

MIR-200C:N KORKEA ILMENTYMINEN ON HUONON
ENNUSTEEN MERKKI
PROGESTERONIRESEPTORINEGATIIVISILLA RINTASYÖPÄ-
POTILAILLA

Marie Tuomarila
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Itä-Suomen yliopisto
Terveystieteiden tiedekunta
Lääketieteen laitos
Kliinisen lääketieteen yksikkö
Kliininen patologia ja oikeuslääketiede
Maaliskuu 2015

Marie Tuomarila LT6

Tämä raportti on tiivistelmä englanninkielisestä Plos One -lehdessä 16.10.2014 julkaistusta artikkelista M. Tuomarila et al.: "Overexpression of MicroRNA-200c predicts poor outcome in patients with PR-negative breast cancer".

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Lääketieteen koulutusohjelma

TUOMARILA, MARIE: MiR-200c:n korkea ilmentyminen on huonon ennusteen merkki progesteronireseptorinegatiivisilla rintasyöpäpotilailla

Opinnäytetutkielma, 28 sivua, 7 liitettä (12 sivua)

Tutkielman ohjaajat: apulaisprofessori Arto Mannermaa, FM Kaisa Luostari

Maaliskuu 2015

TIIVISTELMÄ

Mikro-RNA:t (miRNA:t) ovat lyhyitä, proteiinia koodaamattomia RNA-rakenteita, jotka toimivat kohdekudoksesta riippuen joko kasvaimien kasvun hillitsijoinä tai kiihdyttäjinä. MiR-200c kuuluu miR-200-perheeseen, ja se käyttäytyy eri tavalla rintasyöpäkudoksessa kuin terveessä rintakudoksessa. MiR-200c hillitsee epiteelis-mesenkymaalista muuntumista (epithelial - mesenchymal transition, EMT) ja estää solujen invaasiota ja migraatiota. Viimeaikaisten tutkimusten mukaan miR-200c säätelee steroidihormonireseptorien eli progesteroni- ja estrogeenireseptorien (PR ja ER) ilmentymistä. Tutkimuksessani selvitin miR-200c:n esiintyvyyttä ja toimintaa 172 rintasyöpänäytteessä. Rintakudosnäytteet ovat osa Kuopion rintasyöpäprojektia (Kuopio Breast Cancer Project, KBCP), jonka näytteet on kerätty vuosina 1990–1995. Selvitin miR-200c:n ilmentymisen eri näytteissä kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktiolla (qRT-PCR) ja vertasin määriä kliinispatologisiin muuttujiin ja potilaiden elinajanennusteeseen. Tuloksieni mukaan PR ja miR-200c ovat mahdollisia ennustetekijöitä syövän etenemiselle. Korkea miR-200c:n ilmentyminen liittyi huonompaan elinajanennusteeseen PR-negatiivisissa syövissä ($n = 68$) ja alhainen miR-200c:n ilmentyminen huonompaan elinajanennusteeseen PR-positiivisissa syövissä ($n = 86$), (Coxin monimuuttuja-analyysi kummastakin: $P = 0,002$ ja OR = 3,433 sekä $P = 0,004$ ja OR = 4,176). PR-negatiivisissa syövissä korkea miR-200c:n ilmentyminen liittyi myös potilaan lyhyempään uusiutumisvaapaaseen elinajanennusteeseen (relapse-free survival), (Coxin monimuuttuja-analyysillä $P = 0,001$ ja OR = 3,613), paikallisiin tai kaukaisiin syövän uusiutumisiin (logistisella regressiolla $P = 0,006$ ja OR = 3,965) ja kaukoetäpesäkkeisiin (logistisella regressiolla $P = 0,015$ ja OR = 3,390). Löysin myös yhteyden korkean miR-200c:n ilmentymisen sekä huonosti erilaistuneiden (gradus III) ja alhaisen levinneisyysasteen kasvainten välillä (logistinen regressio huonosti erilaistuneille syöville $P = 0,002$ ja OR = 2,791 ja korkean levinneisyysasteen syöville $P = 0,035$ ja OR = 0,285).

Tuloksieni mukaan miR-200c:llä on ilmeinen merkitys rintasyövässä. MiR-200c ja PR toimivat hyvinä ennustetekijöinä elinajan arvioimisessa. Laajempia tutkimuksia tarvitaan kuitenkin varmistamaan tulokseni, mutta tässäkin mittakaavassa ne saattavat luoda pohjan uudelle tutkimuskohteelle eli PR:n säätelemille miRNA-molekyyleille rintasyövässä.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health Sciences

School of Medicine

TUOMARILA, MARIE: Overexpression of MicroRNA-200c predicts poor outcome in patients with PR-negative breast cancer

Thesis, 28 pages, 7 appendixes (12 pages)

Tutors: associate professor Arto Mannermaa, MSc Kaisa Luostari

March 2015

ABSTRACT IN ENGLISH

Micro-RNAs (miRNAs) are small, noncoding RNAs that act as tumor suppressors or oncogenes. MiR-200c is a member of the miR-200 family; it is known to be dysregulated in invasive breast carcinoma. MiR-200c inhibits the epithelial-mesenchymal transition and cell migration and invasion. Recent studies showed that miR-200c regulated steroid hormone receptors, estrogen receptors (ER), and progesterone receptors (PR). The present study aimed to detect miR-200c in 172 invasive breast carcinoma cases selected from a prospective cohort enrolled in Kuopio, Eastern Finland, between 1990 and 1995. MiR-200c expression was determined with relative q-PCR, and results were compared to clinicopathological variables and patient outcome. I found that PR status combined with miR-200c expression was a significant marker of outcome. High miR-200c expression was associated with reduced survival in PR-negative cases ($n = 68$); low miR-200c expression indicated reduced survival in PR-positive cases ($n = 86$) (Cox regression: $P = 0.002$, $OR = 3.433$; and $P = 0.004$, $OR = 4.176$, respectively). In PR-negative cases, high miR-200c expression was associated with shortened relapse-free survival (Cox regression: $P = 0.001$, $OR = 3.613$); increased local/distant recurrence (Logistic regression: $P = 0.006$, $OR = 3.965$); and more frequent distant metastasis (Logistic regression: $P = 0.015$, $OR = 3.390$). I also found that high grade and low stage tumors were positively correlated with high miR-200c expression (Logistic regression for high grade tumors: $P = 0.002$, $OR = 2.791$ and for high stage tumors: $P = 0.035$, $OR = 0.285$).

My results indicated that miR-200c may play a role in invasive breast carcinoma. Furthermore, miR-200c combined with PR status provided a refined predictor of outcome. In future, a larger study is required to confirm our results. This data may provide a basis for new research target – PR -regulated miRNAs in breast cancer.

SISÄLTÖ

1 Johdanto.....	7
2 Aineisto ja menetelmät.....	9
2.1 Aineisto.....	9
2.2 Nukleiinihappoeristys ja kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio.....	10
2.3 Tilastoanalyysit.....	11
3 Tulokset.....	12
3.1 Korkea miR-200c:n ilmentyminen liittyy huonosti erilaistuneisiin syöpiin.....	12
3.2 Alhainen miR-200c:n ilmentyminen kuvaa itsenäisesti lyhyttä elinajanennustetta PR-positiivisissa näytteissä.....	13
3.3 Korkea miR-200c:n ilmentyminen kuvaa itsenäisesti lyhyttä elinajanennustetta ja lyhyempää uusiutumismisvapaita elinajanennustetta PR-negatiivisissa syövisissä.....	14
4 Pohdinta.....	17
4.1 MiRNA ja PR rintasyövässä.....	17
4.2 MiR-200c ja ER.....	18
4.3 Imusolmukemetastaasit.....	18
4.4 Rintasyövän eri tyypit.....	19
4.5 MiRNA-molekyylien ilmentyminen vaihtelee erilaisen elinajanennusteen ja uusiutumismisriskin potilailla.....	20
4.6 MiR-200c korkean erilaistumisasteen rintasyövissä.....	21
4.7. MiRNA-molekyylien määrä vaihtelee kaukoetäpesäkkeissä.....	22

4.8 MiR-200c, transkriptiotekijät ja geenien ilmentymisen säätely.....	22
5 Lähteet.....	24
6 Liitteet.....	29
6.1 Liitetaulukot.....	29
6.2 Liitekuvaajat.....	39

1. Johdanto

Rintasyöpä voidaan jakaa eri alatyyppeihin syövän ennusteeseen vaikuttavien biologisten ja kliinisten muuttujien avulla [1-3]. Muuttujat selvitetään immunohistokemiallisia tutkimusmenetelmiä käyttäen jo syövän diagnosointivaiheessa. Ennusteeseen vaikuttavia muuttujia ovat mm. estrogeenireseptorin (ER) ja progesteronireseptorin (PR) määrät, ihmisen epidermaalisen kasvutekijäreseptori 2:n (*Her2*) monistuma ja kasvaimen solujen jakautumisnopeuden kertova antigeeni Ki-67. Käyttäen apuna näitä muuttujia, kuvantamista sekä muita kliinisiä tietoja selvitetään rintasyövän tarkempi diagnoosi ja suunnitellaan oikea hoito [4].

