progression Of Oral Squamous Carcinoma By Epithelial–Mesenchymal Transition. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 9609–9620. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S223201>.
- (177) Qin, L.; Chen, X.; Wu, Y.; Feng, Z.; He, T.; Wang, L.; Liao, L.; Xu, J. Steroid Receptor Coactivator-1 Upregulates Integrin A₅ Expression to Promote Breast Cancer Cell Adhesion and Migration. *Cancer Res.* **2011**, *71* (5), 1742–1751. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3453>.
- (178) Van der Velde-Zimmermann, D.; Verdaasdonk, M. A.; Rademakers, L. H.; De Weger, R. A.; Van den Tweel, J. G.; Joling, P. Fibronectin Distribution in Human Bone Marrow Stroma: Matrix Assembly and Tumor Cell Adhesion via Alpha5 Beta1 Integrin. *Exp. Cell Res.* **1997**, *230* (1), 111–120. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.3405>.
- (179) Korah, R.; Boots, M.; Wieder, R. Integrin Alpha5beta1 Promotes Survival of Growth-Arrested Breast Cancer Cells: An in Vitro Paradigm for Breast Cancer Dormancy in Bone Marrow. *Cancer Res.* **2004**, *64* (13), 4514–4522. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3853>.
- (180) Oudin, M. J.; Jonas, O.; Kosciuk, T.; Broye, L. C.; Guido, B. C.; Wyckoff, J.; Riquelme, D.; Lamar, J. M.; Asokan, S. B.; Whittaker, C.; Ma, D.; Langer, R.; Cima, M. J.; Wisinski, K. B.; Hynes, R. O.; Lauffenburger, D. A.; Keely, P. J.; Bear, J. E.; Gertler, F. B. Tumor Cell-Driven Extracellular Matrix Remodeling Drives Haptotaxis during Metastatic Progression. *Cancer Discov.* **2016**, *6* (5), 516–531. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1183>.
- (181) Yao, H.; Veine, D. M.; Livant, D. L. Therapeutic Inhibition of Breast Cancer Bone Metastasis Progression and Lung Colonization: Breaking the Vicious Cycle by Targeting A5β1 Integrin. *Breast Cancer Res. Treat.* **2016**, *157* (3), 489–501. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3844-6>.
- (182) Ju, J. A.; Godet, I.; Ye, I. C.; Byun, J.; Jayatilaka, H.; Lee, S. J.; Xiang, L.; Samanta, D.; Lee, M. H.; Wu, P.-H.; Wirtz, D.; Semenza, G. L.; Gilkes, D. M. Hypoxia Selectively Enhances Integrin A5β1 Receptor Expression in Breast Cancer to Promote Metastasis. *Mol. Cancer Res. MCR* **2017**, *15* (6), 723–734. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0338>.
- (183) Luo, D.-Y.; Wazir, R.; Tian, Y.; Yue, X.; Wei, T.-Q.; Wang, K.-J. Integrin A_v Mediates Contractility Whereas Integrin A₄ Regulates Proliferation of Human Bladder Smooth Muscle Cells via FAK Pathway under Physiological Stretch. *J. Urol.* **2013**, *190* (4), 1421–1429. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.04.027>.
- (184) Landgraf, P.; Rusu, M.; Sheridan, R.; Sewer, A.; Iovino, N.; Aravin, A.; Pfeffer, S.; Rice, A.; Kamphorst, A. O.; Landthaler, M.; Lin, C.; Socci, N. D.; Hermida, L.; Fulci, V.; Chiaretti, S.; Foà, R.;

Schliwka, J.; Fuchs, U.; Novosel, A.; Müller, R.-U.; Schermer, B.; Bissels, U.; Inman, J.; Phan, Q.; Chien, M.; Weir, D. B.; Choksi, R.; De Vita, G.; Frezzetti, D.; Trompeter, H.-I.; Hornung, V.; Teng, G.; Hartmann, G.; Palkovits, M.; Di Lauro, R.; Wernet, P.; Macino, G.; Rogler, C. E.; Nagle, J. W.; Ju, J.; Papavasiliou, F. N.; Benzing, T.; Lichter, P.; Tam, W.; Brownstein, M. J.; Bosio, A.; Borkhardt, A.; Russo, J. J.; Sander, C.; Zavolan, M.; Tuschl, T. A Mammalian MicroRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell* **2007**, *129* (7), 1401–1414. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.040>.

(185) Yue, Y.; Lv, W.; Zhang, L.; Kang, W. MiR-147b Influences Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration via Targeting YY1 and Modulating Wnt/ β -Catenin Activities. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2018**, *50* (9), 905–913. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmy086>.

(186) Shen, J.; Niu, W.; Zhang, H.; Jun, M.; Zhang, H. Downregulation of MicroRNA-147 Inhibits Cell Proliferation and Increases the Chemosensitivity of Gastric Cancer Cells to 5-Fluorouracil by Directly Targeting PTEN. *Oncol. Res.* **2018**, *26* (6), 901–911. <https://doi.org/10.3727/096504017X15061902533715>.

(187) Zhang, E.; Liu, Q.; Wang, Y.; Wang, H.; He, L.; Jin, X.; Li, N. MicroRNA MiR-147b Promotes Tumor Growth via Targeting UBE2N in Hepatocellular Carcinoma. *Oncotarget* **2017**, *8* (69), 114072–114080. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23120>.

(188) ZHANG, Y.; ZHANG, H.; LIU, Z. MicroRNA-147 Suppresses Proliferation, Invasion and Migration through the AKT/MTOR Signaling Pathway in Breast Cancer. *Oncol. Lett.* **2016**, *11* (1), 405–410. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3842>.

(189) Li, F.; Wang, X.; Yang, L. MicroRNA-147 Targets BDNF to Inhibit Cell Proliferation, Migration and Invasion in Non-small Cell Lung Cancer. *Oncol. Lett.* **2020**, *20* (2), 1931–1937. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11715>.

(190) Lee, C. G.; McCarthy, S.; Gruidl, M.; Timme, C.; Yeatman, T. J. MicroRNA-147 Induces a Mesenchymal-To-Epithelial Transition (MET) and Reverses EGFR Inhibitor Resistance. *PLOS ONE* **2014**, *9* (1), e84597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084597>.

(191) Bertero, T.; Grosso, S.; Robbe-Sermesant, K.; Lebrigand, K.; Hénaoui, I.-S.; Puisségur, M.-P.; Fourre, S.; Zaragosi, L.-E.; Mazure, N. M.; Ponzio, G.; Cardinaud, B.; Barbry, P.; Rezzonico, R.; Mari, B. “Seed-Milarity” Confers to Hsa-MiR-210 and Hsa-MiR-147b Similar Functional Activity. *PLoS One* **2012**, *7* (9), e44919. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044919>.

(192) Xu, Z.; Han, Y.; Liu, J.; Jiang, F.; Hu, H.; Wang, Y.; Liu, Q.; Gong, Y.; Li, X. MiR-135b-5p and MiR-499a-3p Promote Cell Proliferation and Migration in Atherosclerosis by Directly Targeting MEF2C. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12276. <https://doi.org/10.1038/srep12276>.

(193) Zhang, W. C.; Wells, J. M.; Chow, K.-H.; Huang, H.; Yuan, M.; Saxena, T.; Melnick, M. A.; Politi, K.; Asara, J. M.; Costa, D. B.; Bult, C. J.; Slack, F. J. MiR-147b-Mediated TCA Cycle Dysfunction and Pseudohypoxia Initiate Drug Tolerance to EGFR Inhibitors in Lung Adenocarcinoma. *Nat. Metab.* **2019**, *1* (4), 460–474. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0052-9>.

(194) Lim, L. P.; Glasner, M. E.; Yekta, S.; Burge, C. B.; Bartel, D. P. Vertebrate MicroRNA Genes. *Science* **2003**, *299* (5612), 1540. <https://doi.org/10.1126/science.1080372>.

(195) Chen, C.-Z.; Li, L.; Lodish, H. F.; Bartel, D. P. MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science* **2004**, *303* (5654), 83–86. <https://doi.org/10.1126/science.1091903>.

(196) Ma, J.; Cao, T.; Cui, Y.; Zhang, F.; Shi, Y.; Xia, J.; Wang, Z. P. MiR-223 Regulates Cell Proliferation and Invasion via Targeting PDS5B in Pancreatic Cancer Cells. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2019**, *14*, 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.01.009>.

