

A miR-146a és miR-196a-2 egynukleotidos polimorfizmusának meghatározása alacsonyan differenciált szerózus papilláris ováriumtumoros betegek mintáiban



Lukács János dr.¹, Soltész Beáta dr.², Penyige András dr.²,
Nagy Bálint dr.², Póka Róbert dr.¹

Debreceni Egyetem, ÁOK, ¹Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet, ²Humángenetikai Tanszék, Debrecen

Célkitűzés: A miR-146a rs2910164 és a miR-196a-2 rs11614913 polimorfizmus meghatározása egészséges és petefészekrákos nők csoportjában, valamint a két mikroRNS élettani szerepének vizsgálata hálózatkutatással.

Anyagok és módszerek: A vizsgálatokba 75 fő alacsonyan differenciált szerózus papilláris petefészekrákos és 75 fő egészséges személyt vontunk be, tőlük vért vettünk etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmazó csövekbe. A DNS-t szilika adszorpciós módszerrel izoláltuk ki, majd a miR-146a rs2910164 és a miR-196a-2 rs11614913 SNP-ire kifejlesztett LightSnip kit segítségével meghatároztuk a PCR során keletkezett termékek olvadási pontjait LightCycler 96 készülék segítségével. Megállapítottuk az allél és a genotípus előfordulási gyakoriságokat, az adatok statisztikai kiértékeléséhez khí-négyzet tesztet alkalmaztunk. A két SNP szerepét a tumor kialakulásában hálózatkutatással elemeztük.

Eredmények: Az olvadási görbe analízis során a miR-146a rs2910164 esetében a betegek csoportjában a G-allél 82,00%-ban, a kontrollcsoportban 72,67%-ban fordult elő ($p=0,053$). A genotípusoknál a kontrollcsoportban a GG 53,33%-ban, a GC 38,67%-ban, a CC 8,00%-ban fordultak elő, míg betegeknél 65,33%; 33,33% és 1,33%-ban ($p=0,0917$). A miR-196a-2 rs11614913 esetében a betegek csoportjában a C-allél 59,33%-ban, a kontrollcsoportban 67,33%-ban fordult elő ($p=0,15$). A genotípusok a kontrollcsoportban a CC 37,33%, a CT 44,00%, a TT 18,67%-ban mutatkoztak, míg a betegeknél 46,67%; 41,33% és 12,00%-ban ($p=0,3815$). A hálózatok elemzése során az találtuk, hogy az ATG9A, a LBR, a MBD4 és a RUFY2-gének a két miRNS közös célgénjei.

Következtetések: A miR-146a rs2910164 és a miR-196a-2 rs11614913 számos, a tumor kialakulásában szerepet játszó gén kifejeződésére van hatással, azonban alacsonyan differenciált szerózus papilláris petefészekrákban észlelt polimorfizmusuk jelentősen nem különbözik az egészséges kontrollokban kimutatható polimorfizmushoz képest.

Kulcsszavak: miRNS, miRNS-146a; miR-196a-2, SNP, petefészekrák

Determination of two single nucleotide polymorphisms on miR-146a and miR-196a-2 in samples of patients with high-grade papillary serous carcinoma of the ovary

Objective: MicroRNA molecules are short non-coding sequences which play a role in the regulation of gene expression. They have pivotal role in the development of tumors and in their progression. Potentially, they could be used to monitor efficacy of certain treatment modalities. Single nucleotide polymorphism (SNP) is the most common form of genetic variability. It could be observed in miRNAs and could result in differences of gene expression. Polymorphism of miR-196a-2 was shown to be related to several types of tumors.

Aim: Our investigations aimed to determine miR-146a rs2910164 and miR-196a-2 rs11614913 polymorphisms in ovarian cancer patients and controls.