Steroidihormonien eli estrogeeni- ja progesteronihormonien on todettu liittyvän rintasyövän syntyyn ja kasvuun. Viime aikoina tutkimuksissa on kiinnitetty huomiota hormonien vaikutuksia välittävien hormonireseptorien ER:n ja PR:n sekä mikro-RNA-molekyylien (miRNA) väliseen yhteyteen syövässä. Hormonireseptorien on todettu säätelevän miRNA-molekyyliä [5,6].

MiRNA:t ovat pieniä, noin 19 - 24 emäsparia pitkiä, proteiineja koodaamattomia RNA-molekyyliä, jotka kiinnittyvät kohdemolekyyliinsä lähetti-RNA:n 3'-päähän (3'-UTR) ja säätelevät näiden translaatiota proteiineiksi [7]. Tutkijat ovat löytäneet yhteyksiä miRNA-molekyylien ja syöpäkudoksen välillä. MiRNA:t toimivat syöpäkudoksessa esimerkiksi syövän etenemisen hillitsijoinä tai kiihdyttäjinä [8-10].

MiRNA-molekyyliä on löydetty yli tuhat erilaista, mutta tässä tutkimuksessa tutkitaan miR-200-perheeseen kuuluvaa miR-200c:tä. Samaan perheeseen kuuluvat lisäksi miR-141, miR-200b, miR-200a ja miR-429 [11]. Rintasyövässä miR-200-perhe ylläpitää epiteliaalista fenotyyppiä ja vähentää epiteliaalis-mesenkymaalista muutosta (EMT) hillitsemällä transkriptiotekijöitä ZEB1 ja ZEB2 [12-15]. Lisäksi miR-200-perhe hillitsee migraatioon liittyvien

geenien ilmentymistä kuten *MSN*, *FNI* [16] ja *WAVE3* [17] ja kiinnittyy aktiinia sääteleviin proteiineihin *FHOD1* ja *PPM1F* [18]. MiR-200c ylläpitää solun herkkyyttä anoikikselle kiinnittymällä *TrkB*:ta koodaavaan geeniin [16] sekä vaikuttaa apoptoosin käynnistymiseen säätelemällä *FAP-1*:tä *CD95*:n välityksellä [19]. Eri rintasyöpätyypeissä miR-200-perhe ilmentyy eri tavalla [20,21], esimerkiksi metastaattisessa rintasyövässä sen ilmentyminen oli erään tutkimuksen mukaan hiljentynyt [22]. MiR-200-perheen alhainen ilmentyminen liittyi myös EMT:n transkriptiotekijöiden kohonneeseen määrään ja miR-200c-141:n lokuksen hypermetylaatioon [22].

MiRNA-molekyylien ilmentymiserot syövän ja normaalikudoksen välillä voivat osittain johtua hormonireseptorien määrän vaihtelusta [6]. Useissa tutkimuksissa osoitetaan, että ER säätelee miRNA-molekyyliä rintasyövässä [23-26], mutta myös PR vaikuttaa rintasyövän miRNA-molekyylien ilmentymiseen [27-31].

Työssäni tutkin miR-200c:n ilmentymistä ja rintasyöpäpotilaiden ennustetta. Tutkimukseni rintasyöpänäytteet ovat osa Kuopion rintasyöpäprojektia, jonka aineisto kerättiin vuosina 1990 – 1995. Vertasin miR-200c:n ilmentymistä ja klinispatologisia muuttujia potilaiden ennusteeseen. Tuloksia analysoidessani totesin miR-200c:n ilmentymisen vaikuttavan syövän uusiutumismuutokseen elinajanennusteeseen (relapse-free survival) ja potilaiden rintasyöpäspesifiseen elinajanennusteeseen PR-positiivisissa ja –negatiivisissa syövässä.

2. Aineisto ja menetelmät

2.1 Aineisto

Tutkimuksessa käytettävät rintasyöpänäytteet ovat osa Kuopion rintasyöpäprojektin (Kuopio Breast Cancer Project, KBCP) aineistoa. Projektin 497 näytettä on kerätty Itä-Suomessa vuosina 1990 – 1995 rintasyöpöpotilailta leikkauksen yhteydessä. Tutkimusryhmämme on julkaissut tarkemmat tiedot KBCP:n näytteistä ja tutkimusasetelmista jo aiemmin [32,33]. Tutkimukseeni oli käytettävissä 172 rintasyöpäprojektin näytettä. Aineisto oli valikoimaton enkä arvioinut tarvittavan aineiston määrää etukäteen voimalaskelmin.

Potilaiden keski-ikä aineistossani oli diagnoosihetkellä 60,4 vuotta. Keskimääräinen seuranta-aika oli helmikuuhun 2011 mennessä 9,7 vuotta vaihdellen välillä 0,10 ja 19,8 vuotta. Seuranta-aikana potilaista 60 oli kuollut rintasyöpään, 59 potilasta oli menehtynyt muuhun syyhyn ja 53 potilasta oli elossa. Kesäkuussa 2013 selvitettiin potilaiden sairauden levinneisyys kauko- ja lähietäpesäkkeisiin. Aineistoni potilaista 60 sairasti etäpesäkkeistä rintasyöpää ja heistä 30:n syöpä oli lähettänyt toisen, kolmannen tai neljännen linjan etäpesäkkeen. Tarkempaa tietoa potilaista ja kasvaimista on taulukossa 1 ja liitetaulukossa S1.

Kuopion Rintasyöpäprojektilla on Itä-Suomen yliopiston ja Kuopion yliopistollisen sairaalan eettisen toimikunnan lupa (kirjalliset hyväksynnät 1/1989 ja 61/2010). Jokainen potilas sai sekä suulliset että kirjalliset ohjeet tutkimuksesta ja allekirjoitti suostumuslomakkeen osallistumisestaan.

2.2 Nukleiinihappoeristys ja kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio

Eristin RNA:n $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa säilytetyistä tuorenäytteistä käyttämällä MirVana miRNA Isolation Kit -reagensseja (Ambion, Austin, Texas, TX). Leikkasin tuorenäytteistä noin 30 mg:n kokoiset palat, joista eristin totaali-RNA:n valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Seuraavaksi valmistin komplementaari-DNA:n (cDNA) käänteiskopioimalla 10 nanogrammaa näytettä käyttäen geenispesifisiä alukkeita miR-200c:lle ja RNU48:lle. Käänteiskopiointiin käytin TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Grand Islands, NY) -reagensseja. Tässäkin välivaiheessa noudatin valmistajan ohjeita.

Tämän jälkeen määritin miR-200c:n ilmentymisen kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktiolla (qRT-PCR) käyttäen miR-200c:lle ja RNU48:lle TaqMan MicroRNA Assay -alukkeita. Suoritin PCR-reaktiot Mx3000 Real-Time PCR System qRT-PCR -laitteella (Life Technologies, Grand Islands, NY) valmistajan ohjeiden mukaan. Endogeenikontrollina käytin valmistajan suosittelemaa RNU48:ta.

Määritin ensimmäisessä qRT-PCR -ajossa vakiokäyrät miR-200c:lle ja RNU48:lle. Niiden avulla varmistin reaktioiden toimivuuden hyväksyttävällä tavalla. Laskin geenien suhteelliset ilmentymistasot $\Delta\Delta\text{Ct}$ -menetelmällä käyttäen yhtälöissä jokaisen näytteen kolmen rinnakkaisen kynnysyklin (threshold cycle, Ct) keskiarvoa. Kalibraattorinäytteenä qRT-PCR -ajoissa käytin benigniä rintasyöpänäytettä, jonka suhteelliseen ilmentymisarvoon (fold change) rinnastin muiden näytteiden fold change -arvot. Suhteelliset ilmentymiset ovat nähtävillä liitetaulukossa S2.

Seuraavaksi jaoin miR-200c:n eri näytteiden suhteelliset ilmentymismäärät kahteen ryhmään jatkoanalyysjä varten: (1) keskivertaisen ja korkean ilmentymisen ryhmä, jossa miR-200c:n ilmentyminen oli korkeampi kuin miR-200c:n mediaani-ilmentyminen ja (2) alhaisen ilmen-

tymisen ryhmä, jossa näytteiden miR-200c:n ilmentyminen oli alhaisempi kuin mediaani-ilmentyminen.

2.3 Tilastanalyysit

Laskin tilastanalyysit Windowsin SPSS 19.0. -ohjelmalla (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). MiR-200c:n ilmentymismäärän vertaamiseen eri ryhmissä käytin χ^2 -yhteensopivuustestiä ja ilmentymisen ja kliinisten muuttujien välisten yhteyksien selvittämiseen käytin logistista regressioanalyysiä. Elinajanennusteen selvittämiseen käytin Kaplan-Meierin eloonjäämisanalyysiä ja sen testejä log-rank, Breslow sekä Tarone-Ware. Päätetapahtumaksi määritin rintasyövästä aiheutuneen kuoleman. MiR-200c:n ilmentymisen ja rintasyövän elinajanennusteen välisen yhteyden analysointiin käytin Coxin monimuuttuja-analyysiä. Tilastollisesti merkitsevinä P-arvoina pidin arvoja, jotka olivat alle 0,05.

3. Tulokset

3.1 Korkea miR-200c:n ilmentyminen liittyy huonosti erilaistuneisiin syöpiin

Vertasin miR-200c:n ilmentymistä kliinispatologisiin muuttujiin. MiR-200c:n korkea ilmentyminen liittyi huonosti erilaistuneisiin syöpiin (gradus III), ($P = 0,002$, taulukko 1) ja alhaisen levinneisyysasteen syöpiin (stage I ja stage II), ($P = 0,045$, taulukko 1).

