

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Nina M. Petrović

**Mikro RNK-21 kao indikator invazivnosti
karcinoma dojke kod pacijenata sa
različitim statusom estrogenskog i
progesteronskog receptora**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nina M. Petrović

**MicroRNA-21 as an indicator of breast
carcinoma invasiveness in patients with
different estrogen and progesterone
receptor status**

PhD Thesis

Belgrade, 2014

Mentori

dr Vesna Mandušić, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke "Vinča"

dr Goran Brajušković, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije

dr Dušanka Savić-Pavićević, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Boban Stanojević, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke "Vinča"

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke "Vinča" Univerziteta u Beogradu u okviru projekta "Molekularne determinante za dizajn tumor markera" (ON173049) finansirnog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Najveću zahvalnost dugujem mentoru dr Goranu Brajuškoviću zbog pružene podrške i razumevanja, a posebno tu se zahvaljujem na velikoj stručnoj pomoći koju mi je pružio prilikom pisanja teze i mentoru dr Vesni Mandušić, zbog podrške koju mi je pružila, kao i na stručnoj pomoći, znanju, vremenu i idejama koje je podelila sa mnom tokom izrade teze.

Veliku zahvalnost dugujem dr Silvani Lukić na profesionalnom odnosu, prijateljskom stavu i korisnim sugestijama prilikom izrade teze, dr Bobanu Stanojeviću na sugestijama i idejama, kao i dr Bogomiru Dimitrijeviću, naučnom savetniku na podršci i pruženoj šansi da se bavim istraživanjima vezanim za genetiku i epigenetiku humanih karcinoma.

Takođe, zahvaljujem se dr Ani Kolaković na pomoći prilikom statističke obrade rezultata, kao i kolegicama dr Snežani Jovanović-Ćupić i dr Mileni Krajnović na nesebičnoj pomoći, prijateljskoj atmosferi i savetima. Zahvaljujem se svim kolegama iz Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke Vinča, jer izrada eksperimenta i teze predstavlja timski rad, gde su posredno ili neposredno uključene sve kolege iz laboratorije u kojoj se ona izrađuje.

Posebno se zahvaljujem ćerki Mini i suprugu Miloradu, roditeljima Snežani i Milanu, tetki Marini i sestri Nedi na beskrajnoj ljubavi i podršci, kojima posvećujem ovu doktorsku disertaciju.

Mikro RNK-21 kao indikator invazivnosti karcinoma dojke kod pacijenata sa različitim statusom estrogenskog i progesteronskog receptora

Rezime

Karcinomi dojke su izuzetno heterogeni tumori koji se na osnovu sposobnosti invazivnosti dele na neinvazivne, invazivne asocirane sa neinvazivnim i invazivne. Najznačajniji standardni dijagnostički i prognostički parametri karcinoma dojke su veličina tumora, starost pacijentkinje, status regionalnih limfnih čvorova, gradus tumora, status estrogenskog receptora (ER), progesteronskog receptora (PR), receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (Her-2) i status proliferativnog indeksa (Ki-67). Male nekodirajuće mikro RNK igraju važnu ulogu u regulaciji velikog broja bioloških procesa, a poremećaji u njihovoj ekspresiji detektovani su u procesima nastanka i progresije malignih tumora. Cilj ove disertacije je da se ispita nivo i značaj ekspresije onkogene mikro RNK-21 (miR-21) u tumorskom tkivu dojke. Imunohistohemijski je analiziran nivo ekspresije proteina ER, PR, Her-2 i Ki-67 u neizmenjenom i tumorskom tkivu dojke dok je nivo ekspresije miR-21 određivan lančanom reakcijom polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija korišćenjem prajmera sa petljom. Razlike u nivoima ekspresije miR-21 u uzorcima neinvazivnih i invazivnih karcinoma dojke sa *in situ* komponentom ukazuju na moguću biološku ulogu miR-21 u procesima odgovornim za invazivnost karcinoma dojke, odnosno da nivo ekspresije molekula mikro RNK-21 predstavlja potencijalni biološki marker invazivnosti karcinoma dojke. Rezultat da u analiziranoj grupi čistih invazivnih karcinoma dojke postoji visok stepen pozitivne korelacije između nivoa ekspresije molekula mikro RNK-21 sa nivoom ekspresije proteina ER i PR, ukazuje na to da nivo ekspresije molekula mikro RNK-21 može predstavljati novi nestandardni dijagnostički i prognostički parametar karcinoma dojke.

Ključne reči: mikro RNK 21, karcinom dojke, invazivnost, ER, PR, Her-2, Ki-67

Naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija

Uža naučna oblast: Molekularna genetika čoveka

UDK broj: 577.218:[616-006.6:611.69](043.3)

MicroRNA-21 as an indicator of breast carcinoma invasiveness in patients with different estrogen and progesterone receptor status

Abstract

Breast cancer is a complex and heterogeneous group of tumors. According to their ability to invade, breast cancers are divided in three major types: non-invasive, invasive carcinoma of the breast associated with non-invasive and invasive breast carcinomas. The most significant standard diagnostic and prognostic parameters of the breast carcinomas are size of a tumor, age at diagnosis, regional lymph-node status, tumor grade, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor 2 receptor status and proliferative index Ki-67 status. Small non-coding microRNAs play very important part in the regulation of great number of biological processes. Deregulation in their expression are detected in the process of malignant tumor formation and progression. Main goal of this dissertation was to investigate expression levels of microRNA-21 (miR-21) in the tumorous breast tissue and its potential role in breast tumor formation and invasion. Expression levels of ER, PR, Her-2 and Ki-67 proteins were detected by immunohistochemistry in non-transformed and tumorous tissue of the breast. MicroRNA-21 expression levels were determined by the reaction of Reverse Transcription and Stem-Loop Polymerase Chain Reaction. The differences in expression levels of miR-21 among non-invasive, invasive breast carcinoma associated with non-invasive and invasive breast carcinomas emphasizes potential biological role of miR-21 in the proces of breast cancer invasiveness and indicates that expression levels of microRNA-21 might represent potential biomarker of invasiveness in the breast carcinomas. We have found that there was highly positive correlation in miR-21 expression levels with ER and PR protein expression levels, which indicates that miR-21 expression levels might be used as novel non-standard parameter for breast cancer diagnosis and prognosis.

Key words: microRNA-21, carcinoma of the breast, invasiveness, ER, PR, Her-2, Ki-67

Scientific field: Biochemistry and Molecular Biology

Specific topic: Human Molecular Genetics

UDC number: 577.218:[616-006.6:611.69](043.3)

Skraćenice

3'-UTR, 3' netranslatirajući region (eng. *3'-untranslated region, 3'-UTR*)

Akt (PKB), protein kinaza B (eng. *protein kinase B, Akt(PKB)*)

AP-1, aktivator protein 1 (eng. *activator protein 1, AP-1*)

bp, bazni par

BPB, brom fenol plavo (eng. *bromophenol blue, BPB*)

cDNK, komplementarna DNK (eng. *complementary DNA, cDNA*)

DCIS, duktalni karcinom *in situ* (eng. *ductal carcinoma in situ, DCIS*)

DEPC, dietilpirokarbonat (eng. *diethylpyrocarbonate, DEPC*)

DNK, dezoksiribonukleinska kiselina

EDTA, eilendiaminotetraacetat (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA*)

ER, estrogenski receptor

ERE, element odgovora za estrogen (eng. *estrogen response elements, EREs*)

EtBr, etidijum bromid (eng. *ethidium bromide, EtBr*)

EtOH, etanol (eng. *ethyl alcohol, EtOH*)

Her-2, humani epidermalni faktor rasta 2 receptor (eng. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, Her-2*)

IDC, invazivni duktalni karcinomi (eng. *invasive ductal carcinoma, IDC*)

IDC-DCIS, invazivni duktalni sa duktalnim karcinomom *in situ* (eng. *invasive ductal carcinoma with ductal carcinoma in situ, IDC-DCIS*)

ILC, invazivni lobularni karcinom (eng. *invasive lobular carcinoma, ILC*)

ILC-LCIS, invazivni lobularni karcinom sa lobularnim *in situ* karcinomom (eng. *invasive lobular carcinoma with lobular carcinoma in situ, ILC-LCIS*)

iRNK, informaciona RNK

LCIS, lobularni karcinom *in situ* (eng. *lobular carcinoma in situ, LCIS*)

MAPK, mitogen-aktivirajuća protein kinaza (eng. *mitogen-activated protein kinase,*

MAPK)= **ERK**, vanćelijske signal-regulišuće kinaze (eng. *extracellular signal-regulated kinases, ERK*)

miR, mikro RNK (eng. *microRNA, miR*)

miR-21, mikro RNK 21 (eng. *microRNA-21, miR-21*)

MIRN21, gen koji kodira za mikro RNK 21 (eng. *miR-21 coding gene, MIRN21*)

MRI, slikanje magnetnom rezonancom (eng. *Magnetic Resonance Imaging, MRI*)

NF- κ B, jedarni faktor za pojačavanje kapa lakog lanca aktiviranih B ćelija (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B*)

nt, nukleotid

PCR, lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction, PCR*)

PDCD4, protein programirane ćelijske smrti 4 (eng. *programmed cell death 4 protein, PDCD4*)

PI3K, fosfatidilinozitol-4, 5-bisfosfat 3-kinaza (eng. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, PIK*)

PR, progesteronski receptor

pre-miR-21, prekursor miR-21 (eng. *precursor miR-21, pre-miR-21*)

pri-miR-21, primarna miR-21 (eng. *primar miR-21, pri-miR-21*)

PTEN, fosfataza i tenzin homolog (eng. *phosphatase and tensin homolog, PTEN*)

Ran GTP-aza, jedarni protein vezan za RAs guanozin trifosfataza (eng. *RAs-related nuclear protein guanosine triphosfaaset, Ran GTPase*)

RECK, reverzno-indukujući protein bogat cisteinima sa "kazal"-motivima (eng. *Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs, RECK*)

RISC, utišavajući kompleks (eng. *RNA-induced silencing complex, RISC*)

RNase, ribonukleaza

RNK, ribonukleinska kiselina

Rt, reverzna traskriptaza (eng. *Reverse Transcriptase, Rt*)

RT-pufer, pufer za reverznu transkripciju (eng. *RT-buffer*)

RT-qPCR, kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (eng. *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR*)

Sp-1, protein specifičnosti 1 (eng. *specificity protein 1, Sp1*)

TDLU, terminalna duktalno-lobularna jedinica (eng. *terminal ductal lobular units, TDLU*)

TIMP3, matriks metaloproteinazni inhibitor 3 (eng. *matrix metalloproteinase inhibitor 3, TIMP3*)

TNM, tumor nodus metastaza (eng. *tumor-nodes-metastasis*, *TNM*)

TPM1, tropomiozin 1 (engl. *tropomyosin 1*, *TPM1*)

TRIS, tris hidroksimetil aminometan (eng. *tris hydroxymethyl aminomethane*, *TRIS*)

SADRŽAJ

1 UVOD	1
1.1 Karcinom dojke.....	1
1.1.1 Dijagnostika i lečenje karcinoma dojke	3
1.1.2 Podela karcinoma dojke.....	5
1.1.3 Standardni prognostički parametri u dijagnostici i lečenju karcinoma dojke	6
1.1.3.1 Gradus tumora kao prognostički parametar karcinoma dojke	6
1.1.3.2 Stadijumi tumora određeni prema TNM klasifikaciji kao dijagnostički i prognostički parametri karcinoma dojke	7
1.1.3.3 Status estrogenskih i progesteronskih receptora kao dijagnostički i prognostički parametri karcinoma dojke	8
1.1.4 Molekularna osnova karcinoma dojke	9
1.1.4.1 Steroidni receptori u karcinomu dojke.....	11
1.2 Značaj fenomena RNK interferencije u karcinomima dojke.....	12
1.2.1 Mikro RNK	12
1.2.2 Mikro RNK-21 (miR-21).....	15
1.2.3 Značaj ekspresije i funkcije molekula miR-21 u karcinomu dojke.....	17
1.3 MiR-21 <i>in silico</i> analiza	19
2 CILJEVI RADA	21
3 MATERIJAL I METODE	24
3.1 Materijal	24
3.2 Metode	24
3.2.1 Imunohistohemijska analiza ekspresije proteina ER, PR, Her-2 i Ki-67	24
3.2.2 Izolacija molekula RNK	26
3.2.2.1 Izolacija molekula RNK iz zamrznutih uzoraka tumora dojke.....	26
3.2.2.2 Izolacija molekula RNK iz uzoraka tumora dojke ukalupljenih u parafinske blokove	27

3.2.3	Određivanje koncentracije molekula RNK i provera kvaliteta izolovanih molekula RNK elektroforezom u agaroznom gelu.....	29
3.2.4	Lančana reakcija polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija korišćenjem prajmera sa petljom (<i>Stem-Loop RT-PCR</i>)	30
3.2.5	Umnožavanje cDNK kvantitativnim PCR-om u realnom vremenu.....	32
3.2.6	Statistička analiza.....	33
3.2.7	<i>In silico</i> analiza predikcije ciljnih gena mikro RNK.....	34

4 REZULTATI.....36

4.1	Rezultati selekcije pacijentkinja na osnovu tipa tumora i standardnih dijagnostičkih i prognostičkih parametara karcinoma dojke	36
4.2	Rezultati imunohistohemijske detekcije nivoa ekspresije proteina receptora za estrogen (ER), progesteron (PR), humani epidermalni faktor rasta 2 receptor (Her-2) i jedarnog proteina Ki-67	38
4.2	Rezultati imunohistohemijske detekcije nivoa ekspresije proteina receptora za estrogen (ER), progesteron (PR), humani epidermalni faktor rasta 2 receptor (Her-2) i jedarnog proteina Ki-67	38
4.3	Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miR-21 u neizmenjenom i tumorskom tkivu dojke.....	41
4.3.1	Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miR-21 u različitim grupama tumorskog tkiva karcinoma dojke formiranih na osnovu vrednosti standardnih dijagnostičkih i prognostičkih parametara.....	43
4.3.2	Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miR-21 u tumorskom tkivu invazivnih karcinoma dojke.....	49
4.3.2.1	Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miR-21 u grupama invazivnih karcinoma dojke formiranih na osnovu vrednosti standardnih dijagnostičkih i prognostičkih parametara.....	49
4.3.3	Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miR-21 u grupama invazivnih karcinoma dojke formiranih na osnovu vrednosti standardnih dijagnostičkih i prognostičkih parametara - analize korelacije rangova.....	57

4.4 Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miR-21 u grupi invazivnih karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom formiranih na osnovu vrednosti standardnih dijagnostičkih i prognostičkih parametara	60
4.5 Značaj ekspresije molekula MiR-21 u nastanku i invaziji karcinoma dojke- <i>in silico</i> analiza	63
<u>5 DISKUSIJA</u>	<u>64</u>
<u>6 ZAKLJUČCI</u>	<u>76</u>
<u>7 LITERATURA</u>	<u>78</u>

1 UVOD

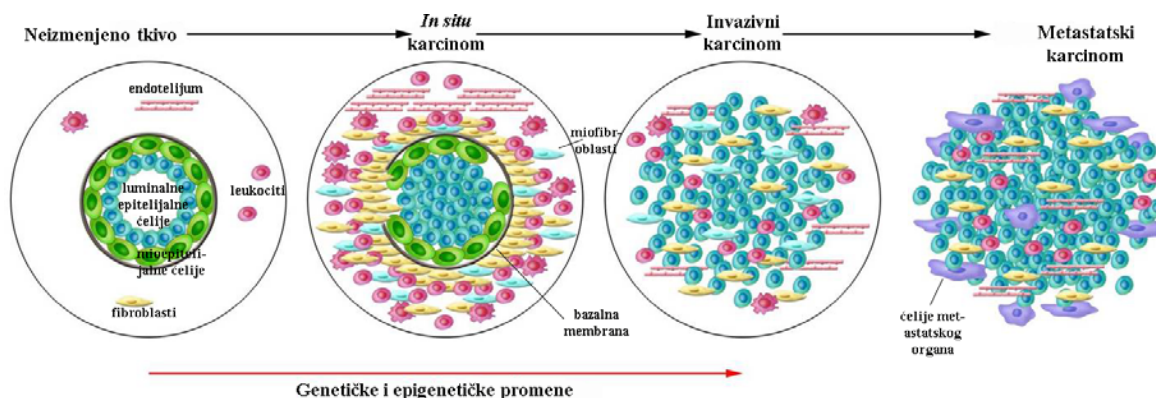
1.1 Karcinom dojke

Karcinom dojke drugi je uzrok smrti žena u svetu i obuhvata gotovo trećinu svih dijagnostikovanih tumora (Jemal i sar., 2010). Patogeneza malignih tumora dojke još uvek nije poznata ali se na osnovu rezultata epidemioloških i eksperimentalnih studija može zaključiti da je jedan od glavnih faktora rizika za razvoj ove bolesti nivo izloženosti estrogenim hormonima (Travis i Key, 2003). Zbog toga je danas, u lečenju karcinoma dojke, česta dodatna (adjuvantna) endokrina terapija (antiestrogena terapija) koja je ujedno i najuspešnija u lečenju estrogen receptor-pozitivnih tumora dojke (Burstein i sar., 2010).

Morfološki, dojka se sastoji iz kanala (duktusa) koji se granaju počevši od bradavice, sa završetkom u žlezdama (acinusi grupisani u lobuluse), čija je uloga u stvaranju i lučenju mleka tokom laktacije. U proseku, 12 velikih mlečnih kanala (engl. *lactiferous ductis*) imaju početak u bradavicama i završavaju se u tkzv. terminalnim duktalno-lobularnim jedinicama (eng. *terminal ductal lobular units*, TDLU) (Rosebrock i sar., 2013). Proces razgranjavanja duktalnog sistema i formiranje TDLU struktura započinje u pubertetu, a svoj maksimum dostiže tokom perioda graviditeta, kako bi pripremili žlezde za fazu sekrecije mleka. Prostor između TDLU naziva se nespecijalizovana stroma tkiva dojke i sastoji se iz fibroznog i masnog tkiva, dok se prostor, odnosno, vezivno tkivo unutar TDLU koji povezuje i razgraničava kanale i žlezde naziva specijalizovanom stromom, koja je osetljiva na promenu nivoa hormona (Anderson, 2002).

Histološki, žlezde i kanali sastoje se iz dva sloja epitelijalnih ćelija, u čijoj se osnovi, kao fizička granica nalazi bazalna membrana. Dvoslojni epitel u kanalima dojke sastoji se iz spoljašnjeg sloja koji čine mioepitelijalne ćelije i unutrašnjeg koga formiraju luminalne ćelije (Gudjonsson i sar., 2002). Unutrašnji sloj ćelija ima sekretornu (unutar TDLU) ili apsorpcionu funkciju (unutrašnji epitel velikih kanala) (Brian J. i Yoder, 2007).

Karcinom dojke je posledica neoplastične transformacije, u najvećem broju slučajeva, luminalnih epitelijskih ćelija dojke. Proliferacijom ovih ćelija formiraju se benigne proliferativne lezije, atipične proliferativne lezije (Stelling i sar., 2003). Malignom transformacijom ćelija nastaju: karcinom *in situ* i/ili invazivni karcinomi dojke sa ili bez metastaza (Polyak, 2007)(Slika 1.1.).



Slika 1.1. Višestepeni proces neoplastične transformacije žlezdanog epitela dojke. Modifikovano iz (Polyak, 2007).

Glavni faktori rizika za nastanak sporadičnih (nenaslednih) karcinoma dojke su mahom faktori koji su povezani sa stepenom izloženosti estrogenu (Travis i Key, 2003). Pored toga, pokazano je da su faktori rizika za razvoj karcinoma dojke i:

- Životna dob (Colditz i Rosner, 2000).
- Rana menarha i/ili kasna menopauza, odnosno, veći broj menstrualnih ciklusa u toku života (Colditz i Rosner, 2000).
- Nuliparnost i izostanak dojenja. (Ma i sar., 2006).
- Konzumiranje alkohola (Singletary i Gapstur, 2001).

- Hormonska supstituciona terapija (eng. *hormone replacement therapy*, HRT), odnosno, dugotrajno izlaganje estrogenu u trajanju od nekoliko godina (Marsden, 2002).
- Dugotrajno i ponavljano izlaganje grudnog koša izvoru zračenja (Einstein i sar., 2007).
- Gojaznot postmenopauzalnih žena (Ballard-Barbash i sar., 2009).

1.1.1 Dijagnostika i lečenje karcinoma dojke

Standardna procedura za postavljanje dijagnoze karcinoma dojke obuhvata klinički pregled i mamografski snimak. Klinički pregled podrazumeva palpaciju i vizuelni pregled dojke (Miller i sar., 2000). Mamografija predstavlja trenutno najprecizniji način za skrinig i detekciju karcinoma dojke. Ovom metodom se vrlo često dijagnostikuje tumor dojke pre nego što poraste toliko da može da se opipa, tako da je mamografija metoda izbora za skrinig i detekciju karcinoma dojke (Yaffe, 1990).

Ultrazvučni pregled najčešće se koristi za razlikovanje ciste ispunjene tečnošću od solidne kvržice. Zbog ograničenja ultrazvučne metode, kjom se ispituje samo deo, a ne kompletna dojka, ne može se koristiti kao test za skrinig karcinoma dojke (Stavros i sar. 1995). Slikanje magnetom rezonancom (eng. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI) je metoda visoke senzitivnosti, ali niske specifičnosti za detekciju karcinoma dojke (Kuhl i sar., 2007; Riedl i sar., 2007). MRI je efikasnija metoda od mamografije samo za razlikovanje *in situ* karcinoma od benignog tumora, atipičnih proliferativnih lezija koje na mamogramu daju lažno pozitivne rezultate i detekciju mikroinvazija (Kneeshaw i sar., 2006; Goto i sar., 2012).

Dijagnoza karcinoma dojke potvrđuje se histopatološkom analizom bioptiranog tkiva dojke od strane patologa (Silverstein i sar., 2009).

U zavisnosti od stadijuma i tipa tumora, primenjuju se različite terapije za tretman pacijentkinja sa tumorom dojke. Hirurška metoda predstavlja vid terapije pri kojoj se otklanja ili masa tumora (lampektomija), odnosno kvržica ili kompletna dojka (mastektomija) (Hwang i sar., 2013). Terapija zračenja primenjuje se kod velikog broja pacijentkinja koje su imale lampektomiju i kod malog broja pacijentkinja koje su imale mastektomiju (Jagsi, 2014).

Hemioterapija je tip lečenja koji podrazumeva primenu citostatika, hemijskih agenasa koji eliminišu ćelije koje se rapidno dele, kao što su ćelije tumora, ali i ćelije kostne srži, digestivnog trakta i ćelije folikula dlake. Hemioterapija može biti jedini vid lečenja ili se može primeniti pre ili posle hirurške terapije. Hemioterapija koja se primenjuje nakon hirurškog tretmana uklanja potencijalno zaostale mikrometastaze, koje mogu biti loklanog karaktera ili udaljene (Hassan, 2010).

Pacijentkinje sa estrogen receptor pozitivnim tumorima prevashodno dobijaju hormonsku terapiju nakon hemioterapije (adjuvantna terapija). Hormonska terapija, u zavisnosti od tipa tumora, podrazumeva upotrebu nekoliko standardnih lekova: tamoksifena, aromataznih inhibitora (anastrozol, letrozol i egzemestan) (Long i sar., 2004).

U cilju inhibicije aktivnosti estrogena tokom tretmana pre i postmenopauzalnih pacijentkinja sa karcinomom dojke koristi se antiestrogeni selektivni ER modulator-tamoksifen. Tamoksifen je "zlatni standard" u lečenju žena sa ER pozitivnim tumorima dojke (Fisher i sar., 2005; Lewis-Wambi i Jordan, 2006). Korišćenjem aromataznih inhibitora kao što su anastrozol, letrozol i egzemestan snižava se endogena produkcija estrogena, čime se efikasnije sprečava relaps bolesti, nego upotrebom tamoksifena kod posmenopauzalnih pacijentkinja (Howell, 2005).

Standardna ciljana terapija se koristi kod pacijentkinja koje imaju prekomerno ekspimiran ili umnožen gen za receptor Her-2 (eng. *Human Epidermal Growth Factor 2 Receptor*, Her-2). Za lečenje ovih pacijentkinja koristi se monoklonsko antitelo trastuzumab

(Herceptin), koje blokira aktivnost Her-2 proteina u ćelijama karcinoma dojke, čime se usporava rast ovih ćelija (Slamon, 2001).

1.1.2 Podela karcinoma dojke

Karcinomi dojke, kao izuzetno heterogena grupa bolesti, mogu se klasifikovati na sledeći način: Invazivni, invazivni sa prisutnim neinvazivnim karcinomom, odnosno invazivni asocirani sa neinvazivnim (invazivni-*in situ* tip) i neinvazivni (*in situ*) karcinomi dojke (Wong i sar., 2010). Još uvek nije pokazano da li invazivni karcinomi dojke nastaju isključivo od karcinoma *in situ* ili se formiraju *de novo* (Wong i sar., 2010). Jedna grupa istraživača ne isključuje ni jednu od dva načina nastanka invazivnog karcinoma dojke, već pretpostavlja da je to individualno (Velds i sar., 2006; Wong i sar., 2010). Takođe, još uvek nije poznato da li svi *in situ* karcinomi dojke, posle dovoljno dugog vremenskog perioda, moraju postati invazivni (Velds i sar., 2006).

Sa histološkog aspekta, karcinomi dojke mogu se grupisati u duktalne, lobularne, mešovite (duktalno-lobularne) i ostale, ređe zastupljene (Suryadevara i sar., 2010). Najčešći su duktalni karcinomi dojke koji se, mogu podeliti na tubularne, inflamatorne, medularne, mucinozne, papilarne i kribriformne (Li i sar., 2005).

Na osnovu invazivnosti, duktalni tumori se dele na invazivne duktalne (eng. *invasive ductal carcinoma*, IDC), invazivne *in situ* duktalne (eng. *invasive ductal carcinoma-ductal carcinoma in situ*, IDC-DCIS) i neinvazivne duktalne (eng. *ductal carcinoma in situ*, DCIS). Lobularni, takođe, mogu biti invazivni lobularni (eng. *invasive lobular carcinoma*, ILC), invazivni *in situ* lobularni (eng. *invasive lobular carcinoma-lobular carcinoma in situ*, ILC-LCIS) i neinvazivni lobularni (eng. *lobular carcinoma in situ*, LCIS) karcinomi dojke (Andrade i sar., 2012; Suryadevara i sar., 2010).

Najčešće zastupljeni histološki podtip karcinoma dojke je duktalni. Invazivni duktalni predstavlja 70-80% svih invazivnih karcinoma dojke. Drugi po učestalosti je

invazivni lobularni, koji obuhvata 5-10% svih dijagnostikovanih karcinoma dojke. ILC je teško dijagnostikovati mamografijom, jer ćelije ovakvog podtipa karcinoma samostalno infiltriraju u okolno tkivo. Upravo zbog toga, infiltracija ILC izaziva mali odgovor okolne strome, i ne razlikuje se mnogo od okolnog tkiva (Verkooijen i sar., 2003).

1.1.3 Standardni prognostički parametri u dijagnostici i lečenju karcinoma dojke

U kategorizaciji pacijentkinja sa karcinomom dojke, koristi se veliki broj kliničkih i histopatoloških parametara u cilju procene kako prognoze, ishoda bolesti i primene adekvatne terapija. Najznačajniji standardni prognostički parametri karcinoma dojke su starost pacijentkinje, veličina tumora, status regionalnih limfnih čvorova, gradus tumora, status estrogenskog receptora (ER), progesteronskog receptora (PR), receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (Her-2) i status proliferacionog indeksa (Ki-67) (Cianfrocca, 2004; Inwald i sar., 2013).

1.1.3.1 Gradus tumora kao prognostički parametar karcinoma dojke

Postoji nekoliko načina za određivanje gradusa tumora. Jedan od njih je Notingem sistem, odnosno, Elston-Elisova modifikacija Skarf-Blum-Ričardsonovog sistema (Ellis i Elston, 1991). To je sistem koji je zasnovan na zbiru tri podzbira kojim se opisuje diferenciranost tumorskih ćelija, morfološke osobine jedara tumorskih ćelija i mitotski indeks. Tumori Gradusa 1 imaju ukupan zbir između 3 i 5, tumori Gradusa 2 imaju 6 ili 7, dok tumori gradusa 3 imaju ukupan zbir 8 ili 9.

I podzbir se odnosi na diferenciranost ćelija. Zbir 1 imaju dobro diferencirani tumori, odnosno oni koji imaju više od dve trećine struktura žlezdi i kanala. Tumori se definišu zbirom 2 sa žlezda/kanal strukturama koji zauzimaju između 10% i 75% tumora. Na kraju, zbir 3 je karakteristika tumora koji imaju manje od 10% struktura kanala i žlezdi (Ellis i Elston, 1991).

Na osnovu II podzbira evaluira se nukleusni gradus. Jedra sa zbirom 1 imaju vrlo malo uvećana jedra u poređenju sa jedrima neizmenjenih ćelija epitela dojke i sa očuvanim jedarnim ovojem. Jedra sa dimenzijama nešto većim od normalnih i sa vidljivim jedarcetom se definišu zbirom 2. Ova jedra mogu biti različite veličine i oblika. Zbir 3 imaju vezikularna jedra sa providnim jedarcetom. Ova jedra karakteriše velika razlikama u veličini i obliku jedara.

Kriterijum za III podzbir podrazumeva mitotski indeks, odnosno, broj mitozu u 10 mikroskopskih polja (Beresford i sar., 2006). Zbir 1 podrazumeva manje ili tačno 7 deoba, zbir 2 između 8 i 14 mitozu. dok zbir 3 podrazumeva 15 ili više mitozu na 10 mikroskopskih polja.

Dakle, gradus 1 podrazumevaju dobro diferencirani tumori čije ćelije i jedra veoma liče na neizmenjene ćelije epitela i koji imaju dobro formirane jedinice žlezda i kanala. Tumori okarakterisani gradusom 2 su umereno diferencirani, dok su tumori gradusa 3 slabo diferencirani. Gradus tumora je prognostički parametar koji je povezan sa prognozom bolesti (Cianfrocca, 2004).

1.1.3.2 Stadijumi tumora određeni prema TNM klasifikaciji kao dijagnostički i prognostički parametri karcinoma dojke

Veoma značajni prognostički parametri karcinoma dojke jesu veličina tumora, status limfnih čvorova i prisustvo regionalnih i udaljenih metastaza. Na osnovu ovih parametara određuje se stadijum bolesti prema TNM (veličina tumora-T, status najbližih-regionalnih limfnih čvorova-N i prisustvo/odsustvo metastaza-M, eng. *tumor, nodes, metastasis*) sistemu klasifikacije. Na osnovu veličine, tumori dojke mogu biti označeni kao T1 sa dijametrom manjim od 2 cm, T2 sa dijametrom između 2 i 5 cm, dok su tumori sa dijametrom jednakim ili većim od 5 cm označeni kao T3. Na osnovu prisustva regionalnih metastaza u limfnim čvorovima pazušnih jama, tumori su okarakterisani kao N0 (tumori bez prisustva metastaza), N1 (tumori sa 1 do 3 metastaze) i N2 (sa više od 4 metastaze). Na

kraju, na osnovu prisustva udaljenih metastaza tumori mogu biti označeni kao M0 (bez udaljenih metastaza) i M1 (sa udaljenim metastazama) (Singletary, 2002a).

TNM sistemom klasifikacije definisana su četiri stadijuma karcinoma dojke: Stadijum 0 podrazumeva stanje kojim se opisuju neinvazivni karcinomi (lat. *carcinoma in situ*), odnosno DCIS i LCIS. To su maligni tumori dojke sa najboljom prognozom. Stadijum I, II i III podrazumevaju tumore većeg dijametra. Što je viši stadijum, tumor ili ima veći dijametar ili je više raširen u okolno tkivo/organe i/ili ima veći broj metastaza u okolini primarnog tumora. Tumori IV stadijuma imaju metastaze raširene na udaljena tkiva i organe i imaju veoma lošu prognozu (Singletary 2002a).

1.1.3.3 Status estrogenskih i progesteronskih receptora kao dijagnostički i prognostički parametri karcinoma dojke

Statusi ER i PR koriste kao standardni prognostički faktori prilikom izbora terapije. ER i PR status se određuju imunohistohemijskom metodom. Evaluacija ER i PR statusa se vrši na osnovu zbira dva faktora-odnosa broja pozitivno obojenih i ukupnog broja jedara ispitivanog uzorka (od 0 do 5) i na osnovu intenziteta bojenja (od 0 do 3). Ukupan zbir dobija se sabiranjem navedena dva i može se kretati od 0 do 8 (Leake, 2000).

Ako je ukupan zbir jednak nuli, to znači da endokrini tretman pacijentkinja neće imati nikakvog efekta. Zbir između 2 i 3 znači da postoji mala verovatnoća (20%) da tretman endokrinom terapijom bude uspešan. Zbir između 4 i 6 označava da postoji šansa od 50% da pacijentkinja dobro odgovori na terapiju, dok pacijentkinje sa zbirom 7 ili 8 imaju 75% šansu da odgovore na terapiju. Status PR evaluira se na isti način i uzima se u obzir prilikom odabira terapije samo pri višim vrednostima zbira za PR statusu i nižim vrednostima zbira za ER (Leake, 2000).

Najveći broj karcinoma dojke (70-80%) ima eksprimiran estrogenski receptor (ER) u malignim ćelijama dojke (više ili jednako 10 fmol/mg ukupnih proteina), pa se oni

označavaju kao ER+ (ER pozitivni), (Harrell i sar., 2007). Između 55 i 65% ER+ karcinoma dojke ima očuvanu ekspresiju progesteronskog receptora (PR+) (više ili jednako 20 fmol/ mg ukupnih proteina), te oni poseduju PR+ fenotip. Tumori ER+/PR+ fenotipa u preko polovini slučajeva odgovaraju na endokrinu terapiju tamoksifenom ili inhibitorima aromataza. ER-/PR- pacijenti (kojih ima oko 18-25%) nemaju ekspimirane ER i PR receptore i oni su manje senzitivni na tamoksifen (Arpino i sar. 2005). (Hefti i sar., 2013) okarakterisali su ER-/PR+ grupu pacijenata kao grupu koja imaja nešto agresivniji fenotip, ali manje agresivan nego ER-/PR- tumori. Samo 10% pacijenata sa PR+ statusom imaju ER- status, dakle veoma su retki (Rakha i sar., 2010; Yaffe, 1990; Ng i sar., 2012).

1.1.4 Molekularna osnova karcinoma dojke

Ključnu ulogu u neoplastičnoj transformaciji ćelija u tkivu dojke, kao i kod drugih malignih tumora, imaju genetičke promene. Najčešći tipovi genetičkih promena jesu aktivacija onkogeni i inaktivacija tumor supresornih gena. Onkogeni su geni čiji proteinski produkti imaju ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, proliferaciji ćelija, procesima prenosa signala u ćeliji, diferencijaciji, transkripciji gena, ćelijskom preživljavanju i programiranoj ćelijskoj smrti po principu apoptoze. Tumor supresorni geni su geni čija proteinski produkti imaju ulogu u procesima supresije neoplastične transformacije a tu biološku ulogu ostvaruju kroz učesće u reparacionim sistemima, zatim u regulaciji ćelijskog ciklusa i regulaciji ćelijskog umiranja po principu apoptoze (Osborne i sar., 2004).

Progresivna akumulacija genetičkih izmena dovodi do pojave koja se definiše kao genomski nestabilnost. Genetička nestabilnost je ran događaj u neoplastičnoj transformaciji epitelnih ćelija dojke i odgovorna je za tranziciju iz atipične duktalne hiperplazije u duktalni karcinom *in situ* (Waldman i sar., 2000).

Onkogeni aktivacija u dojci često je posledica amplifikacije gena. Primer za to je amplifikacija gena *Her-2* i *c-myc*. Tačkaste mutacije takođe mogu biti odgovorne za aktivaciju onkogeni (Osborne i sar., 2004). Najčešće izmenjeni tumor supresorni geni u

karcinomu dojke su *Rb*, *Tp53* (Ross i sar., 2005), *PTEN* (eng. *phosphatase and tensin homolog*, PTEN) (Qi i sar., 2009; Gonzalez-Angulo i sar., 2011), *TIMP3*, matriks metaloproteinazni inhibitor 3 (eng. *matrix metalloproteinase inhibitor 3*, *TIMP3*) (Loging i Reisman, 1999; Span i sar., 2004; Ross i sar., 2005), *PDCD4*, gen za protein programirane ćelijske smrti 4 gen (eng. *programmed cell death 4*, *PDCD4*) (Qi i sar., 2009; Buscaglia, 2011) i *BRCA-1*, *BRCA-2* Protein *BRCA-1*, zajednosa sa proteinom *BRCA-2* ima ulogu u popravci oštećenja na molekulu DNK molekulu. Mutirani *BRCA-1* detektovan je u 5% svih karcinoma dojke kod žena mlađih od 40 godina, ali i u 90% slučajeva žena sa istorijom *BRCA-1* mutacije u porodici (Osborne i sar., 2004; Ross i sar., 2005).

