



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUNA

**miRNAen prozesamendu geneen
aldakortasuna genetikoa Osn**

*N. Bilbao-Aldaiturriaga, A. Gutiérrez-
Camino, I. Martín-Guerrero,
M. Pombar-Gomez, E. López-López
eta A. García-Orad*

808-815 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.113>

ANTOLATZAILEA:



udako
euskal unibertsitatea

BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



miRNAen prozesamendu geneen aldakortasuna genetikoa OSn

Bilbao-Aldaiturriaga N (1); Gutiérrez-Camino A,(1); Martín-Guerrero I,(1); Pombar-Gomez M (1); López-López, E(1)*; Garcia-Orad A,(1,2)*

(1) *Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalia Fisiologia, Medikuntza eta Odontologiako Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, (2) Biocruces Health Research Institute, Bilbao*
africa.garcioarad@ehu.es, nereia.bilbao@ehu.es

Laburpena

Osteosarkomaren (OS) aldagai genetikoa genetan aztertu da orain arte, baina geneak genomaren 1,5% osatzen dute eta gainontzekoa RNA ez kodifikatzaileak omen dira. OS-an miRNAen adierazpenean aldaketak behatu dira. Adierazpen aldaketa hauek miRNAen prozesamendu genetan dauden SNPek eragin ditzakete. Ikerketa lan honen helburua miRNAen prozesamendu genetan dauden SNPak OS-ren suszeptibilitatean eragin dezaketen jakitea. Horretarako, miRNAen prozesamenduarekin erlazionatutako 21 genetan 72 SNP aztertu genituen 99 OS eta 387 kontrol laginetan. Hiru SNP topatu genituen OS-ren suszeptibilitatearekin asoziatuak 3 hiru prozesamendu genetan, denak RISC konplexuan. Konplexu honen SNPak OS-ren suszeptibilitatearen markatzaile genetiko berriak izan daitezke.

Hitz gakoak: miRNA prozesamendu geneak, suszeptibilitate genetikoa, OS, SNPak

Abstract

The contribution of genetic variants in osteosarcoma (OS) has been focused mainly on genes of biologically plausible pathways. However, these genes constitute 1,5% of the genome, leaving a 95% to non coding RNAs. miRNA deregulation has been observed in OS which could be due to genetic variation in miRNA processing genes. The aim of this study was to evaluate whether SNPs in miRNA processing genes confer predisposition to OS. We analyzed 72 SNPs in 21 miRNA processing genes in a total of 99 OS patients and 387 controls. A total of three SNPs were associated with OS susceptibility, all part of the RISC complex. This study suggests that SNPs in the RISC complex genes may be involved in OS susceptibility.

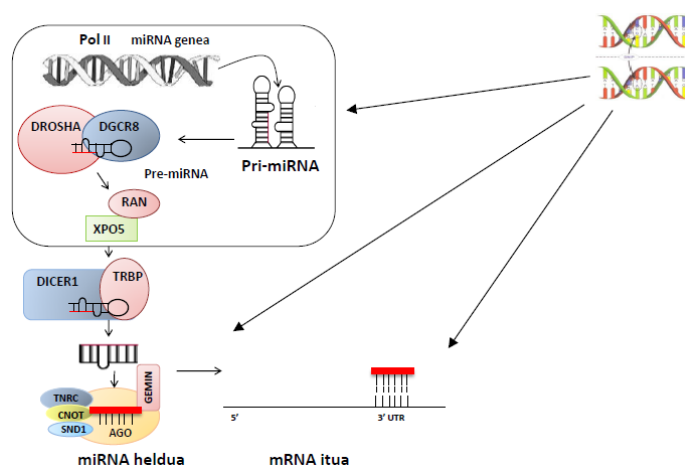
Keywords: microRNA processing pathway, genetic susceptibility, osteosarcoma, SNPs