Taulukko1. Rintasyöpäpotilaiden kliiniset tiedot yhdistettynä miR-200c:n ilmentymiseen.

Kliininen muuttuja	n	miR-200c:n ilmentyminen ^a		P	OR (95 % CL)
		Alhainen ilmentyminen (%)	Korkea ilmentyminen (%)		
Ikä diagnoosihetkellä				0,17 ^b	
Alle 59 v.	85	38 (22,1)	47 (27,3)		
Yli 60 v.	87	48 (27,9)	39 (22,7)		
Potilaan elossaolo				0,242 ^b	
Kuollut rintasyöpään	60	29 (16,9)	31 (18,0)		
Kuollut, muu syy	59	35 (20,3)	24 (14,0)		
Elossa, ei uusimaa	46	20 (11,6)	26 (15,1)		
Elossa, uusima	7	2 (1,2)	5 (2,9)		
Histologinen erilaistumisaste				0,002 ^b	
I ja II	10	63 (37,8)	43 (27,5)		Ref.
III	61	21 (12,6)	40 (24,0)	0,002	2,79 (1,45 – 5,37)
Histologinen levinneisyys				0,045	
I	44	21 (12,7)	23 (13,9)		Ref.
II	10	45 (27,2)	55 (33,3)	0,762	1,116 (0,548 – 2,272)
III ja IV	21	16 (9,7)	5 (3,0)	0,035	0,285 (0,089 – 0,915)
Histologinen tyyppi				0,254 ^b	
Duktaalinen	11	54 (32,3)	63 (37,7)		
Lobulaarinen	31	19 (11,4)	12 (7,2)		
Muu	19	11 (6,6)	8 (4,8)		
Estrogeenireseptori				0,866 ^b	
Negatiivinen	51	26 (15,7)	25 (15,0)		
Positiivinen	11	57 (34,3)	58 (34,9)		
Progesteronireseptori				0,21 ^b	

Negatiivinen	72	40 (24,1)	32 (19,3)		
Positiivinen	94	43 (25,9)	51 (30,7)		
<i>Her2</i> :n monistuma				0,452 ^b	
Ei	13	67 (42,1)	66 (41,5)		
Kyllä	26	11 (6,9)	15 (9,4)		
Triplanegatiivisuus				0,541 ^b	
Kyllä	29	16 (9,3)	13 (7,6)		
Ei	14	70 (40,7)	73 (42,4)		
Paikallinen / kaukousima				0,185 ^b	
Kyllä	73	32 (18,7)	41 (24,0)		
Ei	98	53 (31,0)	45 (26,3)		
Primaarinen kaukoetäpesäke				0,337 ^b	
Kyllä	60	27 (15,7)	33 (19,2)		
Ei	11	59 (34,3)	53 (30,8)		
Luminaalityyppi A / B				0,531 ^b	
Luminaali A (ER+, <i>Her2</i> -, PR+)	10	49 (45,4)	51 (47,2)		
Luminaali B (ER+, <i>Her2</i> +, PR-)	8	3 (2,8)	5 (46,3)		

Lyhenteet: n = tapausten määrä, Ref = verrokkiryhmä logistisessa regressioanalyysissä, p = tapahtuman todennäköisyys, OR (95 % CI) = rintasyöpäspesifisen kuoleman vetosuhte ja 95 %:n luottamusväli

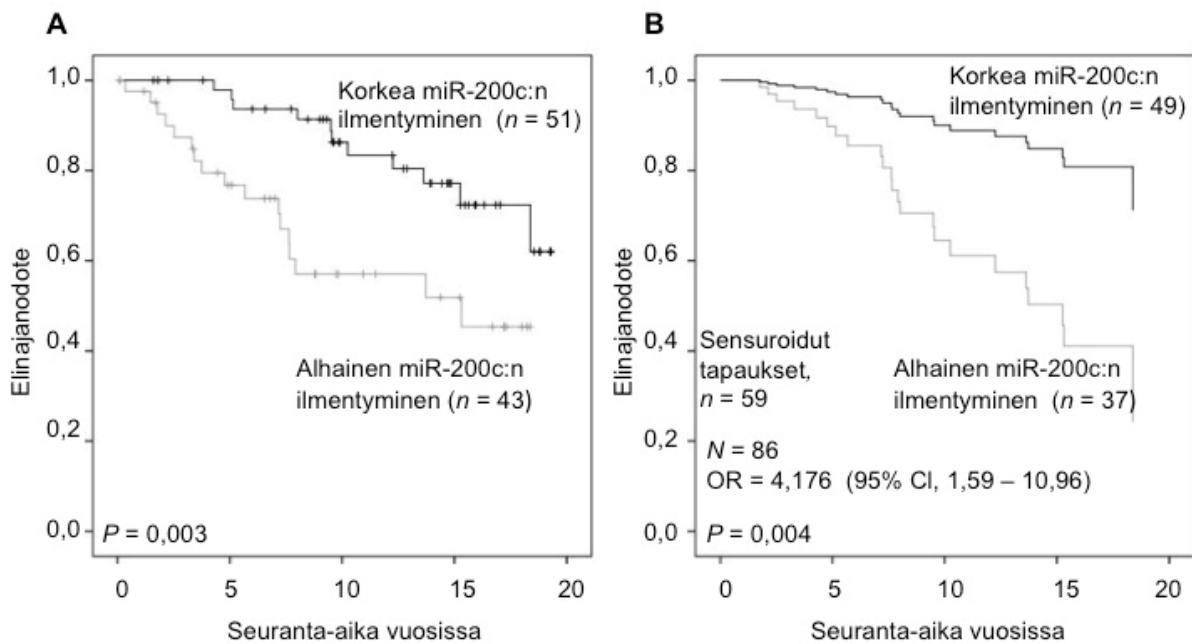
^a: Alhainen ja korkea miR-200c:n suhteellinen ilmentyminen mediaanijaon mukaan

^b: χ^2 - testin P-arvo, muut P-arvot logistisesta regressioanalyysistä (jälkimmäinen tehty χ^2 - testissä merkitsevän tuloksen saaneille näytteille)

3.2 Alhainen miR-200c:n ilmentyminen kuvaa itsenäisesti lyhyttä elinajanennustetta PR-positiivisissa näytteissä

Kaplan-Meierin eloonjäämisanalyysin mukaan alhainen miR-200c:n ilmentyminen PR-positiivisilla syövillä ($n = 94$) viittaa lyhyeen elinajanennusteeseen ($P = 0,003$, kuvaaja 1A).

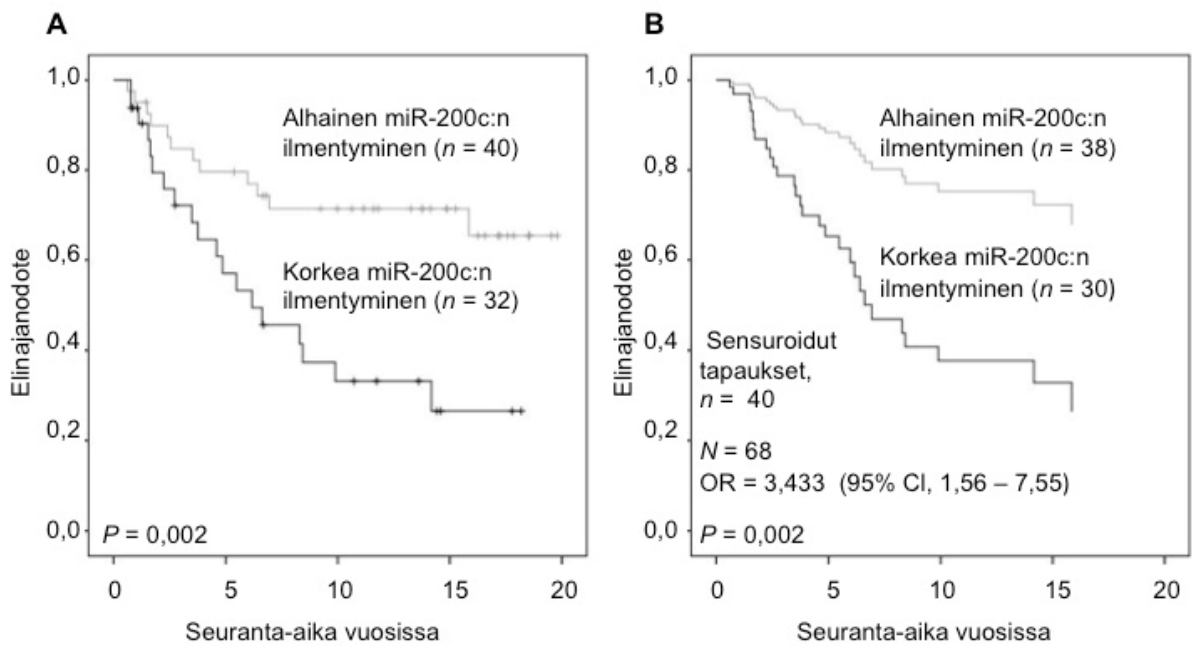
Tekemässäni Coxin monimuuttuja-analyysissä miR-200c osoittautui itsenäiseksi tekijäksi (kuvaaja 1B). Totesin myös imusolmukkeisiin leviämisen ja *Her2*:n monistuman määrän itsenäisiksi tekijöiksi ($P = 0,004$ ja OR = 4,176, liitetaulukko S3). Havaitsin samansuuntaisen yhteyden myös näytteillä, jotka olivat sekä PR- että ER-positiivisia ($n = 88$) Kaplan-Meierin eloonjäämisanalyysissä ($P = 0,013$, liitekuvaaja S1).