Receptor Her-2 je povišeno eksprimiran kod gotovo četvrtine malignih tumora dojke (Dua i sar., 2010). Dosadašnja istraživanja pokazala su da su pacijentkinje sa najlošijom prognozom (10-17% slučajeva) one koje poseduju tzv. trostruko-negativan fenotip-ER-/PR-/Her-2- (Dolle i sar., 2009). Her-2 podgrupa (približno 15% invazivnih karcinoma dojke) ima ili prekomerno eksprimiran ili umnožen gen *Her-2* (Perou i sar., 2000; Schnitt, 2010).

Ki-67 je jedarni protein čija je biološka uloga u procesima odgovornim za proliferaciju ćelija (Scholzen i Gerdes, 2000). Njegovo prisustvo nije detektovano u ćelijama koje su u fazi mirovanja, koje se ne dele, odnosno koje su u G(0) fazi, pa je s pravom nazvan markerom proliferacije. Dosadašnja istraživanja pokazuju da je povišen nivo ekspresije proteina Ki-67 povezan je sa uznapredovalim tumorima i lošijom prognozom. Imunohistohemijski, nivo proteinske ekspresije Ki-67 izražava se kao procenat pozitivno obojenih ćelija, pri čemu se procenat pozitivnih ćelija između 0 i 15% smatran za nisko eksprimiran, između 16 i 30% srednje i više od 30% za visoko eksprimiran (Inwald i sar., 2013).

1.1.4.1 Steroidni receptori u karcinomu dojke

Estrogenski receptor je član podfamilije jedarnih steroidnih hormonskih receptora. Do sada su identifikovane dve izovorme ER-ER α i ER β koje su eksprimirane u velikom broju različitih tkiva. Eksperimentalna istraživanja su pokazala da se izoforma ER α u većoj meri eksprimira u ćelijama karcinoma dojke, endometrijum, ovarijalnim stromalnim ćelijama i hipotalamusu (Couse, 1997) u odnosu na izoformu ER β .

Estrogenim hormonom aktivirani ER se u formi homodimera vezuje za molekul DNK na način specifičan od sekvence. Te specifične sekvence nazivaju se elementi odgovora za estrogen (eng. *estrogen response elements*, EREs) . U genomu čoveka posetoje dva ERE koji se nazivaju Ap-1 i Sp1 . Kada se ER veže za AP-1, aktivira transkripciju target-gena što za posledicu ima pojačanu proliferaciju i rast ćelija (Kushner i sar., 2000). Tamoksifen, koji se kao antiestrogena terapija primenjuje u lečenju obolelih od karcinoma dojke sa ER+ statusom, vezuje se za element odgovora Ap-1 (Webb, 1995).

Progesteronski receptor (PR) je jedarni steroidni receptor koji se aktivira vezivanjem progesterona (Daniel i sar., 2011). Vezuje se za molekul DNK preko mesta odgovora za progesteron (eng. *progesterone response elements*). PR je uključen u proliferativne signalne puteve u ćelijama dojke, naročito preko svoje negenomske, nenukleusne aktivnosti, jer aktivira signalni put MAP kinaze (Stormshak i Bishop, 2008).

Primarna funkcija progesterona jeste da promoviše masivnu ekspanziju epitelijalnih ćelija alveolusa i da ih organizuje u lobuluse za vreme puberteta i tokom graviditeta, u cilju pripreme za laktaciju. Estrogen/ER kompleks takođe učestvuje u organizaciji alveolusa i lobulusa, ali putem indukcije ekspresije PR (Daniel i sar., 2011). Veoma često, PR i ER α se u neizmenjenim ćelijama dojke eksprimirani zajedno i to u 10-20% luminalnih epitelijalnih ćelija. Smatra se da PR pozitivne ćelije iz okoline, parakrinom regulacijom stimulišu susedne ćelije koje nemaju ekspimiran PR i/ili ER da se dele (Barsky, 2003; Barsky i Karlin, 2005; Polyak i Hu, 2005). Klinička ispitivanja su pokazala da je progesteron, kao

deo hormonske supstituciione terapije kod post-menopauzalnih žena doveo do porasta incidence tumora sa višim gradusom, što nije pokazano za sam estrogen (Daniel i sar., 2011).

Približno 70% primarnih karcinoma dojke ekspimiraju ER. Nivo ekspresije ER je od presudnog značaja u odgovoru pacijentkinja sa karcinomom dojke na endokrinu terapiju (Yamashita i sar., 2005). Neke pacijentkinje postaju rezistentne na terapiju tokom vremena, što predstavlja jedan od vodećih problema tokom lečenja (Fedele i sar. 2012). U ćelijama karcinoma dojke najčešći fenotip je ER+PR+, što ukazuje na sinergistički efekat ova dva receptora na svoje nishodne puteve u dojci (Elsayed i sar., 2014).

1.2 Značaj feomena RNK interferencije u karcinomima dojke

Novija istraživanja ukazuju na ogroman značaj promena u epigenetičkim mehanizmima regulacije ekspresije gena u procesu neoplastične transformacije epitela dojke. Epigenetički mehanizmi regulacije ekspresije gena podrazumevaju procese metilacije molekula DNK, postranslacione kovalentne modifikacije N-krajeva histonskih proteina i RNK interferenciju (Chuang i Jones, 2007).

1.2.1 Mikro RNK

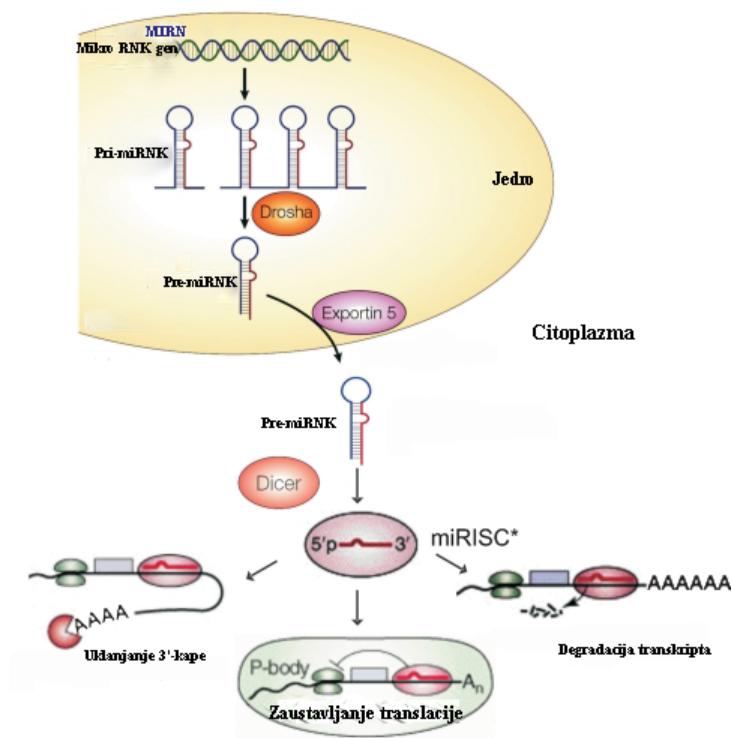
Mikro RNK spadaju u klasu malih nekodirajućih, regulatornih molekula RNK (Bartel, 2009). Osnovna funkcija im je u regulaciji ekspresije gena procesom RNK interferencije. RNK interferencija je proces kojim mali dvolančani molekuli RNK vrše utišavanje gena na posttranskripcionom nivou, vezujanjem za ciljne iRNK sa kojima imaju određen stepen komplementarnosti. Mikro RNK svoj efekat na utišavanje gena ostvaruju na tri načina: degradacijom komplementarne iRNK blokiranjem njene translacije ili modifikacijom histona u sekvenci jedarne DNK u kojoj se nalazi gen sa koga se ekspimiraju komplementarna iRNK (Wu i Belasco, 2008).

Molekuli mikro RNK imaju dužinu između 19 i 24 nukleotida (nt), kodirane su jedarnim genomom (Chuang i Jones, 2007; Wu i sar., 2009) i učestvuju u procesima utišavanje gena kod biljaka, životinja i čoveka već 400 miliona godina (Millar i Waterhouse, 2005). Prva mikro RNK, lin-4 (Rosalind, 1993) identifikovana je kod *Caenorhabditis elegans*. Do danas je registrovano 1872 prekursora i 2578 zrelih mikro RNK kod čoveka (podaci iz *miR-Base Release 20*, Jun 2013). Pokazano je da jedna mikro RNK može da zaustavi sintezu i do 200 proteina, odnosno reguliše ekspresiju i po nekoliko stotina gena (Carbonell i sar., 2012; Satoh, 2012). Ta kompleksna mreža interakcija mikro RNK i ciljnih iRNK naziva se "targetom" (eng. "*targetome*") (Satoh, 2012).

Geni koji kodiraju mikro RNK prepisuju se uz pomoć RNK polimeraze II, pri čemu nastaju molekuli pri-miRNK koji sadrže 5'-kapsu i poly-A rep (Lee i sar., 2004). Novonastale pri-miRNK se dalje u jedru obrađuju Rnazom III, pod nazivom *Drosha*, (Han i sar., 2004) i proteinom koji se specifično vezuje za dvolančane RNK-*Pasha/DGCR8* (Denli i sar., 2004). Na ovaj način nastaje pre-miRNK u formi nepotpune dvolačane petlje dužine približno 70 nukleotida. Protein eksportin 5 vezuje za sebe pre-miRNK i izvozi je iz jedra, zajedno sa Ran GTP-azom. Nakon toga, dolazi do obrade pre-miRNK i formiranja dvolačane oko 22 nukleotida dugačke miRNK. Obradu vrši Rnazi III sličan enzime *Dicer*. Zrele mikro RNK bivaju prepoznate od strane utišavajućeg kompleksa (eng. *RNA – induced silencing complex*, RISC) (Pratt i MacRae, 2009; Redfern i sar., 2013). Utišavajući kompleks je mašinerija sastavljena od različitih proteina. Jedan od njih pripada Argonaut familiji proteina za koga se veruje da prepoznaje i interaguje sa kratkim molekulima dvolačanih molekulaRNK. Posledica kontakta mikro RNK sa kompleksom RISC jeste denaturacija dvolačane mikro RNK na način zavisen od ATP-a.

Nakon denaturacije, jedan lanac mikro RNK koji se naziva vodeći lanac RNK (eng. *guide RNA*) selektivno se ugrađuje u kompleks RISC. Drugi prateći lanac RNK (eng. *passenger RNA*) biva degradovan. Utišavajući kompleks sa vodećim lancem RNK postaje aktivan i biva usmeren ka homolognim iRNK. Način na koji aktivirani utišavajući kompleks vrši lociranje komplementarnih iRNK u ćelji je nepoznat. Zna se da aktivirani

utišavajući kompleks vrši inhibiciju ekspresije gena na tri načina: inhibicijom translacije homologne iRNK; degradacijom homologne iRNK; ili direktnom blokadom ekspresije gena modifikacijom hromatina u regionu promotora ciljnog gena (Valencia-Sanchez, 2006; Ryu i sar., 2013), **Slika 1.2**.



Slika 1.2. Mehanizam RNK interferencije. Modifikovano iz (Muhonen i Holthofer, 2008).

Mikro RNK prvenstveno imaju ulogu u regulaciji esencijalnih bioloških procesa kao što su razviće, diferencijacija i apoptoza. Kod sisara, specifične mikro RNK povezane su sa procesima hematopoeze, adipocitne diferencijacije, sekrecije insulina, razvojem mozga i deferencijacijom neurona. Takođe, pokazano je da su promene u nivou ekspresije mikro RNK uključene u patogenezu mnogih bolesti čoveka. Infarkt miokarda, metaboličke

bolesti i maligni tumori su samo neki od njih (Krützfeldt i Stoffel, 2006; Nelson i sar., 2008).

1.2.2 Mikro RNK-21 (miR-21)

Mala nekodirajuća mikro RNK-21 igra važnu ulogu u regulaciji velikog broja bioloških procesa (Buscaglia, 2011), a poremećaji u njenoj ekspresiji detektovani su procesima neoplastične transformacije, invazije i progresije tumora (Huang i sar., 2009; Song i sar., 2010; Lee i sar. 2011; Petrović i sar., 2014a).

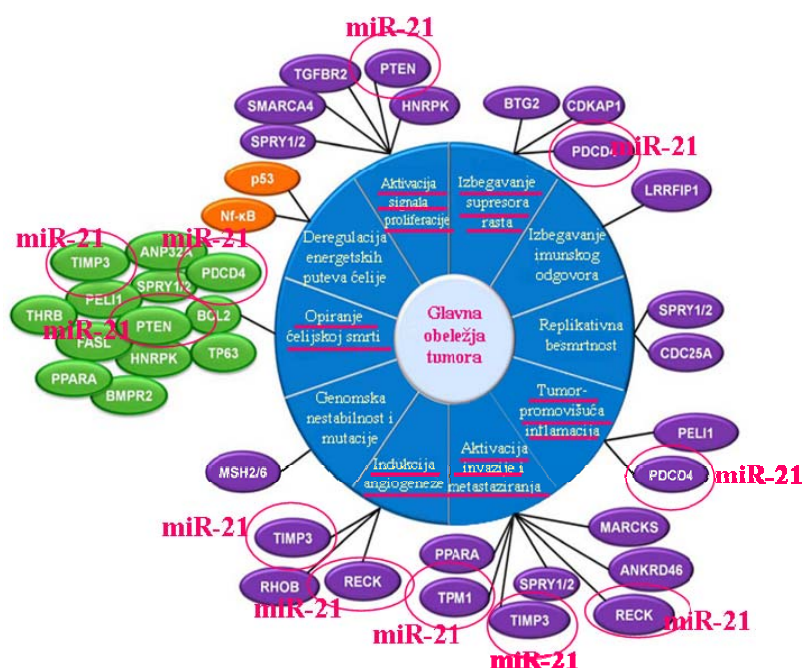
Pri-miR-21 je primarni transkript gena, *MIRN21* dugačak 3433 nt. Pre-miR-21 sadrži 72 nukleotida dok je zrela hsa-miR-21, dužine 22 nt (Krichevsky i Gabriely, 2008; Kuehbacher i sar., 2007).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da miR-21 ima značajnu ulogu u biološkim procesima kao što su razviće, diferencijacija, regulacija ćelijskog ciklusa, migracije ćelija, proliferacije, apoptoze i ćelijskog starenje. Istovremeno poremećaji u ekspresiji i funkciji ove mikro RNK imaju ulogu u patogenezi brojnih bolesti čoveka (Pan i sar., 2010).

Prekomerna ekspresija mikro RNK 21 karakteristika je kardiovaskularnih bolesti kao što su proliferativna vaskularna bolest, hipertrofija i ishemijska bolest srca (Cheng i Zhang, 2010). Poremećaji ekspresije detektovani su i u autoimunskim, metaboličkim i zapaljenskim bolestima (astma, ulcerozni kolitis i eozinofilni ezofagitis, npr.) (Lu i sar., 2013). Patogeneza nekih bolesti čoveka karakteriše smanjen nivo ekspresije miR-21. Najbolji primer je Alchajmerova bolest (Feany i sar., 2010).

Glavno obeležje malignog tumora prema Hannah and Weinberg, (Hanahan i Weinberg, 2011) je narušavanje tkivne homeostaze u pravcu nekontrolisane proliferacije ćelija i inhibicije ćelijskog umiranja po tipu apoptoze. Maligne tumore karakteriše proces neoangiogeneze i sposobnost invazije i metastaziranja. Višestepeni proces karcinogeneze

karakteriše i „izbegavanje“ imunskog odgovora organizma i dodatno, genomska nestabilnost i tumor-promovišuća inflamacija. Akumulacijom i zbirom svih navedenih događaja formira se specifična mikrosredina svakog tumora ponaosob, koja je okarakterisan velikim brojem faktora. Analiza ciljnih gena čiji proteinski produkti imaju ulogu u procesima maligne transformacije ćelija i tkiva pokazala je da je ekspresija mnogih od njih regulisana mikro RNK-21 (**Slika 1.3**). Veliki broj studija u kojima su korišćene kako ćelijske linije, tako i transgeni miševi je pokazao da miR-21 svoj onkogeni potncijal izražava predominantno inhibicijom procesa ćelijskog umiranja po principu apoptoze (Buscaglia, 2011).



Slika 1.3. Shematski prikaz ciljnih gena čija je ekspresija regulisana mikroRNK-21 a čiji proteinski produkti učestvuju u procesima neoplastične transformacije. Modifikovano iz (Buscaglia, 2011).

Prekomerna ekspresija MiR-21 detektovana je u različitim malignim tumorima: pankreasa, prostate, dojke, pluća, nervnog tkiva i hematološkim neoplazmama (Chan i sar., 2005; Volinia i sar., 2012). Ona ima takav onkogeni potencijal, da je njen nivo ekspresije povišen u najvećem broju tumora upoređenim sa normalnim, netumorskim tkivom, u odnosu na druge mikro RNK uključene u istraživanje Pan i sar., (2010). U glioblastomima, miR-21 je takođe bila najčešće prekomerno eksprimirana od svih ispitanih mikro RNK i sa najvišim nivoima ekspresije (Kim i sar., 2009).

1.2.3 Značaj ekspresije i funkcije molekula miR-21 u karcinomu dojke

Slično drugim malignim tumorima, molekul miR-21 je prekomerno eksprimiran i u karcinomima dojke u kojima ima snažan onkogeni potencijal (Yan i sar., 2008; Huang i Yang, 2009). MiR-21 učestvuje u utišavanju gena čiji proteinski produkti regulišu procese propagacije ćelije kroz faze ćelijskog ciklusa i proliferaciju i ćelijsko umiranje po principu apoptoze. Jedan od tih gena je i tumor-supresorni gen fosfataza i tenzin homolog (Huang i Yang 2009; Lee i sar., 2011). Protein PTEN inhibira Akt signalni put defosforilacijom proteina PI3K-fosfatidilinozitol-4, 5-bisfosfat 3-kinaza (eng. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, PIK*). U ćelijama dojke, protein PTEN je uključen u procese kontrole ćelijskog ciklusa i indukcije ćelijskog umiranja po tipu apoptoze. Protein PTEN inhibira i aktivaciju regulatornog proteina NF- κ B (jedarni faktor za pojačavanje kapa lakog lanca aktiviranih B ćelija, eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), tako da inhibicija ekspresije gena *PTEN*-a posredovane mikro RNK-21 ima ulogu u neoplastičnoj transformaciji epitelijalnih ćelija dojke. Istovremeno, pokazano je da transfekcija ćelija sa miR-21 dovodi do njihove povećane migracije, što bi u tkivu tumora dojke za posledicu imalo invaziju i metastaziranje (Buscaglia, 2011).

Identifikovan je veći broj gena čiju ekspresiju reguliše mikro RNK 21 a čiji su proteinski produkti uključeni u ćelijske procese koji za posledicu imaju invaziju i metastaziranje karcinoma dojke. Tropomiozin 1 (*TPM1*, engl. *tropomyosin 1*) je veoma značajan protein koji omogućava mišićnu kontrakciju, jer reguliše mehanizam delovanja

aktina, odnosno pokrestljivosti ćelije. Gen *TPM1* je kao ciljni gen miR-21 identifikovan od strane Zhu i saradnika, (2007) metodom dvodimenzionalne gel elektroforeze. Smanjen nivo translacije TPM1 kao posledica povišene ekspresije miR-21 dovodi do povećanih migracija maligno transformisanih ćelija (Buscaglia, 2011).

PDCD4 je tumor supresorni gen koji ima ulogu u regulaciji ćelijskog umiranja po principu apoptoze (Yang i sar., 2009), (Lee i sar., 2011). Njegovu translaciju negativno reguliše miR-21 nakon što je stimulirana njena ekspresija signalnim putem aktiviranjem receptora Her-2 ili signalnim putem MAP kinaza (Buscaglia, 2011).

U procesu invazije karcinoma dojke, od naročito je značaja interakcija miR-21 sa iRNK gena *TIMP3*. Protein TIMP3 je inhibitor matriks metaloproteinaza koji ostvarivanjem svoje biološke uloge ima sposobnost suprimiranja invazije tumora (Baker i sar., 1998). Naime, protein TIMP3 može da inhibira rast ćelija, kao i da pokrene proces apoptoze kako u neizmenjenim tako i u tumorskim ćelijama (Baker, 1999). Molekularno-genetička studija je pokazala da iRNK za TIMP3 ima konsenzus sekvencu za vezivanje miR-21

Kao jedan od značajnih proteina čija je ekspresija smanjena u invazivnim karcinomima je protein RECK (reverzno-indukujući protein bogat cisteinima sa "kazal"-motivima, eng. *Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs*) matriks metaloproteinazni inhibitor usidren u membranu. Ima ulogu u sprečavanju invazije ćelija karcinoma sličnim mehanizmom kao i protein TIMP proteini. Gen *RECK* je još jedan od ciljnih gena miR-21 (Buscaglia, 2011; Zhang i sar., 2012).

Rezultati eksperimentalnih studija pokazali su da nivo ekspresije miR-21 raste sa porastom nivoa ekspresije ER i PR. Ekspresija gena koji kodira za PR je regulisana ER. To je razlog što više od 90% PR+ tumora dojke ima i ER+ status (Ng i sar., 2012). Novija istraživanja pokazuju da fenotipovi sa različitim statusom ER i PR daju različitu kliničku sliku, pa samim tim i tok i ishod bolesti (Onitilo i sar., 2009).

Zbog do sada već opisane pozitivne veze između povećane količine estrogena i nastanka tumora dojke (Fujita i sar., 2008), bilo bi očekivano da sa povećanjem nivoa estrogena raste i ekspresija miR-21. Međutim, istraživanja su pokazala ne samo to da je miR-21 negativno regulisana estrogenom, a pozitivno ER-om, već i to da je ta interakcije estrogen-miR-21 posredovana na različite načine, što ukazuje na kompleksnost u putevima u kojima ovi molekuli učestvuju (Wickramasinghe i sar., 2009).

Her-2 je član proteinske familije receptora epidermalnog faktora rasta i ima ulogu u prenosu signala u i van ćelije koji regulišu deobu i rast ćelija. Her-2 je onkogen, tako da umnoženi ili prekomerno eksprimirani *Her-2* gena vodi ćelije u nekontrolisanu proliferaciju i nastanak različitih vrsta tumora (Ross i Fletcher, 1998). Eksperimentalno je pokazano da je ekspresija miR-21 u pozitivnoj korelaciji sa ekspresijom Her-2 (Huang i sar., 2009). Povišen nivo ekspresije Her-2 posledica je poremećaja u signalnom putu MAP kinaze (Huang i sar., 2009). Ras-MEK1/2-ERK1/2 i fosfatidilinozitol-3-kinazni-AKT su glavni signalni putevi koji se aktiviraju Her-2. (Huang i sar., 2009) su pokazali i to da inhibitor ERK1/2 potpuno blokira Her-2 zavisnu ekspresiju miR-21, dok inhibitor AKT-a ne smanjuje značajno Her-2 zavisnu ekspresiju miR-21.

1.3 MiR-21 *in silico* analiza

In silico analiza u molekularnoj genetici koristi se za ispitivanje uloge i funkcije određenih bioloških struktura komercijalno dostupnim softverima. Trenutno je za ispitivanje uloge i funkcije mikro RNK dostupno približno 15 softvera. Većina softvera namenjena je predikciji potencijalnih targerta za koje se specifična mikro RNK vezuje, na osnovu definisanih kriterijuma kao što su: savijanje molekula RNK (eng. *foldng*), termodinamičke karakteristike mikro RNK i ciljnih gena, međusobna komplementarnost i konzervisanost ciljnih mesta kroz biološke vrste. Zbog različitih faktora koje algoritmi navedenih softvera upotrebljavaju za predviđanje ciljnih gena, sam rezultat predikcije je kompleksan i nije identičan u svim bazama i programima. Na osnovu dosadašnjih *in silico* istraživanja, navodi se da su programi TargetScan, miRanda i PicTar najpouzdaniji.

Njihova senzitivnost za predikciju ciljnih gena se kreće u granicama od 65 do 68% (Chow i sar., 2008).

Osim predikcije ciljnih gena, postoje i serveri koji koriste algoritme za analizu signalnih puteva u čiju je regulaciju uključena specifična mikro RNK. U ovom istraživanju korišćen je baza DIANA-TarBase v1.0. To je prva dostupna baza podataka koja koristi eksperimentalno potvrđene ciljeve mikro RNK. GeneCards server daje mogućnost predikcije ovih puteva signala sa šematizovanim rezultatima.

U okviru ove doktorske disertacije, za predikciju funkcije miR-21 u procesima neoplastične transformacije ćelija karcinoma dojke korišćeni su sledeći softveri: TargetScan Human 6.2, microRNA.org, PicTar, miRDB i TarBase (DIANA TOOL).

2 CILJEVI RADA

Karcinomi dojke su veoma kompleksna i heterogena gupa oboljenja sa velikim diverzitetom fenotipova, podeljenih u više tipova na osnovu svojih morfoloških i histoloških obeležja. Biologija ponašanja karcinoma dojke i konačan ishod bolesti još uvek su nedovoljno poznati i nepredvidivi. Sa druge strane, još uvek nije pokazano da li invazivni karcinomi dojke nastaju isključivo od karcinoma *in situ* ili *de novo*, ili je taj proces individualan. Takođe, još uvek nije rasvetljeno ni pitanje da li svi *in situ* karcinomi posle dovoljno dugog vremenskog perioda postaju invazivni.

Jedan od značajnijih genetičkih faktora uključenih u nastanak, razvoj i progresiju karcinoma dojke jeste i ekspresija mikro RNK-21, koja poseduje izuzetan onkogeni potencijal. Predmet ove disertacije je ispitivanje uticaja promene u nivou ekspresije miR-21 u: **i)** neinvazivnim (*in situ*) karcinomima, **ii)** invazivnim karcinomima sa neinvazivnom komponentom (invazivnim karcinomima asociranim sa neinvazivnim) i **iii)** čistim invazivnim karcinomima dojke, odnosno ispitivanje potencijalne uloge miR-21 u procesu sticanja invazivnosti.

Glavni cilj ove doktorske disertacije je da se ispita moguća povezanost nivoa ekspresije miR-21 i invazivnosti karcinoma dojke.

Specifični podciljevi su:

1) Prikupljanje klinički i histopatološki okarakterisanih uzoraka: **i)** neinvazivnih (*in situ*) karcinoma, **ii)** invazivnih karcinoma sa neinvazivnom komponentom (invazivni karcinomi asocirani sa neinvazivnim) i **iii)** čistih invazivnih karcinoma dojke, i **iv)** normalnog tkiva dojke

2) Izolacija RNK iz nepromenjenog i tumorskog tkiva

3) Određivanje nivoa ekspresije miR-21 metodom qRT-PCR u neizmenjenom i tumorskom tkivu

4) Utvrditi da li postoji povezanost nivoa ekspresije molekula miR-21 sa standardnim dijagnostičkim i prognostičkim parametrima karcinoma dojke

- Utvrditi da li postoji razlika u ekspresiji molekula miR-21 između invazivnih duktalnih i lobularnih karcinoma dojke.

- Utvrditi da li postoji povezanost nivoa ekspresije molekula miR-21 u tumorskom tkivu dojke sa veličinom tumora, životnom dobi pacijentkinja u trenutku dijagnoze, statusom limfnih čvorova i histološkim i nukleusnim gradusom

- Utvrditi da li postoji korelacija između nivoa ekspresije miR-21 i statusa estrogenskog i progesteronskog receptora

- Utvrditi da li postoji povezanost između ekspresionih nivoa molekula miR-21 i statusa receptora humanog epidermalnog faktora rasta (Her-2) i proliferativnog indeksa (Ki-67)

-Ispitati i okarakterisati nivoe ekspresije molekula miR-21 invazivnih karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom i uporediti ih sa neinvazivnim i čistim invazivnim podjeljenim u grupe prema standardnim dijagnostičkim i prognostičkim parametrima

5) Definisati ulogu ciljnih gena regulisanih sa molekulom miR-21:

- *in silico* analizom predikcije ciljnih molekula potencijalno uključenih u proces neoplastične transformacije uz pomoć TargetScan, miRanda, miRDB i PicTar softvera i *in silico* analizom miR-21 ekspresije uz pomoć DIANA-TarBase v1.0 servera.

- *in silico* analizom predikcije ciljnih molekula potencijalno uključenih u proces invazije karcinomima dojke uz pomoć TargetScan, miRanda PicTar i miRDB softvera, *in silico* analizom miR-21 ekspresije uz pomoć DIANA-TarBase v1.0 servera i analizom uz pomoć GeneCards servera koji sadrži informacije o signalnim putevima u koje je miR-21 uključena.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Materijal

Ovom studijom ispitani su uzorci primarnih karcinoma dojke 46 pacijentkinja, koje nisu primale terapiju pre operacije. Analizirano je i pet uzoraka neizmenjenog tkiva dojke pacijentkinja sa invazivnim karcinomom dojke. Kao kontrolno tkivo smatrano je tkivo udaljeno najmanje 3 cm od ivice tumora.

Tokom makroskopske analize hirurški odstranjenog malignog tkiva dojke, deo tkiva je odvajan za analizu ekspresije mikro RNK. Uzorci iz kojih je izolovana RNK čuvani su i transportovani na tečnom azotu. Ostatak tumorskog tkiva pripreman je za standardnu histopatološku anializu (fiksiran formalinom i kalupljen u parafinske blokove). Ukalupljeno tkivo u parafinu korišćeno je i za imunohistohemijsku analizu ekspresije proteina.

Uzorci karcinoma dojke dobijeni su nakon operacije pacijentkinja koje su dale pristanak u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u periodu od marta 2012. do aprila 2013. godine. Za studiju je dobijena saglasnost Etičkog odbora Instituta za radiologiju i onkologiju Srbije br. 5002/1-01 od 19.12.2012. godine i Etičkog komiteta Instituta za nuklearne nauke Vinča od 04.11.2013. godine.

3.2 Metode

3.2.1 Imunohistohemijska analiza ekspresije proteina ER, PR, Her-2 i Ki-67

Nivoi proteinske ekspresije estrogenskog (ER) i progesteronskog receptora (PR) određivani su imunohistohemijskom metodom na 4-5 µm isečcima formalinom fiksiranih uzoraka ukalupljenih u parafin, uz pomoć zečijih i mišjih monoklonskih antitela (RM-9101-S1, *Thermo Fisher Scientific*, Češir, Engleska i M3569, *Dako*, Kopenhagen, Danska, respektivno). Proteinski nivo ekspresije receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2,

Her-2, evaluirana su zečjim-antihumanim antitelom A0485, (*Dako*, Kopenhagen, Danska) dok je nivo proteinske ekspresije markera proliferacije Ki-67 evaluiran uz pomoć RM9106-S1 (*Thermo Fisher Scientific*, Češir, Engleska) antitela.

Tkivni preseci su deparafinizovani, rehidratirani i tretirani 3% H₂O₂ u trajanju od 10 min, kako bi se neutralizovala endogena aktivnost peroksidaze. Kako bi se oslobodili epitopi za vezivanje antitela, isecci su potapani u 10 mM ključajući citratni pufer (pH 6), i zagrevani do ključanja (pH 6) u mikrotalasnoj pećnici u trajanju od 25 min. Zatim su hlađeni i ispirani u TBS puferu (pH 7,4). Isecci uzoraka inkubirani su 30 min sa odgovarajućim primarnim antitelima u razblaženom odnosu 1:50 u Ab rastvarajućem puferu (eng. *Ab Diluent Buffer*)(Kod No.S0809 *Dako*, Kopenhagen, Danska) na sobnoj temperaturi. Nakon dodatnih ispiranja TBS-om, uzorci su tretirani prema uustvu proizvođača kita TP-125-HL (*Thermo Fisher Scientific*, Češir, Engleska) polimerizacionim sistemom koji sadrži biotinom obeleženo kozje polivalentno antitelo. Reakcija je vizualizovana streptavidin peroksidazom i hromogenom diaminobenzidinom, prema uputstvu proizvođača ovog protokola za uzorke ukalupljene u parafin. Uzorci su nakon toga kontrastirani bojom-hematoksilinom.

Imunohistohemijski nivo ekspresije proteina vršen je uz pomoć *Leica* DM 2000 i *Leica* DFC420 kamere (*Leica Microsystems*, Nuningen, Švajcarska) svetlosnog mikroskopa. Skor bojenja dobijan je brojanjem obojenih ćelija od ukupno 100 na polju mikroskopa.

Braon obojeni nukleusi su računati kao pozitivno bojenje i evaluirani prema (Leake, 2000) za ekspresiju proteina ER i PR. Uzorci čija je ekspresija ER i/ili PR bila između 0 i 3, definisani su kao ER- i/ili PR- (negativni), dok su uzorci sa ekspresijom ER i/ili PR između 4 i 6 bili označavani kao uzorci sa 50% ekspresije (pozitivni). Visoko pozitivni su bili uzorci sa ekspresijom ER i/ili PR 7 ili 8 i obeležavani su sa ER+i/ili PR+.

Ekspresija proteina Her-2 okarakterisana je kao pozitivna za vrednosti 3 ili više ili 2 ili više ako je dodatno potvrđena pozitivnost metodom CISH (Sauter i sar., 2009). Nivoi ekspresije proteina Ki-67 su predstavljeni kao procenti pozitivno obojenih ćelija, pri čemu je stepen bojenja između 0 i 15 % smatran za nisko eksprimiran, između 16 i 30% srednje i više od 30% za visoko eksprimiran.

Kao pozitivne kontrole korišćeni su uzorci za koje je već pokazano da su pozitivni na odgovarajuća antitela i bojeni su paralelno sa ispitivanim uzorcima.

3.2.2 Izolacija molekula RNK

3.2.2.1 Izolacija molekula RNK iz zamrznutih uzoraka tumora dojke

Iz uzoraka tumora dojke (zamrznutih u tečnom azotu) izolacija molekula RNK rađena je pomoću komercijalnog reagensa *TRI Reagent-a* (*Ambion*, Foster City, Kaliforniija). Metoda izolacije se zasniva na klasičnoj ekstrakciji kiselim fenolom (u puferu koji sadrži guanidin tiocijanat), taloženju alkoholom i rastvaranju u vodi.

Sveži uzorci tumora (50-100 mg tkiva) preneti su iz tečnog azota u 1 ml *TRI Reagent-a* dojke i odmah homogenizovani su uz pomoć ULTRA-TURRAX homogenizera za male zapremine. tečnog azota u 1 ml *TRI Reagent-a* (*Ambion*).

Nakon kompletne homogenizacije, uzorci su inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi (uz povremeno mešanje) nakon čega je dodavano 0.2 ml hloroforma (analitičke čistoće)(CENTROHEM) u 1 ml *TRI Reagent-a*. Nakon 15 sekundi intenzivnog mešanja i inkubiranja tokom 3 min na sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani 8 min na 12 000 rcf na 4°C. Centrifugiranjem se smeša razdvajala na donju-roze, fenol-hloroformsku fazu, interfazu (tkz. organska faza u kojoj se nalaze proteini i DNK) i bezbojnu gornju, vodenu fazu.

Supernatant je odlivan i prebacivan u novu tubu, posle čega je dodavano 0.5 ml hladnog izopropanola u 1 ml *TRI Reagent*-a. Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 10 min, a zatim centrifugirani na 12 000 x g u trajanju od 10 min.

Nakon centrifugiranja na 7 500 x g u trajanju od 5 min na 2-8°C, odlivan je supernatant a talog ispiran u najmanje 1 ml 75% DEPC-etanola (razblaženog sa vodom koja je tretirana DEPC-om) u 1 ml *TRI Reagent*-a. Korak ispiranja je ponovljen još jednom, a nakon poslednjeg centrifugiranja beličasti talog molekula RNK nalik na gel bio je uočljiv u svim uzorcima.

Nakon odstranjivanja 75% DEPC-etanola, uzorci molekula RNK sušeni su nad plamenom 15-20 minuta. Nakon toga, dodavano je 50-100 µl DEPC-H₂O, pa su uzorci dodatno inkubirani 10 min na 65°C u suvom kupatilu.

3.2.2.2 Izolacija molekula RNK iz uzoraka tumora dojke ukalupljenih u parafinske blokove

Deo analiziranih uzoraka bio je dostupan kao arhivski materijal ukalupljen u parafinske blokove. Iz ovih uzoraka ukupna RNK izolovana je pomoću komercijalnog kita *Recover AllTM Total Nucleic Acid Isolation Kit*-om (*Ambion*, Foster City, Kalifornija). Metoda obuhvata nekoliko koraka: deparafinizacija ksilolom, uklanjanje ksilola etanolom, i izolovanje i prečišćavanje molekula RNK iz liziranih ćelija na kolonama od vlaknastog stakla.

Uzorci tumora dojke ukalupljenih u parafinske blokove prvo su isecani na mikrotomu na fragmente debljine po 20 µm. Korišćeno je ukupno do četiri ovakva preseka (ukupno oko 80 µm uzorka sastavljenih iz fragmenata od po 20 µm).