- (197) Wong, Q. W.-L.; Lung, R. W.-M.; Law, P. T.-Y.; Lai, P. B.-S.; Chan, K. Y.-Y.; To, K.-F.; Wong, N. MicroRNA-223 Is Commonly Repressed in Hepatocellular Carcinoma and Potentiates Expression of Stathmin1. *Gastroenterology* **2008**, *135* (1), 257–269. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.04.003>.
- (198) Ramkissoon, S. H.; Mainwaring, L. A.; Ogasawara, Y.; Keyvanfar, K.; McCoy, J. P.; Sloand, E. M.; Kajigaya, S.; Young, N. S. Hematopoietic-Specific MicroRNA Expression in Human Cells. *Leuk. Res.* **2006**, *30* (5), 643–647. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2005.09.001>.
- (199) Fazi, F.; Rosa, A.; Fatica, A.; Gelmetti, V.; Marchis, M. L. D.; Nervi, C.; Bozzoni, I. A Minicircuitry Comprised of MicroRNA-223 and Transcription Factors NFI-A and C/EBP α Regulates Human Granulopoiesis. *Cell* **2005**, *123* (5), 819–831. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.023>.
- (200) Fukao, T.; Fukuda, Y.; Kiga, K.; Sharif, J.; Hino, K.; Enomoto, Y.; Kawamura, A.; Nakamura, K.; Takeuchi, T.; Tanabe, M. An Evolutionarily Conserved Mechanism for MicroRNA-223 Expression Revealed by MicroRNA Gene Profiling. *Cell* **2007**, *129* (3), 617–631. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.048>.
- (201) M, E.; S, S.; Ja, S.; S, H.; Bu, M.; T, P. Complexity of MiR-223 Regulation by CEBPA in Human AML. *Leuk. Res.* **2010**, *34* (5). <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2009.11.019>.
- (202) Ismail, N.; Wang, Y.; Dakhllallah, D.; Moldovan, L.; Agarwal, K.; Batte, K.; Shah, P.; Wisler, J.; Eubank, T. D.; Tridandapani, S.; Paulaitis, M. E.; Piper, M. G.; Marsh, C. B. Macrophage Microvesicles Induce Macrophage Differentiation and MiR-223 Transfer. *Blood* **2013**, *121* (6), 984–995. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374793>.
- (203) Fang, G.; Liu, J.; Wang, Q.; Huang, X.; Yang, R.; Pang, Y.; Yang, M. MicroRNA-223-3p Regulates Ovarian Cancer Cell Proliferation and Invasion by Targeting SOX11 Expression. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061208>.
- (204) Li, X.; Zhang, Y.; Zhang, H.; Liu, X.; Gong, T.; Li, M.; Sun, L.; Ji, G.; Shi, Y.; Han, Z.; Han, S.; Nie, Y.; Chen, X.; Zhao, Q.; Ding, J.; Wu, K.; Daiming, F. MiRNA-223 Promotes Gastric Cancer Invasion and Metastasis by Targeting Tumor Suppressor EPB41L3. *Mol. Cancer Res. MCR* **2011**, *9* (7), 824–833. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0529>.
- (205) Wei, Y.; Yang, J.; Yi, L.; Wang, Y.; Dong, Z.; Liu, Z.; Ou-yang, S.; Wu, H.; Zhong, Z.; Yin, Z.; Zhou, K.; Gao, Y.; Yan, B.; Wang, Z. MiR-223-3p Targeting SEPT6 Promotes the Biological Behavior of Prostate Cancer. *Sci. Rep.* **2014**, *4*. <https://doi.org/10.1038/srep07546>.
- (206) Jia, C. Y.; Li, H. H.; Zhu, X. C.; Dong, Y. W.; Fu, D.; Zhao, Q. L.; Wu, W.; Wu, X. Z. MiR-223 Suppresses Cell Proliferation by Targeting IGF-1R. *PLOS ONE* **2011**, *6* (11), e27008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027008>.
- (207) Masciarelli, S.; Fontemaggi, G.; Di Agostino, S.; Donzelli, S.; Carcarino, E.; Strano, S.; Blandino, G. Gain-of-Function Mutant P53 Downregulates MiR-223 Contributing to Chemoresistance of Cultured Tumor Cells. *Oncogene* **2014**, *33* (12), 1601–1608. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.106>.
- (208) Sun, X.; Li, Y.; Zheng, M.; Zuo, W.; Zheng, W. MicroRNA-223 Increases the Sensitivity of Triple-Negative Breast Cancer Stem Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by Targeting HAX-1. *PLOS ONE* **2016**, *11* (9), e0162754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162754>.
- (209) Holliday, D. L.; Speirs, V. Choosing the Right Cell Line for Breast Cancer Research. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13* (4), 215. <https://doi.org/10.1186/bcr2889>.
- (210) Zazo, S.; González-Alonso, P.; Martín-Aparicio, E.; Chamizo, C.; Cristóbal, I.; Arpí, O.; Rovira, A.; Albanell, J.; Eroles, P.; Lluch, A.; Madoz-Gúrpide, J.; Rojo, F. Generation,

Characterization, and Maintenance of Trastuzumab-Resistant HER2+ Breast Cancer Cell Lines. *Am. J. Cancer Res.* **2016**, 6 (11), 2661–2678.

(211) Subik, K.; Lee, J.-F.; Baxter, L.; Strzepek, T.; Costello, D.; Crowley, P.; Xing, L.; Hung, M.-C.; Bonfiglio, T.; Hicks, D. G.; Tang, P. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* **2010**, 4, 35–41.

(212) Tanner, M.; Kapanen, A. I.; Junttila, T.; Raheem, O.; Grenman, S.; Elo, J.; Elenius, K.; Isola, J. Characterization of a Novel Cell Line Established from a Patient with Herceptin-Resistant Breast Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, 3 (12), 1585–1592.

(213) MCF 10A ATCC® CRL-10317™ Homo sapiens mammary gland; breast
https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-10317.aspx?geo_country=pl#characteristics
(accessed 2021 -03 -03).

(214) EpH4-Ev ATCC® CRL-3063™ Mus musculus breast epithelium (mam
<https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-3063.aspx#characteristics> (accessed 2021 -02 -24).

(215) Aslakson, C. J.; Rak, J. W.; Miller, B. E.; Miller, F. R. Differential Influence of Organ Site on Three Subpopulations of a Single Mouse Mammary Tumor at Two Distinct Steps in Metastasis. *Int. J. Cancer* **1991**, 47 (3), 466–472. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910470327>.

(216) Aslakson, C. J.; Miller, F. R. Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a Mouse Mammary Tumor. *Cancer Res.* **1992**, 52 (6), 1399–1405.

(217) Eckhardt, B. L.; Parker, B. S.; van Laar, R. K.; Restall, C. M.; Natoli, A. L.; Tavaría, M. D.; Stanley, K. L.; Sloan, E. K.; Moseley, J. M.; Anderson, R. L. Genomic Analysis of a Spontaneous Model of Breast Cancer Metastasis to Bone Reveals a Role for the Extracellular Matrix. *Mol. Cancer Res. MCR* **2005**, 3 (1), 1–13.

(218) B-MEKDD 116 ATCC® CRL-3069™ https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-3069.aspx?geo_country=pl#characteristics (accessed 2021 -02 -24).

(219) NF639 ATCC® CRL-3090™ Mus musculus breast (mammary gland) b
https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-3090.aspx?geo_country=pl#characteristics
(accessed 2021 -02 -24).

(220) Tao, K.; Fang, M.; Alroy, J.; Sahagian, G. G. Imagable 4T1 Model for the Study of Late Stage Breast Cancer. *BMC Cancer* **2008**, 8, 228. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-228>.

(221) Johnstone, C. N.; Smith, Y. E.; Cao, Y.; Burrows, A. D.; Cross, R. S. N.; Ling, X.; Redvers, R. P.; Doherty, J. P.; Eckhardt, B. L.; Natoli, A. L.; Restall, C. M.; Lucas, E.; Pearson, H. B.; Deb, S.; Britt, K. L.; Rizzitelli, A.; Li, J.; Harmey, J. H.; Pouliot, N.; Anderson, R. L. Functional and Molecular Characterisation of EO771.LMB Tumours, a New C57BL/6-Mouse-Derived Model of Spontaneously Metastatic Mammary Cancer. *Dis. Model. Mech.* **2015**, 8 (3), 237–251.
<https://doi.org/10.1242/dmm.017830>.

(222) EO771 ATCC® CRL-3461™ Mus musculus mammary; breast breast c
https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-3461.aspx?geo_country=pl#characteristics
(accessed 2021 -02 -24).

(223) EpH4 1424.1 ATCC® CRL-3209™ <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-3209.aspx#characteristics> (accessed 2021 -02 -24).

- (224) Eph4 1424.2 ATCC® CRL-3210™ <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-3210.aspx#characteristics> (accessed 2021 -02 -24).
- (225) Papiernik, D.; Urbaniak, A.; Kłopotowska, D.; Nasulewicz-Goldeman, A.; Ekiert, M.; Nowak, M.; Jarosz, J.; Cuprych, M.; Strzykalska, A.; Ugorski, M.; Matkowski, R.; Wietrzyk, J. Retinol-Binding Protein 4 Accelerates Metastatic Spread and Increases Impairment of Blood Flow in Mouse Mammary Gland Tumors. *Cancers* **2020**, *12* (3). <https://doi.org/10.3390/cancers12030623>.
- (226) Naour, A. L.; Rossary, A.; Vasson, M.-P. EO771, Is It a Well-Characterized Cell Line for Mouse Mammary Cancer Model? Limit and Uncertainty. *Cancer Med.* **2020**, *9* (21), 8074–8085. <https://doi.org/10.1002/cam4.3295>.
- (227) Coughlin, S. S. Epidemiology of Breast Cancer in Women. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1152*, 9–29. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_2.
- (228) Condrat, C. E.; Thompson, D. C.; Barbu, M. G.; Bugnar, O. L.; Boboc, A.; Cretoiu, D.; Suciuc, N.; Cretoiu, S. M.; Voinea, S. C. MiRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells* **2020**, *9* (2). <https://doi.org/10.3390/cells9020276>.
- (229) Kaur, P.; Nagaraja, G. M.; Zheng, H.; Gizachew, D.; Galukande, M.; Krishnan, S.; Asea, A. A Mouse Model for Triple-Negative Breast Cancer Tumor-Initiating Cells (TNBC-TICs) Exhibits Similar Aggressive Phenotype to the Human Disease. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 120. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-120>.
- (230) Pillar, N.; Polsky, A. L.; Weissglas-Volkov, D.; Shomron, N. Comparison of Breast Cancer Metastasis Models Reveals a Possible Mechanism of Tumor Aggressiveness. *Cell Death Dis.* **2018**, *9* (10), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1094-8>.
- (231) Phua, Y. W.; Nguyen, A.; Roden, D. L.; Elsworth, B.; Deng, N.; Nikolic, I.; Yang, J.; Mcfarland, A.; Russell, R.; Kaplan, W.; Cowley, M. J.; Nair, R.; Zotenko, E.; O’Toole, S.; Tan, S.; James, D. E.; Clark, S. J.; Kouros-Mehr, H.; Swarbrick, A. MicroRNA Profiling of the Pubertal Mouse Mammary Gland Identifies MiR-184 as a Candidate Breast Tumour Suppressor Gene. *Breast Cancer Res. BCR* **2015**, *17* (1). <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0593-0>.
- (232) Reid, J. F.; Sokolova, V.; Zoni, E.; Lampis, A.; Pizzamiglio, S.; Bertan, C.; Zanutto, S.; Perrone, F.; Camerini, T.; Gallino, G.; Verderio, P.; Leo, E.; Pilotti, S.; Gariboldi, M.; Pierotti, M. A. MiRNA Profiling in Colorectal Cancer Highlights MiR-1 Involvement in MET-Dependent Proliferation. *Mol. Cancer Res. MCR* **2012**, *10* (4), 504–515. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0342>.
- (233) Yao, Y.; Suo, A.-L.; Li, Z.-F.; Liu, L.-Y.; Tian, T.; Ni, L.; Zhang, W.-G.; Nan, K.-J.; Song, T.-S.; Huang, C. MicroRNA Profiling of Human Gastric Cancer. *Mol. Med. Rep.* **2009**, *2* (6), 963–970. https://doi.org/10.3892/mmr_00000199.
- (234) Valera, V. A.; Parra-Medina, R.; Walter, B. A.; Pinto, P.; Merino, M. J. MicroRNA Expression Profiling in Young Prostate Cancer Patients. *J. Cancer* **2020**, *11* (14), 4106–4114. <https://doi.org/10.7150/jca.37842>.
- (235) Liu, G.; Friggeri, A.; Yang, Y.; Park, Y.-J.; Tsuruta, Y.; Abraham, E. MiR-147, a MicroRNA That Is Induced upon Toll-like Receptor Stimulation, Regulates Murine Macrophage Inflammatory Responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (37), 15819–15824. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901216106>.
- (236) Feng, Y.-Y.; Liu, C.-H.; Xue, Y.; Chen, Y.-Y.; Wang, Y.-L.; Wu, X.-Z. MicroRNA-147b Promotes Lung Adenocarcinoma Cell Aggressiveness through Negatively Regulating Microfibril-

Associated Glycoprotein 4 (MFAP4) and Affects Prognosis of Lung Adenocarcinoma Patients. *Gene* **2020**, 730, 144316. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144316>.

