

Abschlussbericht des Vorhabens:**"Tumorassoziierte μ RNA-Analytik"****Förderkennzeichen: 031A094A**

Start des Vorhabens: 01.07.2012

Ende des Vorhabens: 31.03.2016

Autoren:

Prof. Dr. med. Martin Werner

Prof. Dr. med. Elmar Stickeler

Dr. med. Peter Bronsert

Durchführende Institutionen:

Prof. Dr. med. Martin Werner / Department für Pathologie

Postanschrift: Breisacher Straße 115a; 79106 Freiburg

Telefon: +49 761 270-80920

Prof. Dr. med. Elmar Stickeler / Klinik für Gynäkologie und Geburtsmedizin

Postanschrift: Pauwelsstraße 30; 52074 Aachen

Telefax: +49 241 80-88400

Verbundpartner:**Verbundskoordinator:**

Sensovation AG, 78315 Radolfzell

Projektpartner-Industrie:

microfluidic ChipShop GmbH, 07745 Jena

Scienion AG, 44227 Dortmund

Projektpartner-Forschungsinstitutionen:

Universität Freiburg, IMTEK, LS Sensoren, 79110 Freiburg

Universität Freiburg, IMTEK, LS CPI, 79110 Freiburg

Universitätsklinikum Freiburg, Abteilung Gynäkologie, 79106 Freiburg

Universitätsklinikum Freiburg, Institut für Pathologie, 79106 Freiburg

Inhalt

I. Kurzdarstellung	3
I-1. Arbeitspakete und Teilziele der Verbundpartner Gynäkologie und Pathologie	3
I-2. Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	3
I-3. Planung und Ablauf des Vorhabens	4
I-4. Wissenschaftlicher und technischer Stand	8
I-5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	17
II. Eingehende Darstellung.....	17
II-1. Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen	17
II-2 Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	21
II-3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.....	21
II-4. Voraussichtlicher Nutzensund Verwertbarkeit des Ergebnisses.....	22
II-5. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens durch andere Stellen	22
II-6 Veröffentlichung der Ergebnisse:	24

Anlage 1)

III. Erfolgskontrollbericht

- III-1. Beitrag zu den förderpolitischen Zielen
- III-3 Fortschreibung des Verwertungsplanes
- III-4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben
- III-5. Durchgeführte Veranstaltungen 01/13 – 06/15
- III-6. Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung

I. Kurzdarstellung

I-1. Arbeitspakete und Teilziele der Verbundpartner Gynäkologie und Pathologie

Folgende Arbeitspakete und Teilziele haben sich aus zur Umsetzung der Projektierung ergeben. Aufgrund der großen Schnittmengen der Arbeitspakete und Teilziele der Arbeitsgruppen Gynäkologie und Pathologie aus dem Projektstrukturplan werden beide Verbundpartner zusammen in einen Abschlussbericht gefasst.

AP1: Systemspezifikation und Konzeption des Arbeitsablaufes

- AP1.1: Spezifikation der einzelnen Systemelemente; Komponentenauswahl und Bewertung; Vorbereitung und Abstimmung der Beistellungen der einzelnen Partner
- AP 1.2: Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen unter den festgelegten Systemspezifikationen; Schätzung von Auslesesystemkosten und mikrofluidischer Plattformkosten

AP2: Funktionsmuster und Funktionsnachweis

- AP 2.7 *Bereitstellung von charakterisierten Probenbanken, Referenzmethoden*
- AP 2.8 *Nachweis von 5 μ RNA-Parametern (z.B. mi-R16, mi-R21)*

AP 3. Realisierung Labormuster, Erprobung der Anwendung

- AP 3.3 *Probenmaterialoptimierung, Testreihen*

AP 4. Erweiterung, Dokumentation: Labormuster, Anwendung

- AP 4.2 *Erweiterung um weitere μ RNA-Parameter*
- AP 4.4 *Pilotstudie*

I-2. Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Schwerpunkte der Klinik für Frauenheilkunde und des Instituts für Klinische Pathologie des Universitätsklinikums Freiburg innerhalb des Verbundprojektes

Tumorassoziierte μ RNA-Analytik waren a) die Entwicklung von Konzepten zur Probenbereitstellung, b) Probenmaterialoptimierung und c) Assayoptimierung.

Das Institut für Klinische Pathologie der Uniklinik Freiburg beherbergt die Tumorbank des Comprehensive Cancer Centers Freiburg. Leiter des Instituts und der Tumorbank ist Herr Prof. Dr. med. Werner. Die CCCF Tumorbank verfügt über SOP gesteuerte Prozesse zur qualitätsgestützten makroskopischen Aufarbeitung, Lagerung, Asservierung und Ausgabe von Gewebeproben (Kryo- und Paraffingewebe sowie Liquid Biopsy) und deren Derivaten (DNA, RNA, microRNA, Proteine) und nimmt an multiplen lokalen, nationalen und internationalen Forschungsprojekten und Verbünden teil. Die CCCF Tumorbank verfügt über Zugang zu den Routine- und Forschungslaboren des Instituts für Klinische Pathologie, die über Expertise in den modernsten Verfahren der gewebs- und flüssigkeitsbasierten Probenaufarbeitung und Analyse verfügen.

Die Klinik für Frauenheilkunde verfügt ebenfalls über langjährige Erfahrung in der Durchführung uni- und multizentrischer Forschung und ist als Level A Zentrum der German Breast Group (GBG) ein erfahrener Standort für die Durchführung von Phase II-IV Studien. Als interdisziplinäres Brustzentrum zusammen mit dem Kooperationspartner Pathologie verfügen beide über eine große Expertise auf dem Gebiet der klinischen Forschung. Die Klinik für Frauenheilkunde und das Institut für Klinische Pathologie arbeiteten bereits im Vorfeld über 4 Jahre mit dem IMTEK-CPI im Rahmen eines gemeinsamen DFG-Projektes zusammen, welches die Entwicklung einer simultanen Biochipplattform zur simultanen Genexpressions- und Mutationsanalyse am Beispiel des Mamakarzinoms zum Ziel hatte.

I-3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Zusammenfassend etablierten und optimierten beide Arbeitsgruppen gemeinsam kontinuierlich a) die Entwicklung von Konzepten zur Probenbereitstellung, b) Probenmaterialoptimierung und c) Assayoptimierung aus.

a) Entwicklung von Konzepten zur Probenbereitstellung:

Zum Aufbau der Kohorte wurden vorab gemeinsam (Pathologie – Frauenklinik) relevante klinisch-pathologische Parameter definiert. Anhand dieser Parameter

wurde eine retrospektive Kohorte bestehend aus Patientinnen mit Mammakarzinomen festgelegt.

b) Probenmaterialoptimierung

Alle Gewebeproben wurden histologisch und molekulopathologisch charakterisiert. Die Probenqualität wurde mittels Nanodrop und (auf probenspezifische Anfragen seitens der Projektpartner) Bioanalyzer bestimmt. Die miR- Isolierung und Expressionsanalyse aus FFPE-Material erfolgte mittels Norgen Biotek FFPE RNA Purification Kit durch das Institut für Klinische Pathologie. Die anschließende quantitative PCR wurde durch die Klinik für Gynäkologie durchgeführt.

Zusätzlich wurden prospektiv Gewebeproben in enger Kooperation zwischen der CCCF Tumorbank und der AG Molekulare Onkologie in die Projektkohorte eingeschleust. Hiervon wurden sowohl kryo als auch formalinfixierte und paraffineingebettete Gewebeproben an die Kooperationspartner zur Testung relevanter Verfahren weitergeleitet.

c) Assayoptimierung

Alle Gewebeproben wurden entsprechend aktuellster Empfehlungen (Goldhirsch et al. 2011) in die molekularen Subgruppen Luminal A (LumA), Luminal B (LumB), Luminal Her2 (LumHer2), Her2 Enriched (Her2), Triple Negative (TN) und Basal Like (BL) anhand eines immunhistochemischen Markerpanels klassifiziert. Die oben beschriebenen Prozesse wurden ebenfalls auch für alle später in das Projekt eingeschlossenen Proben wiederholt.

Mittels *in vitro*-Analysen anhand von Mammakarzinomzelllinien, die das Spektrum der Rezeptorenausstattung abdecken, wurden erste quantitative miR Expressionsanalysen durchgeführt. Fußend auf diesen Ergebnissen wurden sukzessiv anhand immunhistochemisch phänotypisierter Patientinnen Gewebeproben mikrodissiziert und in pseudonymisierter Form an die Klinik für Gynäkologie zur weiteren quantitativen PCR (qPCR) übergeben.

Während der gesamten Projektdauer wurden unter Leitung der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie der Klinik für Frauenheilkunde anhand ausgiebiger Literaturrecherchen miRs mittels qPCR in Dreifachansätzen untersucht.