1. Sarrera eta motibazioa

OS hezurretako minbizi-mota arruntena da gazteen artean (Miao et al., 2013). Gaixotasun horrek aldagai genetiko garrantzitsua duela adierazi dute zenbait ikerketa lanek (Broadhead et al., 2011; Savage et al., 2013; Yang eta Zhang, 2013). Ikerketa lan horietan OSren jatorrian parte hartu dezaketen geneak eta bidezidorrak aztertu dituzte, esate baterako, hezurren hazkundearekin eta DNAREN konponketan zerikusia duten geneak (Ruza et al., 2003), (Savage et al., 2007b), (Savage et al., 2007a), (Toffoli et al., 2009), (Yang et al., 2014), (He et al., 2013), (He et al., 2014a), (He et al., 2014b), (Wang et al., 2013), etc. Hala ere, Giza Genoma proiektuari esker geneak genomaren 1,5% osatzen dutela ezagutu genuen. Izan ere, gainontzeko %95a proteina izango ez den RNAek osatzen dute (RNA ez kodifikatzaileak). RNA ez kodifikatzaile hauek geneen erregulazioan parte hartzen dute eta bere tamainaren arabera sailkatu daitezke. Hauen artean, mikroRNAk (miRNAk) ikertuenak dira. MiRNAk 18-20 nukleotidoko RNA ez kodifikatzaileak dira. MiRNAk genomaren gune ezberdinetatik transkribatzen dira pri-miRNA moduan. Pri-miRNAk kate biko 300-5000 nukleotidoko DNA

molekulak dira eta urkila egitura tipikoa izaten dute. Pri-miRNA hauek heltze prozesua pairatu behar dute miRNA funtzionala bilakatzeko. Prozesu honen lehenengo pausuan, DROSHA eta DGCR8 proteinak pri-miRNA mozten dute 70-100 nukleotidoko molekula sortuz (pre-miRNA) eta zitoplasmara garraiatzen da *exportinen* bitartez (*XPO5* genea). Zitoplasman, pre-miRNAaren urkila mozten da (DICER eta TARBP2 proteinak) 22 nukleotidoko RNA duplexa lortuz. RNA duplex horien harizpietako bat RNA bidezko ixiltze konplexuari edo ingelesez, *RNA-induced silencing complexari* (RISC) lotzen zaio. Konplexu hori EIF2C1, EIF2C2, SND1, GEMIN3, GEMIN4 proteinak eta CCR4-NOT konplexuek osatzen dute (Inada eta Makino, 2014). RISC konplexuak miRNAek geneen adierazpenean eragiten duten errepresioa, deadenilazioa eta endekapena egiten dute (Li et al., 2014a). Bidezidor horietan gertatzen diren aldaketak miRNA ekoizpenean eragiten du (Iliou et al., 2013; Melo eta Esteller, 2014; Melo et al., 2009; Wu et al., 2014), eta aldaketa horiek minbiziaren jatorrian geneen erregulazioan eragin dezakete. Izan ere, gene horien adierazpen mailan aldaketak behatu dira bular minbizi kasuetan *DROSHA* eta *DICER* geneen azpi-adierazpena eta prostata minbizi kasuetan *EIF2C2* eta *TARBP2* geneen gain-adierazpena (Huang et al., 2014).

Jakina da, polimorfismoak gizabanakoen artean ezberdinak diren aldaera genetikoak direla. Polimorfismo horien artean, nukleotido bakarrekoak (*single nucleotide polymorphisms* edo SNP) arruntenetariakoak dira. Horrez gain, SNPak proteinen ekoizpena eta funtzioa aldatu dezakete. Ondorioz, miRNAen prozesamenduaren bidezidorra osatzen duten genetan dauden SNPak miRNA bidezko erregulazioan eragin dezakete (Mishra eta Bertino, 2009). Izan ere, *DROSHA* kokatuta dagoen rs640831 SNPak 56 miRNAen adierazpena aldatzen zuela behatu zen birikietako minbizia zuten pazientetan (Rotunno et al., 2010). Beraz, bidezidor honetan SNPak minbiziaren garapen eta progresioarekin erlazionatuta daude (Horikawa et al., 2008). Adibidez, rs2740348 *GEMIN4* genean prostata minbiziaren arriskuarekin (Liu et al., 2012), rs417309 *DGCR8* genean bular minbiziaren arriskuarekin (Jiang et al., 2013), rs197412 *GEMIN3* genean giltzurrunetako zelulen kartzinomarekin (Horikawa et al., 2008), eta gure taldeak, duela gutxi, rs139919 *TNRC6B* genean leuzemia limfoblastiko akutuen suszeptibilitatearekin asoziazioa topatu genuen (Gutierrez-Camino et al., 2014). Hala ere, oraindik ere OSn ez da miRNAen prozesamendu bidezidorraren aldakortasun genetikoak ikertu.