Materials and methods: 75 ovarian cancer patients and 75 matched controls were included in the study. Blood samples were drawn into EDTA tubes and DNA was isolated by silica adsorption method. MiR-146a rs2910164 and miR-196a-2 rs11614913

Levelezési cím:

Dr. Póka Róbert, 4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 98., Tel.: +36 52 255 144, Fax: +36 52 255 705,

E-mail: pokar@med.unideb.hu

were determined by LightSnip kit and we used melting curve analysis for allele classification. Chi-square test was used for statistical evaluation of the data. We made network analysis to find the common target genes.

Results: Based on melting curve analysis of miR-146a rs2910164 we found 82.00% G allele frequency in the patients' group, and 72.67% in the control group ($p=0,053$). We detected GG genotype in 65.33 %, GC genotype in 33.33% and CC genotype in 1.33% of controls while they occurred in 50.00%; 43.42% and 6.58% of the patients, respectively ($p=0,0917$). On analysis of miR-196a-2 rs11614913 allele G occurred in 82.00% of patients and in 72.67% of controls ($p=0.15$). GG, GC and CC genotypes occurred with 53.33%, 38.67% and 8.00% frequency among controls, while they were detected with 65.33%; 33.33% and 1.33% frequency among patients, respectively ($p=0.3815$). During the network analysis we found ATG9A, a LBR, a MBD4 and RUFY2 genes to be targets for both miRNAs.

Conclusion: The miR-146a and miR-196a-2 have effect on the expression of several genes; however their SN polymorphisms showed no significant difference between high-grade serous papillary ovarian cancer cases and their controls. To find out their exact role in susceptibility to and progression of ovarian cancer requires more investigation.

Keywords: miRNA, miR-146a, miR-196a-2; SNP, ovarian cancer.

Bevezetés

Az utóbbi időben a mikroRNS-ek (miRNS) funkciói a karcinogenezisben a figyelem középpontjába kerültek. A mikroRNS-ek a kisméretű noncoding RNS-ek új csoportját képezik, amelyek a messenger RNS degradáció folyamataiban, a messenger RNS transláció gátlásában játszanak szerepet, és hatással vannak a transzkripcióra azáltal, hogy a cél messenger RNS-eik 3-as nem translált régiójához (3'-UTR) kötődnek. Sok mikromessenger RNS játszik szerepet a karcinogenezisben azáltal, hogy az onkogéneket és a tumorsuppresszor géneket szabályozzák. A petefészekrákkal kapcsolatos vizsgálatuk kimutatta, hogy hozzájárulnak a rákok kialakulásához, progressziójához, metasztázis képzéséhez és a kemoterápia-rezisztenciájukhoz. A mikromessenger RNS-ekben kialakuló egynukleotid polimorfizmus (SNP-k) hatással lehetnek a vonatkozó miRNS-ek tulajdonságaira és kifejeződéseire, ezáltal az egyénben individuális fogékonyságot alakíthatnak ki a rákok irányában. A mikromessenger RNS-ben az miR-146a, az miR-149, az miR-196A2, és az miR-499 négy genetikai variánsát azonosították, amelyekről kimutatták, hogy kapcsolatban vannak számos betegség iránti fogékonysággal, köztük az emésztőrendszeri rákokkal, a nyelőcső laphám-karcinómával, a colorectalis rákokkal és a prosztatarákokkal. A miRNS-ek nem kódoló, kis RNS-ek, amelyek 18-23 nukleotidból állnak. Az utóbbi időben kimutatták és vizsgálták, hogy a fenti miRNS-ek társulnak-e vagy társulnak a petefészekrákok iránti fogékonysággal.

Számos miRNS polimorfizmust hozták eddig összefüggésbe a mikroRNS képződéssel és a mikroRNS-mRNS interakció során megvalósuló szabályozással [1]. Eddig ezer-nél több különböző mikroRNS-t írtak le a kutatók, amelyek funkciója lehet onkogén, vagy tumorsuppresszor is [2, 3].