Kuvaaja 1. MiR-200c:n ilmentyminen ja rintasyöpäspesifinen elinajanennuste PR-positiivisissa syövässä. A) Kaplan-Meierin eloonjäämisanalyysi; **B)** Coxin monimuuttuja-analyysi lisämuuttujinaan potilaan ikä diagnoosihetkellä, imusolmukkeet, kasvaimen koko, histologinen tyyppi, *Her2*:n monistuma ja ER:n määrä. Lyhenteet: n = tapausten määrä, p = tapahtuman todennäköisyys, OR (95 % CI) = rintasyöpäspesifisen kuoleman vetosuhde ja 95 %:n luottamusväli Coxin monimuuttuja-analyysissä.

3.3 Korkea miR-200c:n ilmentyminen kuvaa itsenäisesti lyhyttä elinajanennustetta ja lyhyempää uusiutumismatkaa elinajanennustetta PR-negatiivisissa syövässä

Totesin korkean miR-200c:n ilmentymisen liittyvän PR-negatiivisissa syövässä ($n = 72$) lyhyeen elinajanennusteeseen Kaplan-Meierin eloonjäämisanalyysissä ($P = 0,002$, kuvaaja 2A). Tulos pysyi merkitseväenä myös Coxin monimuuttuja-analyysissä ($P = 0,002$, OR = 3,433, kuvaaja 2B). Myös histologinen tyyppi, ER:n määrä ja tuumorin koko olivat itsenäisiä tekijöitä Coxin monimuuttuja-analyysissä (liitetaulukko S4).

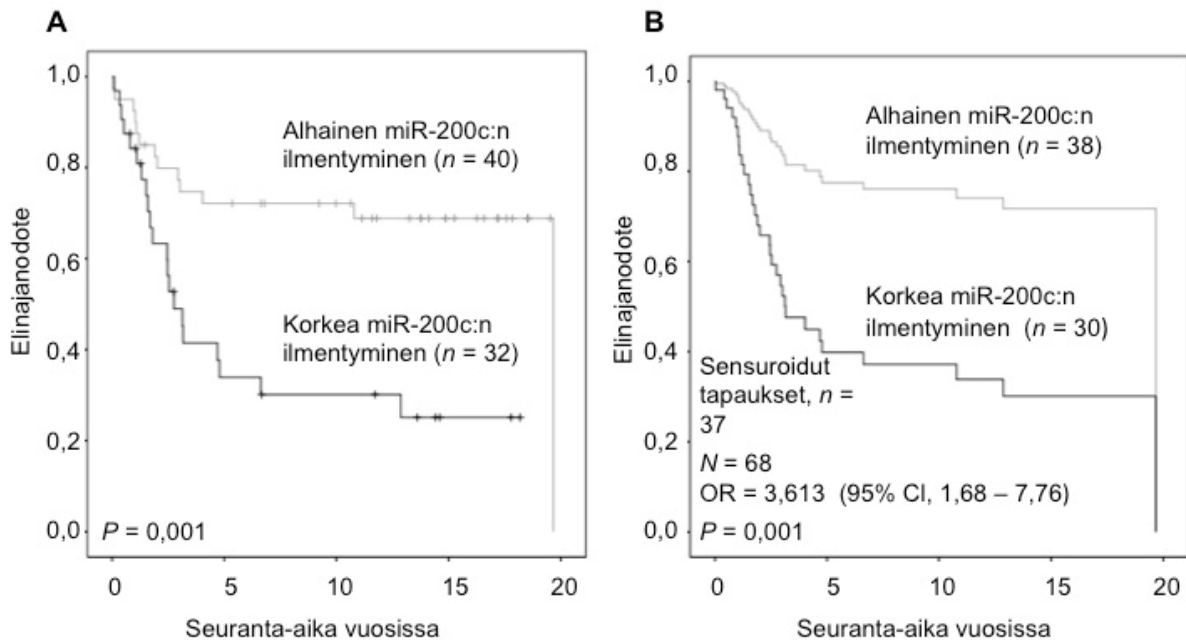


Kuvaaja 2. MiR-200c:n ilmentyminen ja rintasyöpäspesifinen elinajanennuste PR-negatiivisissa syövässä. A) Kaplan-Meierin eloonjäämisanalyysi; B) Coxin monimuuttuja-analyysi lisämuuttujinaan potilaan ikä diagnoosihetkellä, imusolmukkeet, kasvaimen koko, histologinen tyyppi, *Her2*:n monistuma ja ER:n määrä. Lyhenteet: n = tapausten määrä, p = tapahtuman todennäköisyys, OR (95 % CI) = rintasyöpäspesifisen kuoleman vetosuhde ja 95 %:n luottamusväli Coxin monimuuttuja-analyysissä.

PR-negatiivisia syöpiä oli aineistossani 72, joista 45 oli myös ER-negatiivisia. Tein Kaplan-Meierin eloonjäämisanalyysin sekä PR- että ER-negatiivisille syöville tutkiakseni, vaikuttiko ER:n määrä tuloksiin. Näissäkin tapauksissa korkea miR-200c:n ilmentyminen liittyi huonompaan elinajanennusteeseen ($P = 0,025$, liitekuvaaja S2). Coxin monimuuttuja-analyysissä laskelmat eivät kuitenkaan yltäneet merkitsevälle tasolle toisin kuin pelkästään PR-negatiivisilla tuumoreilla.

Seuraavaksi vertasin miR-200c:n ilmentymistä uusiutumismapaaseen elinajanennusteeseen Kaplan-Meierin eloonjäämisanalyysillä. PR-negatiivisessa ryhmässä korkean miR-200c:n ilmentymisen potilailla uusiutumismapa elinajanennuste oli huonompi kuin alhaisen miR-

200c:n potilailla ($P = 0,001$, kuvaaja 3A). Tulos pysyi merkitsevänä myös Coxin monimuuttuja-analyysissä ($P = 0,001$, OR = 3,613, kuvaaja 3B, liitetaulukko S5).



Kuvaaja 3. MiR-200c:n ilmentyminen ja rintasyövän uusiutumismittainen elinajanennuste PR-negatiivisissa syövissä. A) Kaplan-Meierin eloonjäämisanalyysi; B) Coxin monimuuttuja-analyysi lisämuuttujinaan potilaan ikä diagnoosihetkellä, imusolmukkeet, kasvaimen koko, histologinen tyyppi, *Her2*:n monistuma ja ER:n määrä. Lyhenteet: n = tapausten määrä, p = tapahtuman todennäköisyys, OR (95 % CI) = rintasyöpäspesifisen kuoleman vetosuhde ja 95 %:n luottamusväli Coxin monimuuttuja-analyysissä.

Tutkin myös, liittyikö miR-200c:n ilmentyminen paikallis- ja kaukouusiutumisiin. PR-negatiivisessa ryhmässä ($n = 72$) paikallis- tai kaukouusiutuneilla syövillä oli korkeampi miR-200c:n ilmentyminen kuin uusiutumattomilla syövillä ($P = 0,006$, OR = 3,965).

Viimeiseksi selvitin, liittyikö miR-200c:n ilmentyminen rintasyövän kaukoetäpesäkkeisiin. PR-negatiivisilla syövillä, joilla oli kaukoetäpesäkkeitä, miR-200c:n ilmentymismäärät olivat korkeampia kuin etäpesäkkeettömällä rintasyöpätapauksilla ($n = 72$, $P = 0,015$, OR = 3,390).

4. Pohdinta

Tutkimukseni on ensimmäinen julkaistu työ, joka yhdistää rintasyöpöpotilaan elinajanennusteen ja miR-200c:n ilmentymisen kasvaimen PR:n määrään. Tuloksieni mukaan syövän PR:n määrä liittyy oleellisesti siihen, miten miR-200c vaikuttaa potilaan jäljellä olevaan elinaikaan. Totesin miR-200c:n korkean ilmentymisen ennustavan PR-negatiivisissa syöissä lyhyempää jäljellä olevaa elinaikaa, kun taas PR-positiivisissa syöissä alhainen miR-200c:n ilmentyminen on lyhyemmän elinajan itsenäinen ennustetekijä. Vastaava tulos löytyi myös syöissä, joka ovat sekä PR- että ER-positiivisia. PR-negatiivisissa syöissä korkea miR-200c:n ilmentyminen liittyi myös uusiutumismapaaseen elinajanennusteeseen, paikallis- ja kaukouusiutumiin sekä kaukoetäpesäkkeisiin. Löydöksiäni voidaan mahdollisesti käyttää tulevaisuudessa apuna syövän diagnostiikassa ja uusien hoitojen kehittäessä.

