

Экспрессионный анализ микроРНК для диагностики и прогноза рака молочной железы

Н.И. ПОСПЕХОВА¹, С.В. ПОЯРКОВ¹, Е.Г. ЗЕНИТ-ЖУРАВЛЁВА¹,
П.В. ШУБИН¹, А.В. КАРПУХИН¹, Е.В. КАТКОВА², В.А. ХАЙЛЕНКО²

¹ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Москва

²ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

В работе проанализированы данные научной литературы последних лет, посвящённые изучению роли микроРНК в возникновении и прогрессировании рака молочной железы, возможности использования этих молекул в качестве биомаркёров рака. Приведены результаты собственных исследований микроРНК. В работе проведен анализ уровней экспрессии 14 микроРНК, ассоциированных с развитием рака молочной железы, в 54 образцах опухолевой и нормальной ткани (27 пациентов). Показано, что паттерны экспрессии микроРНК разнообразны и пациент-специфичны. Установлен ряд закономерностей. Уровень экспрессии miR-182 повышен в 81% случаев. Экспрессия miR-31, супрессора метастазирования, подавлена в 56% случаев.

С использованием кластерного анализа выделен кластер коэкспрессии 5-ти микроРНК с преимущественно повышенной экспрессией miR-10b, miR-21, miR-155, miR-34a и miR-335. Предполагается существование ассоциации ко-экспрессирующихся в этом кластере микроРНК с патоморфологическими признаками, в том числе, преимущественным наличием метастазов. При анализе транскрипционной регуляции показано, что все микроРНК из кластера - транскрипционные мишени p53, RelA и NF-κB.

Кластеризация и выделение групп микроРНК (signature) позволяют классифицировать пациентов по различным параметрам, выделять особенности, связанные с кластерами, что может расширить представление о роли микроРНК в развитии рака.

Ключевые слова: рак молочной железы, микроРНК, анализ экспрессии микроРНК.

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) является гетерогенным заболеванием. Эта гетерогенность, которая в течение десятилетий характеризовалась на гистологическом уровне, в настоящее время оценивается на молекулярно-генетическом уровне: каждый тип опухоли является самостоятельным заболеванием [Sorlie et al. 2001; Sorlie et al. 2006]. Высокая гетерогенность опухолей молочной железы делает принципиально важным её молекулярную характеристику, основанную не только на определении генных мутаций и профиля экспрессии генов, но и на новых биологических маркерах.

Таковыми новыми биомаркерами являются микроРНК (microRNA, miRNA, miR) – небольшие молекулы, регулирующие экспрессию генов и участвующие, по-видимому, во всех клеточных процессах. К настоящему времени известно более двух тысяч микроРНК человека (miRBase,

<http://www.mirbase.org/>, 2012), каждая из которых потенциально может регулировать работу сотен генов-мишеней [Bartel, 2009], (TargetScan, <http://www.targetscan.org/>, 2012). МикроРНК контролируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне, вызывая деградацию мРНК-мишеней или нарушение трансляции [Janga et al., 2011; Sato et al., 2011]. Значительное количество микроРНК вовлечены в процесс канцерогенеза и изменение их экспрессии способствует образованию и развитию различных типов опухолей [Farazi et al., 2011]. Ассоциация микроРНК с раком молочной железы была установлена в 2005 г. в исследованиях с использованием клеточных линий, клинических образцов и моделей in vivo.

Разные микроРНК могут либо стимулировать, либо супрессировать развитие опухоли и метастазов. Они ассоциированы с разными подтипами рака, могут служить маркерами прогноза ответа на лекарственную терапию. МикроРНК

в качестве маркёров для диагностики РМЖ и прогноза имеют важные преимущества по сравнению с мРНК: в отличие от скрининга значительного числа экспрессируемых генов, может быть достаточным анализ небольшого числа микроРНК; эти молекулы РНК стабильны, и в плазме крови и парафиновых блоках микроРНК остаются в значительной степени интактными. Изучение роли микроРНК в процессах канцерогенеза демонстрирует возможность создания экспрессионных панелей этих молекул (*miRNA signatures*).