A miR-146a-t C-allél variánsait már tanulmányozták mellrákos és petefészekrákos betegek mintáiban, a gén expressziójának magasabb szintjét határozták meg [4, 5]. A miR-196a-2 szintén számos tumor kialakulásában játszik szerepet, tüdő, mell, gyomor stb., valamint szerepel közöttük az epitheliális petefészekrák is [6, 7]. Kang és mtsai 45 816 személy polimorfizmusának adatait gyűjtötték össze 46 tanulmányból és összefüggést kerestek a különböző daganat típusok kialakulásával, metaanalízist végezve [8].

A miR-196a-2 számos polimorfizmust tartalmaz. Eddig főleg kínai populációból származó adatokat közöltek. Hu és munkatársai a nem kissejtes tüdőrák kapcsán a homozigóta CC-genotípust hordozók esetében csökkent túlélést tapasztaltak [9]. Peng és munkatársai (2010) eredményei szerint a gyomorrák kockázata náluk magasabb [10], ugyanakkor Dou és munkatársai szerint csökkent kockázati tényezőt mutat gliómára [11]. Chu és munkatársai metaanalízise szerint – amely 9341 beteget és több mint 10 000 kontrollt tartalmazott –, arra jutottak, hogy TT-genotípus védeltséget nyújtott több ráktípussal szemben, ez alól kivételt jelentett a mell- és tüdőrák, ahol viszont a CC jelentett alacsonyabb kockázati tényezőt [12]. Qi és munkatársai összefüggést találtak a polimorfizmus és a hepatitis B kapcsolt hepatocellularis karcinóma között férfiaknál [13]. Hu és munkatársai viszont kínai nőknél találtak kapcsolatot a mellrákra való fogékonyság és az SNP között [14].

Hoffman és munkatársai mellrákra való alacsonyabb fogékonyságot észleltek a TT-homozigótánál [15], ezzel szemben Catucci és munkatársai nem találtak összefüggést az allélok és mellrák között német, és olasz populációban [16]. Egyiptomi colorectalis-, nyelőcső-, bőr-, tüdő-, pajzsmirigy- és veserákos betegekből álló kutatás során a T-variáns volt a magasabb kockázati tényező [17].

Japán populációban a CC-genotípus magasabb kockázatot mutat gyomorrákra [18]. Észak-indiai populációnál a heterozigóták esetében észleltek nagyobb fogékonyságot prosztatarákra [19]. Christensen és munkatársai azt találták, hogy a homozigóta variáns alléllal rendelkező garattumoros betegek csökkent túlélési eséllyel rendelkeznek [20].

A TT-genotípus esetében csökkent fogékonyság mutatkozott több ráktípusra, Xu és munkatársai 21 kutatást dolgoztak fel metaanalízisük során [21].

A fent felsorolt eredmények közül csak néhány érinti az rs11614913-at. A leginkább kutatott terület a nem kissejtes tüdőrák, a mellrák és a gyomorrák. Három petefészekrákkal, foglalkozó tanulmány jelent meg, azok is kínai populációból származnak.

A fentiek is mutatják, hogy mennyire bonyolult a mikroRNS-ek hatásának vizsgálata. Kevés európai vizsgálati adat áll rendelkezésre, ezért elhatároztuk a miR146a és a miR-196a-2 egy-egy polimorfizmusának meghatározását petefészekrákos betegek csoportjában.

1. táblázat. A miR-146a rs 2910164 alléljeinek és genotípusainak megoszlása petefészekrákos betegekben és egészséges kontrollokban

allélok			
miR-146a rs 2910164	G		C
Kontroll (n=75)	109 (72,67%)		41 (27,33%)
Beteg (n=75)	123 (82%)		27 (18%)
p=0,053			
genotípusok			
miR-146a rs 2910164	GG	GC	CC
Kontroll (n=75)	40 (53,33%)	29 (38,67%)	6 (8%)
Beteg (n=75)	49 (65,33%)	25 (33,33%)	1 (1,33%)
p=0,0917			

Anyagok és módszerek

Betegek

A prospektív vizsgálatba bevont személyeket két csoportba soroltuk, egészséges kontroll (n=75) és high-grade szerózus papilláris ováriumtumorban szenvedők (n=75) (átlagos életkor 59 év, betegek 58,2 év, kontrollok 59,3 év). Az ETT TUKEB engedélyezte a tanulmányt (30231-2/2016), a vizsgálatok lényegéről tájékoztattuk az érintetteket, akik beleegyező nyilatkozatot írtak alá.