(237) Haneklaus, M.; Gerlic, M.; O'Neill, L. a. J.; Masters, S. L. MiR-223: Infection, Inflammation and Cancer. *J. Intern. Med.* **2013**, 274 (3), 215–226. <https://doi.org/10.1111/joim.12099>.

(238) Christenson, J. L.; Butterfield, K. T.; Spoelstra, N. S.; Norris, J. D.; Josan, J. S.; Pollock, J. A.; McDonnell, D. P.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A.; Richer, J. K. MMTV-PyMT and Derived Met-1 Mouse Mammary Tumor Cells as Models for Studying the Role of the Androgen Receptor in Triple-Negative Breast Cancer Progression. *Horm. Cancer* **2017**, 8 (2), 69–77. <https://doi.org/10.1007/s12672-017-0285-6>.

(239) Kowanetz, M.; Wu, X.; Lee, J.; Tan, M.; Hagenbeek, T.; Qu, X.; Yu, L.; Ross, J.; Korsisaari, N.; Cao, T.; Bou-Reslan, H.; Kallop, D.; Weimer, R.; Ludlam, M. J. C.; Kaminker, J. S.; Modrusan, Z.; Bruggen, N. van; Peale, F. V.; Carano, R.; Meng, Y. G.; Ferrara, N. Granulocyte-Colony Stimulating Factor Promotes Lung Metastasis through Mobilization of Ly6G+Ly6C+ Granulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, 107 (50), 21248–21255. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015855107>.

(240) DuPre', S. A.; Hunter, K. W. Murine Mammary Carcinoma 4T1 Induces a Leukemoid Reaction with Splenomegaly: Association with Tumor-Derived Growth Factors. *Exp. Mol. Pathol.* **2007**, 82 (1), 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2006.06.007>.

(241) Li, Z.; Yang, Y.; Du, L.; Dong, Z.; Wang, L.; Zhang, X.; Zhou, X.; Zheng, G.; Qu, A.; Wang, C. Overexpression of MiR-223 Correlates with Tumor Metastasis and Poor Prognosis in Patients with Colorectal Cancer. *Med. Oncol.* **2014**, 31 (11), 256. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0256-5>.

(242) Sun, D.; Wang, C.; Long, S.; Ma, Y.; Guo, Y.; Huang, Z.; Chen, X.; Zhang, C.; Chen, J.; Zhang, J. C/EBP- β -Activated MicroRNA-223 Promotes Tumour Growth through Targeting RASA1 in Human Colorectal Cancer. *Br. J. Cancer* **2015**, 112 (9), 1491–1500. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.107>.

(243) Zhang, J.; Luo, X.; Li, H.; Yue, X.; Deng, L.; Cui, Y.; Lu, Y. MicroRNA-223 Functions as an Oncogene in Human Colorectal Cancer Cells. *Oncol. Rep.* **2014**, 32 (1), 115–120. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3173>.

(244) Yan, L.-X.; Huang, X.-F.; Shao, Q.; Huang, M.-Y.; Deng, L.; Wu, Q.-L.; Zeng, Y.-X.; Shao, J.-Y. MicroRNA MiR-21 Overexpression in Human Breast Cancer Is Associated with Advanced Clinical Stage, Lymph Node Metastasis and Patient Poor Prognosis. *RNA* **2008**, 14 (11), 2348–2360. <https://doi.org/10.1261/rna.1034808>.

(245) Chattopadhyay, E.; Singh, R.; Ray, A.; Roy, R.; De Sarkar, N.; Paul, R. R.; Pal, M.; Aich, R.; Roy, B. Expression Deregulation of Mir31 and CXCL12 in Two Types of Oral Precancers and Cancer: Importance in Progression of Precancer and Cancer. *Sci. Rep.* **2016**, 6 (1), 32735. <https://doi.org/10.1038/srep32735>.

(246) Liu, C.-J.; Kao, S.-Y.; Tu, H.-F.; Tsai, M.-M.; Chang, K.-W.; Lin, S.-C. Increase of MicroRNA MiR-31 Level in Plasma Could Be a Potential Marker of Oral Cancer. *Oral Dis.* **2010**, 16 (4), 360–364. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01646.x>.

(247) Hashemi, Z. S.; Moghadam, M. F.; Farokhimanesh, S.; Rajabibazl, M.; Sadroddiny, E. Inhibition of Breast Cancer Metastasis by Co-Transfection of MiR-31/193b-Mimics. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2018**, 21 (4), 427–433. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.26614.6522>.

(248) Ge, F.; Wang, C.; Wang, W.; Liu, W.; Wu, B. MicroRNA-31 Inhibits Tumor Invasion and Metastasis by Targeting RhoA in Human Gastric Cancer. *Oncol. Rep.* **2017**, 38 (2), 1133–1139. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5758>.

- (249) Slack, J. K.; Adams, R. B.; Rovin, J. D.; Bissonette, E. A.; Stoker, C. E.; Parsons, J. T. Alterations in the Focal Adhesion Kinase/Src Signal Transduction Pathway Correlate with Increased Migratory Capacity of Prostate Carcinoma Cells. *Oncogene* **2001**, *20* (10), 1152–1163. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204208>.
- (250) Luo, M.; Guan, J.-L. Focal Adhesion Kinase: A Prominent Determinant in Breast Cancer Initiation, Progression and Metastasis. *Cancer Lett.* **2010**, *289* (2), 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.07.005>.
- (251) Pylayeva, Y.; Gillen, K. M.; Gerald, W.; Beggs, H. E.; Reichardt, L. F.; Giancotti, F. G. Ras- and PI3K-Dependent Breast Tumorigenesis in Mice and Humans Requires Focal Adhesion Kinase Signaling. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119* (2), 252–266. <https://doi.org/10.1172/JCI37160>.
- (252) Lahlou, H.; Sanguin-Gendreau, V.; Zuo, D.; Cardiff, Robert. D.; McLean, G. W.; Frame, M. C.; Muller, W. J. Mammary Epithelial-Specific Disruption of the Focal Adhesion Kinase Blocks Mammary Tumor Progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (51), 20302–20307. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710091104>.
- (253) Mitra, S. K.; Lim, S.-T.; Chi, A.; Schlaepfer, D. D. Intrinsic Focal Adhesion Kinase Activity Controls Orthotopic Breast Carcinoma Metastasis via the Regulation of Urokinase Plasminogen Activator Expression in a Syngeneic Tumor Model. *Oncogene* **2006**, *25* (32), 4429–4440. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209482>.
- (254) Cichini, C.; Laudadio, I.; Citarella, F.; Corazzari, M.; Steindler, C.; Conigliaro, A.; Fantoni, A.; Amicone, L.; Tripodi, M. TGFbeta-Induced EMT Requires Focal Adhesion Kinase (FAK) Signaling. *Exp. Cell Res.* **2008**, *314* (1), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.09.005>.
- (255) Zhou, J.; Zhu, J.; Jiang, G.; Feng, J.; Wang, Q. Downregulation of MicroRNA-4324 Promotes the EMT of Esophageal Squamous-Cell Carcinoma Cells via Upregulating FAK. *OncoTargets Ther.* **2019**, *12*, 4595–4604. <https://doi.org/10.2147/OTT.S198333>.
- (256) Kong, X.; Li, G.; Yuan, Y.; He, Y.; Wu, X.; Zhang, W.; Wu, Z.; Chen, T.; Wu, W.; Lobie, P. E.; Zhu, T. MicroRNA-7 Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis of Breast Cancer Cells via Targeting FAK Expression. *PLOS ONE* **2012**, *7* (8), e41523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041523>.
- (257) Wang, N.; Li, Y.; Zhou, J. MiR-31 Functions as an Oncomir Which Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition via Regulating BAP1 in Cervical Cancer. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, e6361420. <https://doi.org/10.1155/2017/6361420>.
- (258) Schaller, M. D. Biochemical Signals and Biological Responses Elicited by the Focal Adhesion Kinase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2001**, *1540* (1), 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(01\)00123-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(01)00123-9).
- (259) Sonoda, Y.; Matsumoto, Y.; Funakoshi, M.; Yamamoto, D.; Hanks, S. K.; Kasahara, T. Anti-Apoptotic Role of Focal Adhesion Kinase (FAK). Induction of Inhibitor-of-Apoptosis Proteins and Apoptosis Suppression by the Overexpression of FAK in a Human Leukemic Cell Line, HL-60. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (21), 16309–16315. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.21.16309>.
- (260) Verma, A. K.; Ahmad, I.; Yadav, P.; Rahmani, A. H.; Khan, B.; Alsahli, M. A.; Joshi, P. C.; Ahmad, H.; Ali Beg, M. M. Expression and Correlation of Cell-Free CIAP-1 and CIAP-2 MRNA in Breast Cancer Patients: A Study from India. *J. Oncol.* **2020**, *2020*, e3634825. <https://doi.org/10.1155/2020/3634825>.
- (261) Sawada, K.; Mitra, A. K.; Radjabi, A. R.; Bhaskar, V.; Kistner, E. O.; Tretiakova, M.; Jagadeeswaran, S.; Montag, A.; Becker, A.; Kenny, H. A.; Peter, M. E.; Ramakrishnan, V.; Yamada,

S. D.; Lengyel, E. Loss of E-Cadherin Promotes Ovarian Cancer Metastasis via A5-Integrin, Which Is a Therapeutic Target. *Cancer Res.* **2008**, *68* (7), 2329–2339. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5167>.

(262) Hou, J.; Zhou, Z.; Chen, X.; Zhao, R.; Yang, Z.; Wei, N.; Ni, Q.; Feng, Y.; Yu, X.; Ma, J.; Guo, X. HER2 Reduces Breast Cancer Radiosensitivity by Activating Focal Adhesion Kinase in Vitro and in Vivo. *Oncotarget* **2016**, *7* (29), 45186–45198. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9870>.