U uzorke tkiva ukalupljenih u parafinske blokove debljine od 20 µm dodavano je po 1 ml 100% ksilola. Dobijena smeša kratko je centrifugirana i zagrevana tokom 3 min na

50°C kako bi se istopio parafin. Zatim je smeša centrifugirana 2 min na sobnoj temperaturi na najvećoj brzini, kako bi tkivo oformilo talog. Nakon uklanjanja ksilola, dodavano je 100 ml 100% etanola i uzorci su ponovo izmešani i centrifugirani 2 min na sobnoj temperaturi na maksimalnoj brzini kako bi se ponovo formirao talog. Zatim je pažljivo uklanjan etanol koji je sadržao i ostatke ksilola. Korak ispiranja etanolom je ponavljan kako bi ksilol sa sigurnošću bio uklonjen iz uzoraka. Nakon drugog odabacivanja etanola, uzorci su još jednom centrifugirani i sušeni 15-45 min na sobnoj temperaturi.

Nakon deparafinizacije, uzorci su inkubirani 15 min na 50°C, a zatim 15 min na 80°C u 200 µl digestionog pufera iz *Recover All™ Total Nucleic Acid Isolation Kit-a* (Ambion, Foster City, Kalifornija). Korak proteinazne digestije je vremenski ograničen da bi se sprečilo liziranje jedara, čime bi uzorak bio “kontaminiran” sa molekulom DNK.

Izolacija molekula DNK vršena je prema upustvu proizvođača korišćenog kita. U koraku izolacije molekula RNK u uzorke je dodavano po 240 µl izolacionog aditiva i 550 µl 100% etanola. Zatim je po 700 µl smeše prebacivano u kolektorske tube koje su centrifugirane na 10 000 x g 30 sekundi. Smeša koja je prošla kroz filter je odbačena i kontejneri su ponovo stavljeni u iste tube. U kolektorske tube dodavano je 700 µl rastvora za ispiranje (*Wash 1*) a zatim su one centrifugirane 30 sekundi na 10 000 x g. Postupak je ponovljen nakon što je dodavano 500 µl rastvora *Wash 2/3*. Na kraju, tube su centrifugirane na istoj brzini u trajanju od 30 sekundi. Za korak nukleazne digestije pripremljen je master miks sa komponentama reakcione smeše datih u **tabeli 3.1**.

Tabela 3.1. Sastav reakcione smeše za nukleaznu digestiju:

Količina po reakciji	Komponenta
6 µl	10 x DNazni pufer
4 µl	DNaza
50 µl	DEPC-H ₂ O

U sledećem koraku dodavano je 60 μ l DNaznog miksa i vršena je inkubacija 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, u kolektorske tube dodavano je 700 μ l *Wash* 1 rastvora i nakon kratke inkubacije (30-60 sekundi) na sobnoj temperaturi, vršeno je centrifugiranje 30 sekundi na 10 000 x g, a postupak je ponovljen još dva puta sa 500 μ l *Wash* 2/3 rastvora. Na kraju su tube centrifugirane 1 min na 10 000 x g. Kontejneri sa filterom na kojima su se nalazili molekuli RNK prebačeni su u nove tube u kojima je dodavano 60 μ l DEPC-H₂O i vršeno je centrifugiranje 1 min na maksimalnoj brzini.

3.2.3 Određivanje koncentracije molekula RNK i provera kvaliteta izolovanih molekula RNK elektroforezom u agaroznom gelu

Određivanje koncentracije izolovanih molekula RNK vršeno je spektrofotometrijski. U spektrofotometrijskoj analizi, odnos A260/A280 je indikator čistoće molekula RNK. Koncentracija izolovanih molekula RNK vršena je merenjem apsorbance na BioSpec-nano aparatu (*Shimadzu corporation*, Japan). Uzorci čiji je odnos A260/A280 bio približno između 1.8 i 2.1 smatrani su čistim i pogodnim za dalju analizu. Izmerene koncentracije molekula RNK bile se u opsegu od 110.35 do 2693.35 ng/ μ L.

Razdvajanjem celokupne RNK na agaroznom gelu uočavaju se dve intenzivne trake veličina približno 4.5 i 1.9 kb. Ove trake predstavljaju molekule 28S i 18S rRNK. Odnos jačina traka trebalo bi da bude oko 1.5-2.5:1, respektivno. Nativna poly (A)+ RNK (koja je predstavljena nizom informacionih, iRNK na gelu) pojavljuje se kao "razmaz", (eng. *smear*) traka veličina između 0.1 i 4-7 kb i to između traka koje predstavljaju 28S i 18S RNK (Ishikawa 1997).

Provera kvaliteta izolovanih molekula RNK vršena je elektroforezom u 1.2% agaroznom gelu bojenim etidijum-bromidom (Et-Br). Elektroforetsko razdvajanje vršeno je pri naponu od 10V/cm u trajanju od 30 min. Komponentne agaroznog gela prikazane su u **Tabeli 3.2**). Uzorci su nanošeni u koncentraciji od 1 μ g/ μ l i pomešani sa puferom

(*Loading dye*), koji sadrži brom fenol plavo (eng. *brom phenol blue*), koji omogućava praćenje napredovanja elektroforeze, u odnosu 2:1.

Tabela 3.2. Komponente za pripremanje agaroznog gela

Komponente za 1.2% agarozni gel	Količina-100 ml
agarozna	1.2 g
10 x TAE*	10 ml
Et-Br	5 µl
DEPC-H ₂ O	90 ml

*10 x TAE, pH8 (48.4 g Tris, 11.42 ml CH₃COOH, 20 ml 0.5 M EDTA, dH₂O do 1000 ml)

Gel je arhiviran pomoću sistema za snimanje gelova GS8000 (eng. *gel Documentation System, UVP inc, Upland SAD*).

3.2.4 Lančana reakcija polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija korišćenjem prajmera sa petljom (*Stem-Loop RT-PCR*)

U cilju kvantifikacije molekula miR-21 u odnosu na endogenu kontrolu RNU6B (malu nukleusnu RNK), korišćen je *TaqMan®MicroRNA* esej. *TaqMan®MicroRNA* esej je dizajniran tako da prepisuje i amplifikuje željenu mikro RNK (ne i prekursore) sa izuzetno visokom specifičnošću. Sa pouzdanošću amplifikuje samo zrele mikro RNK, a ne prekursore, iz samo 1-10 ng totalne RNK i sa specifičnošću koja omogućava razliku između samo jednog nukleotida.

Za reakciju reverzne transkripcije korišćeno je 10 ng totalne RNK. Uzorci totalne RNK prepisani su u komplementarnu (cDNK) uz pomoć specifičnih prajmera sa petljom, metodom *Stem-Loop RT-PCR*. MiR-21 i endogena kontrola RNU6B iz

TaqMan®MicroRNA eseja prepisuju se u odvojenim reakcijama, odnosno u različitim mikrotubama.

Kit za reverznu transkripciju za mikro RNK sadrži sledeće komponente 100mM dNTP dezoksiribonukletotid trifosfate (dNTP) sa dezoksitimidintrifosfatima (dTTP); *MultiScribe™* reverznu transkriptazu (50 U/μL); 10x pufer za reverznu transkripciju; Rnazni inhibitor 20 U/μL i DEPC H₂O. Nakon pripreme master miksa (**Tabela 3.3**); u reakciju su dodati uzorci RNK, a nakon toga specifični prajmeri za miR-21, odnosno RNU6B iz *TaqMan miR-21* eseja (ID: 00397) i eseja za malu jedarnu RNK -RNU6B (ID: 001093) koja je korišćena kao endogena kontrola. Reakciona smeša se sastojala iz navedenih komponenti u odnosu 7 μl master miksa : 3 μl 5x RT prajmera : 5 μl uzorka RNK

Tabela 3.3. Komponente kita za reverznu transkripciju mikro RNK

Komponenta	Zapremina komponente master miksa po reakciji od 15 μl
100 mM dNTP (sa dTTP)	0.15
<i>MultiScribe™</i> reverzna transkriptaza 50 U/μL	1.00
10x pufer za reverznu transkripciju	1.50
Rnazni inhibitor, 20 U/μL	0.19
DEPC H ₂ O	4.16
Ukupna zapremina reakcione smeše	7.00

Nakon pravljenja reakcione smeše, uzorci su inkubirani 5 min na ledu i stavljeni u PCR aparat gde je vršena PCR reakcija kojoj prethodi RT sa temepraturnim profilom datim u **Tabeli 3.4**.

Tabela 3.4. Temperaturni profil reakcije reverzne transkripcije mikro RNK

Vreme	Temperatura
30 minuta	16 °C
30 minuta	42°C
5 minuta	85°C
∞	4°C

3.2.5 Umnožavanje cDNK kvantitativnim PCR-om u realnom vremenu

Za umnožavanje cDNK nastalih prespisivanjem sa molekula miR-21, korišćena je 7500 real-Time PCR platforma. U ovom eksperimentu korišćen je set TaqMan hemijskih reagenasa koji sadrže fluorogenu probu za detekciju specifičnih PCR produkata amplifikovane cDNK poreklom od miR-21. Ako je ciljna sekvenca prisutna, Applied Biosystems hot-start DNK polimeraza seče probu koja se vezala za sekvencu između prajmera, svojom 5' nukleaznom aktivnošću u koraku ekstenzije prajmera.

U ovom eksperimentu korišćena je proba koja je na 5' kraju obeležena FAM bojom se nefluorescentnim *quencher*-om konjugovanim sa *minor groove-binder*-om (MGB), koji omogućava korišćenje kraćih proba sa visokom specifičnošću vezivanja za ciljnu sekvencu, jer povišava temperaturu topljenja probe (T_m -eng. *Melting Temperature*).

Nakon reakcije reverzne transkripcije, uzorci cDNK su amplifikovani uz pomoć TaqMan miR-21 eseja (ID: 00397), eseja za malu nukleusnu RNK (nRNK)-RNU6B (ID: 001093) korišćene kao endogenu kontrolu i *TaqMan®2XUniversal PCR Master Mix, No AmpErase®UNG* (**Tabela 3.5**). Reakcija amplifikacije imala je temeperaturni profil dat u **Tabeli 3.6**.

Tabela 3.5. Komponente reakcije kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu

Komponenta	Zapremina komponente master miksa po reakciji od 20 μ l	
	Jedna reakcija	Reakcija triplikata
TaqMan®Small RNA Assay (20x)	1.00 μ L	3.60 μ L
Produkt reakcije reverzne transkripcije	1.33 μ L	4.80 μ L
<i>TaqMan®2xUniversal PCR Master Mix, No AmpErase®UNG</i>	10.00 μ L	36.00 μ L
DEPC H ₂ O	7.67 μ L	27.61 μ L
Ukupna zapremina	20.00 μL	72.01 μL

Tabela 3.6. Temperaturni profil reakcije kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu

Korak	Aktivacija enzima	PCR	
	HOLD	Ciklus (40 ciklusa)	
		Denaturacija	Aniling/ekstenzija
Temperatura	95 °C	95 °C	60 °C
Vreme	10 minuta	15 sekundi	60 sekundi

3.2.6 Statistička analiza

Rezultati su obrađivani neparametrijskim statističkim testovima, jer ekspresioni nivoi molekula miR-21 nisu bili distribuirani prema normalnoj raspodeli. Za analizu su korišćine njihove medijane, a ne srednje vrednosti. Razlike u nivoima ekspresije molekula miR-21 između grupa, kao i korelacija ove ekspresije sa standardnim prognostičkim parametrima karcinom dojke analizirane su testom sume opsega (Mann-Whitney test, prilikom poređenja 2 grupe) ili Kruskal-Wallis-ovim testom analize varijanse opsega (Dunov metod, eng. *Dunn's method*) za upoređivanje 3 ili više grupa.

Za analize korelacije opsega između miR-21 i statusa ER i PR i miR-21 i kliničkih i histopatoloških parametara korišćen je Spirmanov test (eng. *Spearman's tests*).

P vrednosti koje su bile manje ili jednake 0.05 smatrane su statistički značajnim, dok su P vrednosti koje su bile manje od 1.0 smatrane kao statistički trend.

Za obradu rezultata korišćeni su *Sigma Stat 3.5 (Dundas Software, Ltd, Germany)* i *GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. CA)* programi.

3.2.7 *In silico* analiza predikcije ciljnih gena mikro RNK

U analizama predikcije potencijalnih ciljnih gena čija je ekspresija regulisana molekulom miR-21 korišćeni su TargetScan Human 6.2, microRNA.org, PicTar, miRDB i TarBase (DIANA TOOL) softveri.

TargetScan Human 6.2 (Dostupan na URL: <http://www.targetscan.org/>) je softver koji se koristi za predikciju ciljnih gena i to pretragom prisustva konzerviranih septamernih i oktamernih mesta u tkzv. regionu "*seed*" u molekulu mikro RNK. Region "*Seed*" nalazi se na poziciji 2-7n u zreloj mikro RNK i evolutivno je veoma dobro sačuvano (Lewis i sar. 2005). Ako u potencijalnom ciljnom molekulu nema komplementarnosti sa regionom "*seed*" molekula mikro RNK, ovaj softver može da identifikuje potencijalne ciljne iRNK ukoliko postoji konzerviranost u sparivanju na njihovom 3' kraju ciljne iRNK (Friedman i sar. 2009). Kod sisara, predikcije ovog programa rangirane su na osnovu 4 osobine:

- tip ciljnog mesta
- sparivanje na 3' kraju
- rasprostranjenost AU dinukleotida
- pozicija ciljnog mesta (Grimson i sar. 2007).

Takođe, TargetScan 6.2 uključuje stabilnost sparivanja u regionu “seed” kao i zastupljenost ciljnog mesta, odnosno koliko ih potencijalna ciljna iRNK poseduje.

microRNA.org (Dostupan na URL: <http://www.microrna.org/microrna/home.do>) je server za predikciju potencijalnih ciljnih iRNK koji koristi miRanda aplikaciju i miRSVR ciljno-mesto scoring sistem (Alan i sar., 2011).

PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/PicTar>) je još jedan od algoritama za identifikaciju iRNK regulisanih sa određenim molekulom mikro RNK koji funkcioniše na osnovu poravnanja 3'UTR sa predikcionim mestima (Krek i sar., 2005). Algoritam je baziran na skrivenom Markovom modelu koji računa verovatnoću vezivanja molekula mikro RNK za 3'UTR na sve moguće načine na osnovu poravnanja sekvenci.

miRDB (Dostupan na URL: <http://mirdb.org/miRDB/>) je internet baza za predikciju ciljnih molekula i funkcionalnu anotaciju molekula mikro RNK koja komunicira sa različitim softverima i alatima za *in silico* analizu mikro RNK. Sekvence molekula mikro RNK preuzima iz miRBase (Dostupno na URL: <http://www.mirbase.org/>) (Griffiths-Jones, 2006), dok 3'-UTR sekvence ciljnih molekula iRNK preuzima iz GenBank fajlova uz pomoć BioPerl (Dostupno na URL: <http://www.bioperl.org>) softvera. Predikciju ciljnih molekula ostvaruje preko MirTarget2 (Wang, 2008).

TarBase (DIANA TOOL) (Dostupno na URL: <http://www.microrna.gr/tarbase>) je softver za predikciju ciljnih molekula iRNK koji uključuje i eksperimentalno potvrđene rezultate. Odnosno, za svaki potencijalni ciljnimolekul daje informaciju o eksperimentalnoj metodi kojom je potvrđen (Vergoulis i sar., 2011).

4 REZULTATI

4.1 Rezultati selekcije pacijentkinja na osnovu tipa tumora i standardnih dijagnostičkih i prognostičkih parametara karcinoma dojke

Studija je izvršena na uzorcima tumorskog tkiva 46 pacijentkinja sa karcinomom dojke, prosečne starosti 61.3 ± 1.5 godina. Najmlađa pacijentkinja u trenutku postavljanja dijagnoze imala je 30, a najstarija 84 godine. Pacijentkinje sa invazivnim karcinomom dojke imale su u proseku 61 ± 1.8 godina, dok su pacijentkinje sa invazivnim asociranim sa neinvazivnim u proseku imale 63 ± 3 godine. Od ukupnog broja, sedam (18.9%) pacijentkinja imalo manje ili jednako 50 godina, dok je 30 (81.1%) pacijentkinja imalo više od 50 godina u trenutku operacije. Za 9 pacijentkinja podaci o godištu nisu bili poznati (**Tabela 4.1**).

U prvom delu sudije analizirano je tumorsko tkivo devet neinvazivnih, osam invazivnih sa neinvazivnom komponentom i 27 čistih invazivnih karcinoma dojke, odnosno uzorci 44 pacijentkinje. U drugom delu doktorske teze analizirano je tumorsko tkivo 39 invazivnih karcinoma dojke i pet uzoraka neizmenjenog tkiva dojke. U trećem delu ispitivanja analizirano je deset invazivnih karcinoma dojke asociranih sa neinvazivnim (dva uzorka sa DCIS komponentom manjom od 30% priključeni su grupi od osam invazivnih asociranih sa neinvazivnim sa DCIS komponentom većom ili jednakom 30%).

Trinaest pacijentkinja (36.1%) imalo je tumore čiji je dijametar bio ≤ 2 cm, dok su dvadeset i tri pacijentkinje imale tumore čiji je dijametar bio veći od 2 cm (63.9%), Za ostale pacijentkinje podaci o veličini tumora nisu bili poznati. Sedamnaest pacijentkinja (48.6%) imalo je pozitivan status limfnih čvorova, dok je osamnaest (51.4%) imalo negativan status limfnih čvorova (**Tabela 4.1**). Histološki i nukleusni gradus analiziranih tumora dat je u **tabeli 4.2**.

Tabela 4.1. Selekcija pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na veličinu tumora, životnu dob, menstrualni status, i status limfnih čvorova

Dijagnostički i prognostički parametri	Broj pacijentkinja u okviru grupa (%)			
	Neinvazivni	Invazivni asocirani sa neinvazivnim	Invazivni	N Podaci npoznati
Veličina tumora ≤2cm	2 (100)	2 (25.0)	9 (33.3)	10
Veličina tumora >2cm	0 (0)	5 (75.0)	18 (66.7)	
Pacijentkinje mlađe od 50 godina	1 (50)	0 (0)	6 (22.2)	9
Pacijentkinje starije od 50 godina	1 (50)	8 (100)	21 (77.8)	
Menstrualni status-premenopauza	4	0	4 (17.4)	11
Menstrualni status-postmenopauza	/	8 (100)	19 (82.6)	
Status limfnih čvorova-pozitivan	/	4 (50)	13 (48.1)	11
Status limfnih čvorova-negativan	/	4 (50)	14 (51.8)	

Tabela 4.2. Selekcija pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na histološki i nukleusni gradus tumora

Gradus tumora	Broj pacijentkinja u okviru grupa (%)	
	Invazivni sa neinvazivnom komponentom	Invazivni
Histološki gradus 1	0 (0)	5 (18.5)
Histološki gradus 2	8 (100)	18 (66.7)
Histološki gradus 3	0 (0)	4 (14.8)
Nukleusni gradus 1	0 (0)	4 (14.8)
Nukleusni gradus 2	7 (87.5)	18 (66.7)
Nukleusni gradus 3	1 (12.5)	5 (18.5)

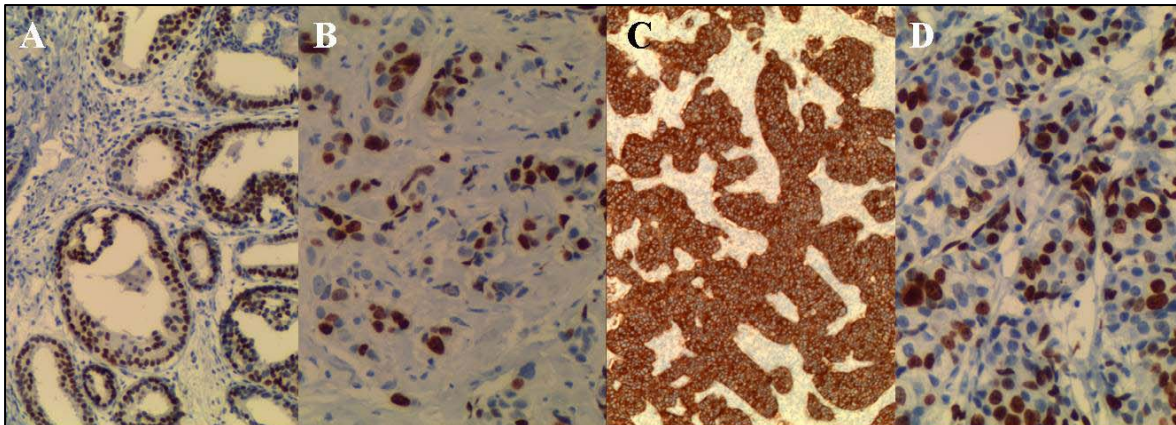
4.2 Rezultati imunohistohemijske detekcije nivoa ekspresije proteina receptora za estrogen (ER), progesteron (PR), humani epidermalni faktor rasta 2 receptor (Her-2) i jedarnog proteina Ki-67

Rezultati imunohistohemijske analize ekspresije proteina ER, PR, Her-2 i Ki-67 dati su u **Tabeli 4.3**.

Tabela 4.3. Rezultati imunohistohemijske detekcije proteina ER, PR, Her-2 i Ki-67 u uzorcima tumorskog tkiva pacijentkinja sa karcinomom dojke

Status ekspresije proteina	Broj pacijentkinja u okviru grupa (%)		
	Neinvazivni	Invazivni sa neinvazivnom komponentom	Invazivni
ER+	4 (80)	6 (75)	24 (88.9)
ER-	1 (20)	2 (25)	3 (11.1)
PR+	2 (40)	4 (50)	21 (77.8)
PR-	3 (60)	4 (50)	6 (22.2)
ER+PR+	2 (40)	4 (50)	21 (77.8)
ER+PR-	2 (40)	2 (25)	3 (11.1)
ER-PR-	1 (20)	2 (25)	3 (11.1)
Her-2 +	/	2 (25)	9 (33.3)
Her-2 -	/	6 (75)	18 (66.7)
Ki-67≤20%	/	5 (62.5)	15 (55.6)
Ki-67>20%	/	3 (37.5)	12 (44.4)

U uzorcima tumorskog tkiva trideset i četiri pacijentkinje (85%) detektovan je imunohistohemijski detektabilni nivo ekspresije proteina ER (**Slika 4.1A**). Takvi uzorci tumorskog tkiva definisani su kao tumorska tkiva sa statusom ER+. Uzorci tumorskog tkiva kod kojih nije imunohistohemijski detektovana ekspresija estrogenskog receptora definisani su kao tumori sa statusom ER-. U analiziranoj grupi, šest uzoraka tumorskog tkiva imalo je status ER-. U dvadeset i sedam (67.5%) uzoraka tumorskog tkiva detektovano je prisustvo progesteronskog receptora te su ovi tumori definisani kao tumori sa PR+ statusom (**Slika 4.1B**).



Slika 4.1. Imunohistohemijska analiza ekspresije proteina u uzorcima karcinoma dojke. **A)** Ekspresija ER u uzorku *in situ* karcinom dojke (PAP, 10X); **B)** Ekspresija PR uzorku invazivnog karcinoma dojke (PAP, 40X); **C)** Ekspresija Her-2 u uzorku invazivnog karcinoma dojke (PAP, 10X); **D)** Ekspresija proteina Ki-67 u uzorku invazivnog karcinom dojke čiji je indeks proliferacije Ki-67>20% (PAP, 40X);.

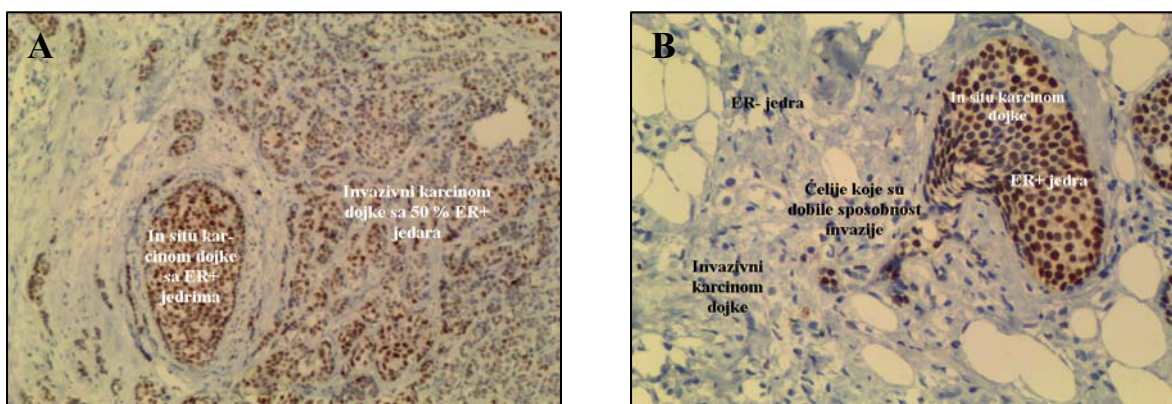
Analiza imunohistohemijske detekcije ekspresije ER i PR pokazala je da je u 27 uzoraka tumorskog tkiva detektovana ko-ekspresija proteina te su ovi izorci tumorskog tkiva definisani kao tumori sa statusom ER+/PR+. U sedam uzoraka tumora sa statusom ER+ nije detektovana ekspresija proteina PR (tumori sa statusom ER+/PR-). Na kraju, u pet uzoraka imunohistohemijski nije detektovana ekspresija estrogenog i progesteronskog receptora pa su ovi tumori definisani statusom ER-/PR- (**Tabela 4.3**)

Imunohistohemijska analiza ekspresije receptora Her-2 i jedarnog proteina Ki-67 vršena je u uzorcima tumorskog tkiva invazivnih karcinoma dojke. Kod trećine analiziranih uzoraka tumorskog tkiva detektovana ekspresija receptora Her-2 te je jedanaest uzoraka definisano kao tumori sa statusom Her-2+ (**Slika 4.1C**). U svim uzorcima tumorskog tkiva invazivnih karcinoma dojke detektovana je ekspresija proteina Ki-67. U uzorcima tumorskog tkiva dvadeset pacijentkinja (57.1%) detektovana je ekspresija jedarnog proteina Ki-67 u manje ili jednako 20% ćelija. Takvi tumori su definisani kao tumori čiji je indeks proliferacije Ki-67 bio $\leq 20\%$. Ekspresija proteina Ki-67 u više od 20% ćelija detektovana

je u uzorcima tumorskog tkiva petnaest pacijentkinja (42.9%), pa su ovi tumori definisani kao tumori sa indeksom proliferacije Ki-67 > 20% (**Slika 4.1D**).

Četiri uzorka tumorskog tkiva kalupljenih u parafin pretrpela su sekundarna oštećenja zbog kojih nije bilo moguće izvršiti imunohistohemijska bojenja. U dva uzorka tumorskog tkiva više puta ponovljena imunohistohemijska detekcija proteina ER nije dala reproducibilni rezultat.

Imunohistohemijska detekcija analiziranih proteina vršena je u osam uzoraka tkiva invazivnih karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom (**Slika 4.2**). U dva uzorka, invazivna i *in situ* komponenta tumora imale su isti obrazac ekspresije ER. Različit nivo ekspresije proteina ER detektovan je u šest uzoraka. U tri uzorka, u *in situ* komponenti ekspresija ER detektovana je u preko 90% ćelija dok je u invazivnoj komponenti imunohistohemijski nivo ekspresije ovog proteina detektovan u oko polovini ćelija (**Slika 4.2A**). Ekspresija estrogenog receptora nije detektovana u invazivnoj komponenti tri uzorka kod kojih je ekspresija u *in situ* komponenti bila preko 90% (**Slika 4.2B**).



Slika 4.2. Imunohistohemijska analiza ekspresije proteina ER u tumorskom tkivu invazivnih karcinoma dojke sa *in situ* komponentom. **A)** Uzorak tumorskog tkiva kod koga je u *in situ* komponenti preko 90% ćelija imalo ekspresiran ER, a u invazivnoj komponenti oko polovina ćelija (PAP, 10X); **B)** Uzorak tumorskog tkiva sa preko 90% ćelija *in situ* komponente u kojima je ekspresiran ER, dok u ćelijama invazivne komponente ekspresija ER nije bila detektovana (PAP, 20X).

4.3 Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miR-21 u neizmenjenom i tumorskom tkivu dojke

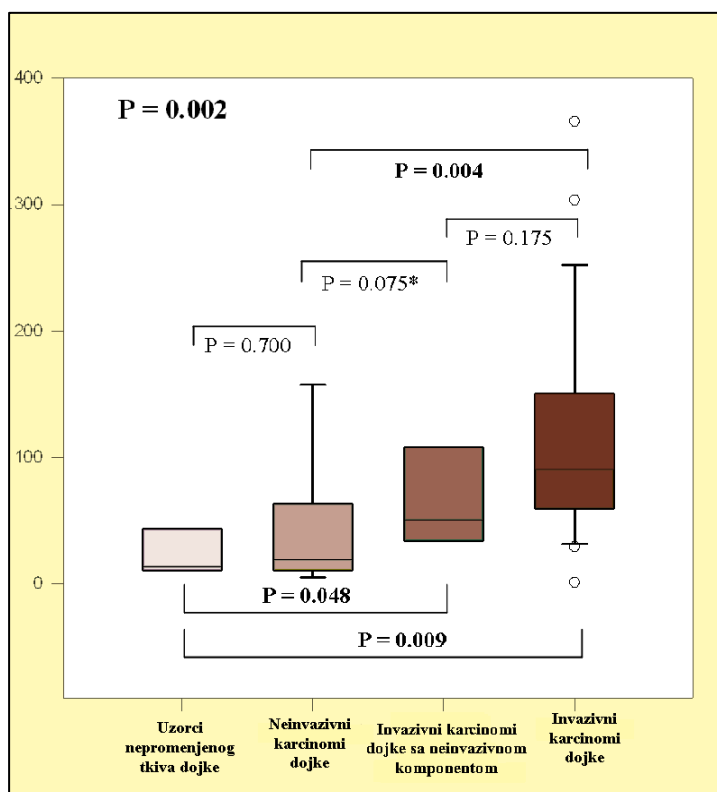
U prvom delu studije analizirano je 44 uzorka karcinoma dojke i pet uzoraka neizmenjenog tkiva. Ispitano je 37 svežih i sedam uzoraka tumorskog tkiva fiksiranih u formalinu i ukalupljenih u parafin. U okviru navedenih 37 uzoraka bila su dva neinvazivna, osam invazivnih asociranih sa neinvazivnim i 27 čistih invazivnih karcinoma dojke. Svih sedam uzoraka tumorskog tkiva ukalupljenih u parafin bili su poreklom od neinvazivnih karcinoma dojke. Analizirani uzorci pripadali su sledećim histološkim podtipovima: 11 ILC, 16 IDC, osam IDC-DCIS i devet DCIS.

Medijana ekspresije molekula miR-21 u uzorcima neizmenjenog tkiva dojke iznosila je 13.491, dok je u tkivima neinvazivnih karcinoma dojke iznosila 19.252. U tkivima invazivnih karcinoma dojke asociranih sa neinvazivnim karcinomom medijana ekspresije miR-21 iznosila je 50.817, a u tkivima čistih invazivnih karcinoma 90.459. Detektovane razlike u medijani ekspresije molekula miR-21 bile su statistički značajne ($P=0.002$, Kruskal-Wallis-ov test, Dunn-ov metod) (**Slika 4.3**).

Korišćenjem Mann-Whitney testa, potvrđena je statistički značajna razlika u nivou ekspresije molekula miR-21 i to kada je vršeno poređenje nivoa njene ekspresije između uzoraka neizmenjenog tkiva dojke ($n=5$) kako sa uzorcima invazivnih karcinoma asociranih sa neinvazivnim ($n=8$) ($P=0.048$, Mann-Whitney-ev U test) tako i sa uzorcima čisto invazivnih karcinoma dojke ($n=27$) ($P = 0.009$, Mann-Whitney-jev U test).

Statistički značajna razlika dobijena je i poređenjem nivoa ekspresije molekula miR-21 u uzorcima tkiva neinvazivnih ($n=9$) i čistih invazivnih karcinoma dojke ($P=0.004$, Mann-Whitney-jev U test). Statistički značajna razlika u nivou ekspresije molekula miR-21 nije detektovana poređenjem uzoraka neizmenjenog tkiva dojke i neinvazivnih karcinoma ($P=0.700$, Mann-Whitney-jev U test), kao ni poređenjem uzoraka tkiva neinvazivnih i invazivnih asociranih sa neinvazivnim karcinomima ($P=0.075$, Mann-Whitney-ev U test).

Poređenjem uzoraka invazivnih karcinoma asociranih sa neinvazivnim i uzoraka čistih invazivnih karcinoma nije utvrđena statistički značajna razlika u nivou ekspresije molekula miR-21 ($P=0.175$, Mann-Whitney-jev U test) (Slika 4.3).



Slika 4.3. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u uzorcima neizmenjenog tkiva dojke, neinvazivnih, invazivnih asociranih sa neinvazivnim i čistim invazivnim karcinomima dojke (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, pravougaonici predstavljaju opseg između 25% i 75% medijane. Horizontalna linija predstavlja medijanu).

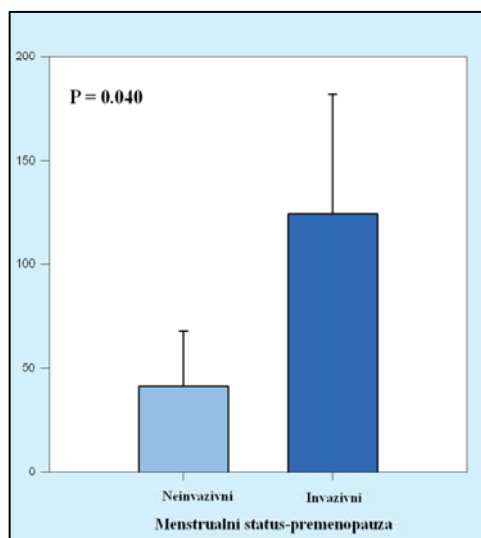
4.3.1 Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miR-21 u različitim grupama tumorskog tkiva karcinoma dojke formiranih na osnovu vrednosti standardnih dijagnostičkih i prognostičkih parametara

Poređenjem nivoa ekspresije molekula miR-21 u uzorcima tumora dijametara većeg od 2 cm i tumorima dijametara manjeg od 2 cm, nije utvrđena statistički značajna razlika. Nivoi ekspresiji molekula miR-21 u tumorskom tkivu nisu se statistički značajno razlikovali između uzoraka sa pozitivnim i negativnim statusom limfnih čvorova (**Tabela 4.4**).

Tabela 4.4. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u grupama tumorskog tkiva karcinoma dojke formiranih na osnovu vrednosti standardnih dijagnostičkih i prognostičkih parametara

Dijagnostički i prognostički parametri	Relativna ekspresija miR-21			P-vrednost	
	Invazivni sa neinvazivnom komponentom	N (%)	Invazivni		N (%)
Veličina tumora ≤ 2cm	74.020 (25.186-122.854)	2 (28.5)	141.412 (97.989-231.405)	9 (33.3)	P=0.289
Veličina tumora > 2cm	56.547 (42.783-135.249)	5 (71.5)	72.756 (38.874-99.051)	18 (66.7)	P=0.628
Godine u trenutku dijagnoze > 50	50.817 (34.779-62.745)	8 (100)	92.303 (70.100-146.531)	21 (77.8)	P=0.067
Status limfnih čvorova-pozitivan	50.339 (30.526-205.686)	4 (50)	90.459 (38.357-112.995)	13 (48.1)	P=0.533
Status limfnih čvorova-negativan	64.545 (39.977-19.988)	4 (50)	122.419 (84.922-22.696)	14(51.8)	P=0.212

U grupi pacijentkinja starijih od 50 godina, uočen je statistički trend ka većoj ekspresiji molekula miR-21 (P=0.067) u grupi čistih invazivnih karcinoma u odnosu na invazivne asocirane sa neinvazivnim karcinomom dojke. Razlike u nivou ekspresije molekula miR-21 u uzorcima tumorskog tkiva čistih invazivnih i inaktivnih tumora sa neinvazivnom komponentom nije bila statistički značajna u grupi pacijantkinja mlađih od 50 godina. Kod pacijentkinja koje su bile u premenopauzi postoji statistički značajno povećanje u nivou ekspresiji miR-21 kod čistih invazivnih u odnosu na neinvazivne karcinome dojke (**Slika 4.4**).



Slika 4.4. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u tumorskom tkivu neinvazivnih i invazivnih karcinoma dojke u grupi pacijentkinja sa premenopauzalnim menstrualnim statusom (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, pravougaonici predstavljaju opseg između 25% i 75% medijane. Horizontalna linija predstavlja medijanu).