Die Expressionsdaten wurden im Institut für Pathologie mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert. Hierbei wurde festgestellt, dass die als House Keeper beschriebenen miR 26b und 16 in den untersuchten Gewebeproben subtypspezifische Schwankungen aufwiesen.

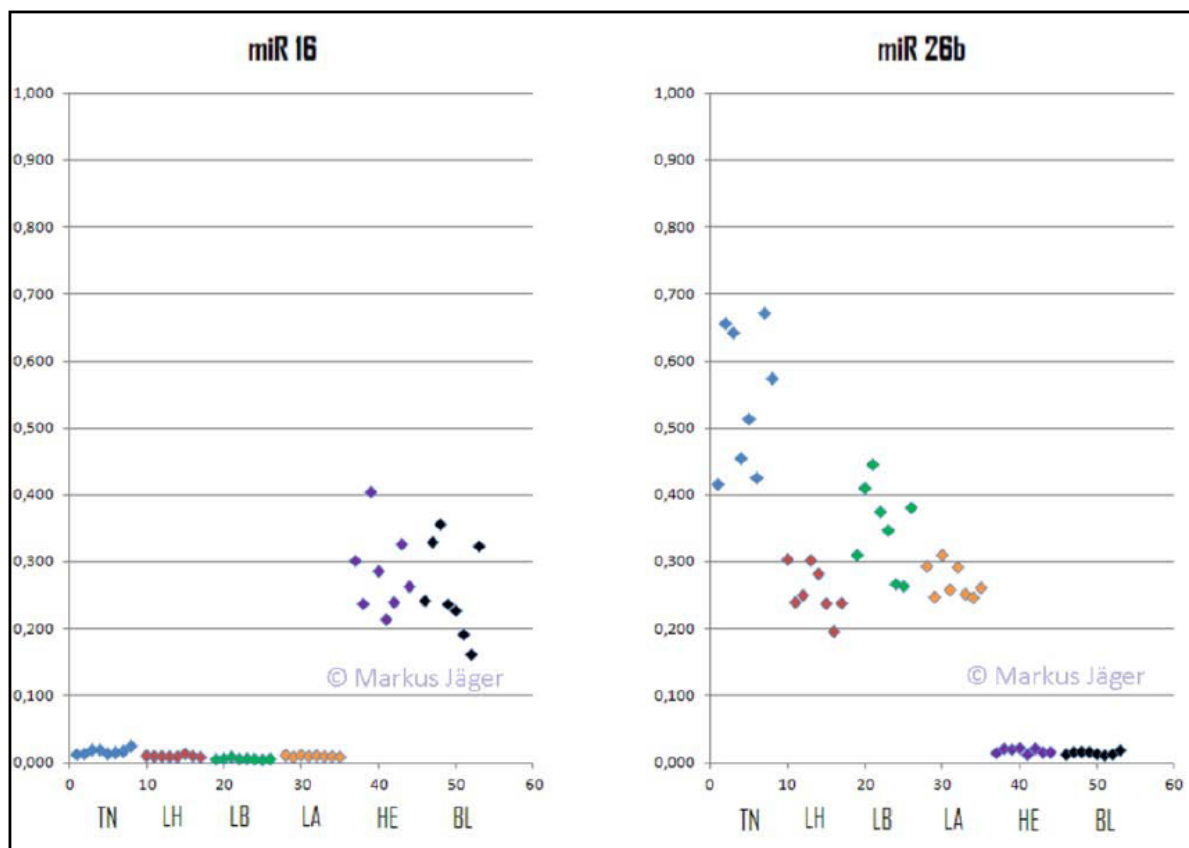


Abbildung 1 Expression von miRNA16 und 26b bezogen auf neue House Keeper (RNUs). Deutlich erkennbar wird die Subtyp-abhängige Regulation der „alten“ House Keeper.

Nach Etablierung neuer House Keeper wurden die Ergebnisse unter Anwendung eines neuronalen Netzwerkes (Abb. 1.) mittels der Statistikprogramme SPSS und SNNS untersucht. Dies geschah in enger Kooperation mit Herrn PD Dr. Ulrich Wellner (UKSH Campus Lübeck).

Angewandt auf unsere Fragestellung zur Vorhersage des intrinsischen Subtyps konnten für alle Subtypen hohe Sensitivität- und Spezifitätswerte errechnet werden (siehe Tab 1.), welche sich auch in den AUC-Werten widerspiegeln (siehe Abb. 2)

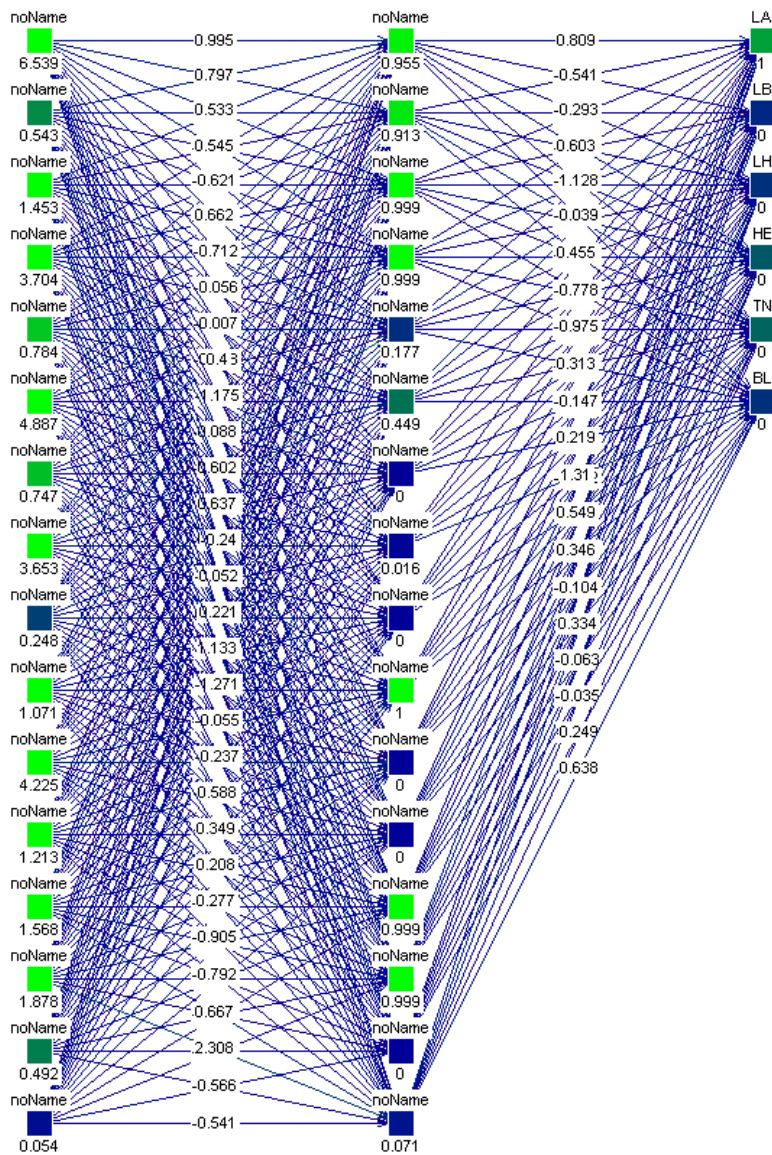


Abbildung 2 Netzwerktopologie, bestehend aus 16 Inputs, 16 Hidden und sechs Output Neuronen. Sobald das Netzwerk anhand des Trainingsdatensatzes erste Berechnungen durchgeführt hatte, wurden diese Informationen innerhalb der Hidden Neurone synaptisch gewichtet, gespeichert und innerhalb des Validierungsdatensatzes geprüft.

Intrinsic Subtype	Sample size (n) of validation dataset	Prevalence in validation dataset n (%)	Wrong predicted n(%)	AUC	CI	p	Spec.%	Sens.%
Luminal A	94	20 (21.3)	1 (1.3)	0.98	0.92 – 1.00	<0.0001	100	95.00
Luminal B	94	20 (21.3)	1 (1.3)	0.98	0.92 – 1.00	<0.0001	100	95.00
Luminal Her2 Enriched	94	20 (21.3)	0 (0)	0.97	0.92 – 1.00	<0.0001	100	94.59
Her2 Enriched	94	10 (10.6)	0 (0)	0.99	0.95 – 1.00	<0.0001	100	98.81
Triple Negative	94	13 (13.8)	2 (2.1)	0.92	0.84 – 0.96	<0.0001	98.77	84.62
Basal-like	94	11 (11.7)	0 (0)	1.00	0.96 – 1.00	<0.0001	100	100

Tabelle 1 Vorhersage des intrinsischen Subtyps anhand des neuronalen Netzwerkes

Durch die Anwendung neuronaler Netze konnte die Aussagekraft von miR Expressionsmustern hinsichtlich der Bestimmung intrinsischer Subtypen des Mammakarzinomes demonstriert werden.