VIII. SPIS TABEL I RYCIN

Spis rycin

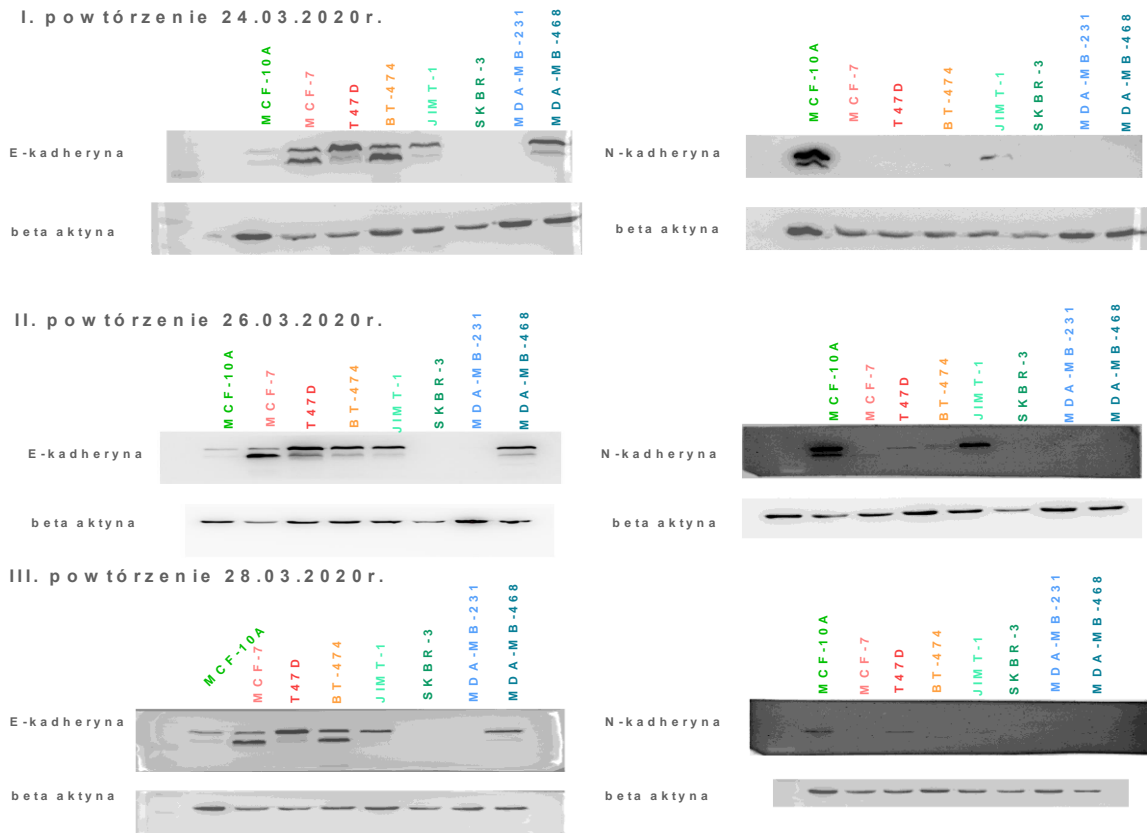
Rycina 1	Liczba zachorowań oraz liczba zgonów z powodu nowotworów złośliwych na świecie wśród populacji kobiet i mężczyzn w 2020 roku. Spośród wszystkich odnotowanych przypadków zachorowań i zgonów, nowotwór piersi i nowotwór płuc (odpowiednio) jest jednym z najczęściej występujących na świecie w obu populacjach. Wykresy przygotowano na podstawie danych statystycznych dostępnych na portalu GLOBOCAN (ang. Global Cancer Observatory) Światowej Organizacji Zdrowia (opracowanie własne).	14
Rycina 2	Liczba zachorowań oraz liczba zgonów u kobiet i mężczyzn w populacji polskiej. Wśród kobiet w 2017 roku najczęściej występującym nowotworem był nowotwór piersi stanowi on 1/5 wszystkich zachorowań. W przypadku populacji mężczyzn jest to nowotwór złośliwy gruczołu krokowego. Zarówno w populacji kobiet jak i mężczyzn nowotwór płuc jest najczęstszą przyczyną zgonów. II miejsce zajmuje w przypadku populacji kobiet rak gruczołu sutkowego, natomiast w populacji mężczyzn rak jelita grubego. Wykresy zostały przygotowane na podstawie danych statystycznych uzyskanych z Krajowego Rejestru Nowotworów (opracowanie własne).	15
Rycina 3	Epidemiologia nowotworów złośliwych u kobiet. Wykresy przygotowano na podstawie danych statystycznych uzyskanych z bazy danych GLOBOCAN 2020. Jak się okazuje nowotwór piersi zajmuje 1 miejsce pod względem zachorowalności i śmiertelności wśród kobiet na całym świecie. Opracowanie własne.	19
Rycina 4	Gruczoł sutkowy zbudowany jest z elementów funkcjonalnych takich jak zraziki i przewody piersiowe. Poza wymienionymi strukturami piersi zawiera również naczynia krwionośne, limfatyczne oraz węzły chłonne.	22
Rycina 5	Klasyfikacja histologiczna raka gruczołu sutkowego. Pierwsza grupa obejmuje raki przedinwazyjne przewodowe do których zalicza się raki lite, sitowate, mikrobrodawkowate oraz brodawkowate. Druga grupa obejmuje raki inwazyjne obejmują – raki mikroinwazyjne, NST, naciekający zrazikowy, cewkowaty, sitowaty, śluzowaty, metaplastyczny oraz rdzeniasty. Opracowanie własne.	23
Rycina 6	Biogeneza dojrzałej, funkcjonalnej cząsteczki miRNA. Powstawanie pierwotnego transkryptu – pri-miRNA oraz jego obróbka i geniza pre-mikroRNA odbywają się w jądrze komórkowym, natomiast ostatni etap – powstawanie funkcjonalnej cząsteczki mikroRNA odbywa się w cytoplazmie.	30
Rycina 7	Mechanizmy regulacyjne onkogennych i supresorowych mikroRNA w przypadku zdarzeń nowotworowych. Zwiększona ekspresja onkogennych miRNA w komórkach nowotworowych hamuje geny supresorowe guza. Zmniejszona ekspresja miRNA supresorowych guza potencjalnie zwiększa ekspresję onkogenów. Zmodyfikowano wg	33
Rycina 8	Krążące mikroRNA jako biomarkery: schematyczny diagram przedstawiający biogenezę miRNA, miejsca wydzielania do płynów ustrojowych, ekstrakcję RNA i oszacowanie ilościowe. W przyszłości decyzje kliniczne mogą być podejmowane na podstawie poziomów ekspresji miRNA. Steer i Subramanian	36
Rycina 9.	Schemat eksperymentu in vivo. Eksperyment rozpoczęto od ortotopowego zaszczepienia myszy szczepu BALB/c (dzień „0” eksperymentu). Do badania wykorzystano dwa modele mysiego raka gruczołu sutkowego: model nieprzerzutujący 67NR oraz jego przerzutujący odpowiednik 4T1. Podczas sekcji, które przeprowadzono w 12 oraz 24 dniu eksperymentu pobierano każdorazowo osocze, płuca oraz guz nowotworowy. Pomiędzy sekcjami, w częstotliwości co 2 dni, wykonywano pomiary masy ciała i guzów. Opracowanie własne.	58
Rycina 10	Poziom wybranych cząsteczek mikroRNA, które wykazywały największe różnice w ekspresji w linii komórkowej 67NR oraz 4T1 podczas rozwoju nowotworu w 12 i 24 dniu eksperymentu. a) i b) wybrane cząsteczki mikroRNA dla tkanki płuc; c) i d) wybrane cząsteczki mikroRNA dla tkanki guza. Wybrane cząsteczki mikroRNA do dalszych badań zaznaczono w ramach pod wykresem. Kontrolę eksperymentu stanowił materiał pochodzący od myszy zdrowych (nieobarczonych nowotworem) – wyizolowane całkowite RNA z osocza, płuc oraz z fragmentu listwy mlecznej.	77
Rycina 11	Poziom ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA do dalszych badań w materiale pochodzenia mysiego w osoczu – wykresy – a), b) i c) w guzie nowotworowym wykresy – d), e) i f) oraz tkance płuc – wykresy – g), h) oraz i). Analizę statystyczną	79