1. irudia. miRNAen jatorria eta bere prozesamendua.

2. Ikerketaren helburuak

Gure helburua: OSren jatorriaren markatzaile genetiko berriak bilatzea, miRNAREN prozesamendu geneen aldakortasun genetikoaren azterketaren bidez.

3. Ikerketaren muina

3.1 Metodoak

3.1.2 Lagina

Ikerketa lan honetan 99 OS kasu (<34 urte) parte hartu zuten. OS kasu guztiak OS konbentzionalak izan ziren *Clinica Universidad de Navarra*-n diagnostikatuak 1985tik 2003ra. Kontrolari dagokiola 387 indibiduo osasuntsu kontrol taldea osatu zuten. Paziente guztiak baimen informatua sinatu zuten eta etika komite lokalen onarpena izan zuten (Research Ethics Committee of the University of Navarra 105/2009).

1. taula. OS eta kontrol laginen ezaugarriak.

	Kasuak	Kontrolak
Paziente kopurua	99	387
Batazbestekoa ± DE, adina	14.60 ± 5.23	51.2 ± 7.7
Gizonezkoak, n (%)	55 (55.55)	199 (51.4)
Emakumezkoak, n (%)	44 (44.44)	187 (48.3)

DE: desbiderapen estandarra.

3.1.2 Gene eta SNP hautaketa

Literaturaren aztertu eta Patrocles datubasean bilatu ostean, miRNA prozesamenduaren bidezidorrean 21 gene hautatu genituen (Hiard et al., 2010). Gene hauen aldakortasun genetikoa aztertzeko tagSNPak erabili genituen. Jakina da, DNA bloketan heredatzen dela eta bloke hauetan SNPak haien artean “lotuta” daudela, hau da, blokeko SNPak batera heredatzen direla. Beraz, SNP baten informazioarekin nahikoa da blokeko beste SNPen efektuaren berri emateko. SNP adierazle honi tagSNP deritza. Geneen aldakortasun genetikoa bloke bakoitzeko SNP adierazlea (tagSNP) hautatuz geneen dauden bloke guztien informazioa jaso genuen tagSNP gutxi batzuekin. Azkenik, bai tagSNP teknika erabiliz; aldaketa funtzionala ekartzen zuten SNPak (aminoazido aldaketak, moztitsasketa alternatiboa eta geneen promotorean dauden transkripzio faktoreen lotura gunetan kokatutak eta miRNA lotura unean sortu edo desargertarazten) eta minbiziarekin asoziatuak ere kontuan hartu genituen hautaketa prozesuan.

3.1.3 Genotipaketa

DNA genomikoa odoletik erauzi zen fenol-kloroformo metodoaren bitartez (Sambrook J, 2001). Genotipaketa TaqMan OpenArray teknologiaren bidez egin zen (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) Applied Biosystems-en protokoloa jarraituz. Datuen analisisa, Taqman Genotyper softwarearen bitartez egin genuen (Applied Biosystems) SNPen genotipoen determinaziorako.