U grupi pacijentkinja sa tumorima histološkog i nukleusnog gradusa 2, nivo ekspresije molekula miR-21 bio je statistički značajno povišen u uzorcima tumorskog tkiva invazivnih karcinoma u poređenju sa tumorskim tkivom invazivnih asociраних sa neinvazivnim karcinomom (P=0.043 i P=0.036, Mann-Whitney-jev U test) (**Tabela 4.5**).

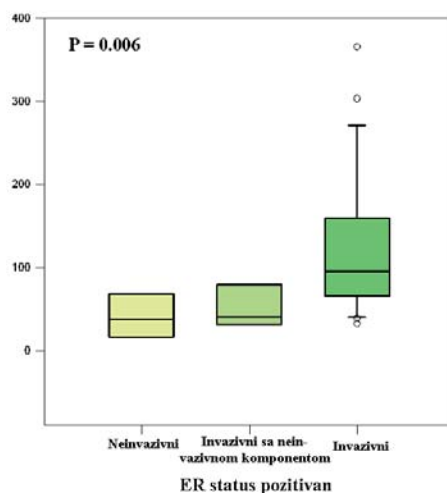
Tabela 4.5. Relativna ekspresija molekula miR-21 u tumorskom tkivu histološkog i nukleusnog gradusa 2

Gradus tumora	Invazivni sa neinvazivnom komponentom	N (%)	Invazivni	N (%)	P- vrednost
Histološki gradus 2	40.477 (36.691-64.811)	8 (100)	99.775 (72.105-161.889)	18 (66.7)	P=0.043
Nukleusni gradus 2	40.477 (33.691-64.811)	7 (87.5)	95.677 (68.096-156.187)	18 (66.7)	P=0.036

U analiziranoj grupi karcinoma dojke sa statusom ER+, nivoi ekspresije molekula miR-21 bili su statistički značajno različiti u tumorskim tkivima neinvazivnih, invazivnih sa neinvazivnom komponentom i invazivnih tumora (P = 0.006, Kruskal-Wallis-ov test, Dunn-ov metod) (Slika 4.5, Tabela 4.6). U tumorskom tkivu sa ER+ statusom najviši nivo ekspresije molekula miR-21 detektovan je u grupi invazivnih karcinoma dojke, a najniži u grupi neinvazivnih karcinoma dojke (Slika 4.5).

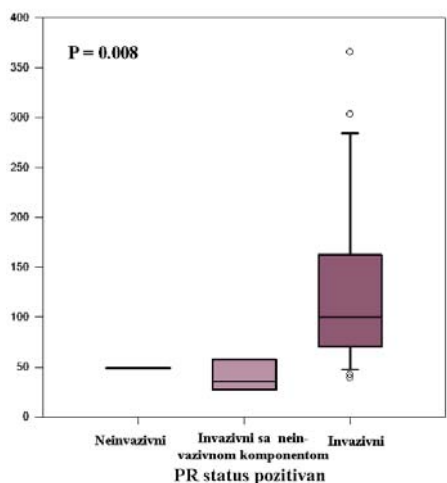
Tabela 4.6. Nivoi ekspresija molekula miR-21 u grupama tumorskog tkiva karcinoma dojke formiranih na osnovu ekspresionog statusa proteina ER, PR, Her-2 i Ki-67

Status ekspresije proteina	Relativna ekspresija miR-21						P-vrednost
	Neinvazivni	N (%)	Invazivni sa neinvazivnom komponentom	N (%)	Invazivni	N (%)	
ER+	38.371 (19.216-62.918)	4 (57.1)	40.477 (33.691-64.811)	6 (75)	95.677 (68.096-156.187)	24 (88.9)	P = 0.006
ER-	/	/	201.554 (56.547-346.561)	2 (25)	29.255 (8.064-34.919)	3 (11.1)	P = 0.200
PR+	48.802 (24.256-73.348)	2 (40)	34.779 (29.439-50.339)	4 (50)	99.775 (72.105-161.889)	21 (77.8)	P = 0.008
PR-	/	/	89.701 (50.817-234.707)	4 (50)	32.358 (22.191-47.754)	6 (22.2)	P = 0.063 ^c
ER+PR+	48.802 (24.256-73.348)	2 (40)	34.779 (29.439-50.339)	4 (50)	100.499 (73.081-162.852)	21 (77.8)	P = 0.007
ER+PR-	33.331 (14.176-52.487)	2 (40)	83.971 (45.088-122.854)	2 (25)	62.084 (39.790-75.966)	3 (11.1)	P = 0.562
ER-PR-	157.438 (157.438-157.438)	1 (20)	201.554 (56.547-346.561)	2 (25)	29.255 (8.064-4.919)	3 (11.1)	P = 0.133
Her-2+	/	/	89.297 (51.481-180.459)	2 (25)	201.554 (56.547-346.561)	9 (33.3)	P = 0.889
Her-2-	/	/	40.477 (33.691-64.811)	6 (75)	91.381 (62.084-150.484)	18 (66.7)	P = 0.067 ^c
Proliferativni indeks Ki-67 ≤ 20%	/	/	56.547 (31.565-79.322)	5 (62.5)	100.499 (72.430-164.777)	15 (55.6)	P=0.036
Proliferativni indeks Ki-67 > 20%	/	/	45.088 (38.172-271.193)	3 (37.5)	69.595 (34.582-98.746)	12 (44.4)	P = 0.829



Slika 4.5. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u tumorskim tkivima sa ER+ statusom (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, pravougaonici predstavljaju opseg između 25% i 75% medijane. Horizontalna linija predstavlja medijanu).

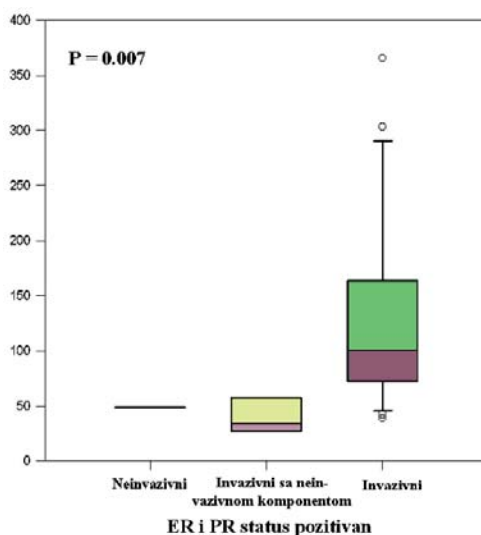
Istovremeno, statistički značajna razlika u nivoima ekspresije molekula miR-21 detektovana je u različitim tipovima tumora u grupi karcinoma dojke sa statusom PR+ (P=0.008, Kruskal-Wallis-ov test, Dunn-ov metod) (**Slika 4.6, Tabela 4.6**).



Slika 4.6. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u tumorskim tkivima sa statusom PR+ (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, pravougaonici predstavljaju opseg između 25% i 75% medijane. Horizontalna linija predstavlja medijanu).

Najviši nivo ekspresije molekula miR-21 u tumorskom tkivu statusa PR+ detektovan je u uzorcima invazivnim karcinomima dojke, dok je najniži nivo ekspresije zabeležen u grupi invazivnih karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom (**Slika 4.6**). U tumorskom tkivu receptorskog statusa PR+ postojao je statistički trend u porastu nivoa ekspresije molekula miR-21 u invazivnim karcinomima dojke u odnosu na invazivne karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom ($P=0.063$, Mann-Whitney-jev U test) (**Tabela 4.6**).

Statistički značajna razlika u nivoima ekspresije molekula miR-21 detektovana je i u grupi tumorskog tkiva sa statusom ER+/PR+ kada su oni podeljeni prema tipu tumora ($P = 0.007$, Kruskal-Wallis-ov test, Dunn-ov metod) (**Slika 4.7, Tabela 4.6**).



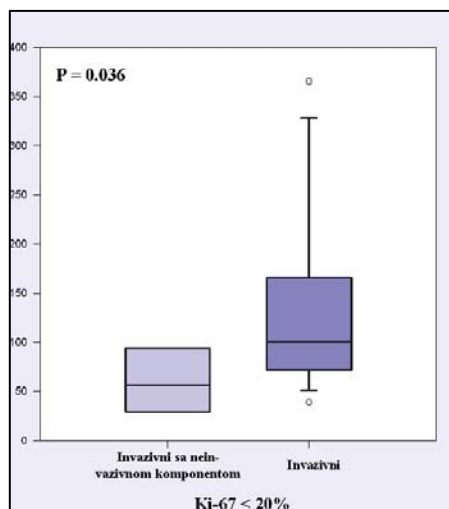
Slika 4.7. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u tumorskim tkivima sa statusom ER+/PR+ (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, pravougaonici predstavljaju opseg između 25% i 75% medijane. Horizontalna linija predstavlja medijanu).

U podgrupi pacijentkinja sa pozitivnim statusom oba receptora (ER i PR) najviši nivo ekspresije molekula miR-21 detektovan je u grupi invazivnih karcinoma, a najniži u grupi invazivnih karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom (**Slika 4.7**).

U tumorskom tkivu sa receptorskim statusom ER-/PR- najniži nivo ekspresije molekula miR-21 detektovan je u neinvazivnim karcinomima dojke, ali statistički značajna razlika u nivoima ekspresije molekula miR-21 između grupa tumorskog tkiva podeljenih na osnovu invazivnosti nije zabeležena.

U uzorcima tumorskog tkiva kod kojih nije detektovana ekspresija receptora Her-2, zabeležen je statistički trend ka većoj ekspresiji molekula miR-21 kod invazivnih karcinoma u odnosu na invazivne sa neinvazivnom komponentom ($P = 0.067$, Mann-Whitney-jev U test) (**Tabela 4.6**).

U tumorskom tkivu dojke sa vrednostima proliferativnog indeksa $Ki-67 \leq 20\%$ detektovana je statistički značajno viša ekspresija molekula miR-21 u invazivnim karcinomima u odnosu na invazivne karcinome dojke sa neinvazivnom komponentom ($P=0.036$, Mann-Whitney-jev U test) (**Slika 4.8, Tabela 4.6**).



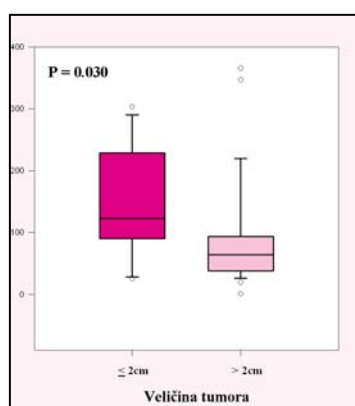
Slika 4.8. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u tumorskom tkivu kojima je proliferativnih indeks iznosio $Ki-67 \leq 20\%$ (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, pravougaonici predstavljaju opseg između 25% i 75% medijane. Horizontalna linija predstavlja medijanu).

4.3.2 Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miR-21 u tumorskom tkivu invazivnih karcinoma dojke

U drugom delu studije analizirana je ekspresija molekula miR-21 u invazivnim karcinomima dojke u cilju utvrđivanja moguće asocijacije sa standardnim dijagnostičkim i prognostičkim parametrima bolesti. Analizom razlika u nivou ekspresije miR-21 u uzorcima različitih histoloških podtipova invazivnih karcinoma dojke (ILC i IDC i ILC-IDC) nije utvrđena statistički značajna razlika. To je razlog što u daljim analizama nije vršena podela invazivnih karcinoma dojke po histološkim podtipovima.

4.3.2.1 Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miR-21 u grupama invazivnih karcinoma dojke formiranih na osnovu vrednosti standardnih dijagnostičkih i prognostičkih parametara

U tumorskom tkivu dijametra manjeg ili jednokog 2 cm postojao je statistički značajno povišen nivo ekspresije molekula miR-21 u odnosu na tumore dijametra većeg od 2 cm kod pacijentkinja sa invazivnim karcinomom dojke ($P=0.030$, Mann-Whitney-jev U test) (Slika 4.9, Tabela 4.7).

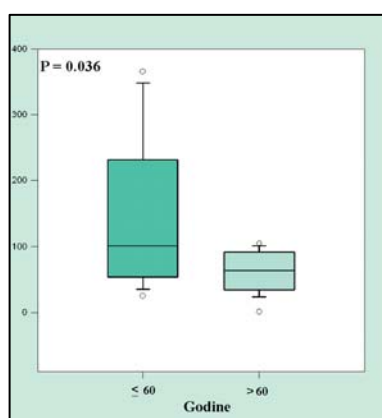


Slika 4.9. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u tkivu invazivnih karcinoma dojke dijametara ≤ 2 cm i > 2 cm (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, pravougaonici predstavljaju opseg između 25% i 75% medijane. Horizontalna linija predstavlja medijanu).

Tabela 4.7. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u grupama tumorskog tkiva invazivnih karcinoma dojke formiranih na osnovu vrednosti standardnih dijagnostičkih i prognostičkih parametara

Standardni dijagnostički i prognostički parametri	Broj pacijentkinja N (%)	Relativna miR-21 ekspresija	P-vrednost
Veličina tumora			
≤2cm	13 (33.3)	122.854 (92.969-209.181)	P = 0.030
>2cm	26 (66.7)	64.449 (38.874-92.303)	
Godine u trenutku dijagnoze			
≤60	20 (51.3)	101.065 (59.316-234.064)	P = 0.050
>60	19 (48.7)	64.087 (35.323-90.920)	
Menopauzalni status			
Premenopauza	4 (17.4)	145.948 (90.143 -158.122)	P = 0.226
Postmenopauza	19 (82.6)	78.850 (50.895-102.844)	
Status limfnih čvorova			
Negativan	20 (51.3)	75.256 (50.817-132.133)	P = 0.623
Pozitivan	19 (48.7)	64.811 (36.102-100.137)	

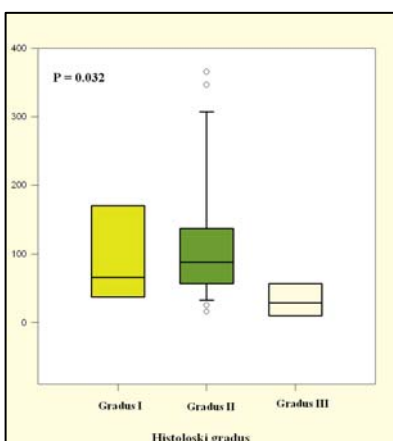
Kod pacijentkinja sa invazivnim karcinomom dojke koje su bile mlađe od 60 godina uočen je statistički značajno viši nivo ekspresije molekula miR-21 u poređenju sa nivom ekspresije molekula miR-21 u uzorcima tumorskog tkiva pacijentkinja starijih od 60 godina, (P=0.036, Mann-Whitney-jev U test) (**Slika 4.10, Tabela 4.7**).



Slika 4.10. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u tkivu invazivnih karcinoma dojke pacijentkinja starijih i mlađih od 60 godina (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, pravougaonici predstavljaju opseg između 25% i 75% medijane. Horizontalna linija predstavlja medijanu).

Pacijentkinje koje su bile u premenopauzi nisu imale statistički značajno različitu ekspresiju molekula miR-21 u odnosu na pacijentkinje u postmenopauzi ($P=0.226$, Mann-Whitney-ev-U test) (**Tabela 4.7**). U uzorcima tumorskog tkiva pacijentkinja sa negativnim statusom limfnih čvorova u poređenju sa uzorcima tumorskog tkiva pacijentkinja sa pozitivnim statusom limfnih čvorova nije utvrđena statistički značajana razlika u ekspresiji molekula miR-21 ($P=0.623$, Mann-Whitney-jev U test) (**Tabela 4.7**).

Uporedna analiza nivoa ekspresije analizirane mikro RNK pokazala je da su najviši nivoi ekspresije detektovani u uzorcima tumora histološkog gradusa 2, dok su tumori histološkog gradusa 3 imali najniže vrednosti ekspresije miR-21 ($P=0.032$, Kruskal-Wallis-ov test, Dunn-ov method) (**Slika 4.11, Tabela 4.8**).



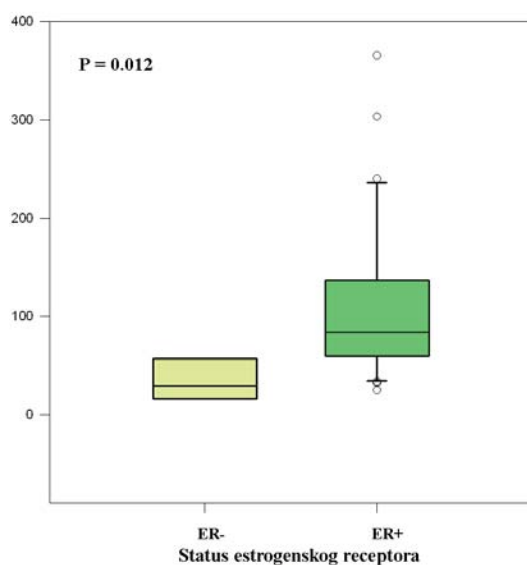
Slika 4.11. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u tumorskom tkivu invazivnih karcinoma podeljenih u grupe na osnovu histološkog gradusa (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, pravougaonici predstavljaju opseg između 25% i 75% medijane. Horizontalna linija predstavlja medijanu).

Tabela 4.8. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u tkivu invazivnih karcinoma dojke histološkog gradusa I, II, III

Histološki gradus	Broj pacijentkinja N (%)	Relativna miR-21 ekspresija	P-vrednost
I	6 (15.4)	66.166 (38.874-150.484)	P = 0.036
II	28 (71.8)	88.472 (58.007-132.133)	
III	5 (12.8)	29.255 (14.718-46.882)	

U prethodnom delu studije pokazano je da postoji korelacija u nivoima ekspresije miR-21 sa proteinskom ekspresijom proteina ER, PR i Her-2, i to kada su se poredili nivo ekspresije u grupama neinvazivnih i invazivnih karcinoma. Zbog toga je ista vrsta analize urađena poređenjem nivoa ekspresije miR-21 i proteinske ekspresije naznačenih proteina u uzorcima tkiva čisto invazivnih i invazivnih karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom.

U tumorskom tkivu sa statusom ER+, ekspresija molekula miR-21 bila je statistički značajno povišena u odnosu na tumore statusa ER- ($P=0.012$, Mann-Whitney-jev U test) (Slika 4.12, Tabela 4.9).

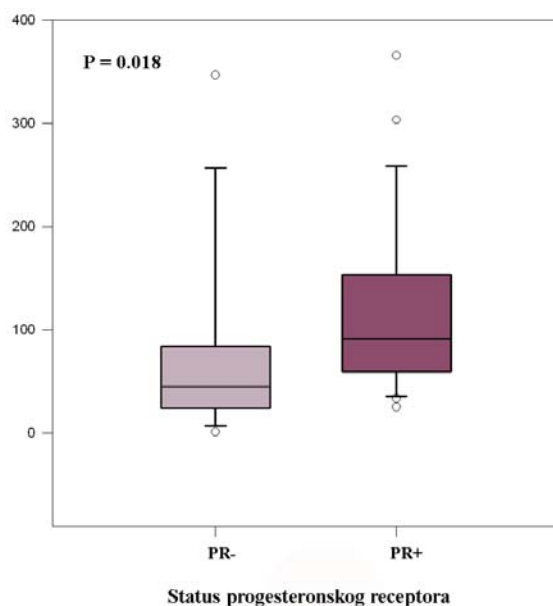


Slika 4.12. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u tumorskom tkivu invazivnih karcinoma podeljenih u grupe na osnovu statusa ER (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, pravougaonici predstavljaju opseg između 25% i 75% medijane. Horizontalna linija predstavlja medijanu).

Tabela 4.9. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u grupama tumorskog tkiva invazivnih karcinoma dojke formiranih na osnovu nivoa ekspresije proteina ER, PR, Her-2 i Ki-67

Status proteinske ekspresije	N (%)	Relativna ekspresija miR-21	P-vrednost
ER status			
ER-	7 (17.9)	29.255 (16.849-51.612)	P = 0.012
ER+	32 (82.1)	83.540 (59.197-132.133)	
PR status			
PR-	13 (33.3)	45.088 (26.764-82.066)	P = 0.018
PR+	26 (66.7)	91.381 (59.467-150.484)	
ER i PR status			
ER-PR-	7 (17.9)	29.255 (16.849-51.612)	P = 0.006
ER+PR-	6 (15.4)	45.088 (28.277-82.066)	
ER+PR+	26 (66.7)	91.381 (59.467-150.484)	
Her-2 status			
Her-2-	27 (69.2)	72.105 (36.102-117.265)	P = 0.308
Her-2+	12 (30.8)	79.946 (58.007-180.459)	
Proliferativni indeks jedarnog proteina Ki-67			
≤20%	19 (48.7)	89.822 (61.777-156.187)	P = 0.027
>20%	20 (51.3)	52.008 (32.358-90.459)	

Invazivni karcinomi dojke sa statusom PR+ imali su povišen nivo ekspresije molekula miR-21 u odnosu na karcinome statusa PR- (P=0.018, Mann-Whitney-jev U test) (Slika 4.13, Tabela 4.9).



Slika 4.13. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u tumorskom tkivu invazivnih karcinoma podeljenih u grupe na osnovu statusa PR (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, pravougaonici predstavljaju opseg između 25% i 75% medijane. Horizontalna linija predstavlja medijanu).

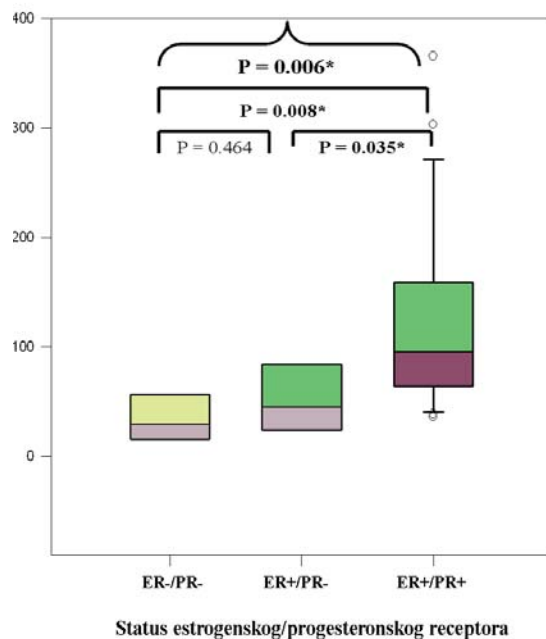
Uporednom analizom invazivnih karcinoma dojke sa statusima ER-/PR- ER+/PR- i ER+/PR+ detektovana je statistički značajna razlika u nivoima ekspresije molekula miR-21, pri čemu je P vrednost iznosila 0.006 (Kruskal-Wallis-ov test, Dunn-ov metod) (Slika 4.14, Tabela 4.9).

Statistički značajno smanjen nivo ekspresije molekula miR-21 uočen je u uzorcima tumorskog tkiva sa statusom ER-/PR- u odnosu na tumore statusom ER+/PR+ (P=0.008, Mann-Whitney-jev U test) (Slika 4.14, Tabela 4.9), dok je statistiki značajno povišen nivo

ekspresije molekula miR-21 zabeležen u tumorskom tkivu statusa ER+/PR+ u odnosu na tumore statusa ER+/PR- (P=0.035, Mann-Whitney-jev U test) (Slika, 4.14 Tabela 4.9).

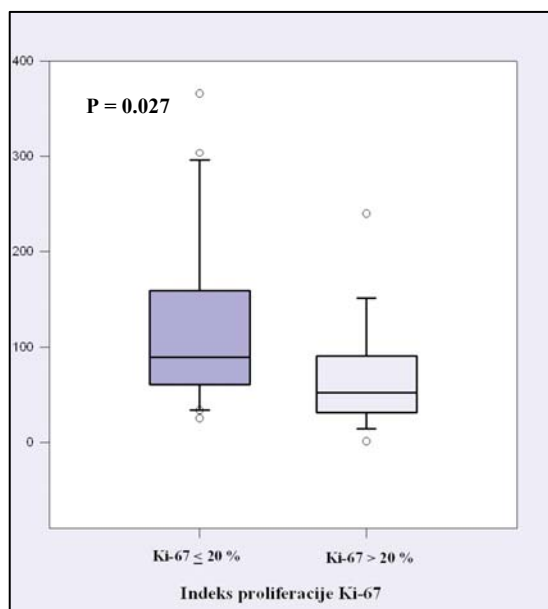
Upoređivanjem nivoa ekspresije molekula miR-21 u uzorcima tumora sa statusom ER+/PR- i statusom ER-/PR- nije uočena statistički značajna razlika.

U analiziranoj grupi invazivnih karcinoma, nije postojala statistički značajna razlika u nivoima ekspresije molekula miR-21 kada su se tumori podeljeni u dve grupe na osnovu imunohistohemijski detektabilnog nivoa proteinske ekspresije Her-2 receptora (Her-2- i Her-2+) (Tabela 4.9).



Slika 4.14. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u tumorskom tkivu invazivnih karcinoma podeljenih u grupe na osnovu statusa ER/PR receptora (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, pravougaonici predstavljaju opseg između 25% i 75% medijane. Horizontalna linija predstavlja medijanu).

U tumorskom tkivu sa vrednostima Ki-67 $\leq 20\%$ detektovan je statistički značajno viši nivo ekspresije molekula miR-21 u odnosu na uzorke tumora sa vrednostima indeksa proliferacije jedarnog proteina Ki-67 $> 20\%$, (P=0.027, Mann-Whitney-jev U test) (**Slika 4.15, Tabela 4.9**).



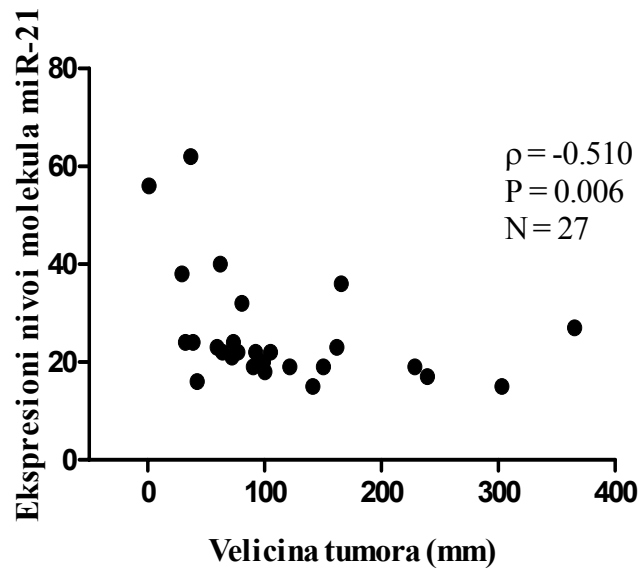
Slika 4.15. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u tumorskom tkivu invazivnih karcinoma podeljenih u grupe na osnovu vrednosti proliferativnog indeksa Ki-67 (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, pravougaonici predstavljaju opseg između 25% i 75% medijane. Horizontalna linija predstavlja medijanu).

4.3.3 Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miR-21 u grupama invazivnih karcinoma dojke formiranih na osnovu vrednosti standardnih dijagnostičkih i prognostičkih parametara -analize korelacije rangova

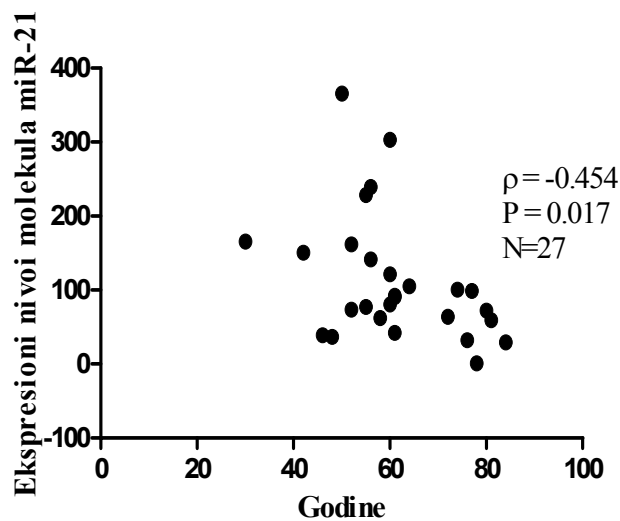
Primenom Spearman-ovg testa dobijena je statistički značajna negativna korelacija između nivoa ekspresije molekula miR-21 kako sa veličinom tumora ($\rho = -0.510$, $P = 0.006$, Spearman-ov test) (Slika 4.16, Tabela 4.10) tako i starosnom dobi pacijentkinja u trenutku postavljanja dijagnoze ($\rho = -0.454$, $P = 0.017$, Spearman-ov test) (Slika 4.17, Tabela 4.10).

Tabela 4.10. Rezultati povezanosti nivoa ekspresije molekula miR-21 i standardnih dijagnostičkih i prognostičkih parametara u tkivu invazivnih karcinoma dojke

Standardni dijagnostički i prognostički parametri	Tip tumora	N	Korelacioni koeficijent	P -vrednost
Godine u trenutku dijagnoze	Invazivni	27	$\rho = -0.454$	P = 0.017
Veličina tumora	Invazivni	27	$\rho = -0.510$	P = 0.006
ER status	Invazivni	27	$\rho = 0.438$	P = 0.022
PR status	Invazivni	27	$\rho = 0.505$	P = 0.007
Proliferativni indeks jedarnog proteina Ki-67	Invazivni	27	$\rho = -0.291$	P = 0.139

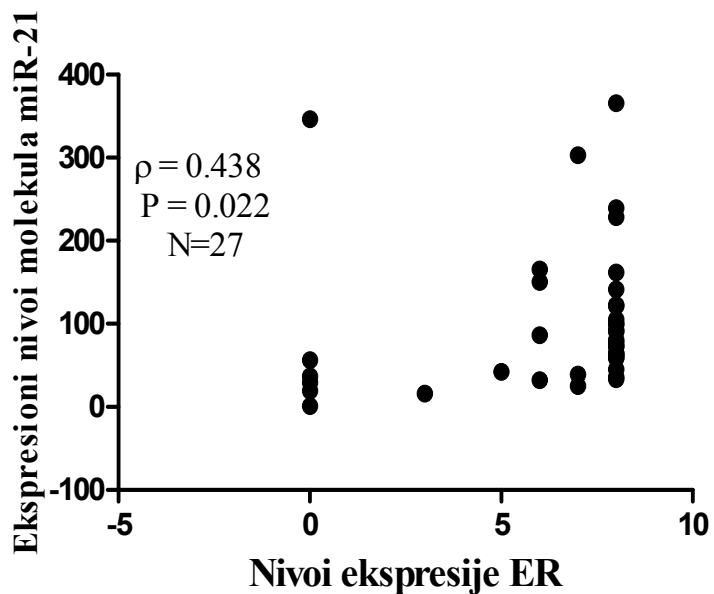


Slika 4.16. Korelacija između nivoa ekspresije molekula miR-21 i veličine tumora kod pacijentkinja sa invazivnim karcinomom dojke (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-2, N-broj uzoraka, P-statističku značajnost, ρ -koeficijent korelacije).

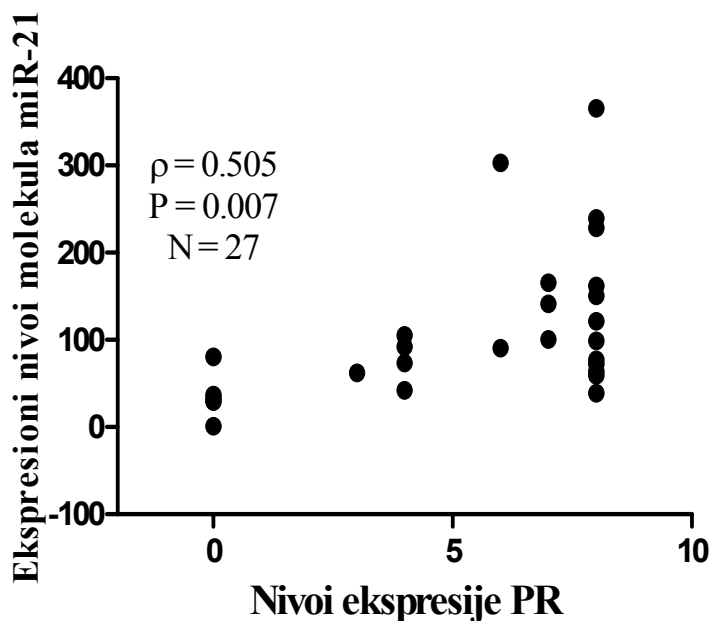


Slika 4.17. Korelacija između nivoa ekspresije molekula miR-21 i životne dobi u trenutku operacije kod pacijentkinja sa invazivnim karcinomom dojke (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, N-broj uzoraka, P-statističku značajnost, ρ -koeficijent korelacije).

Istim testom, pokazana je statistički značajna pozitivna korelacija nivoa ekspresije molekula miR-21 i nivoa ekspresije estrogenskog ($\rho=0.438$, $P=0.022$, Spearman-ov test) (Slika 4.18, Tabela 4.10) i progesteronskog receptora ($\rho=0.505$, $P=0.007$, Spearman-ov test) (Slika 4.19, Tabela 4.10) u grupi analiziranih invazivnih karcinoma dojke.



Slika 4.18. Korelacija između nivoa ekspresije molekula miR-21 i nivoa ekspresije ER u tkivima invazivnih karcinoma dojke (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, N-broj uzoraka, P-statističku značajnost, ρ -koeficijent korelacije).



Slika 4.19. Korelacija između nivoa ekspresije molekula miR-21 i nivoa ekspresije PR u tkivima invazivnih karcinoma dojke (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, N-broj uzoraka, P-statističku značajnost, ρ -koeficijent korelacije).

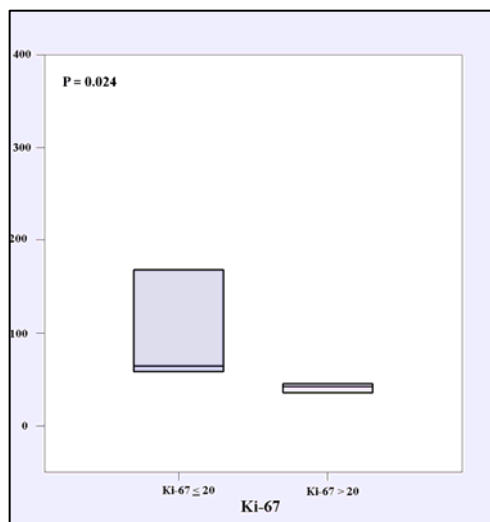
4.4 Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miR-21 u grupi invazivnih karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom formiranih na osnovu vrednosti standardnih dijagnostičkih i prognostičkih parametara

U trećem delu studije analiziran je nivo ekspresije molekula miR-21 kod deset invazivnih karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom. U analiziranoj grupi na osnovu histološkog podtipa, osam IDC-DCIS tumora imalo je više od 30% DCIS komponente i dva IDC-DCIS koji su imali manje od 30% DCIS komponente. Ovo poređenje je rađeno u cilju utvđivanja moguće povezanost nivoa ekspresije molekula miR-21 i procenta zastupljenosti invazivne komponente.

U analizu su uključena još 2 dodatna uzorka invazivnih karcinoma asociiranih sa neinvazivnim, koja nisu bila analizirana u prvoj studiji, zbog niskog procenta DCIS zastupljenosti.

Kada su tumori bili podeljeni u dve grupe u odnosu na nivo ekspresije proteina Her-2, pokazan je statistički trend ka povećanju ekspresije molekula miR-21 u uzorcima tumora sa statusom Her-2 + ($P=0.067$, Mann-Whitney-jev U test).

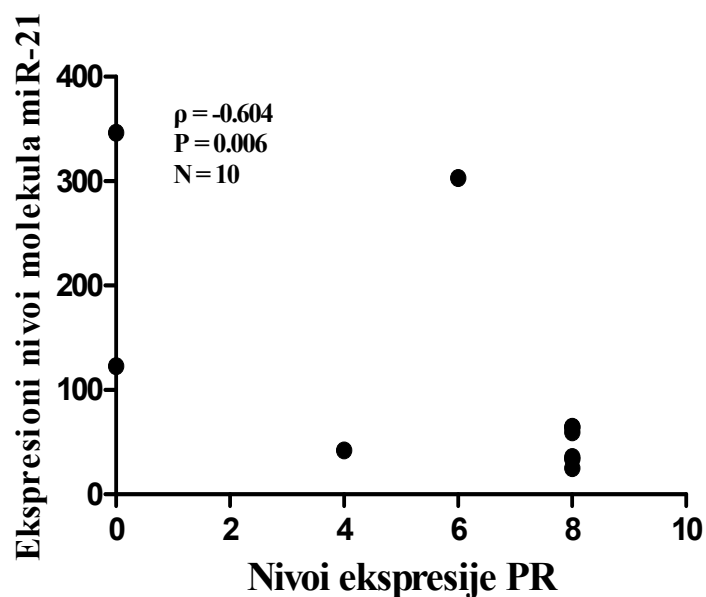
U uzorcima invazivnih karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom koji su imali proliferativni indeks $Ki-67 \leq 20\%$, nivoi ekspresije molekula miR-21 bili su statistički značajno viši u odnosu na tumore sa proliferativnim indeksom $Ki-67$ većim od 20% ($P=0.024$, Mann-Whitney-jev U test) (**Slika 4.20**).