В течение последних нескольких лет исследования микроРНК привели к идентификации ряда *miRNA*, которые абберрантно экспрессируются в опухолях, в том числе в РМЖ. Хорошо охарактеризованы функции только небольшой части этих микроРНК. Активно изучаются взаимоотношения микроРНК с генами-мишенями и генами, регулирующими сами *miR*. В РМЖ, как и в других типах рака, различные микроРНК функционируют или как супрессор опухоли (*tumor suppressors miRNA*), или как онкогены (*oncomir*). Таким образом, возникновение и прогрессирование опухоли может быть следствием снижения активности микроРНК, супрессирующих опухоль, и/или избыточной экспрессии онкогенных микроРНК. Большое число исследований посвящено нескольким микроРНК, связанных с РМЖ. Среди них - микроРНК, обладающие онкогенными свойствами: *miR-21*, *miR-155*, *miR-373/520c*, и микроРНК, супрессирующие развитие опухоли: *miR-31*, *miR-34a*, *miR-125b*, *miR-200*, *miR-145*. В тоже время число *miR*, вовлечённых в канцерогенез РМЖ, увеличивается с каждым днём. Значительное число работ посвящено определению генов, являющихся мишенями микроРНК. Изменения в экспрессии таких генов, регулируемые *miR*, отражают нарушения в клеточных процессах при возникновении и развитии опухоли. Однако взаимодействие микроРНК/мРНК (ген-мишень) далеко не всегда отражается в виде координированной экспрессии этих молекул. Каждая *miR* потенциально взаимодействует с множеством генов, поэтому выявление конкретных путей действия микроРНК представляет значительную проблему.

Метастатический потенциал опухоли также может быть связан с изменением экспрессии определённых *miR*: прометастатических и антиметастатических микроРНК (*metastamiR*). К наиболее известным из них относится *miR-10b*, а также *miR-31*, *miR-373/520c*, *miR-335* и ряд других.

Ассоциация экспрессии микроРНК в опухоли с её чувствительностью к химиотерапии проде-

монстрирована для большинства солидных опухолей. Разные микроРНК могут прогнозировать эффективность применения противоопухолевых препаратов. Известно, что микроРНК играют значительную роль в лекарственной устойчивости раковых клеток при терапии ингибиторами эстрогеновых рецепторов. Так, например, *miR-221* и *miR-222* определяют чувствительность клеток к тамоксифену, участвуя в регуляции экспрессии своего гена-мишени - рецептора эстрогена (*ESR1*) [Zhao et al., 2008]. Эти микроРНК также определяют чувствительность к фулвестранту (*fulvestrant*), который применяют при лечении гормоночувствительного РМЖ в случае неэффективности тамоксифена [Rao X. et al., 2011].

Циркулирующие микроРНК могут играть роль диагностического маркёра. В последние годы охарактеризованы некоторые микроРНК, циркулирующие в крови больных раком, в том числе РМЖ. Возможность определять концентрацию этих молекул в плазме (сыворотке) возникает вследствие высокой стабильности микроРНК, которые циркулируют в крови в составе микровезикул (экзосом) или в связанном с белками Argonaut (AGO) виде. Ряд *miR* с высокой специфичностью и чувствительностью позволяют дифференцировать больных РМЖ и здоровых людей. Например, в работе Roth с соавт. [Roth et al., 2010] были использованы *miR-10b*, *miR-34a* и *miR-155*, повышенная концентрация которых детектировалась в крови больных. В тоже время многие исследователи используют новые микроРНК, ассоциированные с РМЖ, в попытках обнаружить высокоспецифичный маркёр на ранней стадии заболевания.

Ниже дана краткая характеристика микроРНК, изученных в настоящей работе.

Одной из наиболее изученных при РМЖ является микроРНК-21, охарактеризованная как онкогенная *miRNA* в ряде исследований. Ингибирование активности микроРНК-21 запускает апоптоз и угнетает рост раковых клеток *in vitro* и *in vivo* через негативную регуляцию экспрессии *bcl-2* [Si et al., 2007]. Как онкогенная микроРНК, *miR-21* играет важную роль не только в росте опухоли, но и в инвазии и метастазировании опухоли через регуляцию экспрессии ряда генов опухолевых супрессоров, таких как *TPM1*, *Pdcd4* и *maspin*, являющихся её генами-мишенями [Zhu et al., 2007; Lu et al. 2008].

Гиперэкспрессия микроРНК-21 связана с определёнными клинико-патологическими свойствами РМЖ. Например, повышенный уровень *miR-21* ассоциирован со стадией рака, наличием метастазов в регионарных лимфоузлах,

выживаемостью больных [Yan et al., 2008]. Высокий уровень микроРНК-21, циркулирующей в крови больных РМЖ, значительно коррелирует ($P < 0,001$) с наличием висцеральных метастазов [Asaga et al., 2011]. Наряду с другими микроРНК, miR-21 используется в качестве прогностического фактора. Показана корреляция уровня этой микроРНК с общей выживаемостью больных [Volinia et al., 2012].

МикроРНК-155 представляет собой многофункциональную микроРНК. Она имеет различные профили экспрессии и играет важную роль в различных физиологических и патологических процессах, в том числе в канцерогенезе. Имеющиеся экспериментальные доказательства того, что микроРНК-155 гиперэкспрессирована в большинстве злокачественных опухолей, позволяют считать эту молекулу микроРНК в числе наиболее значимых факторов в диагностике рака и прогнозе течения заболевания.