3.1.3 Analisi estatistikoak

Lehenik eta behin, gure kontrol laginek Hardy-Weinberg-en orekari (HWO) jarraitzen zioten aztertu genuen. Analisi horren bidez, kontrol-populazioa ondo hautatu den ala ez jakin daiteke. Desbiderapenik behatuko balitz, genotipaketan akatsak, odolkidetasun-kasuak edota alelo baten aldeko hautespen-fenomenoak daudela adieraziko luke. Ondorioz, kontrol-lagina ez da populazio orokorraren lagin adierazgarria, eta ezin izango litzateke erabili asoziazio-analisietan. Bigarrenik, asoziazio-analisia egin genuen, hau da, SNP eta kasu eta kontrolen arteko erlazioa χ^2 bidez kalkulatu genuen. Asoziazio horren efektuaren tamaina *odds ratio* (OR) balioek ematen digute eta erregresio logistikoko unibariante bitartez kalkulatu genuen. SNP baten genotipoek lau modutara eragin dezakete beren efektua: eredu kodominantea, dominantea, errezesiboa eta aditiboa. Asoziazio-mailak %5koa izan behar zuen adierazgarria izateko. Gainera, SNP kopuru handia aztertzen genbiltzanez, benetan adierazgarriak ez diren SNPak baztertzeko Bonferroniren zuzenketa egiten da. Analisiak R v2.11 softwarearekin egin genituen (<http://www.R-project.org>) (University of Auckland, New Zealand).

3.2 Emaitzak

3.2.1 Genotipaketa

MiRNAen prozesamendu geneen SNPen genotipaketarako 99 OS kasu eta 387 kontrol osasuntsu genituen. Guztira, 427 DNA laginek (87.86%) genotipazio egokia izan zuten (%20ko genotipoak ez zituzten laginak baztertu genituen). SNPei dagokiela, 67/72 (93.05%) genotipazio egokia izan zuten. Gainera, 10 SNP analisitik baztertu genituen ez zutelako HWO betetzen.

3.2.2 Asoziazio-analisia

miRNA prozesamendu geneen aldakortasun genetikoa 57 SNPen (genotipazio egokia) genotipoen frekuentzien konparaketa bidez aztertu genuen kasu eta kontroletan. Emaitzarik adierazgarriena rs11866002 izan zen eta *CNOT1* genean. Eredu genetiko dominantean, CT+TT genotipoak 0.44-bider murriztu zuten OSren arriskua (95% CI: 0.27-0.73; $p = 0.001$) Bonferroni zuzenketaren ostean ia adierazgarria zena ($p = 0.08$). Bestalde, rs3812265 *CNOT4* genean ($p=0.025$) eta rs3823994 *SND1* genean ($p=0.041$) ere OSren arriskuarekin erlazionatu genituen (2. taula).

2. taula. OSren arrikusarekin asoziatutako SNPen genotipoen frekuentziak.

Genea	SNPa	Eredu genetikoa	Genotipoa	Kontrolak n (%)	Kasuak n (%)	OR (95% CI)	P balioa
<i>CNOT1</i>	rs11866002	Dominantea	CC	134 (38.7)	46 (59.0)	1.00	0.001*
			CT/TT	212 (61.3)	32 (41.0)	0.44(0.27-0.73)	
<i>CNOT4</i>	rs3812265	Dominantea	CC	212 (63.1)	39 (49.4)	1.00	0.025
			CT/TT	124 (36.9)	40 (50.6)	1.75 (1.07-2.87)	
<i>SND1</i>	rs3823994	Aditiboa	AA	163 (46.8)	47 (59.5)	1.00	0.041

AT	157(45.1)	28 (35.4)	0.66(0.43-0.99)
TT	28 (8)	4 (5.1)	

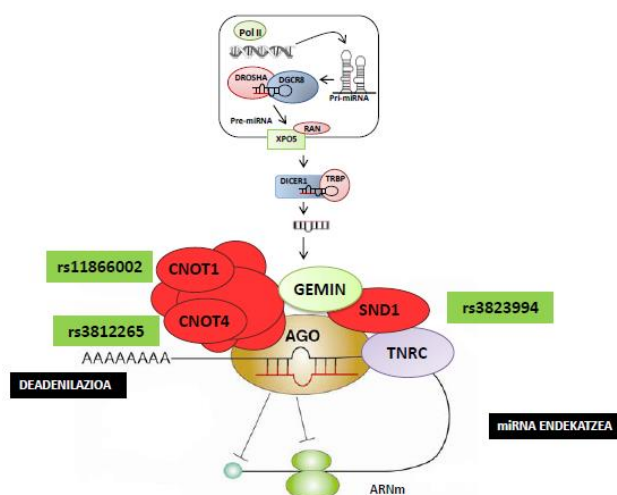
* Bonferroni zuzenketaren ostean adierazgarria (p=0.08).