Slika 4.20. Nivoi ekspresije molekula miR-21 u tumorskom tkivu invazivnih karcinoma sa neinvazivnom komponentom podeljenih u grupe na osnovu vrednosti proliferativnog indeksa Ki-67 (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, pravougaonici predstavljaju opseg između 25% i 75% medijane. Horizontalna linija predstavlja medijanu).

Statistički značajna razlika u nivou ekspresiji molekula miR-21 nije uočena kada su inazivni duktalni kacinomi dojke sa *in situ* komponentom podeljeni u dve grupe u odnosu na procentualnu zastupljenost neinvazivne komponente ($\leq 30\%$ i $> 30\%$ zastupljenosti DCIS).

U analiziranoj grupi tumora invazivnih karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom, nivoi ekspresije molekula miR-21 imali su visok stepen negativne korelacije sa statusom PR ($\rho=-0.886$, $P=0.006$, Spearman-ov test) (**Slika 4.21**).



Slika 4.21. Korelacija između nivoa ekspresije molekula miR-21 i nivoa ekspresije PR u tkivima invazivnih karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom (Y osa predstavlja relativni nivo ekspresije molekula miR-21, N-broj uzoraka, P-statističku značajnost, ρ -koeficijent korelacije).

4.5 Značaj ekspresije molekula MiR-21 u nastanku i invaziji karcinoma dojke- *in silico* analiza

U cilju utvrđivanja moguće uloge transkripcionog utišavanja gena posredovanog molekulom miR-21 u procesima neoplastične transformacije ćelija i invazije karcinoma dojke, korišćenjem *on-line* softvera izvršena je *in silico* analiza.

Identifikacija ciljnih gena molekula miR-21 vršena je uz pomoć 5 softvera: TargetScan Human 6.2, microRNA.org, PicTar, miRDB i TarBase (DIANA TOOL). Navedeni softveri pronašli su izuzetno veliki broj gena-kandidata za utišavanje posredovano molekulom mikro RNK-21.

Na osnovu rezultata prethodnih istraživanja (Yang i sar., 2009) za dalju analizu izdvojili smo 5 gena kandidata čija je regulacija ekspresije molekulom miR-21 poremećena u tkivima karcinoma dojke. To su geni *TIMP3*, *PDCD4*, *TPM1*, *PTEN* i *RECK*.

Na osnovu sparivanja na 3' kraju, rasprostranjenosti AU dinukleotida i pozicije ciljnih mesta (Grimson i sar., 2007) četiri od pet korišćenih algoritama izdvojio je gen *TIMP3* kao ciljni gen molekula miR-21. Tri od pet algoritama izdvojilo je gen *PDCD4*, a samo jedan gen *RECK*. Dva od pet analiziranih gena (*PTEN* i *TPM1*) korišćeni softveri nisu prepoznali kao potencijalne ciljne gene molekula miR-21.

5 DISKUSIJA

Karcinomi dojke su veoma kompleksna i heterogena gupa malignih tumora. Epidemiološke studije pokazuju da je karcinom dojke drugi po redu uzrok smrti i da predstavlja gotovo trećinu svih dijagnostikovanih malignih tumora kod žena (Velds i sar., 2006; Jemal i sar., 2010). Obrazac biološkog ponašanja tumora i konačan ishod bolesti još uvek su nepredvidivi zato što se karcinomi dojke razvijaju u nekoliko etapa i pod uticajem brojnih sredinskih i genetičkih faktora (Gail i sar., 1989; Polyak, 2007).

Dugo se smatralo da je progresija karcinoma dojke višestepeni proces koji najpre započinje kao hiperplazija (benigne proliferativne hiperplazije bez atipije ćelija) nakon čega dolazi do razvoja sve agresivnijeg fenotipa preko atipičnih hiperplazija, karcinoma *in situ*, koji tokom vremena progradira u invazivni i metastatski karcinom (Dupont i Page, 1985; Singletary, 2002b). Istraživnja Buergera i saradnika, (1999) i Simpsona i saradnika, (2005) pokazala su da je razvoj tumora u dojci verovatno posledica serije stohastičkih genetičkih i epigenetičkih događaja koji aktiviraju veliki broj različitih signalnih puteva što za posledicu ima formiranje invazivnog karcinoma dojke. Ova dva postavljena modela ne isključuju jedan drugi, već ukazuju na postojanje različitih mehanizama nastanka i progresije karcinoma dojke i upućuju na individualnost same bolesti. Iz tog razloga, pored već dobro opisanih bioloških markera koji predstavljaju standardne dijagnostičke i prognostičke parametre karcinoma dojke, kao što su statusi proteina ER, PR, Her-2 i Ki-67, neophodno je definisati dodatne biološke markere koji bi se koristili u dijagnostici i lečenju pacijentkinja ponaosob u okviru personalizovane medicine.

Osnovna histološka podela karcinoma dojke vrši se na osnovu njihove invazivnosti i po tome da li potiču od ćelija koje oblažu duktuse ili lobuluse. Na osnovu ovih kriteijuma, izdvojile po dve najučestalije forme *in situ* (DCIS i LCIS) i invazivnih karcinoma dojke (IDC i ILC). Osim navedenih osnovnih histoloških tipova, postoje i različiti histološki podtipovi invazivnih karcinoma dojke asociranih sa neinvazivnom komponentom (IDC-DCIS, ILC-LCIS i ILC-IDC). U veoma retkim slučajevima patohistološki se dijagnostikuju

i mešoviti *in situ* karcinomi sa lobularnom i duktalnom komponentom (udruženost LCIS i DCIS) (Li, 2003).

Invazivni ili infiltrirajući karcinom dojke predstavlja najčešću formu maligne bolesti dojke kod žena (Verkooijen i sar., 2003). Osnovna karakteristika invazivnog karcinoma je sposobnost da probije bazalnu laminu i da se raširi u okolno tkivo, što se definiše kao invazivnost (Bair i sar., 2005). Pored invazivnosti, ove tipove karcinoma dojke karakteriše i sposobnost da metastazira u udaljena tkiva i organe (Ma i Weinberg, 2008; Xia, 2010). Određen broj invazivnih karcinoma dojke poseduje i neinvazivnu komponentu. Sa druge strane, neinvazivni, *in situ* karcinomi dojke su grupa malignih tumora bez invazivnog potencijala i sposobnosti metastaziranja (Velds i sar., 2006). To je razlog što brojni istraživači *in situ* tumore dojke ne svrstavaju u maligne tumore, već u premaligne lezije dojke (Berman i sar., 2010). Do danas nisu poznati mehanizmi kojim neoplastično transformisane ćelije dojke stiču sposobnost invazije. Takođe ostaje nepoznato da li od neizmenjenih ćelija dojke direktno nastaju neoplastično transformisane koje imaju sposobnost invazije ili prvo nastaju neinvazivne ćelije koje sposobnost invazije stiču kasnije (Leonard i Swain, 2004).

Iako patogeneza malignih tumora dojke još uvek nije rasvetljena, na osnovu rezultata epidemioloških i eksperimentalnih studija smatra se da je glavni faktor rizika za njihov nastanak nivo izloženosti estrogenu (Travis i Key, 2003). Dugi niz godina u medikamentoznom lečenju karcinoma dojke isključivo su se koristili citostatici. Nakon otkrića uloge receptora za estrogen u neoplastičnoj transformaciji epitelijalnih ćelija dojke, počela je i upotreba antagonista ovog receptora u lečenju karcinoma dojke. Poslednjih dvadeset godina, pristup tretmanu ovih pacijentkinja evoluirao je u smeru biološke imunske terapije, pre svega korišćenjem monoklonskih antitelija (anti-Her-2 receptora, npr.) (Tinoco, 2013). I pored svih napredaka u strategijama lečenja karcinoma dojke adjuvantna endokrina terapija (antiestrogena terapija) i dalje predstavlja terapiju izbora u lečenju karcinoma dojke sa pozitivnim statusom za ER (Burstein i sar., 2010). Međutim, osnovni problem u primeni antiestrogene terapije je česta rezistencija na tamoksifen, koja se razvija *de novo*, ili stiče

tokom upotrebe ovog leka (Dorssers i sar., 2001). Rezistencija na aniestrogeneru terapiju kao i ograničen domet imunske terapije su razlozi sto se danas intezivno radi na otkriću novih pristupa u lečenju karicnoma dojke. Ova istraživanja za cilj imaju otkriće novih preciznijih bioloških markera neoplastično transformisanih ćelija dojke koji bi se koristili ne samo kao dijagnostički i prognostički parametri bolesti već i kao targeti novih strategija genske terapije.

Pretpostavlja se da je inicijalna faza neoplastične transformacije posledica genetičkih i epigenetičkih poremećaja u jednoj ćeliji. Akumulacijom dodatnih genetičkih i epigenetičkih promena i kombinovanjem sa ekspanzijom i selekcijom klonova ćelija započinje proces progresije tumora kojom on stiče osobinu invazivnosti i sposobnost metastaziranja. U cilju razmevanja ovih složenih procesa, brojne grupe istraživača su za temu svojih istraživanja imali upoređivanje *in situ*, invazivne i metastatske forme karcinoma dojke u cilju definisanja genetičkih markera specifičnih za određen stadijum (*in situ*, invazivni, metastatski) bolesti (Allinen i sar., 2004; Polyak i Hu, 2005; Polyak, 2007). I pored brojnih otkića vezanih za molekularnu osnovu patogeneze karcinoma dojke, procesi odgovorni za tranzicija DCIS u invazivni karcinom koji imaju i presudan efekat na tok i ishod bolesti ostaju i dalje nedovoljno poznati (Allinen i sar., 2004; Polyak i Hu, 2005; Polyak, 2007).

Poslednjih godina, sve je više rezultata eksperimentalnih studija koje govore u prilog značaja poremećaja u procesima transkripcinog utišavanja gena fenomenom RNK interferencije u procesima odgovornim za razvoj i progresiju karcinoma dojke (Pan i sar., 2010). Do danas je identifikovano na desetine molekula mikro RNK čije se promene u strukturi i funkciji dovode u vezu sa procesima neoplastične transformacije. Jedna od njih je i molekul miR-21, koja pokazuje snažan onkogeni potencijal (Yan i sar., 2008; Qian i sar., 2008; Huang i Yang, 2009; Kumar, 2013; Li i sar., 2013). Dosadašnja istraživanja pokazuju da promene u nivou ekspresije molekula miR-21 mogu predstavljati biološki marker procesa odgovornih za invazivnost karcinoma dojke (Zhu i sar., 2008; Huang i Yang, 2009; Song i sar., 2010; Petrović i sar., 2014a).

Upravo zbog toga, prvi cilj naše studije bio je ispitivanje razlika u nivou ekspresije molekula miR-21 u neinvazivnim (*in situ*), invazivnim karcinomima sa neinvazivnom komponentom i čistim invazivnim karcinomima dojke, a u cilju ispitivanja potencijalne uloge molekula miR-21 u procesima invazivnosti karcinoma dojke.

U odnosu na nivo ekspresije u neizmenjenom tkivu dojke, nivo ekspresije molekula miR-21 u uzorcima tkiva invazivnih karcinoma sa neinvazivnom komponentom kao i čistih invazivnih karcinoma bio je značajno viši. Pored toga, izmereni nivoi ekspresije molekula miR-21 bili su značajno viši i u invazivnim karcinomima (bilo da su čisti invazivni ili da su asocirani sa neinvazivnom komponentom) u poređenju sa nivoima ekspresije u neinvazivnim (*in situ*) karcinomima dojke. Dobijeni rezultati potvrđuju biološki značaj molekula miR-21 sa onkogenim potencijalom u procesima koji dovode do invazivnosti karcinoma dojke.

Manja razlika u nivoima ekspresije molekula miR-21 između neinvazivnih i invazivnih karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom nego između neinvazivnih i čistih invazivnih karcinoma dojke još jednom ukazuje na to da je tranzicija neinvazivnog u invazivni fenotipa verovatno postepen proces (Chagpar i sar., 2009). Istovremeno, dobijeni rezultat o odustvu statistički značajne razlike u ekspresiji molekula miR-21 u uzorcima neizmenjenog tkiva dojke i neinvazivnih karcinoma dojke ukazuje na to da poremećaji u transkripcionm utišavanju gena od strane molekula onkogene mikro RNK, miR-21, verovatno nisu uključeni u rane, inicijalne, faze neopstične transformacije epitelijalnih ćelija dojke.

Sa druge strane, nivo ekspresije molekula miR-21 koji je značajno ali postepeno povišen u invazivnim karcinomima sa neinvazivnom komponentom i invazivnim karcinomima dojke, ukazuje na moguću ulogu molekula miR-21 u sticanju invazivnog potencijala ćelija u već formiranom tumoru, što bi značilo da jedan broj *in situ* tumora povećanjem nivoa ekspresije onkogenih molekula miR-21 dobijaju odlike invazivnih

karcinoma odnosno da određen broj invazivnih karcinoma dojke potiče od *in situ* karcinoma.

I ostali rezultati ove studije potvrđuju pretpostavku o značaju ekspresije molekula miR-21 u procesima odgovornim za invazivnost karcinoma dojke. Naime, kod pacijentkinja starijih od 50 godina trend ka višim nivoima ekspresije molekula miR-21 u grupi invazivnih tumora u odnosu na invazivne sa neinvazivnom komponentom. Takođe, efekat povišene ekspresije molekula miR-21 u invazivnosti ogleda se i u tome što su premenopauzalne pacijentkinje sa neinvazivnim karcinomom imale značajno niži nivo ekspresije molekula miR-21 od pacijentkinja sa invazivnim karcinomom dojke. Na kraju, invazivni tumori sa neinvazivnom komponentom imali su značajno niži nivo ekspresije molekula miR-21 od invazivnih tumora i u grupama histološkog i nukleusnog gradusa 2.

Naši rezultati pokazali su da su nivoi ekspresije molekula miR-21 kod invazivnih karcinoma asociраних sa neinvazivnom komponentom (IDC-DCIS) viši od ekspresije kod neinvazivnih karcinoma (DCIS), a niži nego kod čistih invazivnih karcinoma dojke. Ovakav obrazac ekspresije molekula miR-21 ide u prilog onim istraživačima koji invazivne duktalne karcinome asociраних sa neinvazivnom komponentom izdvajaju kao posebnu grupu tumora i ukazuje na mogućnost da oni predstavljaju prelazni stadijum u nastanku invazivnih tumora, odnosno ide u prilog hipotezi o višestepenoj progresiji tumora dojke (Velds i sar., 2006; Wong i sar., 2010). Međutim, pitanje na koje još nema odgovora je da li se čisti invazivni karcinomi dojke isključivo razvijaju od *in situ* formi tumora ili nastaju *de novo* (Farabegoli i sar., 2002; Wong i sar., 2010).

Nakon određivanja nivoa ekspresije molekula miR-21 našu pažnju smo usmerili na istraživanje moguće povezanosti ekspresije molekula miR-21 sa nivoom proteinske ekspresije receptora za estrogen (ER), progesteron (PR), humani epidermalni faktor rasta 2 receptor (Her-2) i proliferativnim indeksom (Ki-67) u neinvazivnim, invazivnim sa neinvazivnom komponentom i invazivnim karcinomoma dojke.

U grupi tumora sa statusom ER+, najviši nivo ekspresije molekula miR-21 detektovan je u uzorcima invazivnih, a najniži u uzorcima neinvazivnih karcinoma dojke. Ovaj rezultat bio je i očekivan jer je ekspresija molekula miR-21 u pozitivnoj korelaciji sa proteinskom ekspresijom ER kod invazivnih karcinoma dojke, ali nije u korelaciji sa nivoima proteinske ekspresije ER kod neinvazivnih karcinoma dojke. Visok nivo korelacije u ekspresiji proteina ER i gena koji kodira miR-21 kod invazivnih karcinoma detektovan je i u istraživanjima (Mattie i sar., 2006).

Po prvi put u ovoj studiji istraživana je korelacija nivoa ekspresije molekula miR-21 i proteinske ekspresije progesteronskog receptora. Rezultati naše studije pokazuju da je najniži nivo u ekspresiji molekula miR-21 detektovan u uzorcima invazivnih karcinoma asociranih sa neinvazivnim kod kojih je imunohistohemijski detektovna proteinska ekspresija PR. Istovremeno, najviši nivo ekspresije molekula miR-21 detektovan je u uzorcima invazivnih tumora kod kojih je ekspresiran i PR.

Rezultat da je najmanji nivo ekspresije molekula miR-21 u analiziranoj grupi invazivnih karcinoma detektovan kod onih uzoraka u kojima imunohistohemijski nije detektovana ni ekspresija ER ni PR ukazuje na mogućnost da je „invazivni karakter“ onkogene miR-21 u pozitivnoj korelaciji sa nivoom ekspresije proteina ER i PR. Ovakav rezultat čini opravdanim dalja istraživanja koekspresije miR-21 i ekspresije receptora za steroidne hormone koji danas predstavljaju standarne dijagnostičke i prognostičke parametre karcinoma dojke.

U uzorcima invazivnih karcinoma kod kojih nije detektovana proteinska ekspresija Her-2 receptora, zabeležen je statistički trend ka višim nivoima ekspresije molekula miR-21 u odnosu na uzorke invazivnih karcinoma asociranih sa neinvazivnim, što ukazuje da u nekim slučajevima invazivni fenotip koji nastaje kao posledica ekspresije molekula miR-21 molekula može biti i Her-2 zavisna. Do sličnih rezultata došli su i (Huang i Yang, 2009) tokom istraživanja invazivnih duktalnih karcinoma dojke. (Berman i sar., 2010) pokazali

su da je prekomerna ekspresija proteina Her-2, odnosno amplifikacija njegovog gena značajna molekularna karakteristika invazivnih karcinoma dojke visokog gradusa.

Eksperimentalna istraživanja *in vitro* pokazala su da je u kulturi ćelija nivo ekspresije molekula miR-21 u pozitivnoj korelaciji sa ekspresijom proteina Her-2 i da je ta povišena ekspresija posledica deregulacije signalnog puta MAP kinaza čiji je član i receptor Her-2 (Huang i sar., 2009). Isti istraživači pokazali su da molekul miR-21 blokira translaciju *PDCD4* iRNK u Her-2 pozitivnim ćelijama karcinoma dojke. Njihovi rezultati ukazuju na to da aktivirani receptor Her-2 preko signalnog puta MPA kinaza ima pozitivan efekat na ekspresiju gena koji kodira miR-21 i posledično indukuje invaziju maligno transformisanog tkiva dojke.

U okolini gena koji kodira miR-21 nalazi se veliki broj regulatornih elemenata za veliki broj različitih regulatornih proteina (Fujita i sar., 2008). To navodi na zaključak da ekspresija molekula miR-21 nije isključivo zavisna od signalnog puta posredovanog aktivnošću receptora Her-2. To je verovatno razlog što su dosadašnji rezultati eksperimentalnih studija o ulozi receptora Her-2 u regulaciji ekspresije gena koji kodira miR-21 nekoherentni (Fujita i sar., 2008; Huang i Yang, 2009; Huang i sar., 2009; Petrović i sar., 2014b).

U selektovanoj grupi uzoraka tumorskog tkiva koji imaju proliferativni indeks $Ki-67 \leq 20\%$, pronađena je statistički značajno povišena ekspresija molekula miR-21 u uzorcima invazivnih karcinoma kada je ona poređena sa nivoom ekspresije u tkivnim uzorcima invazivnih karcinoma asociranih sa neinvazivnim. To može biti posledica agresivnijeg fenotipa čistih invazivnih tumora, kao što je pokazano i u istraživanjima (Qian i sar., 2008; Huang i Yang, 2009).

U grupi čistih invazivnih karcinoma dojke, u tumorskom tkivu indeksa proliferacije $Ki-67 > 20$ uočen je statistički značajno niži nivo ekspresije molekula miR-21 u poređenju sa tumorskim tkivom čiji je indeksa proliferacije iznosio $Ki-67 \leq 20$. Ovaj rezultat je u

suprotnosti sa rezultatima istraživanja Huang-a i Yang-a, (2009). Ovakvi različiti rezultati ukazuju na to da su ekspresije molekula miR-21 i jedarnog proteina Ki-67 verovatno nezavisni događaji tokom neoplastične transformacije epitelijalnih ćelija dojke.

Iorio, (2005) je pokazao da veličina tumora nije u korelaciji sa nivoom ekspresije molekula miR-21. U našim istraživanjima, pokazano je da je ekspresija molekula miR-21 viša u manjim tumorima (manjim ili jednakim 2 cm). Takođe, i prema istraživanjima Li i saradnika, (2013), manji tumori imaju više nivoe ekspresije molekula miR-21. Ovaj rezultat može izgledati paradoksalno u svetlu činjenice da je veličina tumora klinički pokazatelj lošije prognoze karcinoma dojke (Cianfrocca, 2004). Međutim, prema Li i saradnicima, (2013) tumori manjeg dijametra mogu biti agresivniji od tumora većeg dijametra, naročito ukoliko imaju pozitivan status limfnih čvorova i eksprimiran protein Her-2.

U grupi pacijentkinja obuhvaćenih našom studijom pokazano je da je ekspresija molekula miR-21 u negativnoj korelaciji sa starošću pacijentkinja u trenutku postavljanja dijagnoze karcinoma dojke. Poznato je da karcinomi dojke kod mlađih pacijentkinja mogu biti agresivniji i da imaju veći metastatski Takodje, u mlađih pacijentkinja viši nivoi estrogena i progesterona verovatno utiču i na prekomernu ekspresiju molekula miR-21. Rezultati naše studije pokazuju da je nivo ekspresije molekula miR-21 u negativnoj korelaciji sa starošću pacijentkinja sa invazivnim karcinomima. što ukazuju da je invazivni potencijal miR-21 veći što su pacijentkinje u mlađoj životnoj dobi. (Qian i sar., 2008) takođe su pokazali da je nivo ekspresije molekula miR-21 u negativnoj korelaciji sa starošću pacijentkinja sa karcinomom dojke.

Još jedan paradokasni rezultat našeg istraživanja je taj da nivo ekspresije molekula miR-21 raste od uzoraka tumora histološkog gradusa I ka tumorima gradusa II, a potom opada u uzorcima tumora histološkog gradusa III. Međutim, ovakav obrazac promene u nivou ekspresije molekula miR-21 u zavisnosti od histološkog gradusa tumora ima svoju biološku opravdanost. Transkripciono utišavanje posredovano miR-21 vrlo je intenzivno tokom procesa odgovornih za ćelijsku diferencijaciju (Kim i sar., 2009). Možda je činjenica

da su ćelije tumora gradusa III najmanje podložne procesima diferencijacije i razlog smanjenog nivoa ekspresije molekula miR-21 u odnosu da tumorske uzorke gradusa I i II čije su ćelije diferentovanijeg fenotipa. Takođe, uticaj molekula miR-21 bi mogao biti ograničen na određene faze tokom progresije tumora odnosno da nivo ekspresije molekula miR-21 raste, do trenutka kada tumor stiče invazivni potencijal i da nakon toga opada. Ova pretpostavka potkrepljena je i rezultatima drugih eksperimentalnih studija. Kim i saradnici, (2009) su pokazali da miR-21 ima prolazni obrazac ekspresije tokom diferencijacije adipocita u uslovima *in vitro*. Pored toga, nivoi ekspresije molekula miR-21 bili su u pozitivnoj korelaciji sa verovatnoćom pojave recidiva kod pacijentkinja sa tumorima dojke stadijuma I i II, u odnosu na pacijentkinje sa stadijumom III i IV (Qian i sar., 2008).

U analiziranoj grupi tumora, nivo ekspresije molekula miR-21 nije u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa statusom limfnih čvorova. Status limfnih čvorova podrazumeva prisustvo (+) odnosno odsustvo (-) metastatskih ćelija u limfnim žlezdama okolnog tkiva. Ovaj rezultat je u suprotnosti sa rezultatima Huang-a i Yang-a, (2009) koji su pokazali da je nivo ekspresije molekula miR-21 u pozitivnoj korelaciji sa pozitivnim statusom limfnih čvorova. Ova nekonzistentnost u dobijenim rezultatima verovatno je posledica relativno malog broja uzoraka obuhvaćenih našom studijom, naročito u korelaciji sa drugim dobijenim rezultatima koji idu u prilog činjenici da je ekspresija molekula miR-21 u korelaciji sa invazivnim potencijalom karcinoma dojke.

Uporednom analizom podgrupa tumora sa različitim statusom ER i PR pokazano je da je nivo ekspresije molekula miR-21 bio viši u uzorcima tumora koji imaju i eksprimirane steroidne receptore (ER+, PR+ i ER+/PR+). Uočena razlika u nivoima ekspresije molekula miR-21 između tumora sa statusom ER+/PR+, ER+/PR- i ER-/PR-, ukazuje na potencijalni značaj kvantifikacije nivoa ekspresije molekula miR-21 naročito u grupi tumora kod kojih je eksprimiran estrogenski ali ne i progesteronski receptor. Poznato je da tumori sa statusom ER+/PR- imaju lošiji odgovor na standardnu terapiju tamoksifenom (Arpino i sar., 2005; Mattie i sar., 2006). To je razlog što nivo ekspresije molekula miR-21, osim što je okarakterisan kao faktor invazivnosti, može biti i biološki

marker koji bi se koristio za procenu rizika za pojavu recidiva kod karcinoma dojke sa statusom ER+/PR-.

Na osnovu činjenice da nije postojala značajna razlika u ekspresiji molekula miR-21 u uzorcima duktalnih i lobularnih invazivnih karcinoma može se zaključiti da je nivo ekspresije molekula miR-21 nezavisan od histološkog podtipa čistih invazivnih karcinoma dojke.

U dijagnostici i lečenju karcinoma dojke, identifikacija invazivnog potencijala duktalnih neinvazivnih karcinoma dojke predstavlja veliki izazov. Još uvek ne postoji definitivni odgovor na pitanje da li određen broj DCIS ostaje neinvazivan zato što ne dobiju invazivni potencijal, ili zbog toga što DCIS po pravilu veoma sporo napreduje i raste (Leonard i Swain 2004). Na osnovu rezultata ovog rada, nivo ekspresije molekula miR-21 predstavlja potencijalni biološki marker invazivnosti koji bi se koristio u predikciji rizika za razvoj invazivnog fenotipa *in situ* karcinoma dojke.

U ispitivanom uzorku tumora u okviru ove studije nije bilo lobularnog neinvazivnog karcinoma (LCIS lobularni karcinom *in situ*) što nije neobično jer je ovaj histološki tip znatno ređi od dukalnog. Upravo zbog toga, bilo bi od značaja da se u budućim istraživanjima ispita nivo ekspresija molekula miR-21 i u ovom tipu karcinoma.

Rezultati naše studije pokazali su da procenat zastupljenosti DCIS (neinvazivne) komponente ne korelira sa nivoima ekspresije molekula miR-21 (kao biološkim markerom invazivnosti), i proteina Ki-67 (kao markera proliferativnog kapaciteta tumorskog tkiva). Pored toga nije utvđena korelacija procenta zastupljenosti DCIS komponente ni sa nivoom ekspresije proteina ER i PR kao ni sa godištem pacijentkinja. Procenat zastupljenosti DCIS komponente, u analiziranoj grupi tumora, bio je jedino u visoko pozitivnoj korelaciji sa veličinom tumora. Dalja statistička analiza ovih specifičnih bioloških entiteta pokazala je još jednu interesantnu osobinu ovih karcinoma. Naime, rezultati naše studije pokazali su da je nivo ekspresije molekula miR-21 čistih invazivnih karcinoma u visoko pozitivnoj

korelaciji sa nivoom ekspresije ER i PR ($\rho = 0.438$, $P = 0.022$ i $\rho = 0.505$, $P = 0.007$, respektivno), dok je nivo ekspresije molekula miR-21 u grupi invazivnih karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom bio u visoko negativnoj korelaciji samo sa nivoom ekspresije proteina PR ($\rho = -0.866$, $P = 0.006$). Ovi rezultati ukazuju na to da se invazivni karcinomi dojke asocirani sa neinvazivnim ponašaju kao jedinstveni entiteti, nezavisno od prisustva *in situ* komponente i različito od čistih invazivnih karcinoma dojke.

Sa aspekta invazivnosti procenjivanog nivoom ekspresije molekula miR-21, invazivni tumori asocirani sa neinvazivnim ponašaju se sličnije invazivnim nego neinvazivnim karcinomima dojke. Međutim, u uzorcima IDC-DCIS, nije pokazana korelacija između nivoa ekspresije molekula miR-21 sa starošću pacijentkinja i veličinom tumora, za razliku od čistih invazivnih koji imaju negativnu korelaciju oba parametra sa nivoom ekspresije molekula miR-21.

Asocijacija u nivoima ekspresije Ki-67 i miR-21 kod IDC-DCIS ista je kao i kod čistih invazivnih. Nema korelacije između ekspresije molekula miR-21 i ER u uzorcima tumora IDC-DCIS, dok se kod tumorskog tkiva čistih invazivnih karcinoma dojke uočava visok stepen pozitivne korelacije. Takođe, kod IDC-DCIS postoji trend ka većoj ekspresiji molekula miR-21 u uzorcima tumora kod kojih je detektovana i ekspresija proteina Her-2, dok kod čistih invazivnih ne postoji značajna razlika u nivou ekspresije ove onkogene mikro RNK između tumora sa statusom Her-2⁻ u odnosu na tumore sa statusom Her-2⁺. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da se invazivni asocirani sa neinvazivnim karcinomima iako morfološki slični sa čistim invazivnim na molekulskom nivou ponašaju kao zasebni entiteti. Karcinomi dojke IDC-DCIS retko su izučavni kao posebne grupe tumora dojke već su obično analizirani zajedno sa čistim invazivnim. Međutim, oni se na osnovu nivoa ekspresije molekula miR-21 i njegove udruženosti sa drugim standardnim dijagnostičkim i prognostičkim parametrima karcinoma dojke značajno razlikuju.

Rezultati brojnih istraživanja pokazali su da je molekul miR-21 prekomerno ekspimiran u raznim tumorima u odnosu na neizmenjena tkiva, ali se ne može sa

sigurnošću tvrditi da li molekul miR-21 učestvuje u nekom od signalnih puteva vezanih sa neoplastičnu transformaciju (Iorio, 2005; Huang i Yang, 2009; Lee i sar., 2011). Proteinski produkti gena *PDCD4* i *PTEN*, kao 2 od 5 najznačajnijih ciljnih gena molekula miR-21 uključeni su u procese odgovorne za proliferaciju ćelija, blokiranje procesa ćelijskog umiranja po tipu apoptoze i stimulaciju tumor-promovišuće inflamacije. Svi ovi procesi odgovorni su i za propagaciju i progresiju tumora (Hanahan i Weinberg, 2011; Buscaglia, 2011). Stoga se postavlja pitanje da li se ekspresija molekula miR-21 uvećala nakon formiranja neoplazije ili tokom inicijacije neoplastične transformacije ćelija. Zato je jedan deo naših istraživanja bio usmeren ka izdvajanju već opisanih targeta mikro RNK-21 i njihove uloge u različitim fazama nastanka i progresije karcinoma dojke, i to na osnovu eksperimentalnih rezultata o nivoima ekspresije molekula miR-21, rezultata drugih eksperimentalnih istraživanja i *in silico* analize njenih potencijalnih ciljnih gena.

Na osnovu *in silico* analize *TIMP3*, *RECK* i *PDCD4* iRNK su izdvojeni kao najznačajniji ciljni molekuli koje prepoznaje molekul miR-21 u tumorima dojke. Svakako, predikcija *in silico* analizom ima i svoja ograničenja i neophodno je ekperimentalno potvrditi ove rezultate. Za *TIMP3* i *TPM1* je već pokazano da su i u *in vitro* uslovima potencijalni ciljni geni molekula miR-21 (Qi i sar., 2009).

Ključ u rešavanju problema vezanih za invazivni potencijal karcinoma dojke, verovatno leži u razumevanju njegove heterogenosti ne samo na histološkom, već i na ćelijskom nivou. Otkrića vezana za molekulsku osnovu procesa invazivnosti karcinoma dojke predstavljaju dobru osnovu i za otkriće novih bioloških parametara koji bi se kao nestandardni prognostički parametri koristili u dijagnostici i lečenju karcinoma dojke. Istovremeno to bi bio i osnov za kreiranje novih terapijskih pristupa u okviru personalne medicine. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da je molekul miR-21 jedan od bioloških molekula sa potencijalnom primenom u molekularnoj dijagnostici i translacionom lečenju karcinoma dojke.

6 ZAKLJUČCI

1. Nivo ekspresije molekula miR-21 predstavlja potencijalni biološki marker invazivnosti karcinoma dojke.
2. U analiziranoj grupi tumora, invazivni lobularni i invazivni duktalni karcinomi dojke se ne razlikuju prema detektovanim nivoima ekspresije molekula miR-21, što ukazuje na to da bi nivo ekspresije molekula miR-21 mogao predstavljati univerzalni faktor invazivnosti karcinoma dojke.
3. Odustvo statistički značajne razlike u nivoima ekspresije molekula miR-21 u uzorcima neizmenjenog tkiva i neinvazivnih karcinoma dojke ukazuje na to da poremećaji u regulaciji ekspresije gena posredovanih molekulom miR-21 nisu molekularno-biološki događaji odgovorni za inicijalnu fazu neoplastične transformacije epitelijalnih ćelija dojke.
4. Razlike u nivoima ekspresije molekula miR-21 u uzorcima neinvazivnih i invazivnih karcinoma dojke sa neinvazivnom komponentom ukazuju na moguću biološku ulogu molekula miR-21 u procesima u kojima *in situ* karcinomi stiču osobine invazivnih karcinoma.
5. U grupi analiziranih invazivnih karcinoma dojke asociranih sa neinvazivnim nivo ekspresije molekula miR-21 je u negativnoj korelaciji sa nivoom ekspresije proteina PR, čime se potvrđuje njihova različitost od čistih invazivnih karcinoma dojke.
6. Rezultat da u analiziranoj grupi čistih invazivnih karcinomima dojke postoji visok stepen pozitivne korelacije između nivoa ekspresije molekula miR-21 sa nivoom ekspresije proteina ER i PR, ukazuje na to da nivo ekspresije molekula miR-21 može predstavljati nestandardni prognostički parametar karcinoma dojke koji bi se

koristio u odabiru adekvatne terapije za svaku pacijentkinju sa karcinomom dojke ponaosob.

7. Molekul miR-21 je potencijalni biološki marker koji može predstavljati nestandardni dijagnostički i prognostički parametar kacinoma dojke.