4.1 MiRNA ja PR rintasyövässä

ER ja PR liittyvät vahvasti rintasyöpään, mutta vielä ei tarkkaan tiedetä, millä mekanismeilla miRNA-molekyylit vaikuttavat syövän syntyyn ja kehittymiseen. Erään tutkimuksen mukaan hormonireseptorien ja miRNA-molekyylien yhteydet liittyivät rintasyövän etenemiseen [34]. Moni tutkimusryhmä on osoittanut, että ER säätelee miRNA-molekyylien ilmentymistä, mutta vain harvat ryhmät ovat löytäneet PR:n säätelemiä miRNA-molekyylejä. MiR-200-perheestä ja sen vaikutuksesta rintasyöpään ja PR:iin on julkaistu vain muutamia töitä.

Ensimmäiseksi PR:n ja miRNA-molekyylien yhteys havaittiin naisen sukuelinkudoksissa [35-39]. Myöhemmin PR:n osoitettiin säätelevän miRNA-molekyylejä myös rintasyövässä. Syn-teettinen progestiini, medroksiprogesteroniasetaatti, hiljensi miR-16:n ja muiden miRNA-molekyylien säätelyä rintasyövän solulinjoissa [27]. MiR-200c:n määrä muuttui progesteronihoidon vaikutuksesta MCF10A-solulinjassa [28] ja miR-200-perheeseen kuuluvan miR-

141:n ilmentyminen hiljentyi T47D-solulinjassa [30]. MiR-513a-5p on progestiinin säätelemä miRNA, joka eräässä tutkimuksessa sääтели PR:n ilmentymistä [30]. Lisäksi progestiinit hiljensivät miR-29:n esiintymistä hormonireseptoripositiivisessa rintasyövässä [31]. Tutkimuksissa on myös osoitettu miR-181:n ja miR-26a:n sitoutuvan PR:n 3'UTR:aan ja reagoivan ER:n määrään. Näiden miRNA-molekyylien säätelyn hiljentymisen johti PR:n geenin tuotannon kasvamiseen [29].

Aiempien tutkimustulosten mukaisesti voidaan olettaa, että myös omassa aineistossani PR säätelee miR-200c:n ilmentymistä. MiR-200c käyttäytyi elinajanennusteen suhteen eri lailla PR-negatiivisissa ja PR-positiivisissa syövässä. En kuitenkaan löytänyt merkitseviä eroja Kruskal-Wallis testillä miR-200c:n ilmentymisessä PR-positiivisissa ja -negatiivisissa syövässä.

4.2 MiR-200c ja ER

PR-positiivisia syöpätapauksia aineistossani oli 94, joista 88 oli myös ER-positiivisia. Estrogeeni säätelee PR:n toimintaa, joten PR ja ER toimivat yhdessä rintasyövässä [40,41]. Tein Kaplan-Meierin eloonjäämisanalyysin myös ER-positiivisille syöville tutkiakseni miR-200c:n ja elinajanennusteen välistä yhteyttä tässä ryhmässä. Yllätykseksi yhteyttä miR-200c:n ja elinajanennusteen välillä ei löytynyt, vaikka potilasmäärä sekä rintasyöpään kuolleiden määrä olivat suhteellisen suuria ($P = 0,259$). MiR-200c:n ja elinajanennusteen välillä ei löytynyt yhteyttä myöskään ER-negatiivisten syöpien ryhmässä.

4.3 Imusolmukemetastaasit

Syövän leviäminen imusolmukkeisiin on yksi vahvimista elinajanennusteen määrittäjistä. Aineistoni PR-positiivisilla syöville havaitsin imusolmukkeisiin leviämisen olevan tilastollisesti merkitsevä elinajanennustetta kuvaava tekijä. PR-negatiivisilla syöville imusolmukkeet

eivät kuitenkaan olleet merkitseviä Coxin monimuuttuja-analyysissä. PR-negatiivisissa syö-
vissä imusolmukkeisiin levinnyttä tautia oli määrällisesti vähemmän kuin PR-positiivisissa
syövässä, mikä voi mahdollisesti selittää ristiriitaa yleisen tiedon ja tutkimustuloksieni välillä.
Toisaalta PR-positiiviset syövät ovat yleensä myös ER-positiivisia ja niihin on kehitetty hyvä
ja toimiva hoito. Näissä tapauksissa imusolmukkeisiin leviäminen on useimmiten vahva huo-
non ennusteen merkki. Eteneminen kinalon imusolmukkeisiin ei välttämättä ole hor-
monireseptorinegatiivisissa tapauksissa yhtä merkittävä ennustetekijä kuin reseptoriposiitiivi-
sissa tapauksissa, koska reseptorinegatiivisten syöpien ennuste on täsmähoidon puuttuessa
heikompi.

4.4 Rintasyövän eri tyypit

Kahden aiemman tutkimuksen tulokset ovat samankaltaisia kuin omat tulokseni [42,43]. Näi-
den tutkimusten mukaan ER-positiivisissa syövässä PR:n määrä jakaa rintasyövän hyvän (lu-
minaali A) ja huonon ennusteen (luminaali B) luokkiin [42,43]. Tutkimuksissa ei käsitelty
miR-200c:tä. Valitettavasti en pystynyt itse vertaamaan työssäni ER-positiivisten syöpien
elinajanennusteen eroja PR-statuksen mukaan. Aineistossani oli vain muutama ER-
positiivinen ja samalla PR-negatiivinen näyte eli lähes kaikki näytteet olivat sekä ER- että
PR-positiivisia. Analyysieni mukaan ER- ja PR-positiivisilla syöville on sama ennuste kuin
PR-positiivisilla syöville. Molemmissa ryhmissä miR-200c:n ilmentyminen jakoi syövän pa-
remman ja huonomman ennusteen ryhmään.

Geenitutkimuksissa on määritetty neljä rintasyöpäluokkaa: luminaali A, luminaali B, basaali-
tyyppinen (basal-like) ja *Her2* -monistumaposiitiivinen [1,2]. Tutkimukseni aineistossa lumi-
naali B -luokan syöpiä oli vain 8 kappaletta, kun taas luminaali A -luokan kasvaimia oli 100
kappaletta. En löytänyt yhteyksiä miR-200c:n ilmentymisen ja luminaalisten luokkien välillä
todennäköisesti aineistoni liian pienen luminaali B -luokan näytemäärän vuoksi. Syöpänäyt-

teissäni oli vain 29 kolmoisnegatiivista eli ”triplanegatiivista” syöpää, joissa ei ole ER:a, PR:a eikä *Her2*-monistumaa. Yhteyksiä miR-200c:n kanssa ei löytynyt, sillä reseptorinegatiivisten syöpien määrä lienee liian pieni tilastanalyysiin.

4.5 MiRNA-molekyylien ilmentyminen vaihtelee erilaisen elinajanennusteen ja uusiutumISRiskin potilailla

Syöpäpotilaiden elinajanennusteen ja miRNA-molekyylien ilmentymisen välillä on löydetty yhteyksiä useissa tutkimuksissa. Hepatosellulaarisessa maksasyövässä korkeat miR-221:n ja miR-21:n ilmentymiset liittyivät huonoon elinajanennusteeseen [44] ja korkeat miR-21:n ja miR-200c:n ilmentymiset pienisoluisessa keuhkasyövässä huonoon elinajanennusteeseen [45]. Epiteelialisessa kohtusyövässä miR-200c:n ilmentymisen avulla voitiin ennustaa elinajan pituutta ja syövän uusiutumista [46]. Alhainen miR-429:n ilmentyminen liittyi kohtusyövässä lyhyempään uusiutumISvapaaseen elinajanennusteeseen [47]. MiR-200c:n korkea ilmentyminen haimasyövässä yhdistettiin parempaan elinajanennusteeseen [48], kun taas kohdunrunгон syövässä korkea miR-205:n ilmentyminen liittyi huonoon elinajanennusteeseen [49].

Toistaiseksi miR-200c:n ja rintasyövän elinajanennusteen yhdistäviä tutkimuksia ei ole julkaistu. Voidaan ajatella, että alhainen miR-200c:n ilmentyminen johtaisi huonompaan ennusteeseen lisääntyneen migraation ja invaasion vuoksi. Hypoteesini pitää paikkansa PR-positiivisten rintasyöpätapausten joukossa, mutta PR-negatiivisilla tapauksilla tulokset ovat päinvastaisia. Epäselvää on, liittyykö ER:n määrä aineistossani miR-200c:n erilaiseen vaikutukseen PR-positiivisissa ja PR-negatiivisissa syövässä. Olisikin kiinnostavaa tarkastella ER-negatiivisia ja PR-positiivisia syöpiä lähemmin. Nämä syövät ovat kuitenkin harvinaisempia kuin ER-positiiviset ja PR-negatiiviset syövät eikä niitä ole aineistossani tarpeeksi jatkoanalyysiin.

Tulokseni valottivat myös miR-200c:n ilmentymisen ja PR:n vaikutusta syövän uusiutumismapaaseen elinajanennusteeseen. PR-negatiivisessa ryhmässä miR-200c:n korkea ilmentymisen liittyi lyhyempään uusiutumismapaaseen elinaikaan. Tulos on samansuuntainen kuin löydökseni rintasyöpäspesifisessä elinajanennusteessa PR-negatiivisissa tapauksissa. Tietääkseni miR-200c:tä ei ole liitetty rintasyövän uusimaan aiemmin.