Weiterhin bestätigte die Datenanalyse die Einsetzbarkeit der neu verwendeten House Keeping miRs.

I-4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Stand der klinischen Forschung und der Analyseverfahren:

miRs sind nicht kodierende RNA-Moleküle (19-24 nt), die die Genexpression regulieren, indem sie an komplementäre Sequenzen von mRNAs binden und dadurch die Translation hemmen oder den Abbau der mRNAs einleiten [1-3]. 940 menschliche miRs sind bisher identifiziert [4], wovon ein Drittel der Protein kodierenden Gene durch miRs reguliert wird [5], weshalb miRs zentral an der Steuerung vieler biologischer Vorgänge wie Zellentwicklung, Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie der Apoptose beteiligt sind [6-7]. Ein Zusammenhang der miRs mit Krebs wurde zunächst 2002 beschrieben, als Calin et al. [8] bei der chronischen lymphoiden Leukämie (CLL) eine verringerte Expression der miRs miR-15a und miR-16-1 feststellten. Durch Vergleich von Tumor- und Normalgewebe wurden inzwischen in zahlreichen menschlichen Tumoren (CLL[8], Lungen[9]-,

Brust[10]-, Pankreas[11]-, Schilddrüsen[12]- und Leberkarzinom[13]) tumorspezifische miR-Signaturen gefunden, die mit klinisch-pathologisch und diagnostisch wichtigen Parametern korrelieren.

In Brustkrebs und in anderen menschlichen Tumoren wird hauptsächlich eine verringerte Expression der miRs im Vergleich zum Normalgewebe beschrieben, was für eine tumorsuppressive Rolle der meisten miRs spricht. Allerdings sind einige miRs in menschlichen Tumoren überexprimiert und wirken somit als Onkogene [14].

Aufgrund dieser Erkenntnisse werden miRs als neue prognostische und diagnostische Tumormarker gehandelt, die Möglichkeiten der therapeutischen Intervention eröffnen und deren Einsatz man sich in der Routinediagnostik vorstellen könnte [15]. Methoden, um die Expressionshöhen von miRs in biologischen Geweben zu bestimmen, sind deshalb zunehmend gefragter.

Die von der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie der Klinik für Frauenheilkunde und dem Institut für Klinische Pathologie verwendeten immunhistochemischen und molekularen Analysemethoden gelten als Goldstandard und werden täglich weltweit genutzt.

Das zur miR gestützten Subtypbestimmung genutzte Verfahren des neuronalen Netzwerkes bietet einen potentiellen Analyseschritt (Zhang W et al.) komplexer Datensätze.

Verfahren die zur Durchführung des Vorhabens benutzt wurden

- Zhang W, Zang J, Jing X, Sun Z, Yan W, Yang D, Shen B, Guo F: **Identification of candidate miR biomarkers from miR regulatory network with application to prostate cancer.** Journal of translational medicine 2014, 12:66.
- Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, Panel m: **Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011.** Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 2011, 22(8):1736-1747.

Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

1. Steliarova-Foucher E, O'Callaghan M, Ferlay J, Masuyer E, Rosso S, Forman D, Bray F, Comber H: **The European Cancer Observatory: A new data resource.** European journal of cancer 2014.

2. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, Panel m: **Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2011, **22**(8):1736-1747.
3. Grizzle W, Myers R, Oelschlagel D: **Prognostic Biomarkers in Breast Cancer: Factors Affecting Immunohistochemical Evaluation.** *Breast J* 1995, **1**(4):243-250.
4. Rizzardi AE, Johnson AT, Vogel RI, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, Metzger GJ, Schmechel SC: **Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring.** *Diagnostic pathology* 2012, **7**:42.
5. Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, Xing L, Hung MC, Bonfiglio T, Hicks DG *et al*: **The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines.** *Breast cancer : basic and clinical research* 2010, **4**:35-41.
6. Nana-Sinkam S, Croce CM: **MicroRNA regulation of tumorigenesis, cancer progression and interpatient heterogeneity: towards clinical use.** *Genome biology* 2014, **15**(9):445.
7. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y *et al*: **The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups.** *Nature* 2012, **486**(7403):346-352.
8. Kim S, Kon M, DeLisi C: **Pathway-based classification of cancer subtypes.** *Biology direct* 2012, **7**:21.
9. Zhang W, Zang J, Jing X, Sun Z, Yan W, Yang D, Shen B, Guo F: **Identification of candidate miR biomarkers from miR regulatory network with application to prostate cancer.** *Journal of translational medicine* 2014, **12**:66.
10. Jeffrey SS: **Cancer biomarker profiling with microRNAs.** *Nature biotechnology* 2008, **26**(4):400-401.
11. Gasparini P, Cascione L, Fassan M, Lovat F, Guler G, Balci S, Irkkan C, Morrison C, Croce CM, Shapiro CL *et al*: **microRNA expression profiling identifies a four microRNA signature as a novel diagnostic and prognostic biomarker in triple negative breast cancers.** *Oncotarget* 2014, **5**(5):1174-1184.
12. Dvinge H, Git A, Graf S, Salmon-Divon M, Curtis C, Sottoriva A, Zhao Y, Hirst M, Armisen J, Miska EA *et al*: **The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer.** *Nature* 2013, **497**(7449):378-382.
13. Chen K, Rajewsky N: **The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs.** *Nature reviews Genetics* 2007, **8**(2):93-103.
14. Riaz M, van Jaarsveld MT, Hollestelle A, Prager-van der Smissen WJ, Heine AA, Boersma AW, Liu J, Helmijs J, Ozturk B, Smid M *et al*: **miR expression profiling of 51 human breast cancer cell lines reveals subtype and driver mutation-specific miRs.** *Breast cancer research : BCR* 2013, **15**(2):R33.
15. van Schooneveld E, Wildiers H, Vergote I, Vermeulen PB, Dirix LY, Van Laere SJ: **Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management.** *Breast cancer research : BCR* 2015, **17**(1):526.
16. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
17. Dalmay T, Edwards DR: **MicroRNAs and the hallmarks of cancer.** *Oncogene* 2006, **25**(46):6170-6175.
18. Ahmad A, Sethi S, Chen W, Ali-Fehmi R, Mittal S, Sarkar FH: **Up-regulation of microRNA-10b is associated with the development of breast cancer brain metastasis.** *American journal of translational research* 2014, **6**(4):384-390.
19. Jiang S, Zhang HW, Lu MH, He XH, Li Y, Gu H, Liu MF, Wang ED: **MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene.** *Cancer research* 2010, **70**(8):3119-3127.

20. Kong W, He L, Richards EJ, Challa S, Xu CX, Permuth-Wey J, Lancaster JM, Coppola D, Sellers TA, Djeu JY *et al*: **Upregulation of miR-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer.** *Oncogene* 2014, **33**(6):679-689.
21. Kutty RK, Nagineni CN, Samuel W, Vijayasarathy C, Hooks JJ, Redmond TM: **Inflammatory cytokines regulate microRNA-155 expression in human retinal pigment epithelial cells by activating JAK/STAT pathway.** *Biochemical and biophysical research communications* 2010, **402**(2):390-395.
22. 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-beta1.** *Breast cancer research and treatment* 2009, **117**(1):131-140.
23. Roth C, Rack B, Muller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H: **Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer.** *Breast cancer research : BCR* 2010, **12**(6):R90.
24. Adams BD, Cowee DM, White BA: **The role of miR-206 in the epidermal growth factor (EGF) induced repression of estrogen receptor-alpha (ERalpha) signaling and a luminal phenotype in MCF-7 breast cancer cells.** *Molecular endocrinology* 2009, **23**(8):1215-1230.
25. Berber U, Yilmaz I, Narli G, Haholu A, Kucukodaci Z, Demirel D: **miR-205 and miR-200c: Predictive Micro RNAs for Lymph Node Metastasis in Triple Negative Breast Cancer.** *Journal of breast cancer* 2014, **17**(2):143-148.
26. Chao CH, Chang CC, Wu MJ, Ko HW, Wang D, Hung MC, Yang JY, Chang CJ: **MicroRNA-205 signaling regulates mammary stem cell fate and tumorigenesis.** *The Journal of clinical investigation* 2014, **124**(7):3093-3106.
27. Elliman SJ, Howley BV, Mehta DS, Fearnhead HO, Kemp DM, Barkley LR: **Selective repression of the oncogene cyclin D1 by the tumor suppressor miR-206 in cancers.** *Oncogenesis* 2014, **3**:e113.
28. Feliciano A, Castellvi J, Artero-Castro A, Leal JA, Romagosa C, Hernandez-Losa J, Peg V, Fabra A, Vidal F, Kondoh H *et al*: **miR-125b acts as a tumor suppressor in breast tumorigenesis via its novel direct targets ENPEP, CK2-alpha, CCNJ, and MEGF9.** *PloS one* 2013, **8**(10):e76247.
29. Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Di Leva G, Merlo A, Triulzi T, Menard S, Croce CM, Tagliabue E: **microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer.** *Cancer research* 2009, **69**(6):2195-2200.
30. Kasinski AL, Slack FJ: **Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy.** *Nature reviews Cancer* 2011, **11**(12):849-864.
31. Adams BD, Kasinski AL, Slack FJ: **Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer.** *Current biology : CB* 2014, **24**(16):R762-776.
32. Piovan C, Palmieri D, Di Leva G, Braccioli L, Casalini P, Nuovo G, Tortoreto M, Sasso M, Plantamura I, Triulzi T *et al*: **Oncosuppressive role of p53-induced miR-205 in triple negative breast cancer.** *Molecular oncology* 2012, **6**(4):458-472.
33. Wang Z, Liao H, Deng Z, Yang P, Du N, Zhanng Y, Ren H: **miR-205 affects infiltration and metastasis of breast cancer.** *Biochemical and biophysical research communications* 2013, **441**(1):139-143.
34. Zhang Y, Yan LX, Wu QN, Du ZM, Chen J, Liao DZ, Huang MY, Hou JH, Wu QL, Zeng MS *et al*: **miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer.** *Cancer research* 2011, **71**(10):3552-3562.
35. Huang Z, Huang S, Wang Q, Liang L, Ni S, Wang L, Sheng W, He X, Du X: **MicroRNA-95 promotes cell proliferation and targets sorting Nexin 1 in human colorectal carcinoma.** *Cancer research* 2011, **71**(7):2582-2589.
36. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA: **Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer.** *Nature* 2007, **449**(7163):682-688.