	przeprowadzono przy użyciu testu ANOVA oraz Kruskal – Willis’a dla porównań wielokrotnych. *p<0,05. Kontrolę eksperymentu stanowiło mikroRNA wyizolowane z osocza i tkanek – z fragmentu płuc oraz z fragmentu listwy mlecznej uzyskanych od myszy zdrowych – nieobarczonych nowotworem.	
Rycina 12	Analiza profilu ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA w lizatach linii komórkowych mysiego raka gruczołu sutkowego. Linie komórkowe podzielono pod względem pochodzenia oraz stopnia złośliwości. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu ANOVA – dla wielokrotnych powtórzeń. *p<0,05.	81
Rycina 13	Poziom ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA zbadano również w osoczu i guzie nowotworowym uzyskanym od pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem piersi. Grupę kontrolną w przypadku osocza stanowiło osocze uzyskane od zdrowych dawczyń, natomiast w przypadku guza – całkowite RNA uzyskane z prawidłowej tkanki piersi od 5 dawczyń. Osocze: grupa kontrolna – n = 5, rak gruczołu sutkowego nieprzerzutujący oraz z przerzutami do węzłów chłonnych n=50, rak gruczołu sutkowego z przerzutami odległymi – n=10. Guz nowotworowy: grupa kontrolna – n=5, rak piersi nieprzerzutujący oraz z przerzutami do węzłów chłonnych – n=30, rak piersi z przerzutami odległymi – n=6. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu Kruskal-Wallisa. *p<0,05.	83
Rycina 14	Profil ekspresji dojrzałych cząsteczek mikroRNA w lizatach linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego, pogrupowanych pod względem występujących podtypów molekularnych nowotworu piersi. Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując test ANOVA oraz Kruskal-Wiliss’a dla powtórzeń wielokrotnych. *p<0,05.	84
Rycina 15	Poziom wybranych białek uczestniczących w przejściu nabłonkowo mezenchymalnym zbadano w lizatach linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego. Linie podzielono pod względem podtypów molekularnych nowotworu piersi. Dodatkowo pod wykresem dla każdego z badanych białek zestawiono po 1 reprezentatywnym wyniku z Western Blott dla badanego białka i dla β – aktyny. Wyniki pozostałych powtórzeń znajdują się w Suplemencie. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu testu ANOVA dla powtórzeń wielokrotnych. *p<0,05.	86
Rycina 16	. Porównanie zdolności adhezji do fibronektyny w liniach dzikich ludzkiego raka gruczołu sutkowego – wykres a), kontrolę eksperymentu stanowiła linia MCF 10A oraz w liniach w których przeprowadzono przejściową transfekcję wykresy b) -h). kontrolę eksperymentu w przypadku linii transfekowanych stanowiła kontrola negatywna. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu ANOVA dla powtórzeń wielokrotnych, testu T – Studenta oraz testu Wilcoxon’a. *p<0,05.	87
Rycina 17	Poziom wybranych białek – RhoA, FAK i ITGA5 regulowanych przez cząsteczkę miR-31-5p w lizatach dzikich linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu ANOVA dla powtórzeń wielokrotnych *p<0,05. Kontrolę eksperymentu stanowiła linia MCF10A.	88
Rycina 18	Przedstawione wykresy pokazują poziom wybranych białek – RhoA, FAK i ITGA5 regulowanych przez cząsteczkę miR-31-5p w liniach komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego o podtypie luminalnym A – MCF-7, T47D oraz HER2+ – linii BT 474. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu T – Studenta oraz testu Wilcoxon’a. *p<0,05.	90
Rycina 19	Przedstawione wykresy pokazują poziom wybranych białek – RhoA, FAK i ITGA5 regulowanych przez cząsteczkę miR-31-5p w liniach komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego o podtypie HER2+ – JIMT – 1 oraz SKBR – 3. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu T – Studenta oraz testu Wilcoxon’a. *p<0,05.	91
Rycina 20	Przedstawione wykresy pokazują poziom wybranych białek – RhoA, FAK i ITGA5 regulowanych przez cząsteczkę miR-31-5p w liniach komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego o podtypie TNBC – MDA -MB-231 oraz MDA-MB-468. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu T – Studenta oraz testu Wilcoxon’a. *p<0,05.	92

Spis tabel

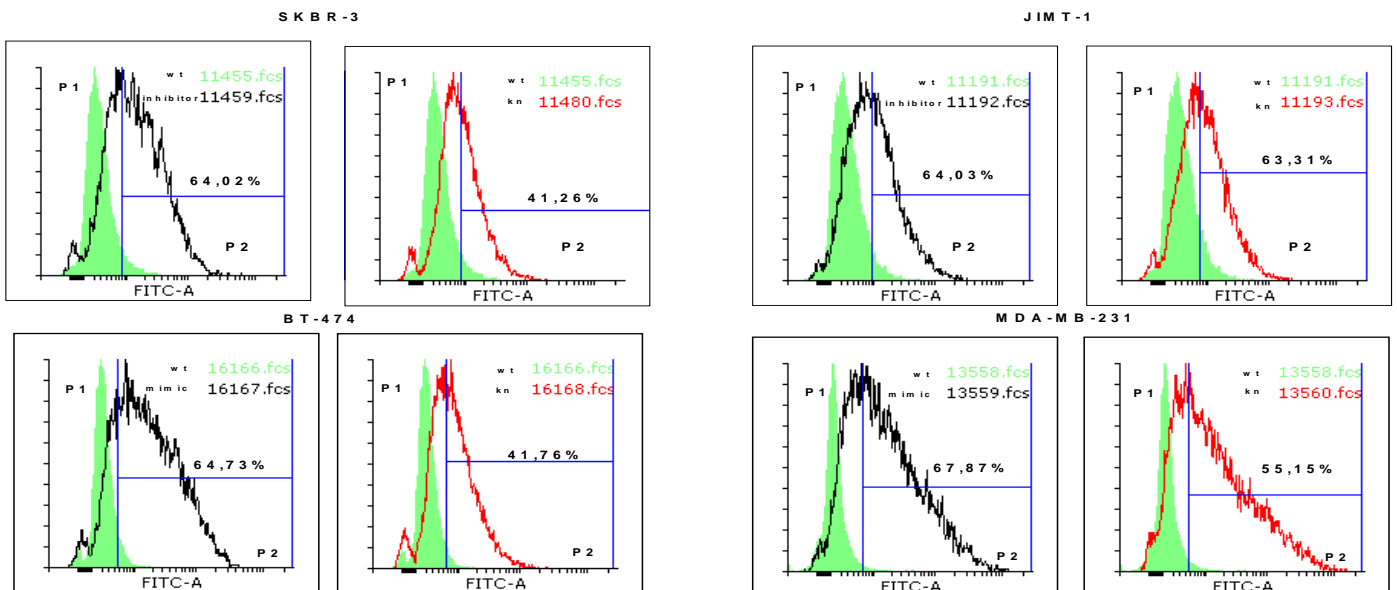
Tabela 1	Charakterystyka kluczowych genów dla inicjacji transformacji nowotworowej. Informacje w tabeli przygotowano na podstawie ¹¹	17
Tabela 2	Obecnie stosowany podział podtypów raka piersi w praktyce klinicznej. Opracowanie własne na podstawie ¹⁴	25
Tabela 3	Charakterystyka podtypów ludzkiego potrójnie ujemnego raka piersi (TNBC) wraz z odpowiednikami ludzkich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego. Przygotowano na podstawie	27
Tabela 4	W tabeli poniżej przedstawiono geny i szlaki sygnałowe pośredniczące w przejściu nabłonkowo-mezenchymalnym w różnych podtypach nowotworu piersi. Poniższe informacje przygotowano na podstawie ⁸⁵	38
Tabela 5	Obniżona ekspresja miR-31-5p w różnych typach nowotworów.	42
Tabela 6	Podwyższona ekspresja miR-31-5p w różnych typach nowotworów.	43
Tabela 7	Cząsteczki docelowe regulowane przez cząsteczkę miR-31-5p w różnych typach nowotworów.	45
Tabela 8	Charakterystyka linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego pod względem obecności poszczególnych markerów.	53
Tabela 9	Charakterystyka mysich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego	54
Tabela 10	Skład mediów hodowlanych dla poszczególnych ludzkich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego wykorzystywanych w badaniach in vitro.	56
Tabela 11	Skład mediów hodowlanych dla poszczególnych mysich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego.	57
Tabela 12	Mieszanię reakcyjną do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji przeprowadzono zgodnie z poniższą tabelą.	64
Tabela 13	Mieszanię reakcyjną do przeprowadzenia reakcji preamplifikacji przygotowano według poniższej tabeli.	65
Tabela 14	Charakterystyka cząsteczek mikroRNA obecnych w osoczu i surowicy.	66
Tabela 15	Charakterystyka cząsteczek mikroRNA związanych z chorobami układu immunologicznego	67
Tabela 16	Charakterystyka cząsteczek mikroRNA uczestniczących w regulacji szlaków związanych z nowotworowymi komórkami macierzystymi	68
Tabela 17	Zestawienie odczynników używanych do przeprowadzenia przejściowej transfekcji	73
Tabela 18	Tabela 18 Wyniki ekspresji cząsteczek mikroRNA w badaniach przesiewowych związane z zaburzeniami układu immunologicznego (miScript miRNA PCR Immunopathology), uczestniczące w regulacji nowotworowych komórek macierzystych (miScript miRNA PCR Cancer Stem Cells) oraz obecnych w osoczu i surowicy (miScript miRNA Serum&Plasma)	139-147

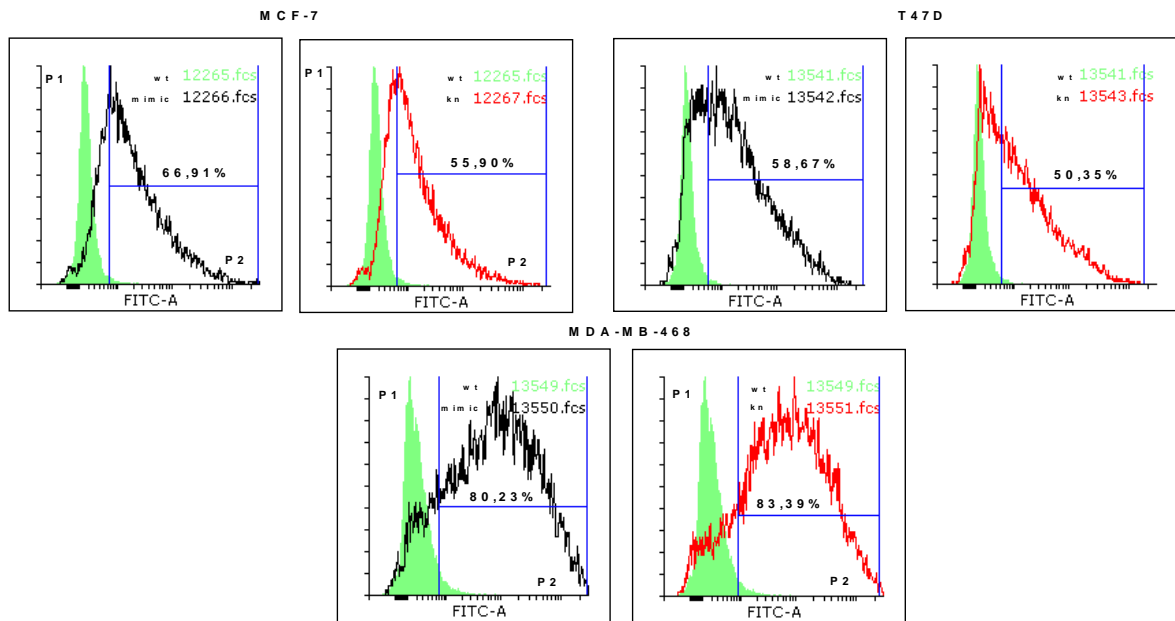
XI. SUPPLEMENT



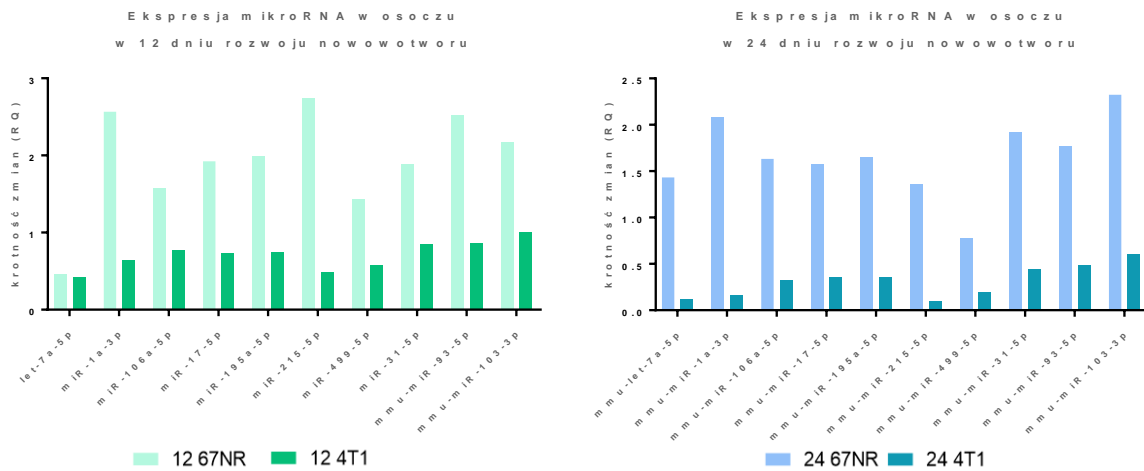
Rycina 21 Poziom białek charakterystycznych dla przejścia nabłonkowo – mezenchymalnego w lisatach ludzkich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego.