3.3 Eztabaida

MiRNAen prozesamenduan diharduten gene guztien aldakortasun genetikoa aztertu eta gero, miRNAen prozesamendu bidezidorreko hiru genetan (*CNOT1*, *CNOT4* eta *SND1*), OS-ren arriskuarekin hiru SNP asoziatuak topatu genituen, guztiak RISC konplexuaren osagai dira. Beraz, gure emaitzen arabera, RISC konplexuko geneen SNPak OSren suszeptibilitatean garrantzitsuak izan daitezke.

Alde batetik CC genotipoa rs11866002 *CNOT1* genean bere moztitsasketan eragin dezake (Lee eta Shatkay, 2008). Bestalde, rs3812265ren CT+TT genotipoak *CNOT4* genean proteinaren sekuentzian aldaketa sortzen du (Val>Ile) (Lee eta Shatkay, 2008), eta beraz, proteinaren funtzioan eragin dezake. Bi gene hauek RISC konplexuaren CCR4-NOT konplexuaren parte dira (Lau et al., 2009; Petit et al., 2012). Konplexu honek miRNAekin lotzen den mRNAren poli(A) isatsa moztzen (deadenilazioa) du (Piao et al., 2010). CCR4-NOT konplexuaren partaideen deplezioa deadenilazioa oztokatzen du (Behm-Ansmant et al., 2006). Ondorioz, *CNOT1* eta *CNOT4* geneen SNPek mRNA deadenilazio aldatu dezake eta horrek, OSren jatorrian eta bilakaeran inplikatuak dauden geneen adierazpenean eragin dezakete.

Azkenik, TT genotipoa rs3823994 SNPan *SND1* genean OSren arriskuaren murrizketarekin asoziatuta behatu genuen. SNPk honek *SND1* genearen moztitsasketan eragin dezake. Gene honek miRNA editatuen endikapena kontrolatzen du RISC konplexuan (Caudy et al., 2003) (Li et al., 2008) eta bere adierazpena aldatuta dago zenbait minbizitan (Yoo et al., 2011) (Sand et al., 2012). Bere adierazpenaren aldaketa miRNA maila aldatu dezake eta honek, OSren arriskuan eragin. Izan ere, *SND1* ixilpenak mir-17-92 miRNA taldearen adierazpena areagotzen du (Heinrich et al., 2013), eta miRNA talde hau gainadierazita dago OSn eta OS lerro zelularren proliferazio, inbasio eta migrazioarekin asoziatuta dago (Li et al., 2014b).



Irudia 2. OSren arriskuarekin asoziatutiko SNPak RISC konplexuaren genetan daude.

4. Ondorioak

Hortaz, lehenengo aldiz RISC konplexuko geneak, bereziki rs11866002 *CNOT1* genean OS-ren suszeptibilitatean inplikaturik egon daitezkeela aurkitu genuen. Eraitza horiek balioztatzeko beste OS populazioetan miRNAen prozesamenduaren aldakortasun genetikoa behatu beharko genuke.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan miRNAen prozesamenduan diharduten geneak OSren jatorrian zeresana eduki dezaketela behatu dugu. miRNAan adierazpena miRNAk eurak dituzten SNPeK (mir-SNP) ere eragin ditzakete. Beraz, hurrengo pausua, miRNAak eurak OS-an duten aldakortasun genetikoa behatzea litzateke. Izan ere, duela gutxi bi ikerketa lanek jadanik frogatu dute mir-34 miRNA familiako bi SNP OS-ren suszeptibilitatean eragiten dutela (Lv et al., 2014; Tian et al., 2014). Beraz, miRNA polimorfiko guztien ikerketa egitea beharrezkoa litzateke OS-ren mir-SNP sinadura lortzeko.