37. Chen X, Chen S, Hang W, Huang H, Ma H: **MiR-95 induces proliferation and chemo- or radioresistance through directly targeting sorting nexin1 (SNX1) in non-small cell lung cancer.** *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2014, **68**(5):589-595.
38. Kolacinska A, Morawiec J, Fendler W, Malachowska B, Morawiec Z, Szemraj J, Pawlowska Z, Chowdhury D, Choi YE, Kubiak R *et al*: **Association of microRNAs and pathologic response to preoperative chemotherapy in triple negative breast cancer: preliminary report.** *Molecular biology reports* 2014, **41**(5):2851-2857.
39. Ouyang M, Li Y, Ye S, Ma J, Lu L, Lv W, Chang G, Li X, Li Q, Wang S *et al*: **MicroRNA profiling implies new markers of chemoresistance of triple-negative breast cancer.** *PloS one* 2014, **9**(5):e96228.
40. Wu MY, Fu J, Xiao X, Wu J, Wu RC: **MiR-34a regulates therapy resistance by targeting HDAC1 and HDAC7 in breast cancer.** *Cancer letters* 2014, **354**(2):311-319.
41. Zhao Y, Deng C, Lu W, Xiao J, Ma D, Guo M, Recker RR, Gatalica Z, Wang Z, Xiao GG: **let-7 microRNAs induce tamoxifen sensitivity by downregulation of estrogen receptor alpha signaling in breast cancer.** *Molecular medicine* 2011, **17**(11-12):1233-1241.
42. Bai WD, Ye XM, Zhang MY, Zhu HY, Xi WJ, Huang X, Zhao J, Gu B, Zheng GX, Yang AG *et al*: **MiR-200c suppresses TGF-beta signaling and counteracts trastuzumab resistance and metastasis by targeting ZNF217 and ZEB1 in breast cancer.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2014, **135**(6):1356-1368.
43. Elston CW, Ellis IO: **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* 2002, **41**(3A):154-161.
44. Vergara-Lluri ME, Moatamed NA, Hong E, Apple SK: **High concordance between HercepTest immunohistochemistry and ERBB2 fluorescence in situ hybridization before and after implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathology 2007 guidelines.** *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2012, **25**(10):1326-1332.
45. Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP: **Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs.** *Plant methods* 2007, **3**:12.
46. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP: **Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations.** *Biotechnology letters* 2004, **26**(6):509-515.
47. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW: **Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR.** *Biotechnology letters* 2006, **28**(19):1601-1613.
48. (n.d.) S-SNNS: **Stuttgart Neural Network Simulator.** Retrieved September 30, 2014 from <http://www.ra.cs.uni-tuebingen.de/SNNS/>.
49. Dedes KJ, Natrajan R, Lambros MB, Geyer FC, Lopez-Garcia MA, Savage K, Jones RL, Reis-Filho JS: **Down-regulation of the miR master regulators Drosha and Dicer is associated with specific subgroups of breast cancer.** *European journal of cancer* 2011, **47**(1):138-150.
50. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM: **MicroRNA and cancer - A brief overview.** *Advances in biological regulation* 2014.
51. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M *et al*: **A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(7):2257-2261.

52. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, Benjamin H, Shabes N, Tabak S, Levy A *et al*: **MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin.** *Nature biotechnology* 2008, **26**(4):462-469.
53. Pencheva N, Tavazoie SF: **Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks.** *Nature cell biology* 2013, **15**(6):546-554.
54. Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF: **A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells.** *Nature* 2012, **481**(7380):190-194.
55. Sun EH, Zhou Q, Liu KS, Wei W, Wang CM, Liu XF, Lu C, Ma DY: **Screening miRs related to different subtypes of breast cancer with miRs microarray.** *European review for medical and pharmacological sciences* 2014, **18**(19):2783-2788.
56. de Rinaldis E, Gazinska P, Mera A, Modrusan Z, Fedorowicz GM, Burford B, Gillett C, Marra P, Grigoriadis A, Dornan D *et al*: **Integrated genomic analysis of triple-negative breast cancers reveals novel microRNAs associated with clinical and molecular phenotypes and sheds light on the pathways they control.** *BMC genomics* 2013, **14**:643.
57. Gyparakis MT, Basdra EK, Papavassiliou AG: **MicroRNAs as regulatory elements in triple negative breast cancer.** *Cancer letters* 2014, **354**(1):1-4.
58. Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO *et al*: **MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype.** *Genome biology* 2007, **8**(10):R214.
59. Dai X, Chen A, Bai Z: **Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miR expression profiling.** *Scientific reports* 2014, **4**:6566.
60. Li J, Li X, Kong X, Luo Q, Zhang J, Fang L: **MiR-26b inhibits cellular proliferation by targeting CDK8 in breast cancer.** *International journal of clinical and experimental medicine* 2014, **7**(3):558-565.
61. Liu XX, Li XJ, Zhang B, Liang YJ, Zhou CX, Cao DX, He M, Chen GQ, He JR, Zhao Q: **MicroRNA-26b is underexpressed in human breast cancer and induces cell apoptosis by targeting SLC7A11.** *FEBS letters* 2011, **585**(9):1363-1367.
62. Sandhu R, Rivenbark AG, Mackler RM, Livasy CA, Coleman WB: **Dysregulation of microRNA expression drives aberrant DNA hypermethylation in basal-like breast cancer.** *International journal of oncology* 2014, **44**(2):563-572.
63. Tan S, Ding K, Li R, Zhang W, Li G, Kong X, Qian P, Lobie PE, Zhu T: **Identification of miR-26 as a key mediator of estrogen stimulated cell proliferation by targeting CHD1, GREB1 and KPNA2.** *Breast cancer research : BCR* 2014, **16**(2):R40.
64. Li J, Kong X, Zhang J, Luo Q, Li X, Fang L: **MiR-26b inhibits proliferation by targeting PTGS2 in breast cancer.** *Cancer cell international* 2013, **13**(1):7.
65. Lv K, Liu L, Wang L, Yu J, Liu X, Cheng Y, Dong M, Teng R, Wu L, Fu P *et al*: **Lin28 mediates paclitaxel resistance by modulating p21, Rb and Let-7a miR in breast cancer cells.** *PloS one* 2012, **7**(7):e40008.
66. Kim SJ, Shin JY, Lee KD, Bae YK, Sung KW, Nam SJ, Chun KH: **MicroRNA let-7a suppresses breast cancer cell migration and invasion through downregulation of C-C chemokine receptor type 7.** *Breast cancer research : BCR* 2012, **14**(1):R14.
67. Wang Y, Hu X, Greshock J, Shen L, Yang X, Shao Z, Liang S, Tanyi JL, Sood AK, Zhang L: **Genomic DNA copy-number alterations of the let-7 family in human cancers.** *PloS one* 2012, **7**(9):e44399.
68. Lu L, Katsaros D, Zhu Y, Hoffman A, Luca S, Marion CE, Mu L, Risch H, Yu H: **Let-7a regulation of insulin-like growth factors in breast cancer.** *Breast cancer research and treatment* 2011, **126**(3):687-694.
69. Liu Y, Li H, Feng J, Cui X, Huang W, Li Y, Su F, Liu Q, Zhu J, Lv X *et al*: **Lin28 induces epithelial-to-mesenchymal transition and stemness via downregulation of let-7a in breast cancer cells.** *PloS one* 2013, **8**(12):e83083.

70. Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, Li QJ, Lowe SW, Hannon GJ, He L: **miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92.** *Genes & development* 2009, **23**(24):2839-2849.
71. Fan Y, Yin S, Hao Y, Yang J, Zhang H, Sun C, Ma M, Chang Q, Xi JJ: **miR-19b promotes tumor growth and metastasis via targeting TP53.** *Rna* 2014, **20**(6):765-772.
72. McDermott AM, Miller N, Wall D, Martyn LM, Ball G, Sweeney KJ, Kerin MJ: **Identification and validation of oncologic miR biomarkers for luminal A-like breast cancer.** *PloS one* 2014, **9**(1):e87032.
73. Buscaglia LE, Li Y: **Apoptosis and the target genes of microRNA-21.** *Chinese journal of cancer* 2011, **30**(6):371-380.
74. Dong G, Liang X, Wang D, Gao H, Wang L, Wang L, Liu J, Du Z: **High expression of miR-21 in triple-negative breast cancers was correlated with a poor prognosis and promoted tumor cell in vitro proliferation.** *Medical oncology* 2014, **31**(7):57.
75. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB *et al*: **p53-mediated activation of miR34 candidate tumor-suppressor genes.** *Current biology : CB* 2007, **17**(15):1298-1307.
76. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ *et al*: **Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis.** *Molecular cell* 2007, **26**(5):745-752.
77. Yang F, Li QJ, Gong ZB, Zhou L, You N, Wang S, Li XL, Li JJ, An JZ, Wang DS *et al*: **MicroRNA-34a targets Bcl-2 and sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to sorafenib treatment.** *Technology in cancer research & treatment* 2014, **13**(1):77-86.
78. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M *et al*: **miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(39):13944-13949.
79. Sun L, Yao Y, Liu B, Lin Z, Lin L, Yang M, Zhang W, Chen W, Pan C, Liu Q *et al*: **MiR-200b and miR-15b regulate chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting BMI1.** *Oncogene* 2012, **31**(4):432-445.
80. Rahman M, Lovat F, Romano G, Calore F, Acunzo M, Bell EH, Nana-Sinkam P: **miR-15b/16-2 Regulates Factors That Promote p53 Phosphorylation and Augments the DNA Damage Response following Radiation in the Lung.** *The Journal of biological chemistry* 2014, **289**(38):26406-26416.
81. O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, Round JL, Scholz RL, Chaudhuri AA, Kahn ME, Rao DS, Baltimore D: **MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development.** *Immunity* 2010, **33**(4):607-619.
82. Liu LH, Li H, Li JP, Zhong H, Zhang HC, Chen J, Xiao T: **miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3.** *Biochemical and biophysical research communications* 2011, **416**(1-2):31-38.
83. Wang H, Tan G, Dong L, Cheng L, Li K, Wang Z, Luo H: **Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer.** *PloS one* 2012, **7**(4):e34210.
84. Chen D, Sun Y, Yuan Y, Han Z, Zhang P, Zhang J, You MJ, Teruya-Feldstein J, Wang M, Gupta S *et al*: **miR-100 induces epithelial-mesenchymal transition but suppresses tumorigenesis, migration and invasion.** *PLoS genetics* 2014, **10**(2):e1004177.
85. Chen WX, Liu XM, Lv MM, Chen L, Zhao JH, Zhong SL, Ji MH, Hu Q, Luo Z, Wu JZ *et al*: **Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs.** *PloS one* 2014, **9**(4):e95240.

86. Deng L, Shang L, Bai S, Chen J, He X, Trevino RM, Chen S, Li X, Meng X, Yu B *et al*: **microRNA100 inhibits self-renewal of breast cancer stem-like cells and breast tumor development**. *Cancer research* 2014.
87. Gebeshuber CA, Martinez J: **miR-100 suppresses IGF2 and inhibits breast tumorigenesis by interfering with proliferation and survival signaling**. *Oncogene* 2013, **32**(27):3306-3310.
88. Grundmann S, Hans FP, Kinniry S, Heinke J, Helbing T, Bluhm F, Sluijter JP, Hoefler I, Pasterkamp G, Bode C *et al*: **MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells**. *Circulation* 2011, **123**(9):999-1009.
89. Farazi TA, Ten Hoeve JJ, Brown M, Mihailovic A, Horlings HM, van de Vijver MJ, Tuschl T, Wessels LF: **Identification of distinct miR target regulation between breast cancer molecular subtypes using AGO2-PAR-CLIP and patient datasets**. *Genome biology* 2014, **15**(1):R9.
90. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ: **The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1**. *Nature cell biology* 2008, **10**(5):593-601.
91. Li X, Roslan S, Johnstone CN, Wright JA, Bracken CP, Anderson M, Bert AG, Selth LA, Anderson RL, Goodall GJ *et al*: **MiR-200 can repress breast cancer metastasis through ZEB1-independent but moesin-dependent pathways**. *Oncogene* 2014, **33**(31):4077-4088.
92. Ye F, Tang H, Liu Q, Xie X, Wu M, Liu X, Chen B, Xie X: **miR-200b as a prognostic factor in breast cancer targets multiple members of RAB family**. *Journal of translational medicine* 2014, **12**:17.
93. Chang BP, Wang DS, Xing JW, Yang SH, Chu Q, Yu SY: **miR-200c inhibits metastasis of breast cancer cells by targeting HMGB1**. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban* 2014, **34**(2):201-206.
94. Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D, Diehn M, Liu H, Panula SP, Chiao E *et al*: **Downregulation of miR-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells**. *Cell* 2009, **138**(3):592-603.
95. Li Q, Liu M, Ma F, Luo Y, Cai R, Wang L, Xu N, Xu B: **Circulating miR-19a and miR-205 in serum may predict the sensitivity of luminal A subtype of breast cancer patients to neoadjuvant chemotherapy with epirubicin plus paclitaxel**. *PloS one* 2014, **9**(8):e104870.
96. Fu Y, Jiang BQ, Wu Y, Li ZD, Zhuang ZG: **[Hsa-miR-206 inhibits the migration and invasion of breast cancer by targeting Cx43]**. *Zhonghua yi xue za zhi* 2013, **93**(36):2890-2894.
97. Li Y, Hong F, Yu Z: **Decreased expression of microRNA-206 in breast cancer and its association with disease characteristics and patient survival**. *The Journal of international medical research* 2013, **41**(3):596-602.
98. Wang J, Tsouko E, Jonsson P, Bergh J, Hartman J, Aydogdu E, Williams C: **miR-206 inhibits cell migration through direct targeting of the actin-binding protein Coronin 1C in triple-negative breast cancer**. *Molecular oncology* 2014.
99. Zhou J, Tian Y, Li J, Lu B, Sun M, Zou Y, Kong R, Luo Y, Shi Y, Wang K *et al*: **miR-206 is down-regulated in breast cancer and inhibits cell proliferation through the up-regulation of cyclinD2**. *Biochemical and biophysical research communications* 2013, **433**(2):207-212.
100. Huang X, Taeb S, Jahangiri S, Emmenegger U, Tran E, Bruce J, Mesci A, Korpela E, Vesprini D, Wong CS *et al*: **miR-95 mediates radioresistance in tumors by targeting the sphingolipid phosphatase SGPP1**. *Cancer research* 2013, **73**(23):6972-6986.