SNP-meghatározás

A vizsgálati személyektől 9 ml EDTA-s vér levétele után 200 mikroliter vérből DNS izolálás történt szilika adszorpciós módszerrel, a gyártó utasításai szerint (High Pure PCR Template Preparation kit, Roche, Mannheim, Németország) [22]. A kvantitatív valósídejű PCR során egy mikroliter DNS-t, egy mikroliter LightSnip keveréket, 3,0 mM MgCl₂-t és egy mikroliter LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes keveréket (Roche, Penzdorf, Németország) mértünk be a PCR elegyhez 10 µl végtérfigatba. A LightSnip primereket a TibMolbiol (Berlin, Németország) tervezte meg és gyártotta le. A PCR során a 10 perces denaturációt követően 36 ciklusban történt a termékek megsokszorozása

60 °C-os annealinggel. Az amplifikációt olvadási görbe analízis követte. Az miR-146a rs2910164 esetében a T- allél 54 °C-os, a C-allél 65 °C-os; a miR-196a-2 rs11614913 esetében a C-allél 54 °C-os, a T-allél 62 °C-os T_m-mel mutatkozott a meghatározások során.

Bioinformatikai analízis (hálózat kutatás)

A has-miR-146a-5p és a has-miR-196a-2-5p mikroRNS cél-génjeinek meghatározásához a TargetScan (www.targetscan.org), MirBase (www.microrna.sanger.ac.uk) és a microRNA-Data-Integration-Portal (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP>) predikciós adatbázisokat és az ezek által felkínált algoritmusokat használtuk fel. A pontos target felismeréshez használt szoftverek a miRNS „mag (seed)” szekvencia és a mRNS szekvenciájának komplementaritása mellett a mag szekvencia környezetét és evolúciós konzerváltságát is figyelembe veszik.

Statisztikai analízis

A kategorikus változók (allél és a genotípus) gyakoriságának összehasonlítására chí-négyzet tesztet használtunk (www.socstatistics.com/tests/chisquare2). A Hardy-Weinberg-törvénynek való megfelelés kiszámítására szabadon hozzáférhető programot alkalmaztunk.

2. táblázat. A miR-196a-2 rs 11614913 alléljeinek és genotípusainak megoszlása petefészekrákos betegekben és egészséges kontrollokban

allélok			
miR-196a-2 rs 11614913	T		C
Kontroll (n=75)	61 (40,67%)		89 (59,33%)
Beteg (n=75)	49 (32,67%)		101 (67,33%)
p=0,15			
genotípusok			
miR-196a-2; rs 11614913	TT	TC	CC
Kontroll (n=75)	14 (18,67%)	33 (44%)	28 (37,33%)
Beteg (n=75)	9 (12%)	31 (41,33%)	35 (46,67%)
p=0,3815			