При РМЖ микроРНК-155 играет важнейшую роль в регуляции выживаемости раковых клеток и определяет чувствительность опухоли к некоторым химиопрепаратам, негативно регулируя FOXO3a [Kong et al., 2010]. MiR-155 участвует в развитии процесса эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), и её экспрессия часто повышена в инвазивном РМЖ [Kong et al., 2008]. Кроме того, показана взаимосвязь между микроРНК-155 и воспалительными процессами при опухолевом развитии [Taganov et al., 2006]. Интересно, что известный опухолевый супрессор BRCA1 эпигенетически контролирует экспрессию микроРНК-155 [Chang et al., 2011].

Опухолевый супрессор SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) идентифицирован как мишень для микроРНК-155. Гиперэкспрессия микроРНК-155 негативно регулирует SOCS1, а также, по-видимому, приводит к активации STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) через сигнальный путь JAK-STAT, а также стимуляции раковых клеток интерфероном IFN-gamma и интерлейкином-6. Эти данные свидетельствуют о связующей роли микроРНК-155 между воспалением и раком молочной железы [Jiang et al., 2010].

Одной из ключевых микроРНК, дисрегуляция которой часто выявляется при РМЖ, является miR-10b. Её гиперэкспрессия, индуцируемая фактором транскрипции Twist, ассоциирована с развитием процесса эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [Foubert et al., 2010]. Опухоли, гиперэкспрессирующие miR-10b, обладают выраженной инвазивностью и метастатическим потенциалом.

МикроРНК-31 является ещё одной из известных miR, потенциально регулирующих метастатическое прогрессирование РМЖ [Valastyan et al., 2009]. Исследования показали обратную зависимость между уровнем экспрессии микроРНК-31 и метастатическим потенциалом 15 различных эпителиальных клеточных линий РМЖ. Также было показано, что уровень микроРНК-31 в опухолях молочной железы обратно пропорционально связан с формированием отдалённых метастазов. Авторы отмечают, что в отличие от большинства других биомаркёров корреляция между экспрессией микроРНК-31 и тенденцией к рецидиву заболевания существует независимо от молекулярного подтипа первичной опухоли.

В тоже время в линиях раковых клеток агрессивного, базально-подобного подтипа отсутствует экспрессия микроРНК-31, а при исследовании опухолей получена обратная корреляция между уровнем экспрессии микроРНК-31 и стадией РМЖ. [Sossey-Alaoui et al., 2011]. Одним из основных механизмов потери экспрессии микроРНК-31 при РМЖ, и, в частности, в трижды-негативном раке (triple-negative breast cancer, TNBC) является гиперметилирование промотора гена LOC554202, в первом интроне которого и картируется микроРНК-31 [Augoff et al., 2012].

Показано, что экспрессия микроРНК-195 значительно выше в опухоли, чем в нормальной ткани молочной железы, особенно в HER2-позитивном РМЖ [Mattie et al., 2006]. Имеются данные о специфичности гиперэкспрессии микроРНК-195 именно для РМЖ [Heneghan et al., 2010].

МикроРНК-125b дифференциально экспрессируется в HER2-позитивном и HER2-негативном РМЖ [Mattie et al., 2006]. Эта микроРНК является потенциальным супрессором опухоли, повышенная экспрессия которой приводит к снижению количества мРНК генов *HER2* и *HER3* и соответствующего белка [Scott et al., 2007]. Опухоли, гиперэкспрессирующие микроРНК-125b, демонстрируют значительно больший процент пролиферирующих клеток, и, наоборот, меньшее число апоптотических клеток [Wang et al., 2012]. В этой же работе показана ассоциация количества микроРНК-125b, циркулирующей в крови больных, с устойчивостью к неоадьювантной химиотерапии.

В настоящее время роль микроРНК-182 в развитии РМЖ слабо изучена. Известно, что геном-мишенью для miR-182 является FOXO1 – транскрипционный фактор, экспрессия которого понижена в опухоли молочной железы [Guttilla et al., 2009]. Высокий уровень экспрессии ми-

кроРНК-182 детектируется в клеточной линии MCF-7, для которой характерен очень низкий уровень белка FOXO1. Эти данные позволяют предполагать, что miR-182 относится к онкогенным микроРНК.

Установлено, что miR-221 and miR-222 участвуют в развитии агрессивного базально-подобного РМЖ, их гиперэкспрессия характерна для эстрогенрецептор-негативных опухолей. Они функционируют в RAS-RAF-MEK сигнальном каскаде, ингибируют экспрессию транскрипционного фактора TRPS1, мишенью которого в свою очередь является супрессор ЭМП белок ZEB2. Увеличение уровня ZEB2, прямо ингибирующего E-cadherin и активирующего vimentin, запускает процесс ЭМП [Shah & Calin, 2011].