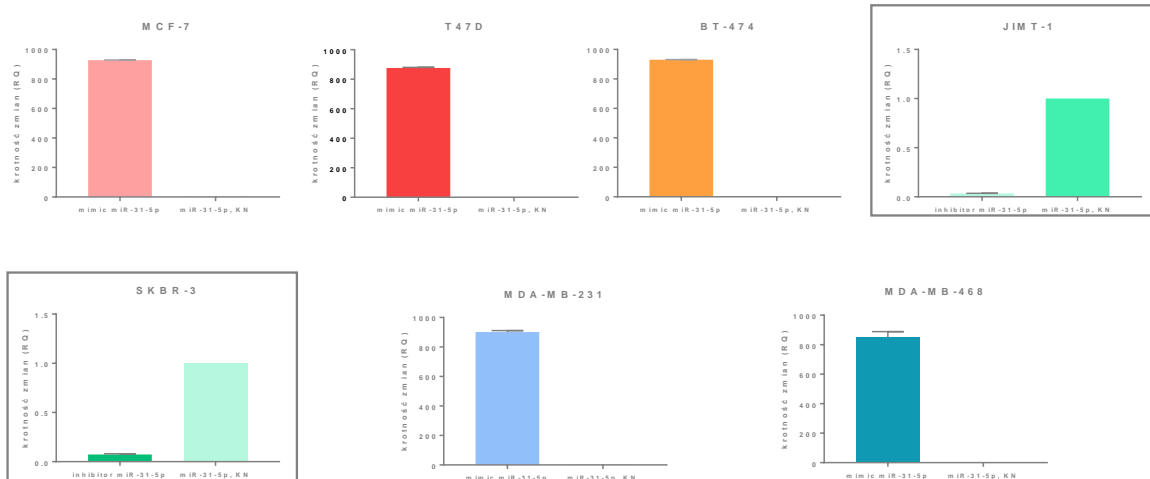
Rycina 22 Sprawdzenie wydajności transfekcji w liniach komórkowych ludzkiego raka gruczołu sutkowego za pomocą cytometrii przepływowej. Wyniki przedstawiono w formie histogramów. Na zielono zaznaczono populację komórek typu dzikiego, na czarno % komórek transfekowanych inhibitorem lub mimetykiem miR-31-5p, a na czerwono % komórek transfekowanych kontrolą negatywną.





Rycina 23 Poziom ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA w mysim osoczu w badaniach przesiewowych, wykonanych techniką Real-Time PCR.





Rycina 24 Poziom ekspresji miR-31-5p uzyskany metodą Real-Time PCR po przeprowadzeniu transfekcji z wyciszeniem (wykresy na rycinie zaznaczono w ramce) oraz z nadekspresją miR-31-5p.

Tabela 18 Wyniki ekspresji cząsteczek mikroRNA w badaniach przesiewowych związanych z zaburzeniami układu immunologicznego (miScript miRNA PCR Immunopathology), uczestniczące w regulacji nowotworowych komórek macierzystych (miScript miRNA PCR Cancer Stem Cells) oraz obecnych w osoczu i surowicy (miScript miRNA Serum&Plasma).

Position	Mature ID	miScript miRNA PCR Immunopathology			
		12 67NR	12 4T1	24 67NR	24 4T1
		Fold Change	Fold Change	Fold Change	Fold Change
A01	mmu-let-7a-5p	43,0435	29,5957	44,2954	23,053
A02	mmu-let-7c-5p	7,0016	5,1245	7,9607	3,7304
A03	mmu-let-7d-5p	7,1712	5,4241	8,427	4,2958
A04	mmu-let-7e-5p	29,5156	24,1322	32,9588	16,5462
A05	mmu-let-7g-5p	2,2896	1,7997	2,4247	1,8408
A06	mmu-miR-103-3p	1,8459	1,6289	1,8016	1,8798
A07	mmu-miR-105	1,5861	1,0329	1,9223	1,4135
A08	mmu-miR-106a-5p	1,8766	2,4525	2,259	3,5081
A09	mmu-miR-125a-5p	2,123	1,7741	1,9232	1,2569
A10	mmu-miR-125b-5p	2,2999	2,3823	1,8184	1,5833
A11	mmu-miR-126a-3p	2,0519	1,3928	1,991	1,543
A12	mmu-miR-129-5p	2,1451	2,3052	3,1957	3,4518
B01	mmu-miR-130a-3p	1,3694	1,1916	1,437	1,1489
B02	mmu-miR-132-3p	1,7901	3,1523	1,8203	2,7053
B03	mmu-miR-134-5p	1,508	1,44	1,5694	1,1803
B04	mmu-miR-135a-5p	2,1659	2,1228	2,3183	2,4937
B05	mmu-miR-135b-5p	0,8404	0,79	0,6546	0,9277
B06	mmu-miR-138-5p	2,7384	3,0243	2,3988	3,1402
B07	mmu-miR-140-5p	1,2062	0,9613	1,1152	1,3383
B08	mmu-miR-142a-3p	1,234	1,1776	1,7137	5,9861
B09	mmu-miR-142a-5p	0,7502	0,9091	1,2775	5,3596
B10	mmu-miR-145a-5p	0,9615	0,6961	0,9163	0,8364
B11	mmu-miR-146a-5p	1,1368	0,7078	1,0695	0,6776
B12	mmu-miR-146b-5p	1,1092	0,9847	1,1016	1,7651
C01	mmu-miR-147-3p	0,8299	2,9692	1,2066	36,0073
C02	mmu-miR-148a-3p	1,5242	1,177	1,5775	1,6951
C03	mmu-miR-149-5p	0,9802	1,6514	1,0388	2,2633
C04	mmu-miR-150-5p	1,0177	0,8946	0,7816	0,8305

<i>C05</i>	mmu-miR-152-3p	0,99	0,7463	0,9847	0,6967
<i>C06</i>	mmu-miR-155-5p	1,794	1,9856	2,1359	1,9101
<i>C07</i>	mmu-miR-15a-5p	0,5645	0,4871	0,7526	0,9589
<i>C08</i>	mmu-miR-15b-5p	1,2336	1,2423	1,312	1,7217
<i>C09</i>	mmu-miR-16-5p	0,8745	0,7351	0,9535	0,9557
<i>C10</i>	mmu-miR-181a-5p	0,8926	0,8163	0,9705	0,9264
<i>C11</i>	mmu-miR-182-5p	0,9831	1,5955	1,1001	1,1335
<i>C12</i>	mmu-miR-183-5p	1,1182	1,625	1,1165	0,9442
<i>D01</i>	mmu-miR-184-3p	0,83	0,6898	1,0779	0,8426
<i>D02</i>	mmu-miR-185-5p	1,7571	1,6123	1,8662	1,742
<i>D03</i>	mmu-miR-186-5p	0,7207	0,7416	0,7856	0,9214
<i>D04</i>	mmu-miR-187-3p	0,7628	0,5332	0,7536	0,7642
<i>D05</i>	mmu-miR-18a-5p	0,5614	0,8893	0,7166	2,308
<i>D06</i>	mmu-miR-18b-5p	1,1732	1,0298	1,2197	2,1035
<i>D07</i>	mmu-miR-191-5p	0,9231	0,8097	0,8291	0,8698
<i>D08</i>	mmu-miR-194-5p	0,9467	0,6257	1,053	0,6799
<i>D09</i>	mmu-miR-195a-5p	0,9789	0,8002	0,9797	0,8495
<i>D10</i>	mmu-miR-196a-5p	2,1137	4,7062	3,4423	8,0552
<i>D11</i>	mmu-miR-19a-3p	0,8449	1,0389	1,1192	1,5352
<i>D12</i>	mmu-miR-19b-3p	0,5293	0,6342	0,6727	0,9055
<i>E01</i>	mmu-miR-200a-3p	0,7097	0,5143	0,6931	0,5674
<i>E02</i>	mmu-miR-203-3p	0,7831	0,6584	0,7978	0,6567
<i>E03</i>	mmu-miR-205-5p	0,651	0,9086	0,6353	0,515
<i>E04</i>	mmu-miR-207	3,1856	2,7533	5,6057	4,0366
<i>E05</i>	mmu-miR-20a-5p	0,6774	0,8605	0,8415	1,2434
<i>E06</i>	mmu-miR-20b-5p	1,3013	1,6297	1,5325	2,0491
<i>E07</i>	mmu-miR-21a-5p	0,7113	0,8639	0,7413	1,3365
<i>E08</i>	mmu-miR-210-3p	0,6595	0,957	0,6509	1,0043
<i>E09</i>	mmu-miR-214-3p	0,888	0,8783	0,9724	0,7408
<i>E10</i>	mmu-miR-223-3p	0,7143	1,8445	0,7677	13,3498
<i>E11</i>	mmu-miR-23b-3p	1,0849	0,8374	1,005	0,7559
<i>E12</i>	mmu-miR-26a-5p	0,8683	0,6574	0,831	0,6018
<i>F01</i>	mmu-miR-26b-5p	10,7729	8,3847	10,4326	7,9643
<i>F02</i>	mmu-miR-27a-3p	0,8456	0,711	0,9531	0,7533
<i>F03</i>	mmu-miR-27b-3p	0,8008	0,6828	0,7669	0,7513