101. Zhang Y, Li M, Wang H, Fisher WE, Lin PH, Yao Q, Chen C: **Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis.** *World journal of surgery* 2009, **33**(4):698-709.
102. Cascio S, D'Andrea A, Ferla R, Surmacz E, Gulotta E, Amodeo V, Bazan V, Gebbia N, Russo A: **miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 alpha and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells.** *Journal of cellular physiology* 2010, **224**(1):242-249.
103. Castellano L, Giamas G, Jacob J, Coombes RC, Lucchesi W, Thiruchelvam P, Barton G, Jiao LR, Wait R, Waxman J et al: **The estrogen receptor-alpha-induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(37):15732-15737.
104. Li D, Ilnytsky Y, Kovalchuk A, Khachigian LM, Bronson RT, Wang B, Kovalchuk O: **Crucial role for early growth response-1 in the transcriptional regulation of miR-20b in breast cancer.** *Oncotarget* 2013, **4**(9):1373-1387.
105. Perez-Rivas LG, Jerez JM, Carmona R, de Luque V, Vicioso L, Claros MG, Viguera E, Pajares B, Sanchez A, Ribelles N et al: **A microRNA signature associated with early recurrence in breast cancer.** *PloS one* 2014, **9**(3):e91884.
106. Peltier HJ, Latham GJ: **Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues.** *Rna* 2008, **14**(5):844-852.
107. Lamba V, Ghodke-Puranik Y, Guan W, Lamba JK: **Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation.** *BMC research notes* 2014, **7**:129.
108. Ratert N, Meyer HA, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Miller K, Kilic E, Erbersdobler A, Weikert S, Jung K: **Reference miRs for miRome analysis of urothelial carcinomas.** *PloS one* 2012, **7**(6):e39309.
109. Torres A, Torres K, Wdowiak P, Paszkowski T, Maciejewski R: **Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues.** *Gynecologic oncology* 2013, **130**(3):588-594.
110. Carlsson J, Helenius G, Karlsson M, Lubovac Z, Andren O, Olsson B, Klinga-Levan K: **Validation of suitable endogenous control genes for expression studies of miR in prostate cancer tissues.** *Cancer genetics and cytogenetics* 2010, **202**(2):71-75.
111. Genovesi LA, Anderson D, Carter KW, Giles KM, Dallas PB: **Identification of suitable endogenous control genes for microRNA expression profiling of childhood medulloblastoma and human neural stem cells.** *BMC research notes* 2012, **5**:507.
112. Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, Kerin MJ, Miller N: **Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer.** *BMC molecular biology* 2008, **9**:76.
113. Wotschovsky Z, Meyer HA, Jung M, Fendler A, Wagner I, Stephan C, Busch J, Erbersdobler A, Disch AC, Mollenkopf HJ et al: **Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases.** *Analytical biochemistry* 2011, **417**(2):233-241.
114. Truong HH, Xiong J, Ghotra VP, Nirmala E, Haazen L, Le Devedec SE, Balcioglu HE, He S, Snaar-Jagalska BE, Vreugdenhil E et al: **beta1 integrin inhibition elicits a prometastatic switch through the TGFbeta-miR-200-ZEB network in E-cadherin-positive triple-negative breast cancer.** *Science signaling* 2014, **7**(312):ra15.
115. Sharma SB, Lin CC, Farrugia MK, McLaughlin SL, Ellis EJ, Brundage KM, Salkeni MA, Ruppert JM: **microRNAs-206 and -21 cooperate to promote RAS-ERK signaling by suppressing the translation of RASA1 and SPRED1.** *Molecular and cellular biology* 2014.
116. Sasaki A, Tsunoda Y, Tsuji M, Udaka Y, Oyamada H, Tsuchiya H, Oguchi K: **Decreased miR-206 Expression in BRCA1 Wild-type Triple-negative Breast**

- Cancer Cells After Concomitant Treatment with Gemcitabine and a Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Inhibitor.** *Anticancer research* 2014, **34**(9):4893-4897.
117. Ren Y, Han X, Yu K, Sun S, Zhen L, Li Z, Wang S: **microRNA-200c downregulates XIAP expression to suppress proliferation and promote apoptosis of triple-negative breast cancer cells.** *Molecular medicine reports* 2014, **10**(1):315-321.
 118. Yao Y, Chen S, Zhou X, Xie L, Chen A: **5-FU and ixabepilone modify the microRNA expression profiles in MDA-MB-453 triple-negative breast cancer cells.** *Oncology letters* 2014, **7**(2):541-547.
 119. Czyzyk-Krzeska MF, Zhang X: **MiR-155 at the heart of oncogenic pathways.** *Oncogene* 2014, **33**(6):677-678.
 120. Howe EN, Cochrane DR, Cittelly DM, Richer JK: **miR-200c targets a NF-kappaB up-regulated TrkB/NTF3 autocrine signaling loop to enhance anoikis sensitivity in triple negative breast cancer.** *PloS one* 2012, **7**(11):e49987.
 121. Savad S, Mehdipour P, Miryounesi M, Shirkoochi R, Fereidooni F, Mansouri F, Modarressi MH: **Expression analysis of MiR-21, MiR-205, and MiR-342 in breast cancer in Iran.** *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2012, **13**(3):873-877.
 122. Li JY, Jia S, Zhang WH, Zhang Y, Kang Y, Li PS: **Differential distribution of microRNAs in breast cancer grouped by clinicopathological subtypes.** *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2013, **14**(5):3197-3203.
 123. Hua L, Zhou P, Li L, Liu H, Yang Z: **Prioritizing breast cancer subtype related miRs using miR-mRNA dysregulated relationships extracted from their dual expression profiling.** *Journal of theoretical biology* 2013, **331**:1-11.
 124. Sempere LF, Christensen M, Silahatoglu A, Bak M, Heath CV, Schwartz G, Wells W, Kauppinen S, Cole CN: **Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer.** *Cancer research* 2007, **67**(24):11612-11620.
 125. Bockmeyer CL, Christgen M, Muller M, Fischer S, Ahrens P, Langer F, Kreipe H, Lehmann U: **MicroRNA profiles of healthy basal and luminal mammary epithelial cells are distinct and reflected in different breast cancer subtypes.** *Breast cancer research and treatment* 2011, **130**(3):735-745.

I-5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Neben der Zusammenarbeit mit den Verbundpartnern wurde mit dem Deutschen Konsortium für translationale Krebsforschung (DKTK) – German Breast Group (GBG) zur Beschaffung von klinischem Probenmaterial von Triple Negativen Mammakarzinomproben kooperiert.

II. Eingehende Darstellung

II-1. Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen

AP1: Systemspezifikation und Konzeption des Arbeitsablaufes - Alle Partner

- AP1.1: Spezifikation der einzelnen Systemelemente; Komponentenauswahl und Bewertung; Vorbereitung und Abstimmung der Beistellungen der einzelnen Partner

AP 1.2: Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen unter den festgelegten Systemspezifikationen; Schätzung von Auslesesystemkosten und mikrofluidischer Plattformkosten

Regelmäßige Arbeitstreffen zwischen den Partnern am IMTEK und der Uniklinik (Klinik für Frauenheilkunde und des Instituts für Klinische Pathologie) wurden durch das Institut für Klinische Pathologie koordiniert. Hier wurden die Fortschritte der einzelnen Partner berichtet, sowie die jeweils folgenden Schritte miteinander abgestimmt und koordiniert. Die Partner am Institut für Pathologie und der Frauenklinik haben vor allem die Auswahl der relevanten miRs getroffen. Primer- und Sondendesign wurden entsprechend durchgeführt. Im Einzelnen war dabei das detaillierte Konzept zur Umsetzung des Projektes zu erstellen. Dazu hat sich der Verbund am 04.10.12 am IMTEK (Universität Freiburg) getroffen, die entsprechenden Details besprochen und festgelegt. Ein Konzept zur Einzelfunktion des PhaseGuide-Chips zur μ RNA-Separation (AP 1.2) wurde erarbeitet.

AP2: Funktionsmuster und Funktionsnachweis

AP 2.7 Bereitstellung von charakterisierten Probenbanken, Referenzmethoden

Die Verwendung der Gewebeproben wurde durch das Ethikvotum 324/09 der Tumorbank des Comprehensive Cancer Centers Freiburg (CCCF) ermöglicht. Zum Aufbau der Kohorte wurden vorab gemeinsam (Pathologie – Frauenklinik) relevante klinisch-pathologische Parameter definiert. Anhand dieser Parameter wurde eine retrospektive Kohorte, bestehend aus 261 Patientinnen mit Mammakarzinomen generiert. Alleinstellungsmerkmal dieser Kohorte war das Vorhandensein von korrespondierenden kryo- und paraffinasservierten Gewebeproben und zugehörigen klinisch pathologischen Parametern.

Zusätzlich wurden allen Projektpartnern Zelllinien (BT474 ER α +, PR+; Her2/neu3+; MCF-7 ER α +, PR+; Her2/neu-; T-47D ER α +, PR+; Her2/neu-; ZR-75-1 ER α +, PR-; Her2/neu-; SK-BR-3 ER α -, PR-; Her2/neu3+; MDA-MB-453 ER α -, PR-; Her2/neu seitens der Klinik für Gynäkologie) sowie prospektiv gesammelte Gewebeproben (seitens des Instituts für Klinische Pathologie) zur Verfügung gestellt.

Alle Gewebeproben wurden bezüglich ihrer Zusammensetzung (prozentuale Anteile Tumor, Stroma, Normal- und nekrotisches Gewebe) durch einen erfahrenen Pathologen histologisch reevaluiert. Nur Proben mit einem Tumoranteil > 50%

wurden in die Kohorte eingeschleust. Die Probenqualität wurde mittels Nanodrop und (auf probenspezifische Anfragen seitens der Projektpartner) Bioanalyzer bestimmt. Nur Proben mit entsprechender „Qualität“ / RNA Gehalt wurden weitergehend analysiert.

Die miR- Isolierung und Expressionsanalyse aus FFPE-Material erfolgte mittels Norgen Biotek FFPE RNA Purification Kit durch das Institut für Klinische Pathologie. Die anschließende reverse Transkription mittels Applied Biosystems Megaplex RT Primer Pool A und quantitative realtime PCR mittels Applied Biosystems miR-spezifischer miR Taqman Kits wurde durch die Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie durchgeführt.