Следует отметить, что исследование микроРНК находится всё же на начальных этапах, однако в будущем они могут быть использованы для формирования панели маркёров для диагностики и прогноза рака.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы 54 образца опухолевых и гистологически нормальных тканей, полученных при проведении оперативного лечения (27 больных РМЖ). Все больные до операции не были подвержены ни лучевой, ни химиотерапии. Образцы тканей хранили при -70°C. Опухоли классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза (UICC) и гистологически верифицированы на основании критериев классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ).

Выделение суммарной (тотальной) РНК.

Суммарную РНК выделяли из образцов с помощью набора «RNeasy Mini Kit», Qiagen по протоколу производителя. Качество выделения РНК проверяли при электрофорезе продукта в 1,8% агарозном геле. Продукт окрашивали бромистым этидием и анализировали на трансиллюминаторе Whatman-Biometra TL-3 в ультрафиолетовом свете. Концентрацию выделенной РНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop 1000.

Проведение реакции обратной транскрипции.

Обратную транскрипцию проводили, используя набор ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega). Для каждой микроРНК использовали синтезированный специфичный олигонуклеотидный праймер. После проведения реакции измеряли концентрацию кДНК на спектрофотометре Nanodrop 1000.

ПЦР в реальном времени.

Уровень экспрессии микроРНК измеряли с помощью прибора StepOnePlus (Applied Biosystems, США). Условия проведения ПЦР - объем смеси 20 мкл, состав: 100-200 нг кДНК; 10 пМ специфичного для каждой микроРНК (F) праймера; 10 пМ универсального (R) праймера, 2 мМ dNTP, 0,5 е. а. Taq-ДНК-полимеразы («СибЭнзим», Россия), буфер для ПЦР, краситель EvaGreen. Нормализацию полученных значений Ct для исследуемых микроРНК проводили по Ct мРНК U6. Изменение уровня экспрессии рассчитывали, используя метод $\Delta\Delta C_t$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для анализа экспрессии микроРНК использовали 14 микроРНК, полученных при анализе данных литературы, которые потенциально могли быть ассоциированы с прогрессией рака молочной железы (РМЖ). Экспрессию микроРНК в тканевых образцах группы пациентов с РМЖ (N=27), гетерогенной по TNM классификации, проанализировали методом ПЦР в реальном времени. Учитывали более чем 2-кратное изменение уровня экспрессии каждой микроРНК. Хотя экспрессия микроРНК была гетерогенна, паттерны экспрессии разнообразны и пациент-специфичны, оказалось возможным выделить ряд закономерностей.

Так уровень экспрессии miR-182 был повышен у 22 из 27 пациентов (81%) и понижен в 2-х образцах (7,4%), (рис.1). При этом miR-182 гиперэкспрессирована - увеличение экспрессии более чем в 10 раз - в 16 образцах опухоли (59%). Экспрессия miR-31, известного супрессора метастазирования, была подавлена в 56% (15 из 27) образцов РМЖ. Следует отметить, что уровни экспрессии miR-10b и miR-155 разделяются на 3 группы с повышенной, пониженной и неизменной экспрессией (рис.1).

Анализ экспрессии бимодальных микроРНК - miR-10b и miR-155 позволил разбить образцы на несколько групп. Используя кластерный анализ, мы смогли выделить 9 образцов из 27 проанализированных (33%), которые составляют кластер коэкспрессии 5-ти микроРНК с преимущественно повышенной экспрессией miR-10b, miR-21, miR-155, miR-34a и miR-335 (рис.2).

При сравнительном анализе клинично-патологических и экспрессионных данных в кластере оказались 4 из 7 образцов с локальным метастазированием в лимфоузлы. Этот кластер полностью представлен образцами с ЭР+ и ПР+ статусом, кроме этого в нем представлены все

Рис.1. Уровни экспрессии miR-182, miR-10b и miR-155 в образцах опухолевой ткани при раке молочной железы относительно условно нормальной ткани.