Eredmények

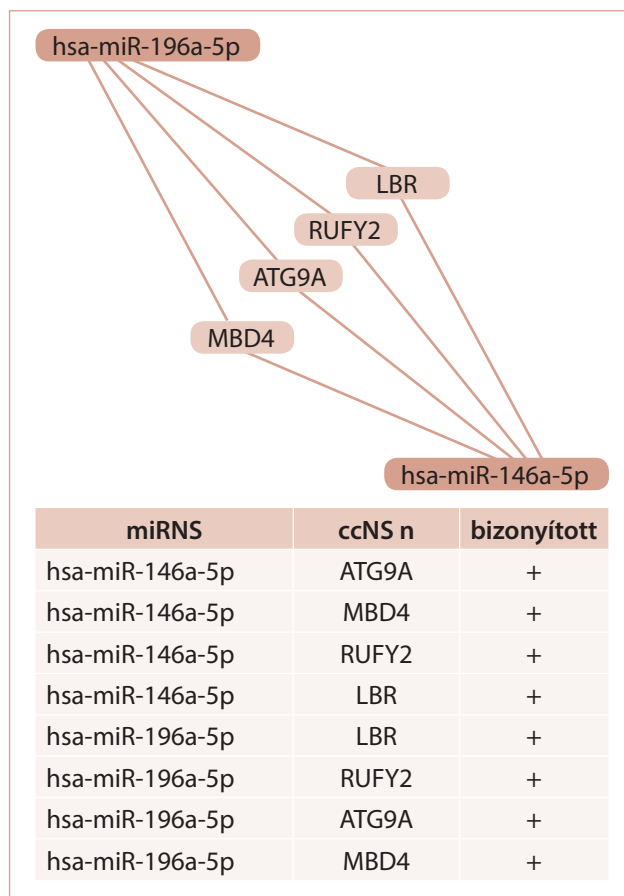
Munkánk során módszert vezetünk be a miR-146a és a miR196a egynukleotidos polimorfizmusának meghatározására. Az alkalmazott PCR körülmények alkalmasak voltak az egyes allélok olvadási pont szerinti megbízható elkülönítésére. Vizsgálataink során a két miRNS SNP előfordulási gyakoriságát határoztuk meg 75 egészséges és 75 high-grade szerózus papilláris petefészekrákos beteg mintáiban. A két csoport átlagos életkorában nem volt lényeges különbség. Az 1. és 2. táblázat mutatja a két SNP allél- és genotípus gyakoriságát. Az olvadási görbe analízis során a miR-146a rs2910164 esetében a betegek csoportjában a G-allél 82,00%-ban, a kontrollcsoportban 72,67%-ban fordult elő ($p=0,053$). A genotípusoknál a kontrollcsoportban a GG 53,33,84%, a GC 38,6700%, a CC 8,00%-ban fordultak elő, míg betegeknél 65,33%; 33,33% és 1,33%-ban ($p=0,0917$). A miR-196a-2 rs11614913 esetében a kontrollcsoportban a C-allél 59,33%-ban, a betegcsoportban 67,33%-ban fordult elő ($p=0,15$). A genotípusok a kontrollcsoportban a CC 37,33%, a CT 44,00%, a TT 18,67%-ban mutatkoztak, míg a betegeknél 46,67%; 41,33% és 12,00%-ban ($p=0,3815$).

A hálózat kutatás során négy gén bizonyult közös célgénnek a Lamin B-receptor (LBR), a Rab4 interacting protein (RUFY2), az Autophagy related 9a (ATG9A), és a Methyl CpG binding domain 4 (MBD4) (1. ábra).

Megbeszélés

A miR-146a elsődleges transzkriptumát a Drosha ribonukleáz III egy 70 bázisból álló prekursor miRNS-sé alakítja, amelyet a citoplazma Dicer ribonukleáza alakít érett miRNS-sé [23]. Az érett miRNS az RNS-indukálta „silencing complex”-be (RISC) épül be, ami a cél RNS-eket tökéletlen bázispár kötődés révén gátolja, illetve destabilizálja. A miR-146a cél RNS-ei között szerepelnek a tumor nekrozis faktor, interleukin-1 receptor-asszociált kináz-1, interleukin-1-béta, TNF-receptor-asszociált faktor 6 és a komplement faktor H. Sun és munkatársai már végeztek miR-146a expressziós vizsgálatokat petefészekrákban és megállapították, hogy a GG-genotípus a CC-genotípushoz képest 3,73-szor, a CG+GG genotípus a CC-genotípushoz képest 1,68-szor, a GG-genotípus a CG+CC-genotípushoz képest pedig 3,02-szor magasabb eséllyel fordul elő petefészekrákos esetekben, mint egészséges kontrollok között [24]. Az eltérések mindhárom összehasonlításban szignifikánsnak bizonyultak. Jelen tanulmányunkban ugyanezek az összehasonlítások, sorrendben 7,35; 6,4 és 1,65-os esélyhányadost eredményeztek, de egyikük sem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. Tekintettel a jelentős esetszámokra feltételezhető, hogy a miR-146a polimorfizmus szerepe a petefészekrák kialakulásában nem kizárólagos.