4.6 MiR-200c korkean erilaistumisasteen rintasyövissä

Metaplastiset rintasyövät [14,22] ja vähäklauidiiniset rintasyövät [22] sisältävät tutkimusten mukaan vähän miR-200-perheen geenejä. Erään tutkimuksen havainnoissa ER-positiivisissa rintasyövissä miR-200-perheen ilmentyminen on runsasta, kun taas *Her2*-positiivisissa ja triplanegatiivisissa syöissä miR-200-perhe ilmentyy vain keskiverrosta [22]. Tulokseni poikkesivat edellä mainitun tutkimuksen aikaansaannoksista mahdollisesti *Her2*-positiivisten ja kolmoisnegatiivisten näytteiden pienen määrän vuoksi.

Cochranen julkaisussa havaittiin korkeita miR-200c-tasoja hyvin erilaistuneissa rintasyöpälinjoissa ja erittäin alhaisia miR-200c-tasoja huonosti erilaistuneissa syöissä [50]. Omassa aineistossani taas korkeimmat miR-200c:n ilmentymiset löytyivät huonosti erilaistuneista, gradus III:n syöistä. Tulos oli merkitsevä myös kun aineisto jaettiin PR-positiivisiin ja PR-negatiivisiin syöpiin (PR-positiivisille syöville $P = 0,001$ ja PR-negatiivisille syöville $P = 0,018$). Erot tuloksien välillä johtuvat todennäköisesti siitä, että Cochranen aineiston näytteet ovat rintasyöpäsolulinjojen soluja kun taas oma aineistoni koostuu oikeista rintasyöpänäytteistä, jotka ovat sekamuotoisempia kuin solulinjat.

Bockmeyerin tutkimuksen tuloksissa miR-200c:n ja miR-429:n ilmentymiset olivat hiljentyneet pahanlaatuisissa myoepitelioomissa mutta eivät basaalityypisissä rintasyövissä [51]. Tutkijat päättelivät korkeiden miRNA-molekyylien ilmentymisten vakauttavan epitelialaista ilmiä ja estävän invasiivista solujen kasvua. Oman tutkimukseni korkea miR-200c:n il-

mentyminen gradus III:n syövissä on ristiriidassa Bockmeyerin tulosten kanssa. Erot saattavat johtua tutkimuksien erityyppisistä aineistoista.

4.7 MiRNA-molekyylien määrä vaihtelee kaukoetäpesäkkeissä

Yleensä potilailla, joiden syöpä on lähettänyt kaukoetäpesäkkeitä, on huonompi eloonjäämisen ennuste kuin etäpesäkkeettömillä potilailla. Eräässä tutkimuksessa miR-200c:n huomattiin olevan yli-ilmentynyt kaukoetäpesäkkeissä verrattuna lähtökasvaimeen [52]. Omat analyysini osoittavat, että kaukometastasoineissa PR-negatiivisissa syövissä on enemmän miR-200c:tä kuin metastasoimattomissa syövissä. Lisäksi korkeimman erilaistumisluokan (gradus III) syöpien miR-200c:n ilmentyminen on korkeampi niin koko aineistossa kuin PR-negatiivisissa syövissäkin. Vaikka tulokseni liittyvätkin ensi linjan kasvaimiin, ovat ne tiettyyn pisteeseen asti yhtenevät edellä mainitun julkaisun tulosten kanssa. Voin päätellä omista tuloksistani, että miR-200c:n ilmentymisen määrä mahdollisesti kasvaa rintasyövän etenemisen myötä ja liittyy etäpesäkkeiden muodostumiseen. Valitettavasti en löytänyt vahvistusta hypoteesiin vertaamalla miR-200c:n ilmentymistä kasvaimen levinneisyysasteeseen.

4.8 MiR-200c, transkriptiotekijät ja geenien ilmentymisen säätely

MiR-200c ja transkriptiotekijät ZEB1 ja ZEB2 säätelevät rintasyövässä toinen toisiaan käänteisesti [12-14,53], mutta vastaavaa yhteyttä miR-200c:n ja ZEB1:n välillä ei löytynyt aineistostani. Tarkemmat kuvaukset ZEB1:n tutkimusmenetelmistä ja immunohistokemiallisista töistä löytyvät tutkimusryhmämme aiemmasta julkaisusta [54]. Useat edellä mainitun yhteyden löytäneet tutkijat käyttivät menetelmissään kaupallisia solulinjoja mutta meidän tutkimusryhmämme arvioi ZEB1:n määrän immunohistokemiallisesti mikroskoopin avulla oikeista rintasyöpänäytteistä. Erot aiempien löydösten ja havaintojeni välillä voidaan siten mahdollisesti selittää eri menetelmillä, joita ZEB1:n määrän arvioimiseen on käytetty.

Kasvainnäytteissäni oli pahanlaatuisten solujen joukossa mahdollisesti myös tavallisia rintakudosoluja, joiden miR-200c:n ja ZEB1:n proteiini-ilmentymiset eronnevat pelkän kasvainkudoksen ilmentymisestä. Löydökseni esittänee miR-200c:n ilmentymistä ennemmin epiteelitalaisen syövän mikroympäristössä kuin pahanlaatuisissa epiteelisoluissa, joihin aiemmat julkaisut ovat keskittyneet.

Halusin seuraavaksi selvittää teoreettisesti, minkä geenin ilmentymistä miR-200c mahdollisesti säätelee. Käyttämällä Targetscan-sovellusta [55] huomasin *Cyp11b1*:n olevan miR-200c:n kohdegeeni. KEGG-sovelluksen [56] avulla totesin *Cyp11b1*:n liittyvän myös steroidihormonien biosynteesiin. Löydösten perusteella miR-200c saattaa vaikuttaa steroidihormonien biosynteesissä geenitasolla ja täten selittää PR:n ja miR-200c:n vastavuoroisuutta analyseissäni.

Yhteenvetona totean korkean miR-200c:n ilmentymisen olevan invasiivista rintasyöpää sairastavien potilaiden elinajanennusteen itsenäinen tekijä. Lisäksi korkea miR-200c:n ilmentyminen liittyy huonosti erilaistuneisiin syöpiin. MiR-200c:n käyttäytyminen riippui PR:n määrästä. PR-negatiivisissa syövässä korkea miR-200c:n ilmentyminen ennakoit uusimisriskiä, lyhyttä elinajanennustetta ja kaukoetäpesäkkeitä. MiR-200c:n ilmentyminen saattaa siis olla rintasyövän etenemisen ennustetekijä ja PR:n merkitys rintasyövässä voi olla luultua suurempi. Laajempia kliinisiä tutkimuksia moninkertaisine näytemäärineen tarvitaan varmentamaan miR-200c:n ja PR:n tärkeys rintasyövän sairastumisriskissä, diagnoosissa ja ennusteessa.

5. Lähteet

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752.
2. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, et al. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10869-10874.
3. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, et al. (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8418-8423.
4. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, et al. (2011) 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. *Ann Oncol* 22: 1736-1747.
5. Klinge CM (2009) Estrogen regulation of MicroRNA expression. *Curr Genomics* 10: 169-183.
6. Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, et al. (2009) MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res* 11: R27.
7. Bartel DP (2009) MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233.
8. Croce CM (2009) Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 10: 704-714.
9. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, et al. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15524-15529.
10. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, et al. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834-838.
11. Howe EN, Cochrane DR, Cittelly DM, Richer JK (2012) miR-200c targets a NF-kappaB up-regulated TrkB/NTF3 autocrine signaling loop to enhance anoikis sensitivity in triple negative breast cancer. *PLoS One* 7: e49987.
12. Hurteau GJ, Carlson JA, Spivack SD, Brock GJ (2007) Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer Res* 67: 7972-7976.

13. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, et al. (2008) A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 9: 582-589.
14. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, et al. (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 10: 593-601.
15. Korpala M, Lee ES, Hu G, Kang Y (2008) The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 283: 14910-14914.
16. Howe EN, Cochrane DR, Richer JK (2011) Targets of miR-200c mediate suppression of cell motility and anoikis resistance. *Breast Cancer Res* 13: R45.
17. Sossey-Alaoui K, Bialkowska K, Plow EF (2009) The miR200 family of microRNAs regulates WAVE3-dependent cancer cell invasion. *J Biol Chem* 284: 33019-33029.
18. Jurmeister S, Baumann M, Balwierz A, Keklikoglou I, Ward A, et al. (2012) MicroRNA-200c represses migration and invasion of breast cancer cells by targeting actin-regulatory proteins FHOD1 and PPM1F. *Mol Cell Biol* 32: 633-651.
19. Schickel R, Park SM, Murmann AE, Peter ME (2010) miR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1. *Mol Cell* 38: 908-915.
20. Wright JA, Richer JK, Goodall GJ (2010) microRNAs and EMT in mammary cells and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15: 213-223.
21. Cochrane DR, Cittelly DM, Howe EN, Spoelstra NS, McKinsey EL, et al. (2010) MicroRNAs link estrogen receptor alpha status and dicer levels in breast cancer. *Horm Cancer* 1: 306-319.
22. Castilla MA, Diaz-Martin J, Sarrío D, Romero-Perez L, Lopez-Garcia MA, et al. (2012) MicroRNA-200 family modulation in distinct breast cancer phenotypes. *PLoS One* 7: e47709.
23. 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. *Mol Endocrinol* 21: 1132-1147.
24. Castellano L, Giamas G, Jacob J, Coombes RC, Lucchesi W, et al. (2009) The estrogen receptor-alpha-induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 15732-15737.
25. Bhat-Nakshatri P, Wang G, Collins NR, Thomson MJ, Geistlinger TR, et al. (2009) Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 37: 4850-4861.