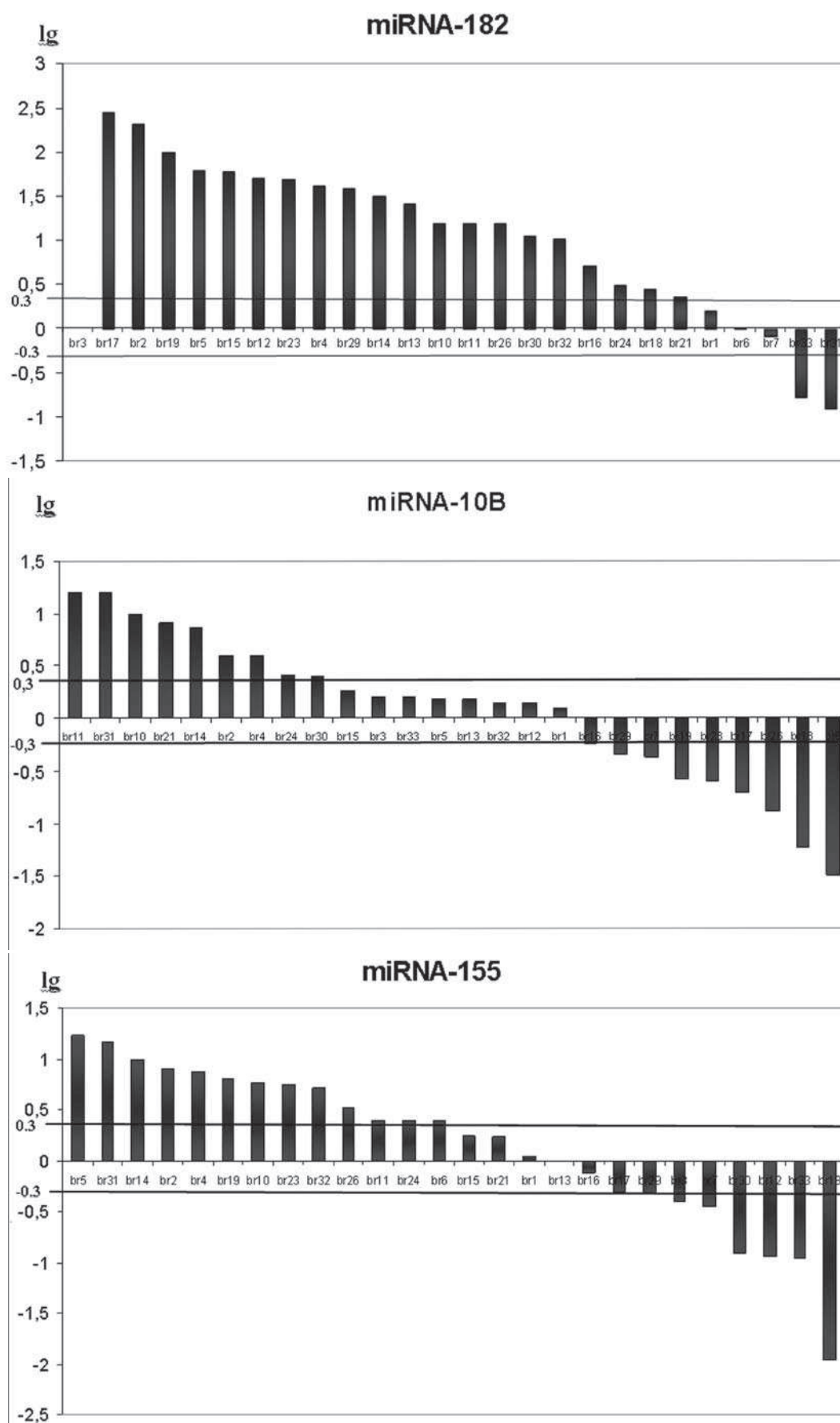
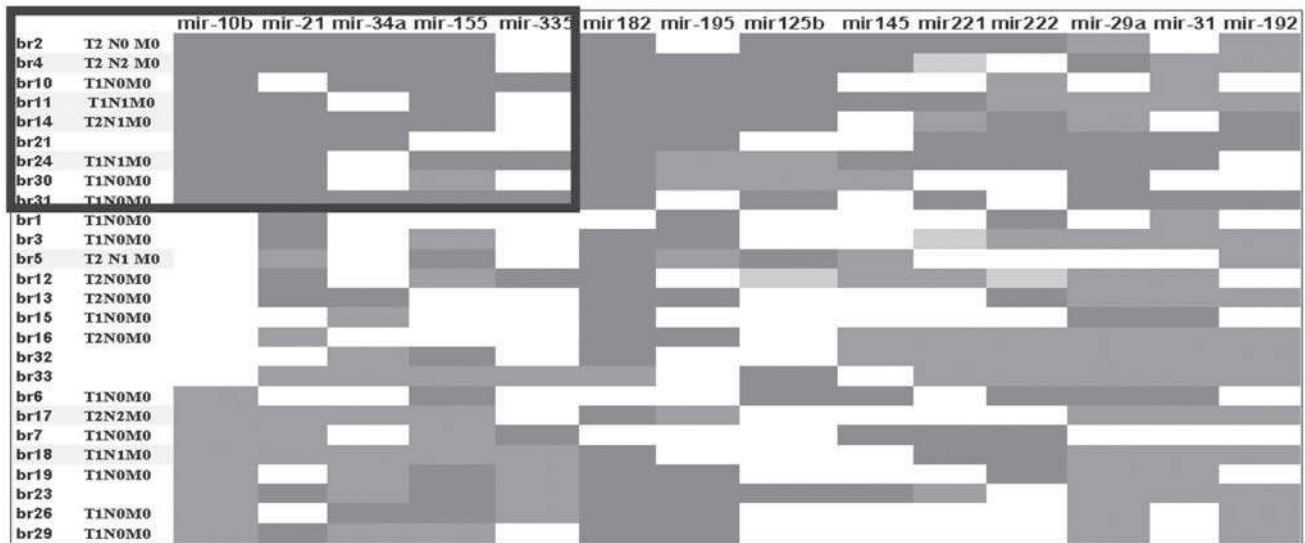