A petefészekrákot már 25 éve összefüggésbe hozták a 17-es kromoszóma hosszú karján lokalizálódó gének allélvesztésével [25]. Talán nem meglepő, hogy a miR196a-1 szintén a 17-es kromoszóma homeobox génklasztereiből származik [26]. A miR-196a által befolyásolt gének felderítése során elsődleges célpontként a HMGA2-gént azonosították. Ennek fehérjeje egy nem hiszton fehérje (high mobility AT-hook 2),



1. ábra. A miR-146a és a miR-196a-2 közös célgénjei a hálózat kutatás alapján

Készült a miRTargetLink Human website felhasználásával.

amelynek működése a DNS kettősszál töréseit okozó környezeti (sugárzás, kemoterápia egyes típusai) hatásokban permisszív szerepet játszik. Petefészekrákból származó sejtvonalakon már vizsgálták a miR-196a expresszióját [27]. Eredményeik alapján a miR-196a-t tumor promoterként azonosították, amelynek target génje a downstream elhelyezkedésű HOXA10-gén. Fan és munkatársai petefészekrákos betegek körében végzett vizsgálata szerint a miR-196a megnövekedett expressziója kedvezőtlen prognózist jelent [28]. Song és munkatársai vizsgálatai szerint szemben a CG+TT genotípussal, a CC-genotípus 1,34-szer nagyobb eséllyel fordul elő petefészekrákos esetek között, mint egészséges kontrollok között [29]. Saját anyagunkban az esélyhányados 1,5-nek bizonyult, de statisztikailag nem volt szignifikáns. A kínai szerzők eredményeit jelentősen befolyásolhatta az, hogy a betegek kevesebb, mint felének volt szerózus papilláris dagana, az esetek kevesebb harmadánál volt high-grade tumor és az európai és amerikai statisztikáktól eltérően többségben voltak a mucinózus és endometrioid tumorok. Tekintettel a merőben eltérő genetikai háttérű típusok gyakoriságára a kínai vizsgálati populáció nem tekinthető reprezentatívnak a klasszikus szerózus papilláris petefészekrák vonatkozásában.

Hálózatelemzésünk során négy olyan gént találtunk, amelyekre a vizsgált két miRNS (miR-146a és a miR-196a) együttesen hat, ezek fontos szerepet játszanak a tumor kifejlődésében és a kemoterápiával szemben kialakuló rezisztencia kialakulásában.

Dai és munkatársai bizonyították, hogy az ATG9a jelenősen felülexpresszált ováriumtumoros betegek csoportjában [30]. Véleményük szerint a fehérjeszint fontos biomarker és összefüggést mutat a prognózissal, valamint a kemoterápiára való érzékenységgel is.

Helleman és munkatársai a platinarezisztens petefészekrák molekuláris analízise során 9 gént találtak, amelyek kifejeződése a rezisztenciát jelezte, ezek között volt a LMB [31]. A fehérje sejtmembrán protein, amely a lamint a kromatinhoz kapcsolja, de további vizsgálatokat tartottak szükségesnek a pontos mechanizmus megismerésére.

Howard és munkatársai kolorektális és petefészekrák esetében a MED1/MBD4-gén csökkent expresszióját mutatták ki [32]. Az MBD4 a DNS mismatch repair proteinnel (MMR) együttesen kapcsolódik a metilált DNS-hez. Az MBD4 fontos szerepet játszik a DNS-ben lévő mutációk kijavításában.