7 LITERATURA

- Alan D, Zakia S, Douglas BC, Jamil (2011) In silico Analysis of Combinatorial microRNA Activity Reveals Target Genes and Pathways Associated with Breast Cancer Metastasis. *Cancer Informatics* 10:13-29. doi:10.4137/cin.s6631
- Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K (2004) Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 6 (1):17-32. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.010
- Anderson E (2002) The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis (2002). *Breast Cancer Research* 4:197-201.
- Andrade VP, Ostrovskaya I, Seshan VE, Morrogh M, Giri D, Olvera N, De Brot M, Morrow M, Begg CB, King TA (2012) Clonal relatedness between lobular carcinoma in situ and synchronous malignant lesions. *Breast Cancer Research* 14 (4):R103. doi:10.1186/bcr3222
- Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, Elledge RM (2005) Estrogen Receptor-Positive, Progesterone Receptor-Negative Breast Cancer: Association With Growth Factor Receptor Expression and Tamoxifen Resistance. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 97 (17):1254-1261. doi:10.1093/jnci/dji249
- Bair EL, Chen ML, McDaniel K, Sekiguchi K, Cress AE, Nagle RB, Bowden GT (2005) Membrane Type 1 Matrix Metalloprotease Cleaves Laminin-10 and Promotes Prostate Cancer Cell Migration. *Neoplasia* 7 (4):380-389. doi:10.1593/neo.04619
- Baker AH, Zaltsman AB, Murphy G, and Newby AC. (1999) Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *British Journal of Cancer* 79 (9):1347–1355. doi:10.1038/sj.bjc.6690217
- Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC (1998) Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro - TIMP-3 promotes apoptosis. *Journal of Clinical Investigation* 101 (6):1478-1487. doi:10.1172/Jci1584

- Ballard-Barbash R, Hunsberger S, Alciati MH, Blair SN, Goodwin PJ, McTiernan A, Wing R, Schatzkin A (2009) Physical Activity, Weight Control, and Breast Cancer Risk and Survival: Clinical Trial Rationale and Design Considerations. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 101 (9):630-643. doi:10.1093/jnci/djp068
- Barsky S, Karlin N (2005) Myoepithelial Cells: Autocrine and Paracrine Suppressors of Breast Cancer Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10 (3):249-260. doi:10.1007/s10911-005-9585-5
- Barsky SH (2003) Myoepithelial mRNA expression profiling reveals a common tumor-suppressor phenotype. *Experimental and Molecular Pathology* 74 (2):113-122. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4800(03)00011-X
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136 (2):215-233. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002
- Beresford MJ, Wilson GD, Makris A (2006) Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. *Breast Cancer Research* 8 (6):216. doi:bcr1618 [pii]10.1186/bcr1618
- Berman HK, Gauthier ML, Tlsty TD (2010) Premalignant Breast Neoplasia: A Paradigm of Interlesional and Intralesional Molecular Heterogeneity and Its Biological and Clinical Ramifications. *Cancer Prevention Research* 3 (5):579-587. doi:10.1158/1940-6207.capr-10-0073
- Brian J. Yoder D, PhD, Edward J. Wilkinson, MD, and Nicole A. Massoll, MD (2007) Molecular and Morphologic Distinctions between Infiltrating Ductal and Lobular Carcinoma of the Breast. *The Breast Journal* 13 (2):172-179. doi: 10.1111/j.1524-4741.2007.00393.x
- Buerger H, Otterbach F, Simon R, Schäfer K-L, Poremba C, Diallo R, Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W (1999) Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *The Journal of Pathology* 189 (4):521-526. doi:10.1002/(sici)1096-9896(199912)189:4<521::aid-path472>3.0.co;2-b
- Burstein HJ, Prestrud AA, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, Giordano SH, Hudis CA, Malin J, Mamounas EP, Rowden D, Solky AJ,

- Sowers MR, Stearns V, Winer EP, Somerfield MR, Griggs JJ (2010) American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline: Update on Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28 (23):3784-3796. doi:10.1200/jco.2009.26.3756
- Buscaglia YLaLEB (2011) Apoptosis and the target genes of miR-21. *Chinese Journal of Cancer* 30 (6): 371–380. doi: 10.5732/cjc.011.10132
- Carbonell J, Alloza E, Arce P, Borrego S, Santoyo J, Ruiz-Ferrer M, Medina I, Jiménez-Almazán J, Méndez-Vidal C, González-del Pozo M, Vela A, Bhattacharya SS, Antiñolo G, Dopazo J (2012) A map of human microRNA variation uncovers unexpectedly high levels of variability. *Genome Medicine* 4 (8):62. doi:10.1186/gm363
- Chagpar AB, McMasters KM, Sahoo S, Edwards MJ (2009) Does ductal carcinoma in situ accompanying invasive carcinoma affect prognosis? *Surgery* 146 (4):561-568. doi:10.1016/j.surg.2009.06.039
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Research* 65 (14):6029-6033. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-0137
- Charles M. Perou TS, Michael B. Eisen, Matt van de Rijn SSJ, Christian A. Rees, Jonathan R. Pollack¶ DTR, Hilde Johnsen, Lars A. Akslen éF, Alexander Pergamenschikov, Cheryl Williams SXZ, Per E. Lønning, Anne-Lise Børresen-Dale POBDB (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747-752. doi:10.1038/35021093
- Cheng Y, Zhang C (2010) MicroRNA-21 in Cardiovascular Disease. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 3 (3):251-255. doi:10.1007/s12265-010-9169-7
- Chow T-fF, Crow M, Earle T, El-Said H, Diamandis EP, Yousef GM (2008) Kallikreins as microRNA targets: an in silico and experimental-based analysis. *Biological Chemistry* 389 (6). doi:10.1515/bc.2008.071
- Chuang JC, Jones PA (2007) Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatric Research* 61 (5 Part 2):24R-29R. doi:10.1203/pdr.0b013e3180457684

- Cianfrocca M (2004) Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *The Oncologist* 9 (6):606-616. doi:10.1634/theoncologist.9-6-606
- Colditz GA, Rosner B (2000) Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: Data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 152 (10):950-964. doi: 10.1093/aje/152.10.950
- Couse J, Lindzey, J, Grandien, K, Gustafsson, JA, Korach, KS. (1997) Tissue Distribution and Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- α (ER α) and Estrogen Receptor- β (ER β) Messenger Ribonucleic Acid in the Wild-Type and ER α -Knockout Mouse. *Endocrinology* 138 (11):4613-4621. doi:doi:10.1210/endo.138.11.5496
- Daniel AR, Hagan CR, Lange CA (2011) Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 6 (3):359-369. doi:10.1586/eem.11.25
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432 (7014):231-235. doi:nature03049 [pii]10.1038/nature03049
- Dolle JM, Daling JR, White E, Brinton LA, Doody DR, Porter PL, Malone KE (2009) Risk Factors for Triple-Negative Breast Cancer in Women Under the Age of 45 Years. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 18 (4):1157-1166. doi: 10.1158/1055-9965.Epi-08-1005
- Dorssers LJ, van der Flier S, Brinkman A, van Agthoven T, Veldscholte J, Berns EJJ, Klijn JM, Beex LAM, Foekens J (2001) Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *Drugs* 61 (12):1721-1733. doi:10.2165/00003495-200161120-00004
- Dua R, Zhang JH, Nhonthachit P, Penuel E, Petropoulos C, Parry G (2010) EGFR over-expression and activation in high HER2, ER negative breast cancer cell line induces trastuzumab resistance. *Breast Cancer Research and Treatment* 122 (3):685-697. doi: 10.1007/s10549-009-0592-x
- Dupont WD, Page DL (1985) Risk Factors for Breast Cancer in Women with Proliferative Breast Disease. *New England Journal of Medicine* 312 (3):146-151. doi:10.1056/NEJM198501173120303

- Einstein AJ, Henzlova MJ, Rajagopalan S (2007) ESTimating risk of cancer associated with radiation exposure from 64-slice computed tomography coronary angiography. *JAMA* 298 (3):317-323. doi:10.1001/jama.298.3.317
- Elsayed MA, Ahmed, R. H. Ahmed2, A, M.A. Ali3 (2014) Correlation of Breast Cancer Subtypes Based on ER, PR and HER2 Expression with Axillary Lymph Node Status. *Cancer and Oncology Research*. doi:10.13189/cor.2014.020402
- Farabegoli F, Champeme MH, Bieche I, Santini D, Ceccarelli C, Derenzini M, Lidereau R (2002) Genetic pathways in the evolution of breast ductal carcinoma in situ. *Journal of Pathology* 196 (3):280-286. doi:10.1002/path.1048 [pii]10.1002/path.1048
- Feany MB, Schonrock N, Ke YD, Humphreys D, Staufienbiel M, Ittner LM, Preiss T, Götz J (2010) Neuronal MicroRNA Deregulation in Response to Alzheimer's Disease Amyloid- β . *PLoS ONE* 5 (6):e11070. doi:10.1371/journal.pone.0011070
- Fedele P, Calvani N, Marino A, Orlando L, Schiavone P, Quaranta A, Cinieri S (2012) Targeted agents to reverse resistance to endocrine therapy in metastatic breast cancer: Where are we now and where are we going? *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 84 (2):243-251. doi:10.1016/j.critrevonc.2012.03.004
- Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Cecchini RS, Cronin WM, Robidoux A, Bevers TB, Kavanah MT, Atkins JN, Margolese RG, Runowicz CD, James JM, Ford LG, Wolmark N (2005) Tamoxifen for the Prevention of Breast Cancer: Current Status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of National Cancer Institute* 97 (22):1652-1662. doi:10.1093/jnci/dji372
- Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* 19 (1):92-105. doi:10.1101/gr.082701.108
- Fujita S, Ito T, Mizutani T, Minoguchi S, Yamamichi N, Sakurai K, Iba H (2008) miR-21 Gene Expression Triggered by AP-1 Is Sustained through a Double-Negative Feedback Mechanism. *Journal of Molecular Biology* 378 (3):492-504. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.03.015
- Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, Mulvihill JJ (1989) Projecting Individualized Probabilities of Developing Breast Cancer for White

- Females Who Are Being Examined Annually. *Journal of National Cancer Institute* 81 (24):1879-1886. doi:10.1093/jnci/81.24.1879
- Gonzalez-Angulo AM, Ferrer-Lozano J, Stemke-Hale K, Sahin A, Liu S, Barrera JA, Burgues O, Lluch AM, Chen H, Hortobagyi GN, Mills GB, Meric-Bernstam F (2011) PI3K Pathway Mutations and PTEN Levels in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapy* 10 (6):1093-1101. doi:10.1158/1535-7163.mct-10-1089
- Goto M, Yuen S, Akazawa K, Nishida K, Konishi E, Kajihara M, Shinkura N, Yamada K (2012) The role of breast MR imaging in pre-operative determination of invasive disease for ductal carcinoma in situ diagnosed by needle biopsy. *European Radiology* 22 (6):1255-1264. doi:10.1007/s00330-011-2357-2
- Griffiths-Jones S (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research* 34 (90001):D140-D144. doi:10.1093/nar/gkj112
- Grimson A, Farh KKH, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell* 27 (1):91-105. doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.017
- Guan-Li Huang X-HZ, Gui-Long Guo, Ka-Te Huang, Kai-Yan Yang XS, Jie You and Xiao-Qu Hu (2009) Clinical significance of miR-21 expression in breast cancer: SYBR-Green I-based real-time RT-PCR study of invasive ductal carcinoma. *Oncology Reports*. doi:10.3892/or_00000270
- Gudjonsson LR-J, René Villadsen, Fritz Rank, Mina J. Bissell, and, Petersen OW (2002) Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *Journal of Cell Science* 1 (115):39-50
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Development* 18 (24):3016-3027. doi:gad.1262504 [pii]10.1101/gad.1262504
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144 (5):646-674. doi:DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013

- Harrell JC, Dye WW, Harvell DM, Pinto M, Jedlicka P, Sartorius CA, Horwitz KB (2007) Estrogen insensitivity in a model of estrogen receptor positive breast cancer lymph node metastasis. *Cancer Research* 67 (21):10582-10591. doi:67/21/10582 [pii]10.1158/0008-5472.CAN-07-1655
- Hassan (2010) Chemotherapy for breast cancer (Review). *Oncology Reports* 24 (5). doi:10.3892/or_00000963
- Hefti M, Hu R, Knoblauch N, Collins L, Haibe-Kains B, Tamimi R, Beck A (2013) Estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast cancer is not a reproducible subtype. *Breast Cancer Research* 15 (4):R68. doi:10.1186/bcr3462
- Howell A (2005) New developments in the treatment of postmenopausal breast cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 16 (9):420-428. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2005.09.003
- Huang TH, Wu F, Loeb GB, Hsu R, Heidersbach A, Brincat A, Horiuchi D, Lebbink RJ, Mo YY, Goga A, McManus MT (2009) Up-regulation of miR-21 by HER2/neu Signaling Promotes Cell Invasion. *Journal of Biological Chemistry* 284 (27):18515-18524. doi:10.1074/jbc.M109.006676
- Hwang ES, Lichtensztajn DY, Gomez SL, Fowble B, Clarke CA (2013) Survival after lumpectomy and mastectomy for early stage invasive breast cancer. *Cancer-American Cancer Society* 119 (7):1402-1411. doi:10.1002/cncr.27795
- Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstadter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, Ortmann O (2013) Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Research and Treatment* 139 (2):539-552. doi: 10.1007/s10549-013-2560-8
- Iorio MV (2005) MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Research* 65 (16):7065-7070. doi:10.1158/0008-5472.can-05-1783
- Ishikawa H (1997) Evolution of ribosomal RNA *Comp Biochem Physiol B* 58 (1):1-7.
- Jagsi R (2014) Progress and controversies: Radiation therapy for invasive breast cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 64 (2):135-152. doi:10.3322/caac.21209
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer Journal for Clinicians* 60 (5):277-300. doi:10.3322/caac.20073

- Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, Jung JS (2009) miR-21 Regulates Adipogenic Differentiation Through the Modulation of TGF- β Signaling in Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue. *Stem Cells*:N/A-N/A. doi:10.1002/stem.235
- Kneeshaw PJ, Lowry M, Manton D, Hubbard A, Drew PJ, Turnbull LW (2006) Differentiation of benign from malignant breast disease associated with screening detected microcalcifications using dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging. *The Breast* 15 (1):29-38.doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2005.05.002
- Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics* 37 (5):495-500. doi:ng1536 [pii]10.1038/ng1536
- Krichevsky AM, Gabriely G (2008) miR-21: a small multi-faceted RNA. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (1):39-53. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x
- Krützfeldt J, Stoffel M (2006) MicroRNAs: A new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metabolism* 4 (1):9-12. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.009
- Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S (2007) Role of Dicer and Drosha for Endothelial MicroRNA Expression and Angiogenesis. *Circulation Research* 101 (1):59-68. doi:10.1161/circresaha.107.153916
- Kuhl CK, Schrading S, Bieling HB, Wardelmann E, Leutner CC, Koenig R, Kuhn W, Schild HH (2007) MRI for diagnosis of pure ductal carcinoma in situ: a prospective observational study. *The Lancet Oncology* 370 (9586):485-492. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61232-X
- Kumar S KR, Pazhanimuthu A, Perumal P. (2013) Overexpression of circulating miRNA-21 and miRNA-146a in plasma samples of breast cancer patients. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 50 (3):210-214.
- Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P (2000) Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74 (5):311-317. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00108-4

- Leake R (2000) Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. *J Clin Pathol* 53 (8):634-635. doi:10.1136/jcp.53.8.634
- Lee JA, Lee HY, Lee ES, Kim I, Bae JW (2011) Prognostic Implications of MicroRNA-21 Overexpression in Invasive Ductal Carcinomas of the Breast. *Journal of Breast Cancer* 14 (4):269-275. doi:10.4048/jbc.2011.14.4.269
- Lee Rosalind C. RLF, Victor Ambros (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 (5):843–854
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal* 23 (20):4051-4060. doi:10.1038/sj.emboj.76003857600385 [pii]
- Leonard GD, Swain SM (2004) Ductal Carcinoma In Situ, Complexities and Challenges. *Journal of National Cancer Institute* 96 (12):906-920. doi:10.1093/jnci/djh164
- Lewis-Wambi JS, Jordan VC (2006) Treatment of Postmenopausal Breast Cancer with Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *Breast Disease* 24 (1):93-105
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120 (1):15-20. doi:DOI 10.1016/j.cell.2004.12.035
- Li AB, Darling J, Moe R (2003) Trends in Incidence Rates of Invasive Lobular and Ductal Breast Carcinoma. *The Journal of American Medical Association* 289 (11):1421-1424. doi:10.1001/jama.289.11.1421.
- Li CI, Uribe DJ, Daling JR (2005) Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British Journal of Cancer* 93 (9):1046-1052. doi:10.1038/sj.bjc.6602787
- Li J, Zhang Y, Zhang W, Jia S, Tian R, Kang Y, Ma Y, Li D (2013) Genetic Heterogeneity of Breast Cancer Metastasis May Be Related to miR-21 Regulation of TIMP-3 in Translation. *International Journal of Surgical Oncology* 2013:1-7. doi:10.1155/2013/875078

- Loging WT, Reisman D (1999) Inhibition of the putative tumor suppressor gene TIMP-3 by tumor-derived p53 mutants and wild type p53. *Oncogene* 18 (52):7608-7615. doi:10.1038/sj.onc.1203135
- Long BJ, Jelovac D, Handratta V, Thiantanawat A, MacPherson N, Ragaz J, Goloubeva OG, Brodie AM (2004) Therapeutic Strategies Using the Aromatase Inhibitor Letrozole and Tamoxifen in a Breast Cancer Model. *Journal of National Cancer Institute* 96 (6):456-465. doi:10.1093/jnci/djh076
- Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G (2006) Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Research* 8 (4):R43. doi:10.1186/bcr1525
- Ma L, Weinberg RA (2008) Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends in Genetics* 24 (9):448-456. doi:10.1016/j.tig.2008.06.004
- Marsden J (2002) Hormone-replacement therapy and breast cancer. *The Lancet Oncology* 3 (5):303-311. doi:10.1016/s1470-2045(02)00732-5
- Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, Fedele V, Ginzinger D, Getts R, Haqq C (2006) Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Molecular Cancer* 5 (1):24. doi:10.1186/1476-4598-5-24
- Millar AA, Waterhouse PM (2005) Plant and animal microRNAs: similarities and differences. *Functional & Integrative Genomics* 5 (3):129-135. doi:10.1007/s10142-005-0145-2
- Miller AB, To T, Baines CJ, Wall C, Study-2 FtCNBS (2000) Canadian National Breast Screening Study-2: 13-Year Results of a Randomized Trial in Women Aged 50–59 Years. *Journal of National Cancer Institute* 92 (18):1490-1499. doi:10.1093/jnci/92.18.1490
- Muhonen P, Holthofer H (2008) Epigenetic and microRNA-mediated regulation in diabetes. *Nephrology Dialysis Transplantation* 24 (4):1088-1096. doi:10.1093/ndt/gfn728

- Nelson PT, Wang W-X, Rajeev BW (2008) MicroRNAs (miRNAs) in Neurodegenerative Diseases. *Brain Pathology* 18 (1):130-138. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00120.x
- Ng CH, Pathy NB, Taib NA, Mun KS, Rhodes A, Yip CH (2012) The Estrogen Receptor Negative-Progesterone Receptor Positive Breast Carcinoma is a Biological Entity and not a Technical Artifact. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13 (4):1111-1113. doi:10.7314/apjcp.2012.13.4.1111
- Ellis O, Elston CWE (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19:403-410. doi: 10.1046/j.1365-2559.2002.14892.x
- Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN (2009) Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. *Clinical Medicine & Research* 7 (1-2):4-13. doi:10.3121/cm.2008.825
- Osborne C, Wilson P, Tripathy D (2004) Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. *The Oncologist* 9 (4):361-377. doi:10.1634/theoncologist.9-4-361
- Pan X, Wang Z-X, Wang R (2010) MicroRNA-21: A novel therapeutic target in human cancer. *Cancer Biology & Therapy* 10 (12):1224-1232. doi:10.4161/cbt.10.12.14252
- Petrović N, Mandušić V, Stanojević B, Lukić S, Todorović L, Roganović J, Dimitrijević B (2014a) The difference in miR-21 expression levels between invasive and non-invasive breast cancers emphasizes its role in breast cancer invasion. *Medical Oncology* 31 (3). doi:10.1007/s12032-014-0867-x
- Petrović N, Mandušić V, Dimitrijević B, Roganović J, Lukić S, Todorović L, Stanojević B (2014b) Higher miR-21 expression in invasive breast carcinomas is associated with positive estrogen and progesterone receptor status in patients from Serbia. *Medical Oncology* 31 (6):1-9. doi:10.1007/s12032-014-0977-5
- Polyak K (2007) Breast cancer: origins and evolution. *Journal of Clinical Investigation* 117 (11):3155-3163. doi:10.1172/JCI33295

- Polyak K, Hu M (2005) Do Myoepithelial Cells Hold the Key for Breast Tumor Progression? *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 10 (3):231-247. doi:10.1007/s10911-005-9584-6
- Pratt AJ, MacRae IJ (2009) The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine. *Journal of Biological Chemistry* 284 (27):17897-17901. doi:10.1074/jbc.R900012200
- Qi L, Bart J, Tan L, Platteel I, Sluis T, Huitema S, Harms G, Fu L, Hollema H, Berg A (2009) Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. *BMC Cancer* 9 (1):163. doi:10.1186/1471-2407-9-163
- Qian B, Katsaros D, Lu L, Preti M, Durando A, Arisio R, Mu L, Yu H (2008) High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF- β 1. *Breast Cancer Research and Treatment* 117 (1):131-140. doi:10.1007/s10549-008-0219-7
- Rakha E, Reis-Filho J, Ellis I (2010) Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 120 (2):293-308. doi:10.1007/s10549-010-0746-x
- Redfern AD, Colley SM, Beveridge DJ, Ikeda N, Epis MR, Li X, Foulds CE, Stuart LM, Barker A, Russell VJ, Ramsay K, Kobelke SJ, Li X, Hatchell EC, Payne C, Giles KM, Messineo A, Gatignol A, Lanz RB, O'Malley BW, Leedman PJ (2013) RNA-induced silencing complex (RISC) Proteins PACT, TRBP, and Dicer are SRA binding nuclear receptor coregulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (16):6536-6541. doi:10.1073/pnas.1301620110
- Riedl CC, Ponnhold L, Flöry D, Weber M, Kroiss R, Wagner T, Fuchsjäger M, Helbich TH (2007) Magnetic Resonance Imaging of the Breast Improves Detection of Invasive Cancer, Preinvasive Cancer, and Premalignant Lesions during Surveillance of Women at High Risk for Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 13 (20):6144-6152. doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-1270

- Rosebrock A, Caban JJ, Figueroa J, Gierach G, Linville L, Hewitt S, Sherman M (2013) Quantitative Analysis of TDLUs using Adaptive Morphological Shape Techniques. *Proceedings SPIE* 8676. doi:Artn 86760nDoi 10.1117/12.2006619
- Ross JS, Fletcher JA (1998) The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *The Oncologist* 3 (4):237-252
- Ross JS, Fletcher JA, Oliveira AM (2005) Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer : The Gatekeepers and the Caretakers. *Pathology Patterns Reviews* 124 (1):S16-S28. doi:10.1309/5xw3l8lu445qwgqr
- Ryu I, Park JH, An S, Kwon OS, Jang SK (2013) eIF4GI Facilitates the MicroRNA-Mediated Gene Silencing. *PLoS ONE* 8 (2):e55725. doi:10.1371/journal.pone.0055725
- Satoh J-i (2012) Molecular network analysis of human microRNAtargetome: from cancers to Alzheimer's disease. *BioData Mining* 5:87. doi: 10.1186/1756-0381-5-17.
- Sauter G, Lee J, Bartlett JMS, Slamon DJ, Press MF (2009) Guidelines for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing: Biologic and Methodologic Considerations. *Journal of Clinical Oncology* 27 (8):1323-1333. doi:10.1200/jco.2007.14.8197
- Schnitt SJ (2010) Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Modern Pathology* 23:S60-S64. doi:10.1038/modpathol.2010.33
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182 (3):311-322. doi: 10.1002/(Sici)1097-4652(200003)182:3<311::Aid-Jcp1>3.0.Co;2-9
- Silverstein MJ, Recht A, Lagios MD, Bleiweiss IJ, Blumencranz PW, Gizienski T, Harms SE, Harness J, Jackman RJ, Klimberg VS, Kuske R, Levine GM, Linver MN, Rafferty EA, Rugo H, Schilling K, Tripathy D, Whitworth PW, Willey SC (2009) Image-Detected Breast Cancer: State-of-the-Art Diagnosis and Treatment. *Journal of the American College of Surgeons* 209 (4):504-520. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2009.07.006

- Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR (2005) Molecular evolution of breast cancer. *The Journal of Pathology* 205 (2):248-254. doi:10.1002/path.1691
- Singletary KW, Gapstur SM (2001) Alcohol and breast cancer: Review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA* 286 (17):2143-2151. doi:10.1001/jama.286.17.2143
- Singletary SE (2002a) Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 20 (17):3628-3636. doi:10.1200/jco.2002.02.026
- Singletary SE (2002b) A Working Model for the Time Sequence of Genetic Changes in Breast Tumorigenesis. *Journal of the American College of Surgeons* 194 (2):202-216. doi: dx.doi.org/10.1016/S1072-7515(01)01108-5.
- Slamon DJ L-JB, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England Journal of Medicine* 34 (344):783-792. doi: 10.1056/NEJM200103153441101.
- Song B, Wang C, Liu J, Wang X, Lv L, Wei L, Xie L, Zheng Y, Song X (2010) MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29 (1):29. doi:10.1186/1756-9966-29-29
- Span PN, Lindberg RLP, Manders P, Tjan-Heijnen VCG, Heuvel JJTM, Beex LVAM, Sweep CGJ (2004) Tissue inhibitors of metalloproteinase expression in human breast cancer: TIMP-3 is associated with adjuvant endocrine therapy success. *The Journal of Pathology* 202 (4):395-402. doi:10.1002/path.1528
- Stavros AT, Thickman D, Rapp CL, Dennis MA, Parker SH, Sisney GA (1995) Solid breast nodules: use of sonography to distinguish between benign and malignant lesions. *Radiology* 196 (1):123-134. doi:10.1148/radiology.196.1.7784555
- Stelling MDCB, Smith MSTL, Sahin MDAA, Krishnamurthy MDS, Whitman MDGJ, Lim MDSC, Sneige MDN (2003) Atypical Ductal Hyperplasia Diagnosis by Directional Vacuum-Assisted Stereotactic Biopsy of Breast Microcalcifications: Considerations

- for Surgical Excision. *American Journal of Clinical Pathology* 119 (2):248-253. doi:10.1309/0gyv4f2lljav4gfn
- Stormshak F, Bishop CV (2008) BOARD-INVITED REVIEW: Estrogen and progesterone signaling: Genomic and nongenomic actions in domestic ruminants. *Journal of Animal Science* 86 (2):299-315. doi:10.2527/jas.2007-0489
- Suryadevara A, Paruchuri L, Banisaeed N, Dunnington G, Rao K (2010) The clinical behavior of mixed ductal/lobular carcinoma of the breast: a clinicopathologic analysis. *World Journal of Surgical Oncology* 8 (1):1-9. doi:10.1186/1477-7819-8-51
- Thomas X, Lu E-JL, SI, JAB, AJP, Mingler MK, JAR, PCF, BJA, MER (2013) Targeted Ablation of miR-21 Decreases Murine Eosinophil Progenitor Cell Growth. *PLoS ONE* 8 (3). doi:10.1371/journal.pone.0059397.g001
- Tinoco G (2013) Treating Breast Cancer in the 21st Century: Emerging Biological Therapies. *Journal of Cancer* 4 (2):117-132. doi:10.7150/jca.4925
- Travis RC, Key TJ (2003) Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Research* 5 (5):239. doi:10.1186/bcr628
- Valencia-Sanchez MA (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & Development* 20 (5):515-524. doi:10.1101/gad.1399806
- Velds A, Halfwerk JBG, Kreike B, Peterse JL, van de Vijver MJ (2006) Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling. *Breast Cancer Research* 8 (5):R61. doi:10.1186/bcr1613
- Vergoulis T, Vlachos IS, Alexiou P, Georgakilas G, Maragkakis M, Reczko M, Gerangelos S, Koziris N, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG (2011) TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support. *Nucleic Acids Research* 40 (D1):D222-D229. doi:10.1093/nar/gkr1161
- Verkooijen HM, Fioretta Gr, Vlastos G, Morabia A, Schubert H, Sappino A-P, Pelte M-Fo, Schefer P, Kurtz J, Bouchardy C (2003) Important increase of invasive lobular breast cancer incidence in Geneva, Switzerland. *International Journal of Cancer* 104 (6):778-781. doi:10.1002/ijc.11032

- Volinia S, Galasso M, Sana ME, Wise TF, Palatini J, Huebner K, Croce CM (2012) Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (8):3024-3029. doi:10.1073/pnas.1200010109
- Waldman FM, DeVries S, Chew KL, Moore DH, Kerlikowske K, Ljung B-M (2000) Chromosomal Alterations in Ductal Carcinomas In Situ and Their In Situ Recurrences. *Journal of National Cancer Institute* 92 (4):313-320. doi:10.1093/jnci/92.4.313
- Wang X (2008) miRDB: A microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *Rna* 14 (6):1012-1017. doi:10.1261/rna.965408
- Webb P, Lopez, GN, Uht, RM and Kushner PJ (1995) Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Molecular Endocrinology* 9 (4):443-456. doi:doi:10.1210/mend.9.4.7659088
- Wickramasinghe NS, Manavalan TT, Dougherty SM, Riggs KA, Li Y, Klinge CM (2009) Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Research* 37 (8):2584-2595. doi:10.1093/nar/gkp117
- Wong H, Lau S, Yau T, Cheung P, Epstein RJ (2010) Presence of an in situ component is associated with reduced biological aggressiveness of size-matched invasive breast cancer. *British Journal of Cancer* 102 (9):1391-1396. doi:10.1038/sj.bjc.6605655
- Wu L, Belasco JG (2008) Let Me Count the Ways: Mechanisms of Gene Regulation by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell* 29 (1):1-7. doi:10.1016/j.molcel.2007.12.010
- Wu W, Lin Z, Zhuang Z, Liang X (2009) Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *European Journal of Cancer Prevention* 18 (1):50-55. doi:10.1097/CEJ.0b013e328305a07a00008469-200902000-00008 [pii]
- Xia H (2010) The Role of MicroRNA in Tumor Invasion and Metastasis *Journal of Cancer Molecules* 5 (2):33-39. doi: 10.1007/s12307-010-0037-4
- Yaffe MJ (1990) AAPM tutorial. Physics of mammography: image recording process. *RadioGraphics* 10 (2):341-363. doi:doi:10.1148/radiographics.10.2.2183301

- Yamashita H, Nishio M, Kobayashi S, Ando Y, Sugiura H, Zhang Z, Hamaguchi M, Mita K, Fujii Y, Iwase H (2005) Phosphorylation of estrogen receptor α serine 167 is predictive of response to endocrine therapy and increases postrelapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research* 7 (5):R753. doi:10.1186/bcr1285
- Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, Zeng YX, Shao JY (2008) MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *Rna* 14 (11):2348-2360. doi:10.1261/rna.1034808
- Yang Y, Chaerkady R, Beer MA, Mendell JT, Pandey A (2009) Identification of miR-21 targets in breast cancer cells using a quantitative proteomic approach. *Proteomics* 9 (5):1374-1384. doi:10.1002/pmic.200800551
- Zhang Y, Cheng S, Zhang G, Ma W, Liu Y, Zhao R, Zhang Q, Pang D (2012) Low expression of RECK indicates a shorter survival for patients with invasive breast cancer. *Cancer Science* 103 (6):1084-1089. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02265.x
- Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY (2007) MicroRNA-21 Targets the Tumor Suppressor Gene Tropomyosin 1 (TPM1). *Journal of Biological Chemistry* 282 (19):14328-14336. doi:10.1074/jbc.M611393200
- Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo Y-Y (2008) MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Research* 18 (3):350-359. doi:10.1038/cr.2008.24

STRUČNA BIOGRAFIJA

Nina Petrović je rođena 28.11.1983. godine u Smederevu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne studije upisala je 2002. godine, a diplomirala je 29.05.2008. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija, odbranom diplomskog rada pod nazivom "Ispitivanje glutamin sintetaze (EC 6.3.1.2) kod *Dryopteris filix-mas* i *Polypodium vulgare*" pod rukovodstvom mentora dr Ane Simonović, na odseku za Fiziologiju biljaka na Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković", u Beogradu.

Školske 2008/2009. godine upisala je poslediplomske, doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskoj grupi Molekularna biologija, smer Molekularna biologija eukariota.

Od 01.10.2008. zaposlena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke "Vinča". U zvanje istraživač-saradnik izabrana je 2011. godine.

Do sada je publikovala 4 rada i 1 saopštenje u zbornicima naučnih skupova. Trenutno je angažovana na projektu "Molekularne determinante za dizajn tumor markera" (br. ON173049), Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Нина Петровић
Број уписа М3010/2008

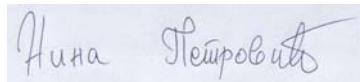
Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
Микро РНК-21 као индикатор инвазивности карцинома дојке код пацијената са различитим статусом естрогенског и прогестеронског рецептора

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 2014.



Нина Петровић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Нина Петровић

Број уписа M3010/2008

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Микро РНК-21 као индикатор инвазивности карцинома дојке код пацијената са различитим статусом естрогенског и прогестеронског рецептора

Ментор др Весна Мандушић, научни сарадник Института за нуклеарне науке „Винча“
др Горан Брајушковић, ванредни професор Биолошког факултета,
Универзитета у Београду

Потписани Нина Петровић

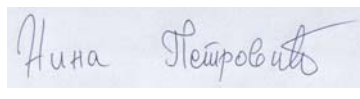
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____ 2014.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Микро РНК-21 као индикатор инвазивности карцинома дојке код пацијената са различитим статусом естрогенског и прогестеронског рецептора

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

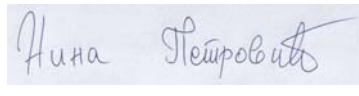
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 2014.



Ана Петровић

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

The difference in miR-21 expression levels between invasive and non-invasive breast cancers emphasizes its role in breast cancer invasion

Nina Petrović · Vesna Mandušić · Boban Stanojević ·
Silvana Lukić · Lidija Todorović · Jelena Roganović ·
Bogomir Dimitrijević

Received: 18 November 2013 / Accepted: 25 January 2014 / Published online: 2 February 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract MicroRNA-21 (miR-21) overexpression is characteristic for various types of tumors, but it is still unknown whether its expression levels differ between invasive and non-invasive breast carcinomas. The main goal of the study was to determine the difference in miR-21 expression among normal tissue, non-invasive, invasive with non-invasive component, and pure invasive breast cancer samples, to explain its potential role and significance in breast cancer invasiveness. The second goal was to propose miR-21 as molecular marker of breast cancer invasiveness and potential target for future anti-miR therapies for the prevention of invasion and metastasis. In order to reveal the role of miR-21 in breast cancer invasiveness, we measured miR-21 expression levels in 44 breast cancer and four normal samples by stem-loop real-time RT-PCR using TaqMan technology. Relative expression levels of miR-21 were significantly higher in invasive than in other groups ($P = 0.002$) and significantly higher in invasive

compared with invasive with non-invasive component group in histological ($P = 0.043$) and nuclear grade 2 ($P = 0.036$), estrogen-receptor-positive (ER+) ($P = 0.006$), progesterone-receptor-positive (PR+) ($P = 0.008$), ER+ PR+ ($P = 0.007$), and proliferation index (Ki-67) $\leq 20\%$ ($P = 0.036$) tumors. Our findings suggest that miR-21 could be independent molecular marker of breast cancer invasiveness and potential target for future anti-miR therapies for the prevention of invasion and metastasis.

Keywords Breast cancer · MicroRNA · MiR-21 expression levels · Invasiveness · TaqMan MicroRNA assay · RT-qPCR

Introduction

The most frequent type of breast cancer is invasive (or infiltrating) breast cancer, which presents 70–80 % of all cases [1]. The main characteristic of an invasive breast cancer is infiltration into the surrounding tissue [2] and the ability to metastasize [3, 4]. Some invasive breast cancers contain non-invasive component. However, according to Farabegoli et al. and Wong et al. [5, 6], there is a great possibility that non-invasive breast cancer at some point gains an invasive character. Yet, researchers cannot answer the question whether all non-invasive breast cancers at some point evolve into invasive, as a result of genetic and epigenetic changes, activation of new signaling pathways, or changes in the microenvironment, or invasive tumor arises de novo [5, 6]. Some researchers believe that all non-invasive breast cancers become invasive at some point of life. It may take a long period of time for non-invasive breast cancer to evolve in invasive. However, some patients with non-invasive breast cancer may die from the

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12032-014-0867-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Petrović (✉) · V. Mandušić · B. Stanojević ·
L. Todorović · B. Dimitrijević
Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade,
Mike Petrovića Alasa 12-14, 11001 Belgrade, Serbia
e-mail: dragoninspiration@yahoo.com

S. Lukić
Institute for Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14,
11000 Belgrade, Serbia

J. Roganović
Department of Pharmacology, Faculty of Dentistry, University
of Belgrade, Dr. Subotića 8, 11000 Belgrade, Serbia

effects of aging or other diseases before they develop an invasive form Velds et al. [7].

MicroRNA-21 (miR-21) is a member of small non-coding RNAs 19–24 nucleotides long that negatively regulates gene expression on the posttranscriptional level. Its clinical significance in the formation, invasion, and metastasis of breast cancers is poorly understood [8, 9]. Most of microRNAs specific for breast cancers are tumor suppressors [10], unlike miR-21, which is the molecule with a huge oncogenic potential [11]. miR-21 binds to consensus sequences in its target genes in an incomplete complementary manner leading to the transcript degradation or blocking the translation, which results in the inhibition of tumor suppressor functions of these genes [11].

Targets of miR-21 are mRNAs of the genes known to be regulators of the cell cycle, proliferation, and apoptosis such as phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) [12], [13], tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (*TIMP3*) [11], tropomyosin 1 (*TPM1*) [14], and programmed cell death 4 (*PDCD4*) [13, 15]. *TIMP3* protein regulates apoptosis and extracellular matrix (ECM) remodeling. Blocking of *TIMP3* mRNA translation into a protein allows matrix metalloproteinases to cut ECM, which undermines physical barrier that basement membrane represents [16, 17]. This allows invasive cancer cells to spread through the surrounding tissue and to intravasate [18]. *TPM1* is known to be a tumor suppressor gene [14]. *PDCD4* protein inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation and regulates apoptosis [15, 19]. This indicates that miR-21 overexpression may lead to posttranscriptional repression of tumor suppressor genes, which not only may lead to neoplastic transformation, but also might promote tumor proliferation and invasion, and as a result enable migration and metastasis [14, 15, 20, 21].

Based on the available data, we assume that miR-21 might have an important role in breast cancer invasion and may represent the marker of an invasive phenotype [2, 4]. The main goal of this study was to find out whether there was a difference in miR-21 expression among normal breast tissue, non-invasive, invasive with non-invasive component, and pure invasive breast cancers. Moreover, we wanted to find out whether invasive cancers with non-invasive component might represent transitional form that leads to more aggressive invasive breast cancer [6, 22] based on the difference in miR-21 expression levels (comparing with miR-21 levels of non-invasive and pure invasive breast cancers), or is it the unique breast cancer entity. In addition, we examined the relationship between miR-21 expression and clinical and pathohistological parameters in female breast cancer patients with non-invasive, invasive with non-invasive component, and pure invasive breast cancers.