Рис.2. Кластеризация экспрессионных данных. Желтым выделены образцы с метастазированием в локальные лимфоузлы (TхN1-2M0). Красный цвет – повышенная экспрессия miR, голубой цвет – пониженная экспрессия miR, белый цвет – экспрессия не изменена.



образцы с инфильтративно-дольковым (ИД) и смешанным вариантами (инфильтративно-дольковый в сочетании с инфильтративно-протоковым) РМЖ. Это позволяет предположить существование ассоциации ко-экспрессирующихся в этом кластере микроРНК с патоморфологическими признаками, в том числе, и с преимущественным наличием метастазов.

Далее был проведен анализ транскрипционной регуляции. Как видно, рис.3., большинство микроРНК кластера регулируется 2-мя транскрипционными факторами: NF-kB (RelA) и p53, кроме того, 2 микроРНК регулируются эстрогеновым рецептором.

ОБСУЖДЕНИЕ

Стремительный прогресс в раскрытии роли микроРНК в развитии рака дает возможность использовать их как потенциальные биомаркеры и предикторы прогноза. Рак молочной железы - гетерогенная группа, хотя и существует классификация по профилю экспрессии генов, и ряд предиктивных сигнатур (signature), определяющих агрессивность, наличие метастазов и прогноз. [Ogino et al., 2012]. В дополнение к экспрессионным данным по генам, экспрессионные профили микроРНК позволяют существенно улучшить классификацию РМЖ [Eo et al., 2012].

Повышенная экспрессия miR-182 более чем в 80% образцов может объясняться важной ролью этой микроРНК для развития РМЖ. Ряд работ показали ассоциацию miR-182 с РМЖ [Moskwa et

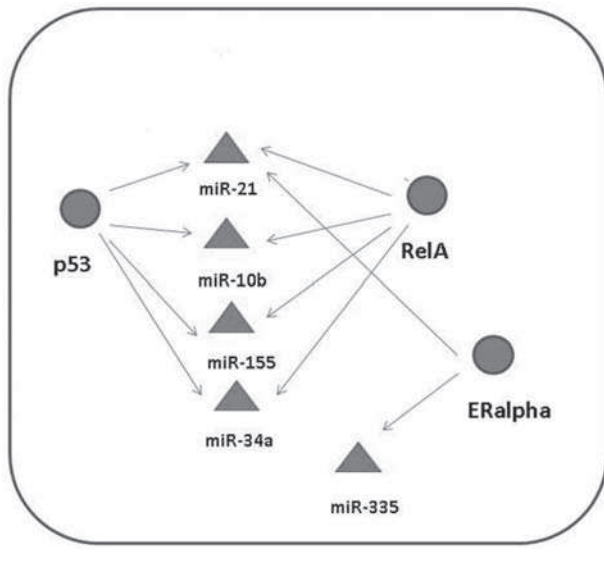
al., 2010]. miR-182 регулируется TGF-beta/SMAD сигнальными каскадами, известно, что при развитии РМЖ эти сигнальные пути часто deregulированы, кроме того, как и miR-10b, miR-182 активирует NF-kB сигнальный путь.

Ряд работ по экспрессии микроРНК в РМЖ показал основные изменения в экспрессии miR-10b, miR-21, miR-155 – онкогенных микроРНК, роль которых в развитии, прогрессии опухолей и метастазирования хорошо известна для многих типов рака [Gabriely et al., 2011; Mattiske et al., 2012; Niu et al., 2012]. Ко-ассоциация этих микроРНК в одном кластере не случайна, что подтверждается анализом транскрипционной регуляции – все они транскрипционные мишени p53 и RelA (NF-kB). Известно, что активация NF-kB часто ассоциирована с различными типами рака, в том числе и РМЖ. Выделение кластера NF-kB-зависимых микроРНК и роль их в прогрессии и метастазировании нуждаются в дальнейшем изучении.

Интересно отметить присутствие в кластере miR-335, роль которой в качестве oncomiR противоречива. Так при раке желудка [Yan et al., 2012], глиоме [Jiang et al., 2012], колоректальном раке [Vickers et al., 2012] повышенная экспрессия ассоциирована с метастазированием и плохим прогнозом, при этом в РМЖ – это онкосупрессорная микроРНК [Png et al., 2011].