<i>F04</i>	mmu-miR-28c	0,7518	0,7233	0,74	0,7289
<i>F05</i>	mmu-miR-298-5p	1,3102	1,4226	2,1874	1,9915
<i>F06</i>	mmu-miR-299a-3p	0,7374	1,1987	1,1818	0,6988
<i>F07</i>	mmu-miR-29b-3p	0,4037	0,3805	0,5516	0,6752
<i>F08</i>	mmu-miR-29c-3p	0,7864	0,7179	0,9479	0,8877
<i>F09</i>	mmu-miR-30b-5p	0,7037	0,5663	0,7155	0,6377
<i>F10</i>	mmu-miR-30c-5p	0,8379	0,6659	0,7991	0,6525
<i>F11</i>	mmu-miR-30e-5p	0,9843	0,8239	1,0419	0,8833
<i>F12</i>	mmu-miR-31-5p	0,7528	1,461	0,7164	0,9958
<i>G01</i>	mmu-miR-320-3p	0,9342	0,8374	1,0452	0,5763
<i>G02</i>	mmu-miR-325-3p	1,1973	0,9723	1,2447	1,333
<i>G03</i>	mmu-miR-335-5p	0,7394	0,5951	0,7239	1,0371
<i>G04</i>	mmu-miR-34a-5p	0,5244	0,5451	0,6075	0,5674
<i>G05</i>	mmu-miR-34c-5p	0,3631	0,3261	0,4557	0,4752
<i>G06</i>	mmu-miR-383-5p	3,6042	4,6111	8,4943	4,5355
<i>G07</i>	mmu-miR-409-3p	0,7043	0,9107	0,8546	0,8628
<i>G08</i>	mmu-miR-451a	0,6883	0,5326	0,7805	0,4877
<i>G09</i>	mmu-miR-493-3p	1,2008	1,7737	2,4607	2,0344
<i>G10</i>	mmu-miR-574-3p	0,9021	0,8411	0,7595	0,6584
<i>G11</i>	mmu-miR-9-5p	1,1949	5,1688	1,4599	8,4887
<i>G12</i>	mmu-miR-98-5p	3,0975	2,6027	2,9578	2,8853
<i>H01</i>	cel-miR-39-3p	1,4676	2,1645	3,3894	2,1667
<i>H02</i>	cel-miR-39-3p	1,7728	1,3265	2,8697	3,2367
<i>H03</i>	SNORD61	0,7372	0,7359	0,8363	0,7121
<i>H04</i>	SNORD68	1,8244	1,6547	1,5891	1,3859
<i>H05</i>	SNORD72	1,2571	1,2268	1,2477	1,173
<i>H06</i>	SNORD95	0,7139	0,7673	0,7583	0,7804
<i>H07</i>	SNORD96A	0,8592	0,7717	0,7453	0,6952
<i>H08</i>	RNU6-6P	0,966	1,1423	1,1074	1,6644
<i>H09</i>	miRTC	1,5004	1,6139	2,7157	3,1256
<i>H10</i>	miRTC	1,4278	1,5023	2,5248	2,9516
<i>H11</i>	PPC	1,5904	1,4235	1,5844	1,9027
<i>H12</i>	PPC	1,5354	1,3898	1,5057	1,7656

miScript miRNA PCR Cancer Stem Cells

<i>Position</i>	<i>Mature ID</i>	12 67NR	12 4T1	24 67NR	24 4T1
		Fold Change	Fold Change	Fold Change	Fold Change
A01	mmu-let-7a-5p	0,4585	0,1496	1,4325	0,1643
A02	mmu-let-7b-5p	2,5673	0,1607	2,083	0,1296
A03	mmu-let-7c-5p	5,9537	0,1511	2,6812	0,1253
A04	mmu-let-7d-5p	1,5798	0,2019	1,6316	0,1497
A05	mmu-let-7e-5p	1,5491	0,2438	1,5746	0,2154
A06	mmu-let-7f-5p	4,6963	0,1606	1,5886	0,1635
A07	mmu-let-7g-5p	4,016	0,363	1,5591	0,3406
A08	mmu-let-7i-5p	11,0443	1,5824	3,542	1,331
A09	mmu-miR-103-3p	7,9715	1,2982	2,5074	1,0873
A10	mmu-miR-105	4,7276	0,1299	1,9232	0,1669
A11	mmu-miR-106b-5p	18,5728	13,7692	6,5709	15,9288
A12	mmu-miR-107-3p	15,4527	0,6591	6,5059	0,5457
B01	mmu-miR-10a-5p	1,6738	0,1884	1,502	0,1124
B02	mmu-miR-122-5p	2,7032	0,1313	1,7759	0,289
B03	mmu-miR-125b-5p	5,3432	4,1254	2,4239	6,5267
B04	mmu-miR-128-3p	4,1094	0,7481	1,5301	0,359
B05	mmu-miR-130a-3p	2,6725	2,3465	1,3541	2,2326
B06	mmu-miR-132-3p	3,9874	17,1169	1,2879	22,8463
B07	mmu-miR-134-5p	1,9249	0,7864	1,5689	0,2964
B08	mmu-miR-135b-5p	2,3426	3,1493	2,2309	7,3633
B09	mmu-miR-137-3p	1,6141	0,134	1,3294	0,0598
B10	mmu-miR-141-3p	2,8324	6,8089	1,2467	10,3325
B11	mmu-miR-142a-3p	1,9861	10,4762	1,6538	7,9019
B12	mmu-miR-142a-5p	2,72	6,1318	1,4579	5,8152
C01	mmu-miR-145a-5p	1,8577	0,5578	1,4232	0,1444
C02	mmu-miR-146a-5p	2,1438	0,1641	1,8097	0,11
C03	mmu-miR-146b-5p	8,4344	0,9888	2,1418	0,5656
C04	mmu-miR-150-5p	5,1526	0,0329	1,5349	0,0045
C05	mmu-miR-151-3p	2,9416	0,5959	1,516	0,4392
C06	mmu-miR-151-5p	3,3997	0,627	1,0494	0,4816

<i>C07</i>	mmu-miR-155-5p	13,0406	0,1291	1,8715	0,0723
<i>C08</i>	mmu-miR-15a-5p	1,6904	6,6436	1,4045	5,5583
<i>C09</i>	mmu-miR-15b-5p	1,0603	0,9099	0,9707	0,6389
<i>C10</i>	mmu-miR-16-2-3p	4,9746	3,8834	4,0528	2,7896
<i>C11</i>	mmu-miR-16-5p	6,7065	2,099	1,7855	1,3601
<i>C12</i>	mmu-miR-17-5p	2,7393	14,3546	1,3561	13,3096
<i>D01</i>	mmu-miR-181a-5p	4,0946	1,8622	1,7716	1,7163
<i>D02</i>	mmu-miR-181b-5p	2,7805	0,4083	1,9461	0,3964
<i>D03</i>	mmu-miR-181c-5p	3,7929	2,2677	1,6561	2,5083
<i>D04</i>	mmu-miR-182-5p	5,5616	7,0172	1,3277	6,7319
<i>D05</i>	mmu-miR-183-5p	4,0962	2,8073	1,5063	3,3617
<i>D06</i>	mmu-miR-184-3p	2,2453	0,0239	1,4415	0,0026
<i>D07</i>	mmu-miR-185-5p	2,9359	0,5792	1,3234	0,4636
<i>D08</i>	mmu-miR-193a-3p	6,4848	0,1977	3,955	0,1326
<i>D09</i>	mmu-miR-193b-3p	2,5097	0,1708	1,4093	0,1325
<i>D10</i>	mmu-miR-196a-5p	3,1118	9,0504	1,8164	10,613
<i>D11</i>	mmu-miR-199b-5p	3,242	5,3944	1,6955	1,7998
<i>D12</i>	mmu-miR-199a-5p	13,1338	5,3888	2,9758	1,8578
<i>E01</i>	mmu-miR-200a-3p	3,098	2,6008	1,4618	4,8612
<i>E02</i>	mmu-miR-200b-3p	1,4289	0,414	0,7733	0,5822
<i>E03</i>	mmu-miR-200c-3p	1,8883	0,3372	1,9138	0,3532
<i>E04</i>	mmu-miR-203-3p	8,2245	0,8347	1,8507	0,644
<i>E05</i>	mmu-miR-205-5p	9,5335	1,3672	2,0376	0,0203
<i>E06</i>	mmu-miR-20a-5p	4,2943	14,5866	1,9994	14,2183
<i>E07</i>	mmu-miR-210-3p	2,2503	3,4446	1,5205	3,4914
<i>E08</i>	mmu-miR-212-3p	2,5224	20,6797	1,7678	30,4163
<i>E09</i>	mmu-miR-214-3p	4,0327	0,4279	1,4775	0,116
<i>E10</i>	mmu-miR-215-5p	3,2317	0,0435	2,7033	0,0234
<i>E11</i>	mmu-miR-21a-5p	2,4567	4,0197	1,0528	3,5033
<i>E12</i>	mmu-miR-221-3p	3,7274	2,2667	1,8775	2,1726
<i>F01</i>	mmu-miR-222-3p	3,2033	2,6619	2,0822	2,5236
<i>F02</i>	mmu-miR-223-3p	11,2974	2,002	3,7686	1,5966
<i>F03</i>	mmu-miR-22-3p	2,1503	4,6844	1,0979	2,2475