Methods

Patients and samples

We analyzed 44 breast cancer samples (37 fresh-frozen and seven formalin-fixed, paraffin-embedded) and four samples of normal breast tissue. Nine cancer samples were non-invasive (in situ) (two fresh-frozen and seven paraffin-embedded), eight were invasive with non-invasive component, and 27 were pure invasive. We had 11 invasive lobular carcinomas (ILC), 16 invasive ductal carcinomas (IDC), eight invasive ductal carcinomas with ductal carcinoma in situ component (IDC-DCIS), and nine ductal carcinomas in situ (DCIS).

Samples were obtained from Institute for Oncology and Radiology of Serbia. The surgeries of all patients were done at the Institute of Oncology and Radiology of Serbia between March 2012 and April 2013. This study got an Institutional Review Board approval according to the National Health Regulation 5002/1-01. All the patients gave informed consents. Clinical patient's data and pathohistological parameters of breast cancer samples are presented in Supplemental Table 1.

Isolation of total RNA from fresh-frozen tissue

The fresh-frozen tissue of breast cancer was homogenized in liquid nitrogen. Total RNA isolation was performed using TRI reagent (Ambion, Foster City, CA) and 0.2 ml of chloroform. Then, the samples were centrifuged for 10 min at 14,000 RPM (4 °C), and the transparent colorless supernatant that contained total RNA was transferred into new tube. In the precipitation step, we used isopropanol and stored the samples at –20 °C overnight. Then, the samples were centrifuged (14,000 RPM, 4 °C), and the pellet was rinsed with 1 ml of 70 % ice-cold ethanol. This step was repeated once, and the pellets were dried and dissolved in 50–100 µl DEPC-DW and incubated for 10 min at 65 °C. RNA samples were quantified by Biospec-nano and qualified using 1 % agarose gel electrophoresis.

Isolation of total RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded samples

Tumor samples from formalin-fixed, paraffin-embedded blocks were cut into 20-µm fragments and deparaffinized with xylene. Xylene was removed with 100 % ethanol, and the samples were incubated at 80 °C in the step of protease digestion in order to remove proteins covalently bound to RNA molecules, according to the manufacturer's protocol for Recover All™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Foster City, CA).

Table 1 miR-21 relative expression among tumor groups

Clinicopathological features	N (%)	Relative miR-21 expression ^a	P value ^b
Tumor groups			
Invasive	27 (56.2)	90.459 (60.121–148.216)	P = 0.002
Invasive with non-invasive component	8 (16.7)	50.817 (34.779–93.833)	
Non-invasive	9 (18.7)	19.252 (12.335–57.702)	
Normal	4 (8.3)	13.491 (10.805–34.288)	

^a Relative miR-21 expression with 25th–75th percentile in parentheses

^b P values <0.05 were considered significant according to Mann–Whitney U test (between two groups) and Kruskal–Wallis test (for three groups)

Reverse transcription and qPCR of miR-21

Reverse transcription and qPCR amplification were performed in two steps, according to the stem-loop real-time RT-PCR protocol (TaqMan[®] Small RNA Assays Protocol, Applied Biosystems, Foster City, CA) [12].

For the reverse transcription step, 10 ng of RNA was used for in reactions: with specific stem-loop RT primer for miR-21 and endogenous control primer for RNU6B. Reaction was performed with TaqMan Micro-RNA Reverse Transcription Kit, according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA). Thermal conditions were as follows: 16 °C for 30 min; 42 °C for 30 min, and 85 °C for 5 min.

In the second step, cDNA samples were amplified in Real Time PCR 7500 (Applied Biosystems) with the specific TaqMan[®] miR-21 Assay (ID 000397) and small nRNA RNU6B (ID 001093) as endogenous control. Thermal conditions were as follows: 95 °C 10 min; 95 °C 15 S; and 60 °C 60 S for 40 cycles.

miR-21 expression levels were analyzed as relative quantities, normalized to endogenous control (RNU6B), and calibrated to sample with the lowest expression (referent, 1× sample). Values were obtained using the 7500 System SDS software, by $\Delta\Delta C_t$ method, according to the equation $RQ_{\text{sample}} = 2^{-(\Delta C_{\text{t sample}} - \Delta C_{\text{t calibrator}})}$ (where RQ_{sample} is relative quantity of sample and $\Delta C_t = C_{t_{\text{miR-21}}} - C_{t_{\text{RNU6B}}}$).

Immunohistochemistry

Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) protein levels were evaluated by immunohistochemistry with rabbit and mouse monoclonal antibodies (RM-9101-S1, Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK and M3569, Dako Copenhagen, Denmark, respectively) on 4–5- μm sections of formalin-fixed, paraffin-embedded blocks. Human epidermal growth factor receptor 2 (Her-2) was evaluated with antibody rabbit antihuman A0485 (Dako,

Copenhagen, Denmark) and proliferation index Ki-67 with RM9106-S1 (Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK). Tissue sections were deparaffinized, rehydrated, and treated with 3 % H_2O_2 for 10 min to neutralize endogenous peroxidase activity. To unmask binding epitopes, the slides were immersed in 10 mM boiling citrate buffer (pH 6) in microwave oven for 25 min (650 W), followed by cooling and washing in TBS, pH 7.4. Sections were incubated for 30 min with the corresponding antibodies at 1:50 dilutions with Ab diluent buffer (Code No.S0809 Dako, Copenhagen, Denmark) at room temperature. After additional washes in TBS, samples were treated with ready-to-use polymer system (TP-125-HL, Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK) and visualized with diaminobenzidine, according to the manufacturer's instructions for paraffin-embedded tissues. Slides were slightly counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted. Representative tumor specimens were evaluated, and any brown nuclear staining in cells was counted and scored according Leake et al. [23] for ER and PR expression. Her-2 expression was considered positive for 3+ by immunohistochemistry and for 2+ by IHC (if positive by CISH), [24]. Ki-67 levels were used as the percentage of positively stained cells.

Statistical analysis

Because miR-21 relative expression values were not distributed according to the Gaussian distribution, they were characterized by median ranges. Mann–Whitney U non-parametric test was used to compare two independent groups and Kruskal–Wallis nonparametric test (Dunn's method) for 3 or more independent group comparisons. For the correlation analysis, we used Pearson's or Spearman's test. P values of 0.05 or less were considered statistically significant, and P values less than 0.1 were characterized as statistical trend. All calculations were performed by *Sigma Stat 3.5* (Dundas Software, Ltd, Germany) and *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Inc. CA) software.

Results

Samples from 48 patients were analyzed (nine non-invasive, eight invasive with non-invasive component, 27 pure invasive breast cancers, and four samples of normal breast tissue) and presented in Online Resource 1.

MiR-21 expression levels in breast cancer samples

MiR-21 expression was found in all 48 samples. The median expression for normal samples was 13.491, for non-invasive was 19.252, for invasive with non-invasive component was 50.817, and pure invasive samples had median of 90.459, Table 1. The highest miR-21 expression levels were detected in pure invasive breast cancer samples. Statistically significant difference among four groups is presented in Fig. 1 (Kruskal–Wallis test, $P = 0.002$, Table 1). However, significant differences were found between: (1) normal and invasive with non-invasive component groups, (2) normal and pure invasive groups, and (3) non-invasive and pure invasive groups. Although, a statistical trend was found

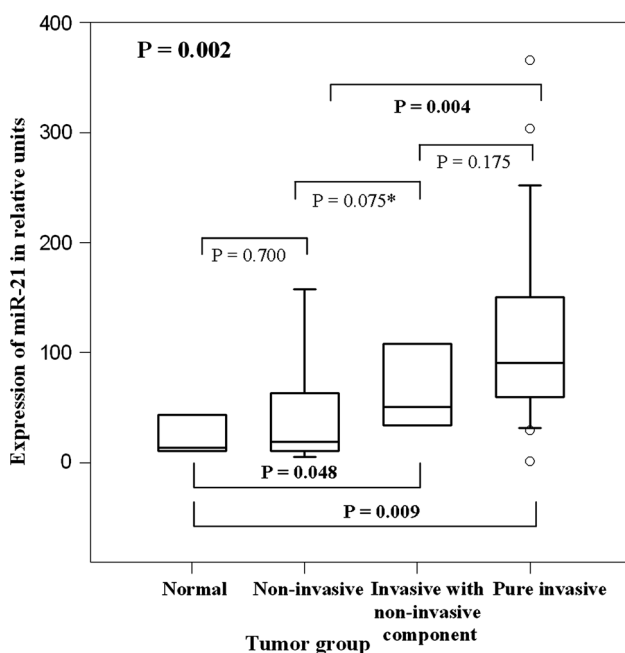


Fig. 1 Relative miR-21 expression in normal breast tissue and in cancer samples. The plot shows interquartile range (*boxes*); the line indicates the median, and the whiskers extended from the boxes represent the highest and lowest values (excluding outliers—dots). The values of miR-21 expression levels are shown in arbitrary units (determined by $\Delta\Delta Ct$ method as explained in “Methods” section), normalized to RNU6B, and calibrated to $\times 1$ sample (sample with lowest miR-21 expression). Statistically significant differences were considered for $P < 0.05$, and $P < 0.1$ was characterized as statistical trend*

Fig. 2 Differences in miR-21 expression between invasive with non-invasive component and pure invasive breast cancer tumor groups in (a) histological grade 2, (b) nuclear grade 2, and (c) proliferation index (Ki-67) $\leq 20\%$ tumors. Differences in miR-21 expression among non-invasive, invasive with non-invasive, and pure invasive tumor groups in (d) estrogen-receptor-status-positive (ER+), (e) progesterone-receptor-status-positive (PR+), and (f) both estrogen-and-progesterone-receptor-status-positive (ER+PR+) tumors

between non-invasive and invasive with non-invasive component groups (shown in Fig. 1).

MiR-21 expression and clinicopathological parameters

Within sample groups of histological and nuclear grade 2, significantly higher expression of miR-21 was found in invasive compared with invasive with non-invasive component breast cancers (Mann–Whitney U test, $P = 0.043$ and $P = 0.036$, Fig. 2a, b, respectively, Table 2).

Also, significantly higher expressions of miR-21 were found in invasive compared with invasive with non-invasive component tumors in Ki-67 $\leq 20\%$ samples (Mann–Whitney, $P = 0.036$, Fig. 2c, Table 2).

When samples were analyzed by steroid receptor status, statistically significant differences among three groups of cancers were found in ER+, PR+, and ER+PR+ tumor samples (Kruskal–Wallis test $P = 0.006$, $P = 0.008$, and $P = 0.007$, Fig. 2d–f, respectively, Table 3), with highest expression of miR-21 in invasive tumors. In ER– and PR– subgroups, invasive cancers showed the lowest expression of miR-21, although not significant, but with an increasing trend toward pure invasive tumors in PR– subgroup ($P = 0.063$, Table 3).

Trend to higher expression in invasive compared with invasive with non-invasive component cancers was found in patients with age above 50 ($P = 0.067$, Mann–Whitney U test, Table 2) and Her-2-negative samples ($P = 0.067$, Mann–Whitney U test, Table 3).

MiR-21 Spearman’s correlation analysis

Correlation analysis of miR-21 with age, tumor size, ER, PR status, and Ki-67 expression is given in Table 4. In pure invasive sample group, significant negative correlation ($P < 0.05$) was found between miR-21 expression levels and (1) the age of patients ($\rho = -0.454$, $P = 0.017$, Spearman’s correlation) and (2) tumor size ($\rho = -0.5103$, $P = 0.006$, Spearman’s correlation), but there was positive correlation between miR-21 and (1) ER ($\rho = 0.022$, $P = 0.4381$, Spearman’s correlation) and (2) PR ($\rho = 0.505$, $P = 0.007$, Spearman’s correlation) levels.

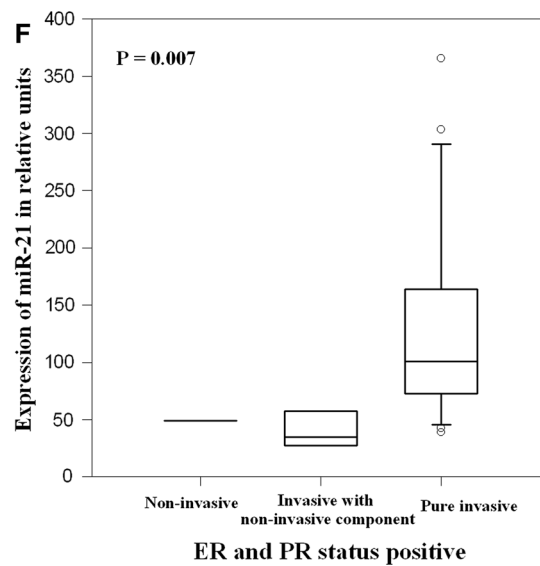
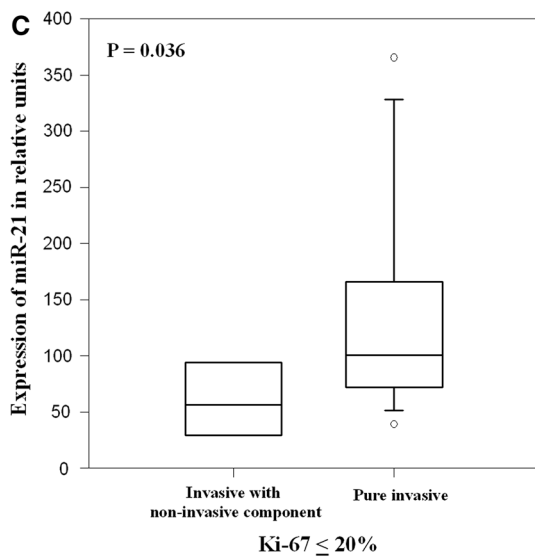
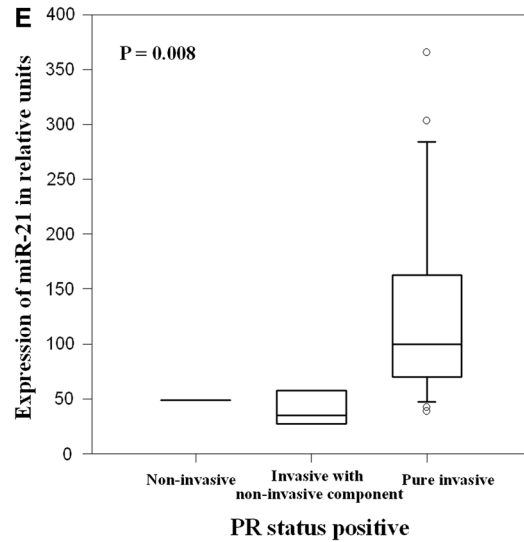
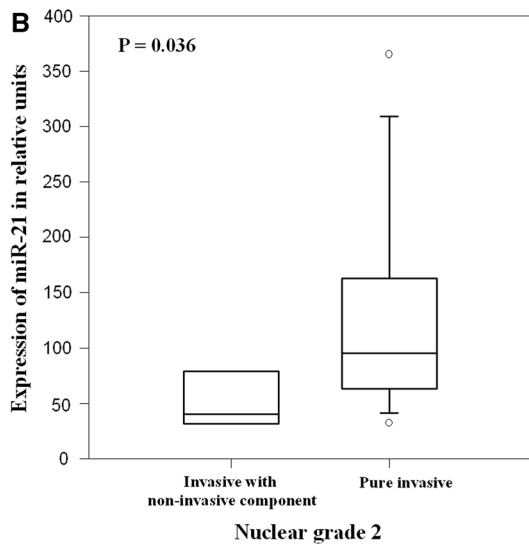
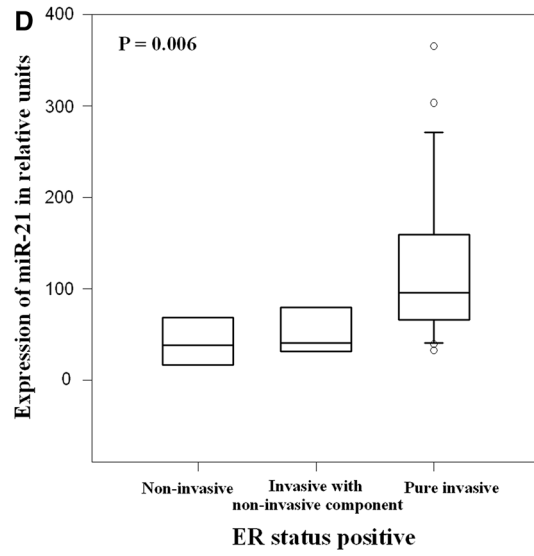
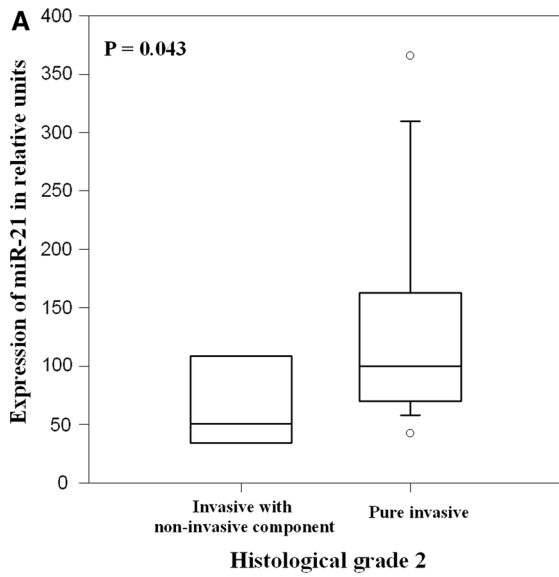


Table 2 MiR-21 expression and clinicopathological parameters

Clinical parameter	Relative miR-21 expression ^a				P value ^b
	Invasive with non-invasive component	N (%)	Invasive	N (%)	
Tumor size ^c ≤ 2 cm	74.020 (25.186–122.854)	2 (25.0)	141.412 (97.989–231.405)	9 (33.3)	0.289
Tumor size > 2 cm	56.547 (42.783–135.249)	5 (62.5)	72.756 (38.874–99.051)	18 (66.7)	0.628
Age > 50	50.817 (34.779–62.745)	8 (100)	92.303 (70.100–146.531)	21 (77.8)	0.067 ^d
Lymph node metastasis positive	50.339 (30.526–205.686)	4 (50)	90.459 (38.357–112.995)	13 (48.1)	0.533
Lymph node metastasis negative	64.545 (39.977–19.988)	4 (50)	122.419 (84.922–22.696)	14(51.8)	0.212
Histological grade 2	40.477 (36.691–64.811)	8 (100)	99.775 (72.105–161.889)	18 (66.7)	0.043
Nuclear grade 2	40.477 (33.691–64.811)	7 (87.5)	95.677 (68.096–156.187)	18 (66.7)	0.036
Proliferation index Ki-67 ≤ 20 %	56.547 (31.565–79.322)	5 (62.5)	100.499 (72.430–164.777)	15 (55.6)	0.036
Proliferation index Ki-67 > 20 %	45.088 (38.172–271.193)	3 (37.5)	69.595 (34.582–98.746)	12 (44.4)	0.829

Statistically significant values are in bold

^a Relative miR-21 expression with 25th–75th percentile in parentheses

^b P values <0.05 were considered significant according to Mann–Whitney U test (between two groups) and Kruskal–Wallis test (for three groups)

^c Maximal tumor diameter

^d Statistical trend

Discussion

We showed that expressional levels in invasive with non-invasive component and pure invasive cancers were significantly increased compared with normal tissue. There was also statistical difference in miR-21 expression between non-invasive and pure invasive tumors. Significant difference in amounts that rises from normal to pure invasive through non-invasive and invasive with non-invasive component in miR-21 expression levels emphasizes the role of miR-21 in breast cancer invasiveness. The fact that there was the highest difference between non-invasive and pure invasive cancer samples (the lowest P value) than in other compared group pairs indicates that miR-21 is a factor more specific to the process of invasion than for cancerogenesis or tumor formation.

miR-21 is often overexpressed in various types of invasive breast cancers compared with normal tissue, as some authors have already shown [12, 13, 25]. It is not surprising because miR-21 has already been characterized as an oncogenic element [8, 26], but no one has yet compared invasive with non-invasive breast tumors in order to confirm its role in breast cancer invasion.

One of the miR-21 functions is inhibition of PTEN mRNA translation, which is an important regulator of the cell cycle. Therefore, the moment when miR-21 starts to overexpress could be the trigger of cell cycle deregulation via PTEN. Together with other genes involved in carcinogenesis, miR-21 might promote tumor progression and invasion.

The increase in miR-21 expression levels may trigger the invasive potential since miR-21 blocks transcription of some tumor suppressor genes. In the development of

invasive phenotype, it is especially important that it stops transcription of TIMP3 mRNA [27]. This leads to extracellular matrix remodeling, and destroying of the basement membrane as a physical barrier to cancer cells, enabling them to invade the surrounding [16, 28]. Our results show that samples from invasive with non-invasive component breast cancer group had miR-21 expression median levels higher than non-invasive and smaller than invasive group. Significant difference appeared between: (1) normal and invasive with non-invasive component groups, (2) normal and pure invasive groups, and (3) non-invasive and pure invasive groups.

Invasive with non-invasive component group of tumors was not significantly different from nighters in situ, or pure invasive groups, with medians distributed between the medians of in situ and pure invasive breast carcinomas. According to these findings, miR-21 may be one of the factors that indicate that some invasive with non-invasive component tumors might represent transitional forms from in situ toward more aggressive invasive phenotype of the disease. Probably, some invasive breast cancers arise from non-invasive breast cancers, and some of them develop de novo [5–7]. Significant difference in miR-21 expression levels between non-invasive and pure invasive breast carcinomas denotes the role of miR-21 in the process of tumor invasion.

In ER+ group, miR-21 also showed its invasive character. It has the highest expression levels in invasive and the lowest in non-invasive groups with middle levels in invasive with non-invasive component group. In patients with both, ER+ and PR+ (ER+PR+) and only PR+ group, miR-21 has the highest levels in invasive than in non-invasive and the lowest expression levels were found

Table 3 Receptor status and relative miR-21 expression

Receptor status	Relative miR-21 expression ^a						P value ^b
	Non-invasive	N (%)	Invasive with non-invasive component	N (%)	Invasive	N (%)	
ER+	38.371 (19.216–62.918)	4 (57.1)	40.477 (33.691–64.811)	6 (75)	95.677 (68.096–156.187)	24 (88.9)	0.006
ER–			201.554 (56.547–346.561)	2 (25)	29.255 (8.064–34.919)	3 (11.1)	0.200
PR+	48.802 (24.256–73.348)	2 (40)	34.779 (29.439–50.339)	4 (50)	99.775 (72.105–161.889)	21 (77.8)	0.008
PR–			89.701 (50.817–234.707)	4 (50)	32.358 (22.191–47.754)	6 (22.2)	0.063 ^c
ER+PR+	48.802 (24.256–73.348)	2 (40)	34.779 (29.439–50.339)	4 (50)	100.499 (73.081–162.852)	21 (77.8)	0.007
ER+PR–	33.331 (14.176–52.487)	2 (40)	83.971 (45.088–122.854)	2 (25)	62.084 (39.790–75.966)	3 (11.1)	0.562
ER–PR–	157.438 (157.438–157.438)	1 (20)	201.554 (56.547–346.561)	2 (25)	29.255 (8.064–4.919)	3 (11.1)	0.133
Her-2+			89.297 (51.481–180.459)	2 (25)	201.554 (56.547–346.561)	9 (33.3)	0.889
Her-2–			40.477 (33.691–64.811)	6 (75)	91.381 (62.084–150.484)	18 (66.7)	0.067 ^c

Statistically significant values are in bold

ER estrogen receptor, PR progesterone receptor, Her-2 human epidermal growth factor receptor-2

^a Relative miR-21 expression with 25th–75th percentile in parentheses

^b P values <0.05 were considered significant according to Mann–Whitney U test (between two groups) and Kruskal–Wallis test (for three groups)

^c Statistical trend

Table 4 Spearman’s correlation between miR-21 expression and breast cancer characteristics

Variables	Tumor type	N	Correlation coefficient	P value ^a
Age (years)	Invasive	27	$\rho = -0.454$	0.017
	Invasive with non-invasive component	8	$\rho = -0.335$	0.387
Tumor size	Invasive	27	$\rho = -0.510$	0.006
	Invasive with non-invasive component	7	$\rho = 0$	0.968
ER status	Invasive	27	$\rho = 0.438$	0.022
	Invasive with non-invasive component	8	$\rho = -0.206$	0.619
	Non-invasive	5	$\rho = -0.476$	0.255
PR status	Invasive	27	$\rho = 0.505$	0.007
	Invasive with non-invasive component	8	$\rho = -0.655$	0.072 ^b
	Non-invasive	5	$\rho = -0.112$	0.783
Ki-67	Invasive	27	$\rho = -0.291$	0.139
	Invasive with non-invasive component	8	$\rho = 0.359$	0.353

Statistically significant values are in bold

ER estrogen receptor, PR progesterone receptor, Ki-67 proliferation index

^a P values less than 0.005 were considered statistically significant

^b Statistical trend

in invasive with non-invasive component group. This result might be the repercussion of the small number of samples. The other possibility is that invasive with non-invasive component group shows different behavior in PR+, than in

ER+ tumors, or that it is independent of PR status. We have found positive correlation between miR-21 and PR in pure invasive tumors, opposite of Qian et al. [29].

Although statistical trend that follows difference between invasive and invasive with non-invasive component samples persists in Her-2-negative samples, it seems that miR-21 expression is not related to Her-2 status. Therefore, miR-21 expression might be independent of PR and Her-2 receptor status.

In histological and nuclear grade 2 and Ki-67 ≤ 20 % groups, miR-21 expression is significantly higher in pure invasive compared with invasive with non-invasive component tumors, probably because pure invasive cancers might have higher infiltrating potential than invasive with non-invasive component samples.

In the patients older than 50 years, statistical trend to higher miR-21 expression in invasive compared with invasive with non-invasive component group was found. miR-21 was also significantly higher in invasive compared with non-invasive tumors in premenopausal patients (results not shown).

Taken together, presented results indicate that expression of miR-21 may distinguish pure invasive from invasive with non-invasive component breast cancers, at least in ER+, PR+ status, histological nuclear grade 2, and Ki-67 ≤ 20 % tumors.

We are aware of the limitations of our study, especially referring to the number of samples in ER/PR subgroups, but in situ carcinomas of the breast are very difficult to be diagnosed, not only because of their small sizes, but also because they are highly differentiated, and it is difficult to distinguish them from the surrounded tissue. Proportion of

non-invasive breast cancers detected by mammography in our country is still negligible.

Future researches should be directed toward measuring of circulating miR-21 from the blood since it has been shown and that could be the way to monitor breast cancer patients from time to time and maybe detect the presence of an invasive breast cancer tissue that is small and not palpable yet, or visible by mammography [30, 31]. miR-21 might be one of the factors for prediction and prevention of invasiveness and metastasis of small breast cancers that could be highly dangerous and aggressive, regardless of their size (there was negative correlation between tumor size and miR-21 expression in our cohort). To summarize, the expression of miR-21 is significantly different between non-invasive (in situ) and pure invasive breast carcinomas and might represent potential marker of invasiveness in breast cancer.

Importance of miR-21 as potential biological marker sheds the light on the future anti-miR therapies. Anti-miR therapies might not only prevent invasion and metastasis, but also lead to the tumor regression as already shown in animal models [32].

Conclusion

Our results indicate strong association between miR-21 overexpression and invasiveness of malignant breast tumors. miR-21 might be important marker, independent of some conventional clinical parameters for breast cancer invasiveness, and the target for future anti-miR therapies.

Acknowledgments This work was supported by the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia, Grant ON173049 (Nina Petrović, Vesna Mandušić, Boban Stanojević, Silvana Lukić, Lidija Todorović, Bogomir Dimitrijević). We thank Radoslav Davidović for valuable technical support.

Conflict of interest All authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Verkooijen HM, Fioretta GR, Vlastos G, Morabia A, Schubert H, Sappino A-P, et al. Important increase of invasive lobular breast cancer incidence in Geneva. Switzerland. *Int J Cancer*. 2003; 104:778–81.
- Bair EL, Chen ML, McDaniel K, Sekiguchi K, Cress AE, Nagle RB, et al. Membrane type 1 matrix metalloprotease cleaves laminin-10 and promotes prostate cancer cell migration. *Neoplasia*. 2005;7:380–9.
- Ma L, Weinberg RA. Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet*. 2008;24: 448–56.
- Xia M, Hu M. The role of microRNA in tumor invasion and metastasis. *J Cancer Mol*. 2010;5:33–9.
- Farabegoli F, Champeme MH, Bieche I, Santini D, Ceccarelli C, Derenzini M, et al. Genetic pathways in the evolution of breast ductal carcinoma in situ. *J Pathol*. 2002;196:280–6.
- Wong H, Lau S, Yau T, Cheung P, Epstein RJ. Presence of an in situ component is associated with reduced biological aggressiveness of size-matched invasive breast cancer. *B J Cancer*. 2010;102:1391–6.
- Hannemann J, Velds A, Halfwerk JBG, Kreike B, Peterse JL, van de Vijver MJ. Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling. *Breast Cancer Res*. 2006;8:61–80.
- Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res*. 2007;61(5 Part 2):24R.
- Wu W, Lin Z, Zhuang Z, Liang X. Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev*. 2009;18:50–5.
- Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28:369–78.
- Song B, Wang C, Liu J, Wang X, Lv L, Wei L, et al. MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29:29–36.
- Huang G-L, Zhang X-H, Guo G-L, Huang K-T, Yang K-Y, Shen X, et al. Clinical significance of miR-21 expression in breast cancer: SYBR-Green I-based real-time RT-PCR study of invasive ductal carcinoma. *Oncol Rep*. 2009;21:673–9.
- Lee JA, Lee HY, Lee ES, Kim I, Bae JW. Prognostic implications of microRNA-21 overexpression in invasive ductal carcinomas of the breast. *J Breast Cancer*. 2011;14:269–75.
- Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*. 2007;282:14328–36.
- Yang Y, Chaerkady R, Beer MA, Mendell JT, Pandey A. Identification of miR-21 targets in breast cancer cells using a quantitative proteomic approach. *Proteomics*. 2009;9:1374–84.
- Span PN, Lindberg RLP, Manders P, Tjan-Heijnen VCG, Heuvel JJTM, Beex LVAM, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinase expression in human breast cancer: TIMP-3 is associated with adjuvant endocrine therapy success. *J Pathol*. 2004;202:395–402.
- Mylona E, Magkou C, Giannopoulou I, Agrogiannis G, Markaki S, Keramopoulos A, et al. *Breast Cancer Res*. 2006;8:R57–64.
- Lopez-Camarillo C, Fonseca-Sánchez MA, Flores-Pérez A, Marchat LA, Arechaga-Ocampo E, Azuara-Liceaga E, et al. Functional roles of microRNAs in cancer: microRNomes and oncomiRs connection. In: Lopez-Camarillo CAL, Arechaga-Ocampo E, Azuara-Liceaga E, Perez Plasencia C, Fuentes-Mera L, et al., editors. *Oncogenomics and cancer proteomics—novel approaches in biomarkers discovery and therapeutic targets in cancer*. InTech; 2013. p. 72–89.
- Yoshinaga H, Matsushashi S, Fujiyama C, Masaki Z. Novel human PDCD4 (H731) gene expressed in proliferative cells is expressed in the small duct epithelial cells of the breast as revealed by an anti-H731 antibody. *Pathol Int*. 1999;49:1067–77.
- Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2007;283:1026–33.
- Yu Z, Baserga R, Chen L, Wang C, Lisanti MP, Pestell RG. microRNA, cell cycle, and human breast cancer. *Am J Pathol*. 2010;176:1058–64.
- Tang J, Ahmad A, Sarkar FH. The role of microRNAs in breast cancer migration, invasion and metastasis. *Int J Mol Sci*. 2012;13:13414–37.
- Leake R. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. *J Clin Pathol*. 2000;53:634–5.

24. Sauter G, Lee J, Bartlett JMS, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*. 2009;27:1323–33.
25. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65:7065–70.
26. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. MiR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2006;26:2799–803.
27. Li J, Zhang Y, Zhang W, Jia S, Tian R, Kang Y, et al. Genetic heterogeneity of breast cancer metastasis may be related to miR-21 regulation of TIMP-3 in translation. *Int J Surg Oncol*. 2013;2013:1–7.
28. Liu YE. Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). *J Biol Chem*. 1997;272:20479–83.
29. Qian B, Katsaros D, Lu L, Preti M, Durando A, Arisio R, et al. High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF- β 1. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;117:131–40.
30. Si H, Sun X, Chen Y, Cao Y, Chen S, Wang H, et al. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;139:223–9.
31. Kumar SKR, Pazhanimuthu A, Perumal P. Overexpression of circulating miRNA-21 and miRNA-146a in plasma samples of breast cancer patients. *Indian J Biochem Biophys*. 2013;50:210–4.
32. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol*. 2011;8:706–13.

Higher miR-21 expression in invasive breast carcinomas is associated with positive estrogen and progesterone receptor status in patients from Serbia

Nina Petrović · Vesna Mandušić · Bogomir Dimitrijević ·
Jelena Roganović · Silvana Lukić · Lidija Todorović ·
Boban Stanojević

Received: 31 March 2014 / Accepted: 21 April 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract MicroRNAs play essential role in breast carcinoma progression and invasion. Our principal goals were to assess clinicopathological and prognostic correlations of microRNA-21 (miR-21) expression levels in a group of 39 Serbian breast cancer patients with invasive lobular (ILC), ductal (IDC), or mixed (ILC–IDC) breast carcinomas and in order to discover the role of miR-21 in potential novel form of stratification of the patients with different estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) status. MiR-21 expression levels were measured by stem-loop real-time RT-PCR using TaqMan technology. ER, PR, human epidermal growth factor 2 receptor (Her-2), and proliferative index (Ki-67) were evaluated by immunohistochemistry. MiR-21 levels do not vary among ILC, IDC, and ILC–IDC subgroups. MiR-21 expression levels varied significantly in the age, tumor size, Ki-67, and different grade ($p = 0.030$, $p = 0.036$, $p = 0.027$ and $p = 0.032$, respectively) subgroups. ER+ and PR+ showed higher miR-21 levels than their negative receptor status paired groups ER– and PR– with $p = 0.012$ and $p = 0.018$, respectively. MiR-21 positively correlated with ER and PR status ($p = 0.018$, $\rho = 0.379$ and $p = 0.034$, $\rho = 0.345$, respectively). Our

findings suggest that miR-21 emulates transitional form of expression and that the levels of expression might be useful for stratification of the patients with different receptor status with the purpose to seek for new therapy approaches especially for the patients with the lack of response to conventional endocrine therapy.

Keywords Invasive breast carcinoma · Micro RNA · MiR-21 expression levels · Estrogen receptor status · Progesterone receptor status

Introduction

MicroRNAs are small nonprotein-coding RNA elements, involved in various biological processes such as development and differentiation, and pathological processes such as cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders, inflammation, immune response, and obesity [1]. Because of the importance of miRNA-mediated regulation of genes related to the cell cycle, proliferation, apoptosis, and cell migration, it is not surprising that changes in miRNAs expression might lead to cancerogenesis, tumor invasion, and metastasis [2]. In support of this, an increasing number of miRNAs have been found deregulated in a variety of cancers, acting as oncogenes (oncomirs) by post-transcriptional repressing the expression of target tumor suppressor genes or as tumor suppressor genes (tumor suppressor miRNAs) by repressing the expression of target oncogenes [2].

It has been shown that microRNA-21 (miR-21) expression is elevated in different types of cancers, especially breast carcinomas [3–5]. MiR-21 is one of the oncoMiRs with the highest oncogenic potential [1]. It has been reported that miR-21 has been implicated in initiation,

N. Petrović (✉) · V. Mandušić · B. Dimitrijević · L. Todorović ·
B. Stanojević
Department for Radiobiology and Molecular Genetics, Vinča
Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Mike
Petrovića Alasa 12-14, 11000 Belgrade, Serbia
e-mail: dragoninspiration@yahoo.com

J. Roganović
Department of Pharmacology, Faculty of Dentistry, University
of Belgrade, Dr. Subotića 8, 11000 Belgrade, Serbia

S. Lukić
Institute for Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14,
11000 Belgrade, Serbia

progression, and metastasis of breast carcinomas as well as a variety of other cancers by targeting various important genes [3–5]. In breast cancer, it has been demonstrated that miR-21 functions as an oncogene by targeting tumor suppressors genes such as phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) [3, 5, 6], programmed cell death 4 (*PDCD4*) [7, 8], tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (*TIMP3*) and other tumor-related genes [1, 9–11], and tropomyosin 1 (*TPM1*) [12].