Предпринималось достаточно много попыток описать различные signature на основе кластерного анализа. [Lyng et al., 2012]. В нашей работе описан кластер (примерно 30% пациентов), в

Рис.3. Транскрипционная регуляция 5-ти микроРНК, образующих кластер.



котором корегулированы 5 разных oncomir. Повышенная экспрессия miR-34a в кластере заслуживает внимания, так как в РМЖ эта микроРНК выполняет онкосупрессорную функцию. Часто её гиперэкспрессия связана с повышенной агрессивностью опухоли, но при этом повышение экспрессии связано с увеличением средней выживаемости и периода без метастазов [Peurala H et al., 2011]. Кроме того, повышенная экспрессия этой miR ассоциирована с устойчивостью к доцетакселю [Kastl et al., 2011]. С этой точки зрения роль и значение этой микроРНК в метастазировании требует дальнейшего изучения. Все микроРНК из кластера являются транскрипционными мишенями p53, что может свидетельствовать о дерегуляции этого звена в кластере, связанной, например, с мутантным p53.

Комплексная природа дерегуляции экспрессии микроРНК не позволяет однозначно трактовать результаты экспрессионных данных, тем более для отдельных miR, так как почти для каждой микроРНК роль в развитии опухолевого процесса имеет зависимость от контекста. Кластеризация и выделение групп микроРНК (signature) позволяют классифицировать пациентов по различным параметрам, выделять особенности, связанные с этими кластерами, что может расширить представление о роли микроРНК в развитии рака.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, открытие и изучение микроРНК значительно расширили наше понима-

ние биологии рака. Наши знания в этой области исследований стремительно растут. Опухоль-супрессирующая и онкогенная роли этих молекул в определённых типах рака позволяют считать, что микроРНК могут быть использованы в качестве биомаркёров и, возможно, экспрессионные характеристики комплекса miR применимы для достижения клинического эффекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Asaga S., Kuo C., Nguyen T. et al. Direct Serum Assay for MicroRNA-21 Concentrations in Early and Advanced Breast Cancer.// *Clinical Chemistry*. - 2011. - V. 57. - P. 184-91.
2. Augoff K., McCue B., Plow E. and Sossey-Alaoui K. miR-31 and its host gene lncRNA LOC554202 are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer.// *Mol. Cancer* - 2012. - V. 11. - P. 5-17.
3. Bartel D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.// *Cell*. - 2009. - V. 136(2). - P. 215-33.
4. Chang N., Wang R., Akagi K. et al. Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic microRNA-155.// *Nature Medicine* - 2011. - V. 17. - P. 1275-1283.
5. Eo H.S., Heo J.Y., Choi Y. et al. A pathway-based classification of breast cancer integrating data on differentially expressed genes, copy number variations and MicroRNA target genes. // *Mol. Cells*. - 2012.
6. Farazi T.A., Spitzer J.I., Morozov P., Tuschl T. miRNAs in human cancer.// *J Pathol*. - 2011. - V. 223(2). - P. 102-15.
7. Foubert E., De Craene B. and Berx G. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. The Snail1-Twist1 conspiracy in malignant breast cancer progression // *Breast Cancer Res*. - 2010. - V. 12. - P. 206-217.
8. Heneghan H.M., Miller N., Kelly R. et al. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting non-invasive and early stage disease. // *Oncologist*. - 2010. - V. 15(7) - P. 673-82.
9. Gabriely G., Teplyuk N.M., Krichevsky A.M. Context effect: microRNA-10b in cancer cell proliferation, spread and death. // *Autophagy*. - 2011 - V. 7(11). - P. 1384-6.
10. Guttilla I.K., White B.A. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells // *J Biol Chem*. - 2009. - V. 284(35). - P. 23204-16.
11. Janga S.C., Mittal N. Construction, structure and dynamics of post-transcriptional regulatory network directed by RNA-binding proteins.// *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2011. - V. 722. - P. 103-17.
12. Jiang J., Sun X., Wang W. et al. Tumor microRNA-335 expression is associated with poor prognosis in human glioma.// *Med. Oncol*. - 2012. May 27
13. Jiang S., Zhang H.W., Lu M.H. et al. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene.// *Cancer Res*. - 2010. - V. 70(8). - P. 3119-27.
14. Kastl L., Brown I., Schofield A.C. miRNA-34a is associated with docetaxel resistance in human breast cancer cells.// *Breast Cancer Res. Treat.* - 2012. - V. 131(2).

– P.445-54.

15. Kong W., He L., Coppola M. et al. MicroRNA-155 Regulates Cell Survival, Growth, and Chemosensitivity by Targeting FOXO3a in Breast Cancer. // J. Biol. Chem. – 2010. – V. 285(23). – P. 17869–17879.

16. Kong W., Yang H., He L. et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. // Mol. Cell. Biol. – 2008. – V. 28. – P. 6773–6784.