26. Di Leva G, Piovan C, Gasparini P, Ngankeu A, Taccioli C, et al. (2013) Estrogen mediated-activation of miR-191/425 cluster modulates tumorigenicity of breast cancer cells depending on estrogen receptor status. *PLoS Genet* 9: e1003311.
27. Rivas MA, Venturutti L, Huang YW, Schillaci R, Huang TH, et al. (2012) Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progestin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development. *Breast Cancer Res* 14: R77.
28. Vares G, Cui X, Wang B, Nakajima T, Nenoï M (2013) Generation of breast cancer stem cells by steroid hormones in irradiated human mammary cell lines. *PLoS One* 8: e77124.
29. Maillot G, Lacroix-Triki M, Pierredon S, Gratadou L, Schmidt S, et al. (2009) Widespread estrogen-dependent repression of microRNAs involved in breast tumor cell growth. *Cancer Res* 69: 8332-8340.
30. Cochrane DR, Jacobsen BM, Connaghan KD, Howe EN, Bain DL, et al. (2012) Progestin regulated miRNAs that mediate progesterone receptor action in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 355: 15-24.
31. Cittelly DM, Finlay-Schultz J, Howe EN, Spoelstra NS, Axlund SD, et al. (2012) Progestin suppression of miR-29 potentiates dedifferentiation of breast cancer cells via KLF4. *Oncogene* 32: 2555-64.
32. Pellikainen MJ, Pekola TT, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, et al. (2003) p21WAF1 expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation, and prognosis. *J Clin Pathol* 56: 214-220.
33. Hartikainen JM, Tuhkanen H, Kataja V, Dunning AM, Antoniou A, et al. (2005) An auto-some-wide scan for linkage disequilibrium-based association in sporadic breast cancer cases in eastern finland: Three candidate regions found. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 75-80.
34. Tessel MA, Krett NL, Rosen ST (2010) Steroid receptor and microRNA regulation in cancer. *Curr Opin Oncol* 22: 592-597.
35. Kuokkanen S, Chen B, Ojalvo L, Benard L, Santoro N, et al. (2010) Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biol Reprod* 82: 791-801.
36. Renthal NE, Chen CC, Williams KC, Gerard RD, Prange-Kiel J, et al. (2010) miR-200 family and targets, ZEB1 and ZEB2, modulate uterine quiescence and contractility during pregnancy and labor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20828-20833.
37. Williams KC, Renthal NE, Gerard RD, Mendelson CR (2012) The microRNA (miR)-199a/214 cluster mediates opposing effects of progesterone and estrogen on uterine contractility during pregnancy and labor. *Mol Endocrinol* 26: 1857-1867.
38. Panda H, Pelakh L, Chuang TD, Luo X, Bukulmez O, et al. (2012) Endometrial miR-200c is altered during transformation into cancerous states and targets the expression of ZEBs, VEGFA, FLT1, IKKbeta, KLF9, and FBLN5. *Reprod Sci* 19: 786-796.

39. Williams KC, Renthal NE, Condon JC, Gerard RD, Mendelson CR (2012) MicroRNA-200a serves a key role in the decline of progesterone receptor function leading to term and preterm labor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 7529-7534.
40. Bradshaw MS, Tsai SY, Leng XH, Dobson AD, Conneely OM, et al. (1991) Studies on the mechanism of functional cooperativity between progesterone and estrogen receptors. *J Biol Chem* 266: 16684-16690.
41. Petz LN, Ziegler YS, Schultz JR, Kim H, Kemper JK, et al. (2004) Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 88: 113-122.
42. Braun L, Mietzsch F, Seibold P, Schneeweiss A, Schirmacher P, et al. (2013) Intrinsic breast cancer subtypes defined by estrogen receptor signalling-prognostic relevance of progesterone receptor loss. *Mod Pathol* 26: 1161-71.
43. Feeley LP, Mulligan AM, Pinnaduwege D, Bull SB, Andrulis IL (2013) Distinguishing luminal breast cancer subtypes by Ki67, progesterone receptor or TP53 status provides prognostic information. *Mod Pathol* 27: 554-61.
44. Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G, et al. (2013) Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Mol Carcinog* 52: 297-303.
45. Liu XG, Zhu WY, Huang YY, Ma LN, Zhou SQ, et al. (2012) High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Med Oncol* 29: 618-626.
46. Marchini S, Cavalieri D, Fruscio R, Calura E, Garavaglia D, et al. (2011) Association between miR-200c and the survival of patients with stage I epithelial ovarian cancer: A retrospective study of two independent tumour tissue collections. *Lancet Oncol* 12: 273-285.
47. Leskela S, Leandro-Garcia LJ, Mendiola M, Barriuso J, Inglada-Perez L, et al. (2010) The miR-200 family controls beta-tubulin III expression and is associated with paclitaxel-based treatment response and progression-free survival in ovarian cancer patients. *Endocr Relat Cancer* 18: 85-95.
48. Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, Sato N, Kayashima T, et al. (2010) MicroRNA, hsa-miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation. *Mol Cancer* 9: 169-169.
49. Karaayvaz M, Zhang C, Liang S, Shroyer KR, Ju J (2012) Prognostic significance of miR-205 in endometrial cancer. *PLoS One* 7: e35158.

50. Cochrane DR, Spoelstra NS, Howe EN, Nordeen SK, Richer JK (2009) MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Ther* 8: 1055-1066.
51. Bockmeyer CL, Christgen M, Muller M, Fischer S, Ahrens P, et al. (2011) MicroRNA profiles of healthy basal and luminal mammary epithelial cells are distinct and reflected in different breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res Treat* 130: 735-745.
52. Gravgaard KH, Lyng MB, Laenkholm AV, Sokilde R, Nielsen BS, et al. (2012) The miRNA-200 family and miRNA-9 exhibit differential expression in primary versus corresponding metastatic tissue in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 134: 207-217.
53. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME (2008) The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 22: 894-907.
54. Soini Y, Tuhkanen H, Sironen R, Virtanen I, Kataja V, et al. (2011) Transcription factors zeb1, twist and snail in breast carcinoma. *BMC Cancer* 11: 73-2407-11-73.
55. TargetScan Internet-sivusto: <http://www.targetscan.org>. Vierailtu sivustolla 13.9.2013.
56. KEGG pathway Internet-sivusto: <http://www.kegg.jp>. Vierailtu sivustolla 13.9.2013.

6. Liitteet

6.1. Liitetaulukot

Liitetaulukko S1. Kasvainaineiston kliiniset piirteet

Kliininen muuttuja	<i>n</i>
Yhteensä	172
Ikä diagnoosihetkellä	
Alle 59 v.	85
Yli 60 v.	87
Ei tiedossa	0
Potilaan elossaolo	
Kuollut rintasyöpään	60
Kuollut, muu syy	59
Elossa, ei uusimaa	46
Elossa, uusima	7
Ei tiedossa	0
Paikallinen / kaukousima	
Kyllä	73
Ei	98
Ei tiedossa	1
Histologinen erilaistumisaste	
I ja II	106
III	61
Ei tiedossa	5
Histologinen levinneisyys	
I	44
II	100
III and IV	21
Ei tiedossa	7
Histologinen tyyppi	
Duktaalinen	117
Lobulaarinen	31
Muu	19
Ei tiedossa	5
Estrogeenireseptori	
Negatiivinen	51
Positiivinen	115
Ei tiedossa	6

Progesteronireseptori	
Negatiivinen	72
Positiivinen	94
Ei tiedossa	6
<i>Her2</i> :n monistuma	
Ei	133
Kyllä	26
Ei tiedossa	13
Triplenegatiivisuus	
Kyllä	29
Ei	143
Ei tiedossa	0
Luminaalityyppi A / B	
Luminaali A (ER+, <i>Her2</i> - ja PR+)	100
Luminaali B (ER+, <i>Her2</i> + ja PR-)	8
Ei tiedossa	64
Primaarinen kaukoetäpesäke	
Kyllä	60
Ei	112
Ei tiedossa	0

Lyhenteet: n = tapausten määrä

Liitetaulukko S2. MiR-200c:n ilmentymisen suhteelliset arvot

Potilasnumero	Kerroinluku eli fold change
1	0,042
2	0,095
3	0,113
4	1,305
5	0,044
6	0,097
7	0,288
8	7,561
9	0,488
10	0,322
11	0,342
12	0,749
13	2,642
14	0,318
15	0,267
16	9,213
17	0,476
18	0,811
19	0,385
20	1,122
21	0,111
22	0,206
23	1,082
24	2,845
25	0,118
26	0,054
27	0,166
28	0,155
29	0,165
30	0,166
31	0,098
32	0,195
33	0,132
34	0,091
35	0,165
36	0,184
37	0,183
38	0,113