6. Erreferentziak

- Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork, eta E. Izaurralde, (2006), mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes: *Genes Dev*, v. 20, p. 1885-98.
- Broadhead, M. L., J. C. Clark, D. E. Myers, C. R. Dass, eta P. F. Choong, (2011), The molecular pathogenesis of osteosarcoma: a review: *Sarcoma*, v. 2011, p. 959248.
- Caudy, A. A., R. F. Ketting, S. M. Hammond, A. M. Denli, A. M. Bathoorn, B. B. Tops, J. M. Silva, M. M. Myers, G. J. Hannon, eta R. H. Plasterk, (2003), A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes: *Nature*, v. 425, p. 411-4.
- Gutierrez-Camino, A., E. Lopez-Lopez, I. Martin-Guerrero, M. A. Piñan, P. Garcia-Miguel, J. Sanchez-Toledo, A. Carbone Bañeres, J. Uriz, A. Navajas, eta A. Garcia-Orad, (2014), Noncoding RNA-related polymorphisms in pediatric acute lymphoblastic leukemia susceptibility: *Pediatr Res*, v. 75, p. 767-73.
- He, J., J. Wang, D. Wang, S. Dai, T. Yv, P. Chen, R. Ma, C. Diao, eta G. Lv, (2014)a, Association between CTLA-4 genetic polymorphisms and susceptibility to osteosarcoma in Chinese Han population: *Endocrine*, v. 45, p. 325-30.
- He, M., Z. Wang, J. Zhao, Y. Chen, eta Y. Wu, (2014)b, COL1A1 polymorphism is associated with risks of osteosarcoma susceptibility and death: *Tumour Biol*, v. 35, p. 1297-305.
- He, M. L., Y. Wu, J. M. Zhao, Z. Wang, eta Y. B. Chen, (2013), PIK3CA and AKT gene polymorphisms in susceptibility to osteosarcoma in a Chinese population: *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 14, p. 5117-22.
- Heinrich, E. M., J. Wagner, M. Krüger, D. John, S. Uchida, J. E. Weigand, B. Suess, eta S. Dimmeler, (2013), Regulation of miR-17-92a cluster processing by the microRNA binding protein SND1: *FEBS Lett*, v. 587, p. 2405-11.
- Hiard, S., C. Charlier, W. Coppieters, M. Georges, eta D. Baurain, (2010), Patrocles: a database of polymorphic miRNA-mediated gene regulation in vertebrates: *Nucleic Acids Res*, v. 38, p. D640-51.