MiR-21 regulates its target genes in a sequence-specific base pairing on their 3'-untranslated regions (3'UTR), but in an incompletely complementary way, unlike small interfering RNAs [13]. This leads to degradation of transcripts and translation inhibition, which blocks tumor suppressor mRNAs on their way to prevent cancerogenesis. The next step is probably oncogenesis, and miR-21 gets its functional prefix-*onco* (oncomiR-21) [1, 14, 15]. MiR-21 is an epigenetic element that negatively regulates its target genes in cancer, which causes tumor progression, invasion, and metastasis. This very powerful, but very small regulatory element is 22 nucleotides long [16]. Every miRNA has multiple target sites, so it is not surprising that miR-21 regulates many crucial points in cancerogenesis [17].

Invasive ductal carcinomas (IDC) is the most frequent histological subtype that contains approximately 70–80 % of all invasive breast cancers, while invasive lobular carcinomas (ILC), as the second most frequent breast cancer subtype involve only 5–10 % of all breast cancer cases. ILC are difficult for detection by mammography, because its cells infiltrate into the surrounding tissue on their own, not as groups of cells, so they cause minimal stromal response and they show less density unlike IDC [18]. For that reason a suitable genetic marker would be needed to give the reflection of histological image that cannot be seen, and to reveal its relations with different histopathological characteristics of tumors, especially in the process of invasion. Our study has been directed toward examination of miR-21 overexpression in these two major histological subtypes of invasive breast carcinomas IDC and ILC.

There has been a welcome increase in studies evaluating the correlation of miR-21 expression with clinicopathological characteristic such as histological grade, lymph-node metastasis, ER status, PR status, or Her-2 status, but this correlation is still inconclusive due to the inconsistencies across different reports [3–6, 8, 11–13]. Furthermore, some studies revealed that high miR-21 expression was associated with poor survival in breast cancer patients, while others give opposing results. Therefore, at this time, the clinical significance of miR-21 is poorly understood to reach any conclusion about miR-21 utility as an independent biomarker.

In our previous study [19], we have shown the importance of miR-21 in breast cancer invasion. In this study, we

wanted to clarify an influence on the invasion but only within the group of invasive breast cancer patients with different grades, age, tumor size, lymph-node status, proliferation index, and ER, PR, and Her-2 receptor status. This study continues our previous researches in order to reveal the behavior of invasive factor miR-21 in pure invasive breast carcinomas and the difference between invasive tumors with different clinical parameters and pathological characteristics of tumors and especially potential correlations and/or differences between tumors with different receptor status.

This study was also performed to shed more light and to better understand biological role of miR-21 and its clinical relevance by investigating the relationship between the expression of miR-21 and clinicopathological characteristics in a group of 39 Serbian patients admitted to our reference center for invasive breast carcinoma from November 2012 to May 2013. We also correlated miR-21 expression levels with histological data to investigate its utility as potential novel biomarker. Our work is the first study of this kind in Serbia.

The main goal of this research was to investigate whether there was a difference in miR-21 expression levels in patients with various clinicopathological characteristics and to have revealed its potential significance in stratification of the patients with different ER, PR, and Her-2 status, actually, to have determined the difference in miR-21 expression levels between breast carcinomas in various receptor status subgroups (ER+ and ER-, PR+ and PR-, and ER-/PR- and ER+/PR+). We also wanted to show whether there was a difference between Her-2+ and Her-2- patients.

About 70–80 % of primary breast carcinomas express ER [20]. Expression levels of ER are of the major importance in response to endocrine therapies and prognosis in ER+ patients. Expression levels of ER vary widely among patients [21], and it changes during the cancer progression. Some patients become resistant for standard therapeutics. That is the reason why it is necessary to include additional factors (potential biomarkers) such as miR-21, especially in ER+ patients, not only for patient stratification but also in searching for a new kind of therapeutics. Progesterone receptor shows its expression pattern to be very similar to the estrogen receptor expression, because 90 % of PR+ tumors are also ER+ [22].

Methods

Patients and samples

Samples from 39 patients and 5 normal breast tissue samples matched to corresponding tumors were obtained

from the Institute for Oncology and Radiology of Serbia—11 ILC, 24 and IDC and 4 invasive lobular associated with ductal carcinomas (ILC–IDC). The surgeries of all patients were performed at the Institute of Oncology and Radiology of Serbia between November 2012 and May 2013. All patients were diagnosed and treated according to uniform protocol in a single center. Pathological diagnosis was based on the WHO standards and confirmed by two experienced pathologists (S.L, Dj.S). This study has an Institutional Review Board approval according to the National Health Regulation 5002/1-01. All the patients gave informed consents.

Isolation of total RNA from fresh-frozen tissue

The fresh-frozen tissue of breast cancers was homogenized in liquid nitrogen. Total RNA has been isolated with TRI Reagent (Ambion, Foster City). After adding of 0.2 ml of chloroform, the samples were centrifuged for 10 min at 14000 RPM (4 °C). RNA was precipitated with isopropanol. Then, the samples were centrifuged (14,000 RPM, 4 °C), and the pellet was rinsed with 1 ml of 70 % ice-cold ethanol. The pellets were dried and dissolved in 50–100- μ l DEPC-DW and incubated for 10 min at 65°C. Quantification of RNA samples was performed by Biospec-Nano, and we checked its quality on 1 % agarose gel.

Immunohistochemistry

Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) protein levels were evaluated by immunohistochemistry with rabbit and mouse monoclonal antibodies (RM-9101-S1, Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK, and M3569, Dako Copenhagen, Denmark, respectively) on 4–5- μ m sections of formalin-fixed paraffin-embedded blocks. Human epidermal growth factor receptor 2 (Her-2) status was evaluated with antibody rabbit-antihuman A0485, (Dako, Copenhagen, Denmark), while proliferation index was evaluated with Ki-67 with RM9106-S1, (Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK). Tissue samples were deparaffinized, rehydrated, and treated with 3 % H₂O₂ for 10 min. The slides were immersed in 10-mM citrate buffer (pH 6) in microwave oven for 25 min (650 W), than cooled and washed in TBS, pH 7.4. Sections were incubated with the antibodies at 1:50 dilutions with Ab Diluent Buffer (Code No. S0809 Dako, Copenhagen, Denmark). After washes in TBS, samples were treated with ready-to-use polymer system (TP-125-HL, Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK) and visualized with diaminobenzidine, according to the manufacturer's instructions for paraffin-embedded tissues. Brown nuclear staining in cells was counted and scored according to Leak et al. [23], for ER and PR status. Her-2 expression was considered positive

for 3+ by immunohistochemical procedure [24]. Ki-67 levels were evaluated as the percentage of positively stained cells.

Reverse transcription and qPCR of miR-21

For the reaction of reverse transcription, 10 ng of RNA together with specific stem-loop RT primer for miR-21 and for endogenous control RNU6B, from TaqMan[®] miR-21 Assay (ID: 000397 and ID: 001093, respectively) were used in each reaction and mixed with TaqMan Micro RNA Reverse Transcription Kit components with following thermal conditions: 16 °C for 30 min, 42 °C for 30 min, and 85 °C for 5 min. RT-qPCR was performed according to the protocol TaqMan[®] Small RNA Assays Protocol, Applied Biosystems, Foster City, CA. Quantitative RT-PCR amplification reactions were performed on Applied Biosystems, Foster City, CA, with specific TaqMan[®] miR-21 and RNU6B Assays with the following thermal conditions: 95 °C 10 min; (95 °C 15 s; 60 °C 60 s) for 40 cycles.

We analyzed miR-21 expression levels in relative units, and the expression level values were normalized to endogenous control (RNU6B) and calibrated to the sample with the lowest relative expression (set as referent-1 \times sample). Relative quantity values were analyzed with the 7500 System SDS Software, by $\Delta\Delta$ Ct method, following the equation $RQ_{\text{sample}} = 2^{-(\Delta C_{\text{t sample}} - \Delta C_{\text{t calibrator}})}$ (where RQ_{sample} represents relative quantity of sample, while $\Delta C_{\text{t}} = C_{\text{t miR-21}} - C_{\text{t RNU6B}}$).

Statistical analysis

MiR-21 relative expression levels were characterized by their median ranges. For two independent group comparisons, we used Mann–Whitney *U* nonparametric test and Kruskal–Wallis nonparametric test (Dunn's method) for 3 or more independent groups. For the correlation analysis, Spearman's test was used. For statistically significant results, we considered *p* values ≤ 0.050 . All calculations were performed by *GraphPad Prism 5* software (GraphPad Software, Inc. CA).

Results

To assess the clinical relevance of miR-21 in human breast cancer, we measured its expression in a group of breast cancer patients samples ($n = 39$) that included IDC ($n = 24$), ILC ($n = 11$), mixed ILC–IDC ($n = 4$) and normal-matched tissues to corresponding tumor ($n = 5$).

First, we compared miR-21 expression levels among three tumor subgroups—ILC, IDC, and ILC–IDC (histologically mixed tumors). There was no statistically

Table 1 Association of miR-21 relative expression with clinicopathological features

Clinicopathological features	N (%)	Relative miR-21 expression ^a	p value ^b
<i>Tumor size^c (cm)</i>			
≤2	13 (33.3)	122.854 (92.969–209.181)	0.030
>2	26 (66.7)	64.449 (38.874–92.303)	
<i>Age</i>			
≤60	20 (51.3)	101.065 (59.316–234.064)	0.050
>60	19 (48.7)	64.087 (35.323–90.920)	
<i>Lymph-node metastasis</i>			
Negative	20 (51.3)	75.256 (50.817–132.133)	0.623
Positive	19 (48.7)	64.811 (36.102–100.137)	
<i>Histological grade</i>			
I	6 (15.4)	66.166 (38.874–150.484)	0.036
II	28 (71.8)	88.472 (58.007–132.133)	
III	5 (12.8)	29.255 (14.718–46.882)	
<i>Proliferation index Ki-67 (%)</i>			
≤20	19 (48.7)	89.822 (61.777–156.187)	0.027
>20	20 (51.3)	52.008 (32.358–90.459)	
<i>Tumor type</i>			
Ductal	24 (61.5)	61.777 (37.371–125.492)	0.567
Lobular	11 (28.2)	92.303 (72.430–117.449)	
Mixed (ILC–IDC)	4 (10.3)	89.109 (34.582–185.079)	

Bold values are statistically significant

ILC invasive lobular carcinoma, IDC invasive ductal carcinoma

^a Relative miR-21 expression with 25th–75th percentile in parentheses

^b *p* values equal or <0.05 were considered significant according to Mann–Whitney *U* test (between two groups) and Kruskal–Wallis test (for three groups)

^c Maximal tumor diameter

significant difference among those subgroups in miR-21 expression levels, so for further analysis, we analyzed them together (Table 1).

The difference between in miR-21 expression levels between normal and matched invasive breast cancer samples

We examined five IDC samples and compared them with their matched nontumor samples. Our results showed that miR-21 levels were significantly increased in tumors compared with matched controls ($p = 0.043$, Wilcoxon test, Fig. 1a, b).

Correlation between miR-21 expression and clinicopathological characteristics

Since miR-21 expression levels have been associated with certain clinical parameters of breast cancer in previous works, we evaluated its correlation in our series.

Tumors with a maximal diameter equal or smaller than 2 cm showed statistically higher miR-21 expression levels as compared with tumors with maximal diameter higher than 2 cm ($p = 0.030$, Mann–Whitney *U* test, Table 1; Fig. 2a). At the age of 60 or under 60 years and Ki-67 >20 patients, miR-21 expression was significantly higher than in the age over 60 and Ki-67 ≤20 patients ($p = 0.036$ and $p = 0.027$, respectively, Mann–Whitney *U* test, Table 1;

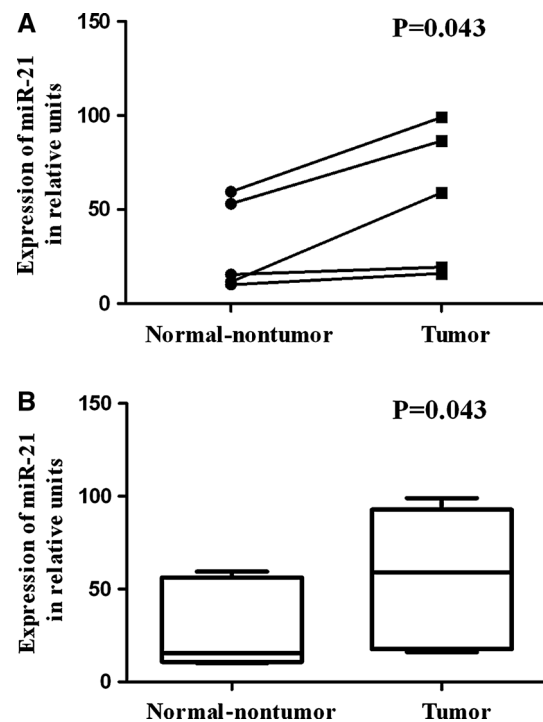


Fig. 1 Relative miR-21 expression in normal breast tissue and in cancer samples presented with **a** symbols and lines diagram (symbol represents the expression value of a single sample of the normal connected with the value of the tumor sample) and **b** the plot that shows interquartile range (boxes), the line that indicates the median and the whiskers extended from the boxes represent the highest and lowest values

Fig. 2 The difference in miR-21 expression levels between subgroups of **a** tumor size ≤ 2 cm and >2 cm, **b** age ≤ 60 and >60 years, **c** proliferation index Ki-67 ≤ 20 and >20 , and **d** histological grades I, II, and III. The values of miR-21 expression levels are shown in arbitrary units (determined by $\Delta\Delta C_t$ method as explained in “Methods” section), normalized to RNU6B and calibrated to $1 \times$ sample (sample with lowest miR-21 expression). Statistically significant differences were considered for $p < 0.05$

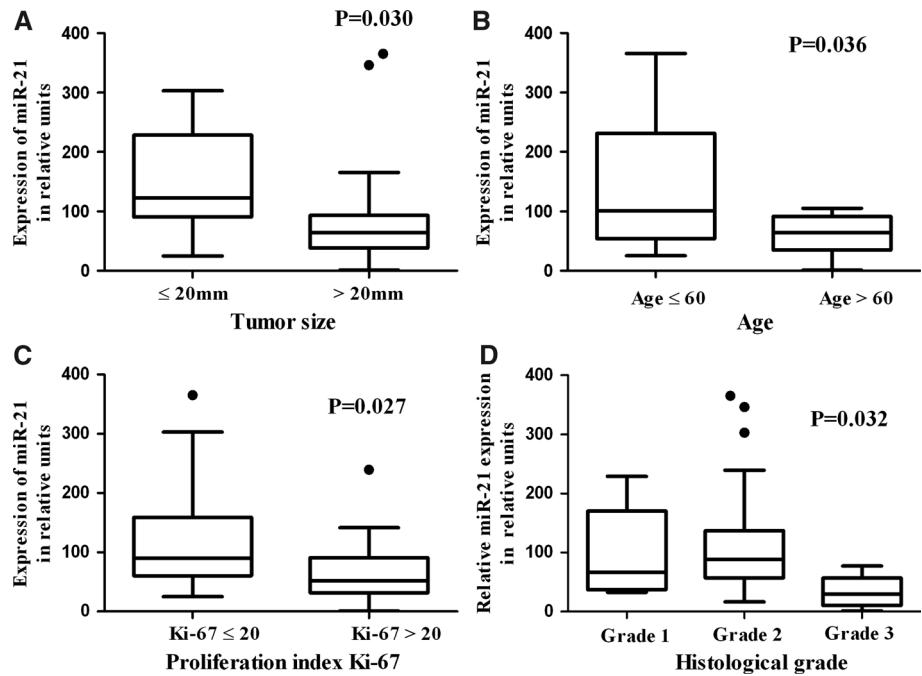


Table 2 Association of miR-21 relative expression with receptor status

Receptor status	N (%)	Relative miR-21 expression ^a	p value ^b
<i>ER status</i>			
ER–	7 (17.9)	29.255 (16.849–51.612)	0.012
ER+	32 (82.1)	83.540 (59.197–132.133)	
<i>PR status</i>			
PR–	13 (33.3)	45.088 (26.764–82.066)	0.018
PR+	26 (66.7)	91.381 (59.467–150.484)	
<i>ER and PR status</i>			
ER–PR–	7 (17.9)	29.255 (16.849–51.612)	0.006
ER+PR–	6 (15.4)	45.088 (28.277–82.066)	
ER+PR+	26 (66.7)	91.381 (59.467–150.484)	
<i>Her-2 status</i>			
Her-2–	27 (69.2)	72.105 (36.102–117.265)	0.308
Her-2+	12 (30.8)	79.946 (58.007–180.459)	

Bold values are statistically significant

ER estrogen receptor, PR progesterone receptor, Her-2 human epidermal growth factor receptor-2

^a Relative miR-21 expression with 25th–75th percentile in parentheses

^b p values <0.05 were considered significant according to Mann–Whitney U test (between two groups) and Kruskal–Wallis test (for three groups)

Fig. 2b, c, respectively). The highest miR-21 expression levels appeared in histological grade 2 tumors, while the lowest values were detected in histological grade 3 tumors, with $p = 0.032$, (Kruskal–Wallis test, Dunn’s method, Table 1; Fig. 2d).

In all receptor status, subgroups ER–, PR–, and ER–/PR– miR-21 were statistically significantly elevated compared with ER+, PR+, and ER+/PR+ subgroups, ($p = 0.012$, $p = 0.018$, and $p = 0.013$, respectively, Mann–Whitney U test, Table 2; Fig. 3a, c, e, respectively). When we compared three subgroups with different receptor status (ER–/PR–, ER+/PR–, and ER+/PR+), all pairwise p value was 0.006 (Kruskal–Wallis test, Dunn’s method, Table 2; Fig. 3e). Statistically significant difference appeared between ER–/PR– and ER+/PR+ subgroups ($p = 0.008$, Mann–Whitney U test, Fig. 3e) and between ER+/PR– and ER+/PR+ subgroups ($p = 0.035$, Mann–Whitney U test, Fig. 3e). ER+/PR– subgroup miR-21 expression levels were higher than in ER–/PR–, but lower than in ER+/PR+ subgroup, which statistically differed from all groups.

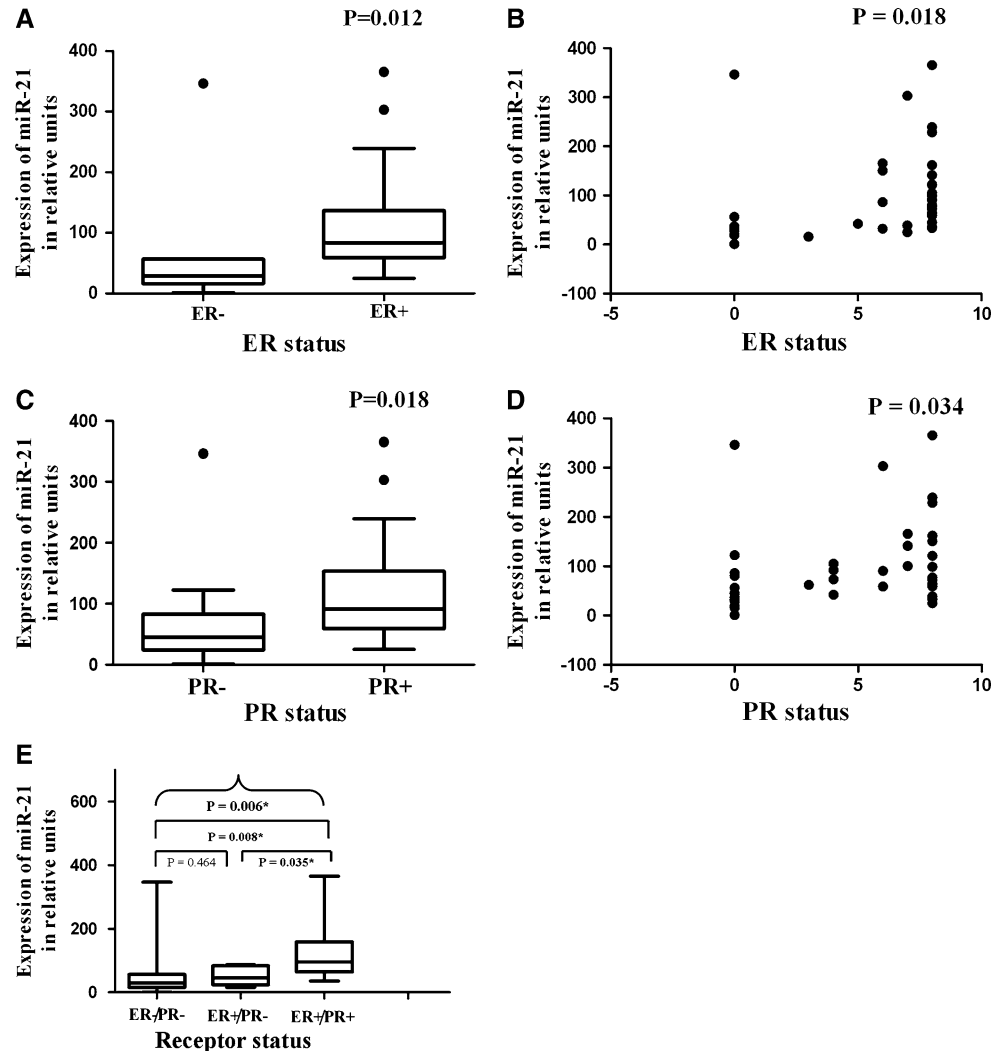
Spearman correlation between miR-21 expression levels and clinicopathological features

MiR-21 expression negatively correlates with the age of patients ($p = 0.018$, $\rho = -0.378$, Spearman correlation, Fig. 3b), and positively with ER and PR status ($p = 0.018$, $\rho = 0.379$, and $p = 0.034$, $\rho = 0.345$, respectively, Spearman correlation, Fig. 3d).

Discussion

MiR-21 is one of the most prominent up-regulated miRNAs in a majority of human cancers [1, 25]. An increasing

Fig. 3 Association of miR-21 relative expression with receptor status. Relative miR-21 expression with 25th–75th percentile in parentheses and medians. **a** ER+ versus ER– subgroups, **b** Spearman's correlation between miR-21 and ER status, **c** PR+ versus PR– subgroups, **d** Spearman's correlation between miR-21 and PR status, **e** ER–/PR– versus ER+/PR– versus ER+/PR+ subgroups all pairwise. Statistically significant differences were considered for $p < 0.05$, and $p < 0.1$ were considered as statistical trend



number of evidence has demonstrated that miR-21 is up-regulated in breast cancer [3, 5]. For that reason, miR-21 expression has been extensively explored for clinicopathological associations. In particular, it has been proposed, although not always unequivocally, that miR-21 overexpression is associated with more aggressive clinical course and poorer outcome of breast cancer patients [3–5]. Discordant findings reported in the literature are probably due to the difference in the characteristic of patients, sample size, detection methodology, the duration of follow-up, and so on.

In our previous study [19], we have shown that miR-21 has important factor and regulator of breast cancer invasion, comparing noninvasive, invasive with noninvasive component (invasive associated with noninvasive breast carcinoma), and pure invasive breast carcinomas. In this study, we compared miR-21 expression levels of ILC ($n = 11$) with IDC ($n = 24$) and ILC–IDC ($n = 4$) in order to find out whether miR-21 expression level is

specific for distinct histological subtype. Our results showed that there were no significant differences between these three groups, suggesting that that miR-21 expression might be a process that does not depend on histological type of invasive breast carcinoma, and that it probably has general character in the process of breast cancer invasion. So, further we decided to analyze them together.

The difference that we have found between normal and matched tumor samples, taken together with the results of previous studies, demonstrate that elevated miR-21 expression in breast tumor tissues compared with normal tissues is undeniable, and emphasize that miR-21 might probably be involved in the process of malignant transformation in our cases [3, 6, 11].

Next, we compared miR-21 expression levels with clinicopathological features of breast cancer patients. We found that miR-21 expression levels were significantly increased from grade I to grade II, and then, the levels were rapidly decreased toward grade III. According to some

studies, miR-21 expression levels should have been the highest in grade III tumors because it is related with poor prognosis, and miR-21 levels were shown to be the highest in the most aggressive and poorly differentiated tumors. But, if we observe its expression from the aspects of invasion and differentiation together, we might consider that this pattern of miR-21 expression might be logical. Videlicet, miR-21 levels increase when normal tissue becomes cancerous. We confirmed this with the difference between normal and tumor samples. From the “invasion aspect” and by the fact that miR-21 levels were increased in grade II compared with grade I tumors, we might consider that levels of expression rise through the tumor progression and invasion. Expression levels of miR-21 rise further until the tumor probably reaches the maximum of its miR-21 expression, and then, miR-21 expression probably decreases. That is, increasing expression profile of miR-21 might be transient as Kim et al. [25] have shown in adipocyte cell line model. Our results show that grade III tumors have the lowest miR-21 expression (compared with grade I and grade II tumors). Similarly, high miR-21 levels were associated with increased risk of the disease recurrence in stage I and II patients, while it was opposite relation among the patients with III and IV stages, but grade I was compared with grade II and III tumors together [26]. On the other hand, Rask et al. [14] have not found significant difference in miR-21 expression between grade I and II tumors (low and high risk patient groups). When we observe our results from the aspect of miR-21 role in the process of differentiation, we can explain why miR-21 levels were the lowest in grade III tumors. I.e. Kim et al. [25] showed that miR-21 levels are elevated during the cell differentiation, so it supports our findings that miR-21 has the lowest levels in the least differentiated grade III tumors. Our results might be the repercussion of the small sample size, or because the upregulating pathways of miR-21 are still unknown and poorly understood [27], and so the pathways that regulate cancer progression, invasion and metastasis. Our results suggest that further researches are necessary, but it is evident that miR-21 shows increasing manner toward higher grade, while in the highest, it decreases below grade I. We might assume that large number of pathways is included in cancer formation and progression, and that we must include additional factors for prognosis and therapies.

MiR-21 correlates negatively with the age of patients, and our results also confirmed that miR-21 reaches significantly higher levels in patients <60 years old than in patients over 60 years. Qian et al [26] also showed that miR-21 expression negatively correlated with the age of patients.

Iorio [28] has also shown that size of the tumor has not correlated with miR-21 overexpression. But, tumors with

maximal diameter over 2 cm significantly differed from tumors with maximal diameter 2 cm or less, according to our findings. Additionally, bigger tumors had lower miR-21 expression levels than smaller. Li et al. [11] classified tumors smaller than 2 cm in more aggressive group together with Her-2 and lymph-node metastasis positive characteristics and had higher mir-21 expression levels, than tumors with Her-2 and lymph-node negative characteristics.

According to our results, miR-21 also does not correlate with lymph-node status, while Huang et al. [3] showed that miR-21 overexpression was related to lymph-node positivity, which means that more detailed analysis are required.

Our findings showed decreasing expression character from lower proliferation index (Ki-67 ≤ 20) toward higher (Ki-67 >20), opposite from Huang et al. [3]. So, miR-21 expression might be independent from Ki-67 expression. Due to the absence of significant differences between Her-2+ and Her-2- tumor samples, miR-21 might also be independent of Her-2 status. Although, amplification of Her-2 in Her-2+ patients mediates tumor progression and invasion, and miR-21 is described as a factor of breast cancer invasiveness, our result showed that there was no clear relationship between miR-21 and Her-2 status. In our previous study [19], we compared IDC associated with DCIS (ductal carcinoma in situ) with pure IDC samples in order to reveal whether there was the difference between in miR-21 expression in Her-2- and Her-2+ tumors. MiR-21 acted independently of Her-2 status in both cases, which supports our present results and the results from Huang et al. [29].

Our results showed that miR-21 correlates positively with ER and PR status and might be used as a potential biomarker independent of pathohistological factors such as Ki-67 or Her-2, as well as for novel clinical stratification of patients with different ER and PR receptor status in order to steer these patients for new kinds of potential therapies such as anti-miR therapy. This could be of the great importance especially for patients with ER+, PR+, or ER+/PR+ status that do not respond to conventional therapies and treatments. Mattie et al. [30] showed that expression of this oncomiR and its downstream targets is regulated by ER and that it was higher in ER+ compared with ER- tumors. We showed that PR-miR-21 relation seems to be similar to ER-miR-21 relation (with high positive correlation between ER and PR levels, results not shown). ER+/PR- subgroup is characterized to be the subgroup of patients that is less sensitive to tamoxifen than other receptor subgroups [31]. According to miR-21 levels, this subgroup lays just in the middle, between ER-/PR- and ER+/PR+ groups and significantly differs from ER+/PR+. This might be target group of patients, where future anti-miR-21 therapy should be applied.

It is a matter of question is miR-21 biomarker that relates or depends on Ki-67, Her-2 lymph-node status, but it is evident that it correlates with ER and PR status and that it has significant oncogenic potential and probably leads to tumor invasion. In summary, our results show that miR-21 is overexpressed in breast cancer and significantly correlated with distinct clinicopathological characteristics.

According to these findings and findings from our previous study [19], miR-21 is a potential biomarker for breast cancer invasion, rather than cancerogenesis and that it might be great biological marker for regrouping the patients with different receptor status. In other words, miR-21 is a potential biomarker of invasion that has general character, independent of histological subtype of invasive breast carcinoma, Ki-67, Her-2, or lymph-node status.

Also, miR-21 has transitional character, which means that it rises and stops when the aggressiveness of the tumor reaches its maximum.

Further miR-21 studies are promising in the terms of future clinical applications in clinical stratification and classification of patients with different pathohistological characteristics and receptor status, as well as in the terms of novel additional anti-miR therapy approaches.

Acknowledgments This work was supported by the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia, Grant ON173049 (Nina Petrović, Vesna Mandušić, Boban Stanojević, Lidija Todorović, Silvana Lukić, Bogomir Dimitrijević).

Conflict of interest All the authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Pan X, Wang Z-X, Wang R. MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(12):1224–32. doi:10.4161/cbt.10.12.14252.
- Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metast Rev*. 2009;28(3–4):369–78. doi:10.1007/s10555-009-9188-5.
- Huang G-L, Zhang X-H, Guo G-L, Huang K-T, Yang K-Y, Shen X, You J, Hu X-Q. Clinical significance of miR-21 expression in breast cancer: SYBR-Green I-based real-time RT-PCR study of invasive ductal carcinoma. *Oncol Rep*. 2009. doi:10.3892/or_00000270.
- Song B, Wang C, Liu J, Wang X, Lv L, Wei L, Xie L, Zheng Y, Song X. MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29(1):29. doi:10.1186/1756-9966-29-29.
- Lee JA, Lee HY, Lee ES, Kim I, Bae JW. Prognostic implications of MicroRNA-21 overexpression in invasive ductal carcinomas of the breast. *Int J Breast Cancer*. 2011;14(4):269–75. doi:10.4048/jbc.2011.14.4.269.
- Qi L, Bart J, Tan L, Platteel I, Sluis T, Huitema S, Harms G, Fu L, Hollema H, Berg A. Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. *BMC Cancer*. 2009;9(1):163. doi:10.1186/1471-2407-9-163.
- Yoshinaga H, Matsuhashi S, Fujiyama C, Masaki Z. Novel human PDCD4 (H731) gene expressed in proliferative cells is expressed in the small duct epithelial cells of the breast as revealed by an anti-H731 antibody. *Pathol Int*. 1999;49:1067–77. doi:10.1186/bcr1285.
- Yang Y, Chaerkady R, Beer MA, Mendell JT, Pandey A. Identification of miR-21 targets in breast cancer cells using a quantitative proteomic approach. *Proteomics*. 2009;9(5):1374–84. doi:10.1002/pmic.200800551.
- Span PN, Lindberg RLP, Manders P, Tjan-Heijnen VCG, Heuvel JJTM, Beex LVAM, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinase expression in human breast cancer: TIMP-3 is associated with adjuvant endocrine therapy success. *J Pathol*. 2004;202(4):395–402. doi:10.1002/path.1528.
- Mylona E, Magkou C, Giannopoulou I, Agrogiannis G, Markaki S, Keramopoulos A, Nakopoulou L. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-3 protein in invasive breast carcinoma: Relation to tumor phenotype and clinical outcome. *Breast Cancer Res*. 2006;8(5):R57. doi:10.1186/bcr1607.
- Li J, Zhang Y, Zhang W, Jia S, Tian R, Kang Y, Ma Y, Li D. Genetic heterogeneity of breast cancer metastasis may be related to miR-21 regulation of TIMP-3 in translation. *Int J Sur Oncol*. 2013;2013:1–7. doi:10.1155/2013/875078.
- Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*. 2007;282(19):14328–36. doi:10.1074/jbc.M611393200.
- Lopez-Camarillo C, Fonseca-Sánchez MA, Flores-Pérez A, Marchat LA, Arechaga-Ocampo E, Azuara-Liceaga E, et al. Functional roles of microRNAs in cancer: microRNomes and oncomiRs connection. In: Lopez-Camarillo C, Marchat LA, Arechaga-Ocampo E, Azuara-Liceaga E, Perez Plasencia C, Fuentes-Mera L, et al., editors. *Oncogenomics and cancer proteomics—novel approaches in biomarkers discovery and therapeutic targets in cancer*. InTech, p. 72–89, 2013; 9(1):53–9. doi:10.1111/j.1743-7563.2012.01548.x.
- Rask L, Balslev EVA, JØRgensen S, Eriksen J, Flyger H, MØLLer S, HØGDall E, Litman T, Schnack Nielsen B. High expression of miR-21 in tumor stroma correlates with increased cancer cell proliferation in human breast cancer. *Apms*. 2011;119(10):663–73. doi:10.1111/j.1600-0463.2011.02782.x.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259–69. doi:10.1038/nrc1840.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115(2):199–208.
- Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, Benes V, Schmidt S, Blake J, Ball G, Kerin MJ. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009;11(3):R27. doi:10.1186/bcr2257.
- Verkooijen HM, Fioretta Gr, Vlastos G, Morabia A, Schubert H, Sappino A-P, et al. Important increase of invasive lobular breast cancer incidence in Geneva, Switzerland. *Int Cancer*. 2003;104(6):778–81. doi:10.1002/ijc.11032.
- Petrović N, Mandušić V, Stanojević B, Lukić S, Todorović L, Roganović J, et al. The difference in miR-21 expression levels between invasive and non-invasive breast cancers emphasizes its role in breast cancer invasion. *Med Oncol*. 2014;31(3):867. doi:10.1007/s12032-014-0867-x.
- Harrell JC, Dye WW, Harvell DM, Pinto M, Jedlicka P, Sartorius CA, Horwitz KB. Estrogen insensitivity in a model of estrogen receptor positive breast cancer lymph node metastasis. *Cancer Res*. 2007;67(21):10582–91.
- Yamashita H, Nishio M, Kobayashi S, Ando Y, Sugiura H, Zhang Z, Hamaguchi M, Mita K, Fujii Y, Iwase H. Phosphorylation of estrogen receptor α serine 167 is predictive of response to

- endocrine therapy and increases postrelapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005;7(5):R753. doi:[10.1186/bcr1285](https://doi.org/10.1186/bcr1285).
22. Ng CH, Pathy NB, Taib NA, Mun KS, Rhodes A, Yip CH. The estrogen receptor negative-progesterone receptor positive breast carcinoma is a biological entity and not a technical artifact. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(4):1111–3. doi:[10.7314/apjcp.2012.13.4.1111](https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.4.1111).
 23. Leake R. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. *J Clin Pathol.* 2000;53(8):634–5. doi:[10.1136/jcp.53.8.634](https://doi.org/10.1136/jcp.53.8.634).
 24. Sauter G, Lee J, Bartlett JMS, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1323–33. doi:[10.1200/jco.2007.14.8197](https://doi.org/10.1200/jco.2007.14.8197).
 25. Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, Jung JS. miR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Stem Cells.* 2009;27(12):3093–102. doi:[10.1002/stem.235](https://doi.org/10.1002/stem.235).
 26. Qian B, Katsaros D, Lu L, Preti M, Durando A, Arisio R, Mu L, Yu H. High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF- β 1. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;117(1):131–40. doi:[10.1007/s10549-008-0219-7](https://doi.org/10.1007/s10549-008-0219-7).
 27. Wickramasinghe NS, Manavalan TT, Dougherty SM, Riggs KA, Li Y, Klinge CM. Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucl Acids Res.* 2009;37(8):2584–95. doi:[10.1093/nar/gkp117](https://doi.org/10.1093/nar/gkp117).
 28. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65(16):7065–70. doi:[10.1158/0008-5472.CAN-05-1783](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1783).
 29. Huang TH, Wu F, Loeb GB, Hsu R, Heidersbach A, Brincat A, Horiuchi D, Lebbink RJ, Mo YY, Goga A, McManus MT. Up-regulation of miR-21 by HER2/neu signaling promotes cell invasion. *J Biol Chem.* 2009;284(27):18515–24. doi:[10.1074/jbc.M109.006676](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.006676).
 30. Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, Fedele V, Ginzinger D, Getts R, Haqq C. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer.* 2006;5(1):24. doi:[10.1186/1476-4598-5-24](https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-24).
 31. Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, Elledge RM. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Nat Cancer Inst.* 2005;97(17):1254–61. doi:[10.1093/jnci/dji249](https://doi.org/10.1093/jnci/dji249).