39	0,155
40	0,181
41	1,994
42	0,369
43	0,238
44	0,830
45	0,538
46	0,689
47	1,325
48	1,870
49	3,287
50	0,772
51	0,237
52	1,549
53	0,380
54	0,372
55	0,145
56	0,604
57	0,265
58	0,442
59	0,147
60	0,130
61	0,358
62	0,149
63	0,894
64	0,384
65	0,272
66	0,166
67	0,160
68	0,469
69	0,517
70	0,287
71	0,207
72	0,265
73	0,493
74	0,020
75	0,109
76	0,122
77	0,048
78	0,091
79	0,667

80	0,175
81	0,108
82	0,097
83	0,091
84	0,039
85	0,105
86	0,090
87	0,000
88	4,279
89	0,091
90	0,075
91	0,259
92	3,946
93 kalibraattori	1,016
94	0,064
95	0,083
96	0,077
97	0,059
98	0,080
99	0,108
100	0,006
101	0,121
102	0,135
103	0,095
104	0,062
105	2,589
106	0,083
107	0,133
108	0,054
109	0,254
110	24,190
111	0,380
112	0,405
113	0,943
114	2,195
115	2,978
116	0,444
117	0,313
118	0,800
119	0,360
120	0,268

121	0,155
122	0,171
123	0,580
124	0,706
125	0,133
126	0,175
127	0,039
128	0,253
129	0,142
130	0,095
131	0,183
132	0,121
133	0,168
134	0,114
135	0,187
136	0,626
137	0,224
138	0,221
139	0,327
140	0,184
141	0,582
142	0,604
143	0,432
144	0,452
145	0,465
146	0,011
147	0,242
148	0,336
149	0,372
150	0,391
151	1,472
152	1,183
153	0,523
154	0,495
155	0,812
156	0,065
157	1,703
158	0,695
159	0,759
160	0,645
161	0,957

162	0,781
163	0,509
164	0,355
165	0,752
166	1,638
167	0,664
168	2,787
169	0,407
170	0,506
171	0,300
172	0,744
173	0,824

Liitetaulukko S3. Rintasyöpäspesifisen elinajanennusteen Coxin monimuuttuja-analyysi ja kliinispatologiset muuttujat PR-positiivisissa syövässä.

Kliininen muuttuja	<i>n</i>	B	Wald	OR (95% CI)	<i>P</i>
Ikä diagnoosihetkellä					
Alle 59 v.	39				0,152
Yli 60 v.	47		Ref.		
Tauti imusolmukkeissa					
Ei	54		Ref.		
Kyllä	32	1,04	5,630	2,82 (1,20 – 6,62)	0,018
Kasvaimen koko					0,462
T1	36		Ref.		
T2	46				0,215
T3 ja T4	4				0,579
MiR-200c:n ilmentyminen ^a					
Alhainen	37	1,43	8,430	4,18 (1,59 – 10,96)	0,004
Korkea	49		Ref.		
Histologinen tyyppi					0,107
Duktaalinen	63				0,102
Lobulaarinen	14				0,039
Muu	9		Ref.		
Estrogeenireseptori					
Negatiivinen	5				0,654
Positiivinen	81		Ref.		
<i>Her2</i> :n monistuma					
Ei	79		Ref.		
Kyllä	7	- 2,37	15,50	0,094 (0,030 – 0,30)	0,000

Lyhenteet: *n* = tapausten määrä, B = kerroin, Wald = kertoimen tärkeys, Ref = verrokkiryhmä, OR (95 % CI) = vetosuhde ja 95 %:n luottamusväli, *p* = tapahtuman todennäköisyys.

Lisämuuttujina toimivat potilaan ikä, imusolmukkeet, kasvaimen koko, histologinen tyyppi, *Her2*:n monistuma ja ER:n määrä.

^a: Korkea ja alhainen miR-200c:n ilmentyminen jaoteltuna mediaanin mukaan.

Liitetaulukko S4. Rintasyöpäspesifisen elinajanennusteen Coxin monimuuttuja-analyysi ja kliinispatologiset muuttujat PR-negatiivisissa syövässä

Kliininen muuttuja	<i>n</i>	B	Wald	OR (95 % CI)	<i>P</i>
Ikä diagnoosihetkellä					
Alle 59 v.	37				0,856
Yli 60 v.	31		Ref.		
Tauti imusolmukkeissa					
Ei	36		Ref.		
Kyllä	32				0,408
Kasvaimen koko					0,004
T1	21		Ref.		
T2	36	0,04	0,007	1,04 (0,40 – 2,71)	0,932
T3 ja T4	11	1,66	8,29	5,27 (1,70 – 16,32)	0,004
MiR-200c:n ilmentyminen ^a					
Alhainen	38		Ref.		
Korkea	30	1,23	9,41	3,43 (1,56 – 7,55)	0,002
Histologinen tyyppi					0,015
Duktaalinen	48	2,11	4,09	8,26 (1,07 – 63,93)	0,043
Lobulaarinen	11	3,07	7,37	21,61 (2,35 – 198,80)	0,007
Muu	9		Ref.		
Estrogeenireseptori					
Negatiivinen	43	0,88	3,86	2,42 (1,00 – 5,83)	0,049
Positiivinen	25		Ref.		
<i>Her2</i> :n monistuma					
Ei	50				0,283
Kyllä	18		Ref.		

Lyhenteet: *n* = tapausten määrä, B = kerroin, Wald = kertoimen tärkeys, Ref = verrokkiryhmä, OR (95 % CI) = vetosuhde ja 95 %:n luottamusväli, *p* = tapahtuman todennäköisyys.

Lisämuuttujina toimivat potilaan ikä, imusolmukkeet, kasvaimen koko, histologinen tyyppi, *Her2*:n monistuma ja ER:n määrä.

^a: Korkea ja alhainen miR-200c:n ilmentyminen jaoteltuna mediaanin mukaan.

Liitetaulukko S5. Uusimavapaan elinajanennusteen Coxin monimuuttuja-analyysi ja kliinispatologiset muuttujat PR-negatiivisissa syövässä.

Kliininen muuttuja	<i>n</i>	B	Wald	OR (95% CI)	<i>P</i>
Ikä diagnoosihetkellä					
Alle 59 v.	37				0.609
Yli 60 v.	31		Ref.		
Tauti imusolmukkeissa					0.371
Ei	36		Ref.		
Kyllä	32				
Kasvaimen koko					0.013
T1	21		Ref.		
T2	36	0.03	0.006	1.04 (0.42 – 2.55)	0.936
T3 ja T4	11	1.39	6.17	4.01 (1.34 – 12.02)	0.013
MiR-200c:n ilmentyminen ^a					
Alhainen	38		Ref.		
Korkea	30	1.29	10.85	3.61 (1.68 – 7.76)	0.001
Histologinen tyyppi					0.088
Duktaalinen	48	2.03	3.84	7.62 (1.00 – 58.04)	0.050
Lobulaarinen	11	2.42	4.84	11.20 (1.30 – 96.33)	0.028
Muu	9		Ref.		
Estrogeenireseptori					0.155
Negatiivinen	43				
Positiivinen	25		Ref.		
<i>Her2</i> :n monistuma					0.992
Ei	50				
Kyllä	18		Ref.		

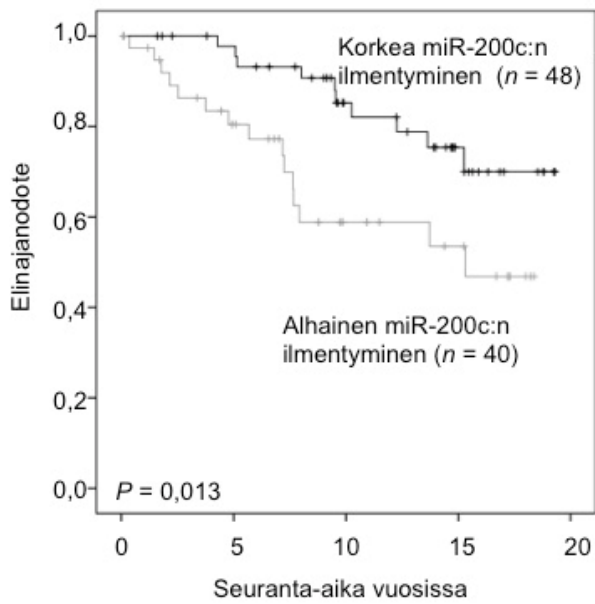
Lyhenteet: *n* = tapausten määrä, B = kerroin, Wald = kertoimen tärkeys, Ref = verrokkiryhmä, OR (95 % CI) = vetosuhde ja 95 %:n luottamusväli, *p* = tapahtuman todennäköisyys.

Lisämuuttujina toimivat potilaan ikä, imusolmukkeet, kasvaimen koko, histologinen tyyppi, *Her2*:n monistuma ja ER:n määrä.

^a: Korkea ja alhainen miR-200c:n ilmentyminen jaoteltuna mediaanin mukaan.

6.2 Liitekuvaajat

Liitekuvaaja S1. Kaplan-Meierin elonjäämisanalyysi miR-200c:n ilmentymisestä ja rintasyövän elinajanennusteesta PR- ja ER-positiivisissa syöissä. Lyhenteet: n = tapaus-ten määrä, p = tapahtuman todennäköisyys.



**Liitekuvaaja S2. Kaplan-Meierin eloonjäämisanalyysi miR-200c:n ilmentymisestä ja rintasyövän elinajanennusteesta PR- ja ER-negatiivisissa syövässä. Lyhenteet: n = tapaus-
ten määrä, p = tapahtuman todennäköisyys.**