- Horikawa, Y., C. G. Wood, H. Yang, H. Zhao, Y. Ye, J. Gu, J. Lin, T. Habuchi, et al. X. Wu, (2008), Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma: *Clin Cancer Res*, v. 14, p. 7956-62.
- Huang, J. T., J. Wang, V. Srivastava, S. Sen, et al. S. M. Liu, (2014), MicroRNA Machinery Genes as Novel Biomarkers for Cancer: *Front Oncol*, v. 4, p. 113.
- Iliou, M. S., V. da Silva-Diz, F. J. Carmona, J. Ramalho-Carvalho, H. Heyn, A. Villanueva, P. Muñoz, et al. M. Esteller, (2013), Impaired DICER1 function promotes stemness and metastasis in colon cancer: *Oncogene*.
- Inada, T., et al. S. Makino, (2014), Novel roles of the multi-functional CCR4-NOT complex in post-transcriptional regulation: *Front Genet*, v. 5, p. 135.
- Jiang, Y., J. Chen, J. Wu, Z. Hu, Z. Qin, X. Liu, X. Guan, Y. Wang, J. Han, T. Jiang, G. Jin, M. Zhang, H. Ma, S. Wang, et al. H. Shen, (2013), Evaluation of genetic variants in microRNA biosynthesis genes and risk of breast cancer in Chinese women: *Int J Cancer*, v. 133, p. 2216-24.
- Lau, N. C., A. Kolkman, F. M. van Schaik, K. W. Mulder, W. W. Pijnappel, A. J. Heck, et al. H. T. Timmers, (2009), Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits: *Biochem J*, v. 422, p. 443-53.
- Lee, P. H., et al. H. Shatkay, (2008), F-SNP: computationally predicted functional SNPs for disease association studies: *Nucleic Acids Res*, v. 36, p. D820-4.
- Li, S., S. L. Lian, J. J. Moser, M. L. Fritzler, M. J. Fritzler, M. Satoh, et al. E. K. Chan, (2008), Identification of GW182 and its novel isoform TNGW1 as translational repressors in Ago2-mediated silencing: *J Cell Sci*, v. 121, p. 4134-44.
- Li, S., L. Wang, B. Fu, M. A. Berman, A. Diallo, et al. M. E. Dorf, (2014)a, TRIM65 regulates microRNA activity by ubiquitination of TNRC6: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 111, p. 6970-5.
- Li, X., H. Yang, Q. Tian, Y. Liu, et al. Y. Weng, (2014)b, Upregulation of microRNA-17-92 cluster associates with tumor progression and prognosis in osteosarcoma: *Neoplasma*, v. 61, p. 453-60.
- Liu, J., M. Wei, Y. He, B. Liao, G. Liao, H. Li, et al. J. Huang, (2012), Genetic variants in the microRNA machinery gene GEMIN4 are associated with risk of prostate cancer: a case-control study of the Chinese Han population: *DNA Cell Biol*, v. 31, p. 1296-302.
- Lv, H., J. Pei, H. Liu, H. Wang, et al. J. Liu, (2014), A polymorphism site in the pre-miR-34a coding region reduces miR-34a expression and promotes osteosarcoma cell proliferation and migration: *Mol Med Rep*, v. 10, p. 2912-6.
- Melo, S. A., et al. M. Esteller, (2014), Disruption of microRNA nuclear transport in human cancer: *Semin Cancer Biol*, v. 27C, p. 46-51.
- Melo, S. A., S. Roperio, C. Moutinho, L. A. Aaltonen, H. Yamamoto, G. A. Calin, S. Rossi, A. F. Fernandez, F. Carneiro, C. Oliveira, B. Ferreira, C. G. Liu, A. Villanueva, G. Capella, S. Schwartz, R. Shiekhattar, et al. M. Esteller, (2009), A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function: *Nat Genet*, v. 41, p. 365-70.
- Miao, J., S. Wu, Z. Peng, M. Tania, et al. C. Zhang, (2013), MicroRNAs in osteosarcoma: diagnostic and therapeutic aspects: *Tumour Biol*, v. 34, p. 2093-8.
- Mishra, P. J., et al. J. R. Bertino, (2009), MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine: *Pharmacogenomics*, v. 10, p. 399-416.
- Petit, A. P., L. Wohlbold, P. Bawankar, E. Huntzinger, S. Schmidt, E. Izaurralde, et al. O. Weichenrieder, (2012), The structural basis for the interaction between the CAF1 nuclease and the NOT1 scaffold of the human CCR4-NOT deadenylase complex: *Nucleic Acids Res*, v. 40, p. 11058-72.
- Piao, X., X. Zhang, L. Wu, et al. J. G. Belasco, (2010), CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells: *Mol Cell Biol*, v. 30, p. 1486-94.
- Rotunno, M., Y. Zhao, A. W. Bergen, J. Koshiol, L. Burdette, M. Rubagotti, R. I. Linnoila, F. M. Marincola, P. A. Bertazzi, A. C. Pesatori, N. E. Caporaso, L. M. McShane, E. Wang, et al. M. T. Landi, (2010), Inherited polymorphisms in the RNA-mediated interference machinery affect microRNA expression and lung cancer survival: *Br J Cancer*, v. 103, p. 1870-4.