Zusätzlich wurden prospektiv Gewebeproben in enger Kooperation zwischen der CCCF Tumorbank und der AG Molekulare Onkologie in die Projektkohorte eingeschleust. Hiervon wurden sowohl kryo- als auch formalinfixierte und paraffineingebettete Gewebeproben an die Kooperationspartner zur Testung relevanter Verfahren weitergeleitet.

AP 2.8 Nachweis von 5 µRNA-Parametern (z.B. mi-R16, mi-R21, miR-10b, miR-125a, miR-125b, miR-210, miR-206)

In vitro-Analysen anhand von Mammakarzinomzelllinien, die ein Spektrum an unterschiedlicher Rezeptorenausstattung abdecken (BT474 ERα+; PR+; Her2/neu3+; MCF-7 ERα+; PR+; Her2/neu-; T-47D ERα+; PR+; Her2/neu-; ZR-75-1 ERα+; PR-; Her2/neu-; SK-BR-3 ERα-; PR-; Her2/neu3+; MDA-MB-453 ERα-; PR-; Her2/neu) wurden erste quantitative miR Expressionsanalysen durchgeführt. Die Applikation tumorbiologischer Begleiterscheinungen (Hypoxie bzw. Azidose vs. Kontrolle) wies signifikante Expressionsveränderungen der miRs auf. Die Stabilität der housekeeping miRs 26b und 16 konnte vorerst anhand der Zelllinien verifiziert werden.

Fußend auf diesen Ergebnissen wurden sukzessiv weitere immunhistochemisch phänotypisierten Gewebeproben von Patientinnen mikrodissiziert, qualitätskontrolliert, in pseudonymisierter Form an die AG Molekulare Onkologie zur weiteren reversen Transkription übergeben und bezüglich folgender miRs quantitativ untersucht: miR21, miR122, miR125a, miR125b, miR100, miR19b, miR34a, miR375, miR10b, miR206, miR125a, miR200c, miR155, let7a, miR200b.

AP 3. Realisierung Labormuster, Erprobung der Anwendung

AP 3.3 Probenmaterialoptimierung, Testreihen

Die Ergebnisse unter Anwendung eines neuronalen Netzwerkes (Abb. 1.) wurden mittels der Statistikprogramme SPSS und SNNS untersucht. Dies geschah in enger Kooperation mit Herrn PD Dr. Ulrich Wellner (UKSH Campus Lübeck).

Neuronale Netze sind digitale Netzwerke aus künstlichen Neuronen, deren Ursprung in der Biologie zu finden ist. Sie beziehen sich auf das Neuronennetz des menschlichen Gehirns und adaptieren dessen regulatorische (exzitatorisch/inhibitorische) Eigenschaften (Abb 1). Neuronale Netze werden zur Lösung konkreter Anwendungsprobleme aus Bereichen wie z. B. Statistik, Wirtschaftswissenschaften, Technik und vielen anderen Gebieten eingesetzt.

Angewandt auf unsere Fragestellung zur Vorhersage des intrinsischen Subtyps konnten für alle Subtypen hohe Sensitivität- und Spezifitätswerte errechnet werden (siehe Tab 1.), welche sich auch in den AUC werten widerspiegeln (siehe Abb. 2)

Durch die Anwendung neuronaler Netze konnte die Aussagekraft von miR Expressionsmustern hinsichtlich der Bestimmung intrinsischer Subtypen des Mammakarzinoms demonstriert werden.

Zusätzlich wurde ein weiteres neuronales Netz zur Prognose der Lymphknotenmetastasierung programmiert. Die Ergebnisse waren hinsichtlich der Sensibilität und Spezifität nicht befriedigend. Der Grund hierfür wird in den untersuchten miRs vermutet, da diese speziell zur Bestimmung des Subtyps und nicht zur Vorhersage der Lymphknotenmetastasierung ausgewählt wurden. Weitere Untersuchungen diesbezüglich laufen.

AP 4. Erweiterung, Dokumentation: Labormuster, Anwendung

AP 4.2 Erweiterung um weitere μ RNA-Parameter

Während der gesamten Projektdauer wurden unter Leitung der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie anhand ausgiebiger Literaturrecherchen folgende miRs mittels qPCR in dreifach Ansätzen untersucht: miRs 21, miR 26b, miR 10a 5p, miR 27a 3p,

miR 205 5p, miR 302b 5p, miR 512 3p, miR-19b-3p, letNA-7i-3p, miR-34a-5p, miR-125b-5p, miR-125a-5p, miR-128a-3p, miR-155-5p, miR-298, miR-203a, miR-221-5p, miR-451a, miR-505-5p, miR-1, miR-133a-1, miR-206, miR-146a-5p, miR-190a-5p, miR-16-5p, miR-100-5p, miR-10b-5p, let-7a-5p, miR-200b-3p, miR-200c-3p, miR-335-5p, miR-15b-5p, miR-22-3p, miR-375, miR-122-5p, miR-451a, miR-135b-5p, miR-139-5p, miR-95-5p, miR-199a-3p, miR-362-5p, miR-20b-5p, miR-148a-3p. Es ergeben sich somit über 10.000 durchgeführte Sequenzierungsansätze.

AP 4.4 Pilotstudie

Gewebeproben und Derivate sowie Zelllinien zur Validierung der miR Muster im Rahmen einer Pilotstudie wurden bereitgestellt.

II.2 Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

IMTEK-CPI (FKZ031A094D)	Sensoren (FKZ031A094E)	UKL-P (FKZ031A094F)	UKL-F (FKZ031A094G)	Soll:	IST:	
Pos. 812	207.711,26	174.734,03	0	0	349.772,00	382.445,29 1,09
Pos. 817	78.495,10	0	55.771,96	55.771,98	181.110,00	190.039,04 1,05
Pos. 822	5.684,55	36.505,36	0	0	37.074,00	42.189,91 1,14
Pos. 835	4.068,30		0	0	17.265,00	4.068,30 0,24
Pos. 843	59.685,62	41.867,12	5.263,33	20.018,08	118.400,00	126.834,15 1,07
Pos. 846	8.751,02	2.583,33	0	166,84	10.200,00	11.501,19 1,13
Pos. 850	30.715,17	0	0	0	73.974,00	30.715,17 0,42
	395.111,02	255.689,84	61035,29	75956,9	787.795,00	787.793,05 1,00
	356.714,00	257.229,00	86.926,00	86.926,00	787.795,00	Guthaben: 1,95 €

Tabelle 2 Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

II-3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Projektumsetzung wurde zu Beginn mit allen Kooperationspartnern detailliert geplant und abgestimmt, wodurch die Notwendigkeit und Angemessenheit der einzelnen Teilprojekte im Projektablauf in Umfang und Abfolge definiert wurden (kritischer Pfad). Die Arbeiten zur Abstimmung zwischen Labormuster und Assay-Gesamtchip waren umfangreicher und komplexer als ursprünglich geplant. Mit Hilfe der 9 monatigen kostenneutralen Verlängerung der Projektierung konnte den im Wesentlichen das Projekt entsprechend umgesetzt werden. Auch wurden die Notwendigkeiten des Gesamtprojektes angemessen erfüllt.

II-4. Voraussichtlicher Nutzensund Verwertbarkeit des Ergebnisses

Die projektbegleitende Literaturrecherche hat die Bedeutung des Verbundprojektzieles für die zukünftige Diagnostikentwicklung unterstrichen. Die Entwicklung einer Plattform zur tumorassoziierten miR-Analytik ist wissenschaftlich wie klinisch innovativ. Teile der generierten Daten konnten in eine Publikation mit einfließen. Inwieweit die Chip-basierte, tumorassoziierte μ RNA-Analytik im Feld der molekularen Diagnostik Einzug erhält, ist aufgrund der rasanten Fortschritte, v.a. durch neuidentifizierte Mutationen auf genomischer Ebene, aktuell nicht absehbar und muss abgewartet werden.