F04	mmu-miR-25-3p	0,7354	0,9949	1,6401	0,8791
F05	mmu-miR-296-5p	12,215	0,7869	1,7274	0,5325
F06	mmu-miR-299b-5p	8,9093	1,7964	3,5103	0,562
F07	mmu-miR-29b-3p	14,7648	4,0296	3,2171	4,9371
F08	mmu-miR-302a-3p	7,1647	0,1272	2,1953	0,0683
F09	mmu-miR-320-3p	17,6154	0,3227	3,2462	0,2103
F10	mmu-miR-31-5p	1,062	87,2468	1,1178	113,2264
F11	mmu-miR-34a-5p	2,5588	9,4151	1,5974	7,3305
F12	mmu-miR-365-3p	5,1123	0,4034	1,0944	0,2543
G01	mmu-miR-409-3p	1,5864	2,1834	2,2927	0,4673
G02	mmu-miR-423-5p	3,0216	0,2748	1,4531	0,156
G03	mmu-miR-425-5p	4,7651	6,3459	0,6734	4,4466
G04	mmu-miR-429-3p	0,9339	0,5059	1,0241	0,7699
G05	mmu-miR-451a	3,5506	1,9646	1,1144	0,9767
G06	mmu-miR-455-3p	2,175	0,171	2,3235	0,0483
G07	mmu-miR-455-5p	0,7005	2,0729	0,8107	0,9135
G08	mmu-miR-486b-5p	2,08	0,1357	1,5746	0,0842
G09	mmu-miR-494-3p	4,2938	3,0725	1,863	1,5377
G10	mmu-miR-744-5p	3,7252	0,0914	2,0883	0,0629
G11	mmu-miR-9-5p	4,6065	14,6798	1,8838	17,543
G12	mmu-miR-96-5p	1,1192	37,1826	1,267	48,0569
H01	cel-miR-39-3p	18,7173	0,1364	4,108	0,0739
H02	cel-miR-39-3p	18,3807	0,157	7,4998	0,0694
H03	SNORD61	3,5116	1,395	1,8125	1,7059
H04	SNORD68	0,5461	1,1277	0,8844	1,012
H05	SNORD72	0,0875	0,2901	0,246	0,2343
H06	SNORD95	1,3414	1,26	0,9302	1,1454
H07	SNORD96A	0,4034	0,5336	0,6932	0,544
H08	RNU6-6P	0,3694	14,9079	1,2477	10,7771
H09	miRTC	10,5288	4,7988	2,9584	2,7436
H10	miRTC	13,2819	4,9589	3,7777	2,9034
H11	PPC	4,1361	0,1237	1,2517	0,0654
H12	PPC	3,5705	0,1298	1,0588	0,0677

Position	Mature ID	miScript miRNA PCR Serum&Plasma			
		12 67NR	12 4T1	24 67NR	24 4T1
		Fold Change	Fold Change	Fold Change	Fold Change
A01	mmu-let-7a-5p	0,4585	0,4167	1,4325	0,1132
A02	mmu-miR-1a-3p	2,5673	0,6473	2,083	0,1602
A03	mmu-miR-100-5p	5,9537	2,6434	2,6812	1,1111
A04	mmu-miR-106a-5p	1,5798	0,7792	1,6316	0,3174
A05	mmu-miR-106b-5p	1,5491	0,7174	1,5746	0,3357
A06	mmu-miR-10b-5p	4,6963	1,6739	1,5886	0,4019
A07	mmu-miR-122-5p	4,016	1,3225	1,5591	0,1402
A08	mmu-miR-124-3p	11,0443	3,9704	3,542	1,2361
A09	mmu-miR-125b-5p	7,9715	2,4066	2,5074	0,5854
A10	mmu-miR-126a-3p	4,7276	1,0854	1,9232	0,3816
A11	mmu-miR-133a-3p	18,5728	4,2852	6,5709	1,5169
A12	mmu-miR-133b-3p	15,4527	3,5011	6,5059	1,362
B01	mmu-miR-134-5p	1,6738	0,7353	1,502	0,4794
B02	mmu-miR-141-3p	2,7032	0,676	1,7759	0,4346
B03	mmu-miR-143-3p	5,3432	0,8352	2,4239	0,2977
B04	mmu-miR-146a-5p	4,1094	0,8519	1,5301	0,3881
B05	mmu-miR-150-5p	2,6725	1,4429	1,3541	0,4625
B06	mmu-miR-155-5p	3,9874	0,9161	1,2879	0,3362
B07	mmu-miR-17-5p	1,9249	0,7337	1,5689	0,3573
B08	mmu-miR-17-3p	2,3426	1,1034	2,2309	0,511
B09	mmu-miR-18a-5p	1,6141	0,6593	1,3294	0,3651
B10	mmu-miR-192-5p	2,8324	0,6446	1,2467	0,1993
B11	mmu-miR-195a-5p	1,9861	0,7505	1,6538	0,357
B12	mmu-miR-196a-5p	2,72	0,6463	1,4579	0,2642
C01	mmu-miR-19a-3p	1,8577	0,7308	1,4232	0,4125
C02	mmu-miR-19b-3p	2,1438	0,8087	1,8097	0,4703
C03	mmu-miR-200a-3p	8,4344	1,1015	2,1418	0,4059
C04	mmu-miR-200b-3p	5,1526	0,8766	1,5349	0,2441
C05	mmu-miR-200c-3p	2,9416	0,8612	1,516	0,2747
C06	mmu-miR-203-3p	3,3997	0,5381	1,0494	0,2067
C07	mmu-miR-205-5p	13,0406	1,5597	1,8715	0,6292
C08	mmu-miR-20a-5p	1,6904	0,5908	1,4045	0,3346
C09	mmu-miR-21a-5p	1,0603	0,436	0,9707	0,2064
C10	mmu-miR-210-3p	4,9746	2,2703	4,0528	1,4612
C11	mmu-miR-214-3p	6,7065	1,3015	1,7855	0,4863
C12	mmu-miR-215-5p	2,7393	0,4941	1,3561	0,1009
D01	mmu-miR-221-3p	4,0946	1,5408	1,7716	1,2929
D02	mmu-miR-222-3p	2,7805	1,125	1,9461	0,4372
D03	mmu-miR-223-3p	3,7929	3,2889	1,6561	4,2147
D04	mmu-miR-224-5p	5,5616	1,0364	1,3277	0,2755
D05	mmu-miR-23a-3p	4,0962	1,1952	1,5063	0,5783
D06	mmu-miR-25-3p	2,2453	0,9226	1,4415	0,2948
D07	mmu-miR-27a-3p	2,9359	0,8172	1,3234	0,5284
D08	mmu-miR-296-5p	6,4848	3,112	3,955	1,0478
D09	mmu-miR-29a-3p	2,5097	0,7162	1,4093	0,456
D10	mmu-miR-30d-5p	3,1118	1,3131	1,8164	0,5772

<i>D11</i>	mmu-miR-34a-5p	3,242	0,9156	1,6955	0,9246
<i>D12</i>	mmu-miR-375-3p	13,1338	1,7453	2,9758	0,6041
<i>E01</i>	mmu-miR-423-5p	3,098	1,2777	1,4618	0,4887
<i>E02</i>	mmu-miR-499-5p	1,4289	0,5826	0,7733	0,1902
<i>E03</i>	mmu-miR-31-5p	1,8883	0,8559	1,9138	0,4429
<i>E04</i>	mmu-miR-574-3p	8,2245	2,2159	1,8507	0,8765
<i>E05</i>	mmu-miR-199a-5p	9,5335	1,2245	2,0376	0,3896
<i>E06</i>	mmu-miR-9-5p	4,2943	1,0893	1,9994	0,3952
<i>E07</i>	mmu-miR-92a-3p	2,2503	1,1367	1,5205	0,4301
<i>E08</i>	mmu-miR-93-5p	2,5224	0,8578	1,7678	0,4833
<i>E09</i>	mmu-let-7c-5p	4,0327	0,8647	1,4775	0,3202
<i>E10</i>	mmu-miR-107-3p	3,2317	1,2071	2,7033	0,9788
<i>E11</i>	mmu-miR-10a-5p	2,4567	1,1526	1,0528	0,5773
<i>E12</i>	mmu-miR-128-3p	3,7274	0,998	1,8775	0,4583
<i>F01</i>	mmu-miR-130b-3p	3,2033	1,3143	2,0822	0,6762
<i>F02</i>	mmu-miR-145a-5p	11,2974	2,4341	3,7686	0,7113
<i>F03</i>	mmu-miR-148a-3p	2,1503	0,6783	1,0979	0,3911
<i>F04</i>	mmu-miR-15a-5p	0,7354	0,5628	1,6401	0,3222
<i>F05</i>	mmu-miR-184-3p	12,215	1,4078	1,7274	0,46
<i>F06</i>	mmu-miR-193a-3p	8,9093	3,0754	3,5103	1,6706
<i>F07</i>	mmu-miR-204-5p	14,7648	3,6792	3,2171	0,8519
<i>F08</i>	mmu-miR-206-3p	7,1647	0,9229	2,1953	0,2243
<i>F09</i>	mmu-miR-211-5p	17,6154	3,5227	3,2462	0,8447
<i>F10</i>	mmu-miR-26b-5p	1,062	0,4734	1,1178	0,1997
<i>F11</i>	mmu-miR-30e-5p	2,5588	0,8038	1,5974	0,4754
<i>F12</i>	mmu-miR-34c-5p	5,1123	0,897	1,0944	0,2421
<i>G01</i>	mmu-miR-181a-5p	1,5864	1,0428	2,2927	0,7744
<i>G02</i>	mmu-miR-181b-5p	3,0216	0,7566	1,4531	0,3091
<i>G03</i>	mmu-miR-376c-3p	4,7651	0,5728	0,6734	0,2938
<i>G04</i>	mmu-miR-7a-5p	0,9339	0,3474	1,0241	0,1696
<i>G05</i>	mmu-miR-96-5p	3,5506	0,9738	1,1144	0,2111
<i>G06</i>	mmu-miR-103-3p	2,175	1,0111	2,3235	0,6026
<i>G07</i>	mmu-miR-15b-5p	0,7005	0,3011	0,8107	0,1588
<i>G08</i>	mmu-miR-16-5p	2,08	0,7398	1,5746	0,4583
<i>G09</i>	mmu-miR-191-5p	4,2938	1,4117	1,863	0,6342
<i>G10</i>	mmu-miR-22-3p	3,7252	1,2055	2,0883	0,74
<i>G11</i>	mmu-miR-24-3p	4,6065	1,1365	1,8838	0,7597
<i>G12</i>	mmu-miR-26a-5p	1,1192	0,4987	1,267	0,2293
<i>H01</i>	cel-miR-39-3p	18,7173	2,5318	4,108	0,8247
<i>H02</i>	cel-miR-39-3p	18,3807	2,817	7,4998	1,0008
<i>H03</i>	SNORD61	3,5116	1,4116	1,8125	1,2336
<i>H04</i>	SNORD68	0,5461	0,7894	0,8844	0,6985
<i>H05</i>	SNORD72	0,0875	0,1194	0,246	0,1566
<i>H06</i>	SNORD95	1,3414	1,3944	0,9302	1,9543
<i>H07</i>	SNORD96A	0,4034	0,6593	0,6932	0,62
<i>H08</i>	RNU6-6P	0,3694	0,8576	1,2477	3,8706
<i>H09</i>	miRTC	10,5288	2,8355	2,9584	0,967
<i>H10</i>	miRTC	13,2819	3,4355	3,7777	1,1923
<i>H11</i>	PPC	4,1361	1,0553	1,2517	0,2392
<i>H12</i>	PPC	3,5705	0,8707	1,0588	0,1927