- Ruza, E., E. Sotillo, L. Sierrasesúмага, C. Azcona, eta A. Patiño-García, (2003), Analysis of polymorphisms of the vitamin D receptor, estrogen receptor, and collagen I α 1 genes and their relationship with height in children with bone cancer: *J Pediatr Hematol Oncol*, v. 25, p. 780-6.
- Sambrook J, R. D., (2001), *Molecular cloning: A laboratory manual.*, v. 6: USA, CSHL Press, 4–12 p.
- Sand, M., M. Skrygan, D. Georgas, D. Sand, T. Gambichler, P. Altmeyer, eta F. G. Bechara, (2012), The miRNA machinery in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases and benign melanocytic nevi: *Cell Tissue Res*, v. 350, p. 119-26.
- Savage, S. A., L. Burdett, R. Troisi, C. Douglass, R. N. Hoover, S. J. Chanock, eta N. O. E. s. group, (2007)a, Germ-line genetic variation of TP53 in osteosarcoma: *Pediatr Blood Cancer*, v. 49, p. 28-33.
- Savage, S. A., L. Mirabello, Z. Wang, J. M. Gastier-Foster, R. Gorlick, C. Khanna, A. M. Flanagan, R. Tirabosco, I. L. Andrulis, J. S. Wunder, N. Gokgoz, A. Patiño-García, L. Sierrasesúмага, F. Lecanda, N. Kurucu, I. E. Ilhan, N. Sari, M. Serra, C. Hattinger, P. Picci, L. G. Spector, D. A. Barkauskas, N. Marina, S. R. de Toledo, A. S. Petrilli, M. F. Amary, D. Halai, D. M. Thomas, C. Douglass, P. S. Meltzer, K. Jacobs, C. C. Chung, S. I. Berndt, M. P. Purdue, N. E. Caporaso, M. Tucker, N. Rothman, M. T. Landi, D. T. Silverman, P. Kraft, D. J. Hunter, N. Malats, M. Kogevinas, S. Wacholder, R. Troisi, L. Helman, J. F. Fraumeni, M. Yeager, R. N. Hoover, eta S. J. Chanock, (2013), Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for osteosarcoma: *Nat Genet*, v. 45, p. 799-803.
- Savage, S. A., K. Woodson, E. Walk, W. Modi, J. Liao, C. Douglass, R. N. Hoover, S. J. Chanock, eta N. O. E. S. Group, (2007)b, Analysis of genes critical for growth regulation identifies Insulin-like Growth Factor 2 Receptor variations with possible functional significance as risk factors for osteosarcoma: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 16, p. 1667-74.
- Tian, Q., J. Jia, S. Ling, Y. Liu, S. Yang, eta Z. Shao, (2014), A causal role for circulating miR-34b in osteosarcoma: *Eur J Surg Oncol*, v. 40, p. 67-72.
- Toffoli, G., P. Biondo, A. Russo, E. De Mattia, E. Cecchin, C. M. Hattinger, M. Pasello, M. Alberghini, C. Ferrari, K. Scotlandi, P. Picci, eta M. Serra, (2009), Effect of TP53 Arg72Pro and MDM2 SNP309 polymorphisms on the risk of high-grade osteosarcoma development and survival: *Clin Cancer Res*, v. 15, p. 3550-6.
- Wang, J., L. Nong, Y. Wei, S. Qin, Y. Zhou, eta Y. Tang, (2013), Association of interleukin-12 polymorphisms and serum IL-12p40 levels with osteosarcoma risk: *DNA Cell Biol*, v. 32, p. 605-10.
- Wu, S., W. Yu, X. Qu, R. Wang, J. Xu, Q. Zhang, J. Li, eta L. Chen, (2014), Argonaute 2 promotes myeloma angiogenesis via microRNA dysregulation: *J Hematol Oncol*, v. 7, p. 40.
- Yang, J., eta W. Zhang, (2013), New molecular insights into osteosarcoma targeted therapy: *Curr Opin Oncol*, v. 25, p. 398-406.
- Yang, W., M. He, J. Zhao, eta Z. Wang, (2014), Association of ITGA3 gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathological characteristics of osteosarcoma: *Med Oncol*, v. 31, p. 826.
- Yoo, B. K., P. K. Santhekadur, R. Gredler, D. Chen, L. Emdad, S. Bhutia, L. Pannell, P. B. Fisher, eta D. Sarkar, (2011), Increased RNA-induced silencing complex (RISC) activity contributes to hepatocellular carcinoma: *Hepatology*, v. 53, p. 1538-48.

7. Eskerrak eta oharrak

Proiektu hau Red Tematica de la Investigación Cooperativa en Cancer (RTICC) (RD/12/0036/0036), Eusko Jaurlaritzak (IT661-13), eta Euskal Herriko Unibertsitateari (UFI11/35) esker burutu da. AGC-k Eusko Jaurlaritzako laguntza predoktorala jaso zuen eta ELL-k Eusko Jaurlaritzako laguntza posdoktorala jaso zuen. Eskerronak Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Zerbitzu Orokorreari (SGIker).