II-5. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens durch andere Stellen

(Weitere Publikationen vgl. Sie bitte auch I-4. Wissenschaftlicher und technischer Stand)

1. Adams BD, Furneaux H & White BA. (2007). **The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines.** Molecular endocrinology, Md 21, 1132-1147.
2. Bian HB, Pan X, Yang JS, Wang ZX & De W. (2011). **Upregulation of microRNA-451 increases cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cell line (A549).** J Exp Clin Cancer Res 30, 20.
3. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, MacDougald OA, Cho KR & Fearon ER. (2007). **p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes.** Curr Biol 17, 1298-1307.
4. Buscaglia LE & Li Y. (2011). **Apoptosis and the target genes of microRNA-21.** Chinese journal of cancer 30, 371-380.
5. Chen J, Tian W, Cai H, He H & Deng Y. (2012a). **Down-regulation of microRNA-200c is associated with drug resistance in human breast cancer.** Medical oncology (Northwood, London, England) 29, 2527-2534.
6. Chen ML, Liang LS & Wang XK. (2012b). **miR-200c inhibits invasion and migration in human colon cancer cells SW480/620 by targeting ZEB1.** Clinical & experimental metastasis 29, 457-469.
7. Ding Y, Tian M, Liu J, Deng Y, Li W, Feng X & Hou D. (2012). **[Expression profile of miRNAs in APP swe/PSDeltaE9 transgenic mice]. Nan fang yi ke da xue xue bao.** Journal of Southern Medical University 32, 1280-1283.
8. Feng B, Wang R & Chen LB. (2012a). **Review of miR-200b and cancer chemosensitivity. Biomedicine & pharmacotherapy.** Biomedecine & pharmacotherapie 66, 397-402.
9. Feng B, Wang R, Song HZ & Chen LB. (2012b). **MicroRNA-200b reverses chemoresistance of docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells by targeting E2F3.** Cancer 118, 3365-3376.

10. Hashiguchi Y, Nishida N, Mimori K, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Mochizuki H, Hase K, Doki Y & Mori M. (2012). **Down-regulation of miR-125a-3p in human gastric cancer and its clinicopathological significance.** International journal of oncology 40, 1477-1482.
11. He JF, Luo YM, Wan XH & Jiang D. (2011). **Biogenesis of MiRNA-195 and its role in biogenesis, the cell cycle, and apoptosis.** Journal of biochemical and molecular toxicology 25, 404-408.
12. Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J & Kerin MJ. (2010). **Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease.** The oncologist 15, 673-682.
13. Huang HC, Yu HR, Huang LT, Huang HC, Chen RF, Lin IC, Ou CY, Hsu TY & Yang KD. (2012a). **miRNA-125b regulates TNF-alpha production in CD14+ neonatal monocytes via post-transcriptional regulation.** Journal of leukocyte biology 92, 171-182.
14. Huang L, Luo J, Cai Q, Pan Q, Zeng H, Guo Z, Dong W, Huang J & Lin T. (2012b). **MicroRNA-125b suppresses the development of bladder cancer by targeting E2F3.** International journal of cancer 128, 1758-1769.
15. Kim SJ, Shin JY, Lee KD, Bae YK, Sung KW, Nam SJ & Chun KH. (2012). **MicroRNA let-7a suppresses breast cancer cell migration and invasion through downregulation of C-C chemokine receptor type 7.** Breast Cancer Res 14, R14.
16. Kutty RK, Nagineni CN, Samuel W, Vijayasarathy C, Hooks JJ & Redmond TM. (2010). **Inflammatory cytokines regulate microRNA-155 expression in human retinal pigment epithelial cells by activating JAK/STAT pathway.** Biochemical and biophysical research communications 402, 390-395.
17. Link A, Balaguer F, Shen Y, Nagasaka T, Lozano JJ, Boland CR & Goel A. (2010). **Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 19, 1766-1774.
18. Liu Q, Lv GD, Qin X, Gen YH, Zheng ST, Liu T & Lu XM. (2012). **Role of microRNA let-7 and effect to HMGA2 in esophageal squamous cell carcinoma.** Molecular biology reports 39, 1239-1246.
19. Nan Y, Han L, Zhang A, Wang G, Jia Z, Yang Y, Yue X, Pu P, Zhong Y & Kang C. (2010). **MiRNA-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cells.** Brain research 1359, 14-21.
20. O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, Round JL, Scholz RL, Chaudhuri AA, Kahn ME, Rao DS & Baltimore D. (2010). **MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development.** Immunity 33, 607-619.
21. Peltier HJ & Latham GJ. (2008). **Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues.** RNA (New York, NY 14, 844-852.
22. Pogue AI, Cui JG, Li YY, Zhao Y, Culicchia F & Lukiw WJ. (2010). **Micro RNA-125b (miRNA-125b) function in astrogliosis and glial cell proliferation.** Neuroscience letters 476, 18-22.
23. Roth C, Rack B, Muller V, Janni W, Pantel K & Schwarzenbach H. (2010). **Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer.** Breast Cancer Res 12, R90.
24. Song G, Zhang Y & Wang L. (2009). **MicroRNA-206 targets notch3, activates apoptosis, and inhibits tumor cell migration and focus formation.** The Journal of biological chemistry 284, 31921-31927.
25. Tang F, Zhang R, He Y, Zou M, Guo L & Xi T. (2012). **MicroRNA-125b induces metastasis by targeting STARD13 in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells.** PloS one 7, e35435.
26. Ward A, Balwierz A, Zhang JD, Kublbeck M, Pawitan Y, Hielscher T, Wiemann S & Sahin O. (2012). **Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer.** Oncogene.

II.6 Veröffentlichung der Ergebnisse:

MicroRNA based classification of breast cancer subtypes; Peter Bronsert, Marc Hirschfeld, Ulrich F. Wellner, Kristin Werner, Katja Thurig, Markus Jäger, Martin Werner, Elmar Stickeler; BMC Cancer (conditionally accepted)

Anlage 1: III. Erfolgskontrollbericht

III-1. Beitrag zu den förderpolitischen Zielen

Ziel des Instituts für Klinische Pathologie und der CCCF Tumorbank sind erfolgreich abgeschlossene Forschungsprojekte mit lokalen, nationalen und internationaler Partnern und die anschließende Translation der gewonnenen Erkenntnisse in einen patientenorientierten klinischen Kontext.

Der Fokus der AG Molekulare Onkologie liegt in der Detektion von entität- und subtypspezifischen miR Mustern und deren prognostische und prädiktive Relevanz.

Die Verknüpfung mit entwicklungsorientierten nicht klinisch tätigen Kooperationspartnern im Rahmen des Projektes bietet dem Institut für Klinische Pathologie und der CCCF Tumorbank die Möglichkeit aktiv an der Realisierung neuer prädiktiver Methoden teilzunehmen.

III-3 Fortschreibung des Verwertungsplanes

Im Berichtszeitraum sind bei der Projektbearbeitung keine Erkenntnisse gewonnen worden, die eine Änderung oder Fortschreibung des Verwertungsplans notwendig machten.

III-4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Aus Sicht des Instituts für Klinische Pathologie und der AG Molekulare Onkologie gab es keine Aufgabenstellung im Förderprojekt, die nicht gelöst werden konnte.

III-5. Durchgeführte Veranstaltungen 01/13 – 06/15

März 2013	Prof. Elmar Stickeler Dr. Peter Bronsert	St. Gallen Oncoconferences
Mai 2015	Dr. Peter Bronsert	Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie

Tabelle 3 : Reise- und Vortragsaktivitäten

III-6. Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung

Die im Projekt beschriebenen und angestrebten Ziele wurden erreicht. Die Kosten liegen im Bereich des von der Universität Freiburg für vergleichbare Projekte angesetzten Kostenrahmens (Restguthaben: 1,95 €).

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht	
3. Titel Abschlussbericht des Vorhabens: "Tumorassoziierte µRNA-Analytik"		
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Prof. Dr. med. Martin Werner Prof. Dr. med. Elmar Stickeler Dr. med. Peter Bronsert	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.03.2016	6. Veröffentlichungsdatum
	7. Form der Publikation	
	8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Prof. Dr. med. Martin Werner / Department für Pathologie Postanschrift: Breisacher Straße 115a; 79106 Freiburg Telefon: +49 761 270-80920 Prof. Dr. med. Elmar Stickeler / Klinik für Gynäkologie und Geburtsmedizin Postanschrift: Pauwelsstraße 30; 52074 Aachen Telefax: +49 241 80-88400	
9. Ber. Nr. Durchführende Institution		10. Förderkennzeichen *) 031A094A
		11. Seitenzahl 22
		12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn
13. Literaturangaben 168		14. Tabellen 3
		15. Abbildungen 2
		16. Zusätzliche Angaben
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)		
18. Kurzfassung Im Verbundprojekt „Tumorassoziierte µRNA-Analytik“ wurden micro RNA (miR) Expressionsmuster innerhalb unterschiedlicher Mammakarzinom Subgruppen analysiert. Ziele des Teilvorhabens waren die Entwicklung von Konzepten zur Probenbereitstellung, Probenmaterial- und Assayoptimierung. Hierzu wurden miR aus Paraffingewebeproben isoliert, mittels qPCR amplifiziert und ihren Subgruppen entsprechend und durch neuronale Netzwerke den entsprechenden Subtypen zugeordnet. Hierdurch konnten Signaturen mit einer prädiktiven Spezifität von min. 98.77% und einer Sensitivität von 84.62% identifiziert werden.		
19. Schlagwörter miR; miRNA; microRNA; Brustkrebs; molekularer Subtyp; intrinsischer Subtyp		
20. Verlag	21. Preis	

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.