17. Lu Z., Liu M., Stribinskis V. et al. microRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. // Oncogene. – 2008. – V. 27. – P. 4373–4379.

18. Lyng M.B., Lænkholm A.V., Søkilde R. et al. Global microRNA expression profiling of high-risk ER+ breast cancers from patients receiving adjuvant tamoxifen monotherapy: a DBCG study. // PLoS One. – 2012. – V. 7(5). e36170

19. Mattie M.D., Benz C.C., Bowers J. et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. // Mol. Cancer – 2006. – V. 5. – P. 24.

20. Mattiske S., Suetani R.J., Neilsen P.M., Callen D.F. The Oncogenic Role of miR-155 in Breast Cancer. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2012. – V. 21(8). – P. 1236-43.

21. Moskwa P., Buffa F.M., Pan Y. et al. miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. // Mol. Cell. – 2011. – V. 41(2). – P. 210-20.

22. Niu J., Shi Y., Tan G. et al. DNA damage induces NF- κ B-dependent microRNA-21 up-regulation and promotes breast cancer cell invasion. // J. Biol. Chem. – 2012. – V. 287(26). – P. 21783-95.

23. Ogino S., Fuchs C.S., Giovannucci E. How many molecular subtypes? Implications of the unique tumor principle in personalized medicine. // Expert Rev. Mol. Diagn. – 2012. – V. 12(6). – P. 621-8.

24. Peurala H., Greco D., Heikkinen T. et al. MiR-34a expression has an effect for lower risk of metastasis and associates with expression patterns predicting clinical outcome in breast cancer. // PLoS One. – 2011. – V. 6(11):e26122.

25. Png K.J., Yoshida M., Zhang X.H. et al. MicroRNA-335 inhibits tumor reinitiation and is silenced through genetic and epigenetic mechanisms in human breast cancer. // Genes Dev. – 2011. – V. 25(3). – P. 226-31.

26. Rao X., Di Leva G., Li M. et al. MicroRNA-221/222 confers breast cancer fulvestrant resistance by regulating multiple signaling pathways. // Oncogene. – 2011. – V. 30(9). – P. 1082-97.

27. Roth C., Rack B., Müller V. et al. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer // Breast Cancer Res. – 2010. – V. 12, R90.

28. Sato F., Tsuchiya S., Meltzer S.J., Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. // FEBS J. – 2011. – V. 278(10).

– P. 1598-609.

29. Scott G.K., Goga A., Bhaumik D. Et al. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. // J. Biol. Chem. – 2007. – V. 282(2). – P. 1479-86.

30. Shah M. & Calin G. MicroRNAs miR-221 and miR-222: a new level of regulation in aggressive breast cancer // Genome Medicine – 2011. – V. 3. – P. 56-59.

31. Si M.L., Zhu S., Wu H. et al. miR-21-mediated tumor growth. // Oncogene. – 2007. – V. 26. – P. 2799–803.

32. Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – V. 98. – P. 10869–74.

33. Sorlie T., Wang Y., Xiao C. et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. // BMC. – Genomics. – 2006. – V. 7. – P. 127.

34. Sossey-Alaoui K., Downs-Kelly E., Das M. et al. WAVE3, an actin remodeling protein, is regulated by the metastasis suppressor microRNA, miR-31, during the invasion-metastasis cascade. // Int. J. Cancer – 2011. – V. 129(6). – P. 1331-1343.

35. Taganov K.D., Boldin M.P., Chang K.J., Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2006. – V. 103. – P. 12481–12486.

36. Valastyan S., Reinhardt F., Benaich N. et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. // Cell – 2009. – V. 137. – P. 1032-46.

37. Vickers M.M., Bar J., Gorn-Hondermann I. et al. Stage-dependent differential expression of microRNAs in colorectal cancer: potential role as markers of metastatic disease. // Clin. Exp. Metastasis. – 2012. – V. 29(2). – P. 123-32.

38. Volinia S., Galasso M., Sanaa M. et al. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. // PNAS – 2012. – V. 109. – P. 3024–3029.

39. Wang H., Tan G., Dong L. et al. Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer. // PLoS One. – 2012. – V. 7(4):e34210.

40. Yan L., Huang X., Shao Q. et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis // RNA. – 2008 – V. 14(11). – P. 2348-60.

41. Yan Z., Xiong Y., Xu W. et al. Identification of hsa-miR-335 as a prognostic signature in gastric cancer. // PLoS One. – 2012. – V. 7(7):e40037.

42. Zhao J.J., Lin J., Yang H. et al. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. // J. Biol. Chem. – 2008. – V. 283(45). – P. 31079-86.

43. Zhu S., Si M.L., Wu H. et al. microRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). // J. Biol. Chem. – 2007. – V. 282. – P. 14328–14336.