Shin és munkatársai mikroszatellita instabilitást vizsgálva az egyik gyakran mutációt szenvedett génnek találták a RUFY2-öt [33].

Az olvadási görbe analíziseink során a miR-146a rs2910164 esetében a betegek csoportjában a G allél 82,00%-ban, a kontrollcsoportban 72,67%-ban fordult elő ($p=0,053$). A genotípusoknál a kontrollcsoportban a GG 53,33,84%, a GC 38,6700%, a CC 8,00%-ban fordultak elő, míg betegeknél 65,33%; 33,33% és 1,33%-ban ($p=0,0917$). A miR-196a-2 rs11614913 esetében a betegek csoportjában a C-allél 59,33%-ban, a kontrollcsoportban 67,33%-ban fordult elő ($p=0,15$). A genotípusok a kontrollcsoportban a CC 37,33%, a CT 44,00%, a TT 18,67%-ban mutatkoztak, míg a betegeknél 46,67%; 41,33% és 12,00%-ban ($p=0,3815$).

A hálózatok elemzése során az találtuk, hogy az ATG9A, a LBR, a MBD4 és a RUFY2-gének a két miRNS közös cél-génjei. Vizsgálataink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy high-grade szerőzus papilláris petefészekrákban a miR-146a rs2910164 és a miR-196a-2 rs11614913 polimorfizmusai statisztikailag nem mutatnak jelentős eltérést az egészséges kontrollokhoz képest. Ni és Huang közelmúltban publikált vizsgálatai ugyanerre a következtetésre jutottak, azonban az általunk nem vizsgált miR-499 esetében jelentős eltérést találtak az rs3746444 polimorfizmusában [34]. A petefészekrákos betegek között 12%-ban, míg az egészséges kontrollok között 6%-ban fordult elő a GG-genotípus, s ez statisztikailag szignifikánsnak bizonyult. A viszonylag alacsony esetszám növelése mellett további vizsgálatokra van szükség annak tisztázására, hogy a talált eltérések milyen mértékben köthetők a petefészekrák iránti fogékonysághoz, illetve a tumorprogresszió során bekövetkező genetikai változásokhoz.

IRODALOM

1. Wang PY, Gao ZH, Jiang ZH, et al. The association of single nucleotide polymorphisms in miR-146a, miR-196a and miR-499 with breast cancer susceptibility. *PlosOne* 2013; 8:e706856
2. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259–269.
3. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin Chem* 2009; 55: 834–838.
4. Pastrello C, Polesel J, Della Puppa L, et al. Association between hsa-miR-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1/BRCA2 negative familial breast and ovarian cancer patients. *Carcinogenesis* 2010; 31: 2124–2126.

5. Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1963–1966.
6. Alshatwi AA, Shafi G, Hasan TN, et al. Differential expression profile and genetic variants of microRNA sequences in breast cancer patients. *PlosOne* 2012; 7:e30049
7. Song ZH, Wu Y, Zhao HG, et al. Association between the rs11614913 variants of miRNA-196a-2 and the risk of epithelial ovarian cancer. *Oncol Letters* 2016; 11: 194–200.
8. Kang Z, Li Y, He X, et al. Quantitative assesment of the association between miR-196a2 rs11614913 polymorphism and cancer risk: evidence based on 45,816 subjects. *Tumor Biol* 2014; 35: 6271–6282.
9. Hu Z, Chen J, Tian T, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest* 2008; 118: 2600–2608.
10. Peng S, Kuang Z, Sheng C, et al. Association of microRNA-196a-2 gene polymorphism with gastric cancer risk in a Chinese population. *Digest Dis Sci* 2010; 55: 2288–2293.
11. Dou T, Wu Q, Chen X, et al. A polymorphism of microRNA-196a genome region was associated with decreased risk of glioma in Chinese population. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 1853–1859.
12. Chu H, Wang M, Shi D, et al. Hsa-miR-196a2 rs11614913 polymorphism contributes to cancer susceptibility: evidence from 15 case-control studies. *PLoS One* 2011; 6: e18108.
13. Qi P, Dou TH, Geng L, et al. Association of a variant in miR-196a-2 with susceptibility to hepatocellular carcinoma in male Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hum Immunol* 2010; 71: 621–626.
14. Hu Z, Liang J, Wang Z, et al. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women. *Human Mutation* 2009; 30: 79–84.
15. Hoffman AE, Zheng T, Yi C, et al. microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. *Cancer Research* 2009; 69: 5970–5977.
16. Catucci I, Yang R, Verderio P, et al. Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases. *Human Mutation* 2010; 31: E1052–1057.
17. Toraih EA, Fawzy MS, Mohammed EA, et al. MicroRNA-196a2 biomarker and targetome network analysis in solid tumors. *Mol Diagn Ther* 2016; 20: 559–577.
18. Okubo M, Tahara T, Shibata T, et al. Association between common genetic variants in pre-microRNAs and gastric cancer risk in Japanese population. *Helicobacter* 2010; 15: 524–531.
19. George GP, Gangwar R, Mandal RK, et al. Genetic variation in microRNA genes and prostate cancer risk in North Indian population. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 1609–1615.
20. Christensen BC, Avissar-Whiting M, Ouellet LG, et al. Mature microRNA sequence polymorphism in miR-196a-2 is associated with risk and prognosis of head and neck cancer. *Clin Canc Res* 2010; 16: 3713–3720.
21. Xu Y, Gu L, Pan Y, et al. Different effects of three polymorphisms in microRNAs on cancer risk in Asian population: evidence from published literatures. *PLoS One* 2013; 8: e65123.
22. Nagy B, Bán Z, Papp Z. The DNA isolation method has effect on allele drop out and on the results of fluorescent PCR and DNA fragment analysis. *Clin Chim Acta* 2005; 360: 128–132.
23. HGNC: MIR146A (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406938>) 2017. május 21.
24. Sun XC, Zhang AC, Tong LL, et al. MiR-146a and miR-196a2 polymorphisms in ovarian cancer risk. *Genet Mol Res* 2016; 15(3). doi: 10.4238/gmr.15038468.
25. Eccles DM, Cranston G, Steel CM, et al. Allele losses on chromosome 17 in human epithelial ovarian carcinoma. *Oncogene* 1990; 5(10): 1599–601.
26. Chen C, Zhang Y, Zhang L, et al. MicroRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer *J Cell Mol Med* 2011; 15: 14–23.
27. Yang B, Li SZ, Ma L, et al. Expression and mechanism of action of miR-196a in epithelial ovarian cancer. *Asian Pac J Trop Med* 2016; 11: 1105–1110.
28. Fan Y, Fan J, Huang L, et al. Increased expression of microRNA-196a predicts poor prognosis in human ovarian carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(4): 4132–4137.
29. Song ZS, Wu Y, Zhao HG, et al. Association between the rs11614913 variant of miRNA-196a-2 and the risk of epithelial ovarian cancer. *Oncol Lett* 2016; 11(1): 194–200.
30. Dai F, Zhang Y, Chen CY. Involvement of miR-29b signaling in the sensitivity to chemotherapy in patients with ovarian carcinoma. *Human Pathology* 2014; 45: 1285–1293.
31. Helleman J, Jansen MP, Span PN, et al. Molecular profiling of platinum resistant ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2006 Apr 15; 118(8): 1963–71.
32. Howard HJ, Frolov A, Tzeng D CW, et al. Epigenetic downregulation of the DNA repair gene MED1/MBD4 in colorectal and ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 1–7.
33. Shin N, You KT, Lee H, et al. Identification of frequently mutated genes with relevance to nonsense mediated mRNA decay in the high microsatellite instability cancers. *Int J Cancer* 2011 Jun 15; 128(12): 2872–80. doi: 10.1002/ijc.25641.
34. Ni J, Huang Y. Role of polymorphisms in miR-146a, miR-149, miR-196a2 and miR-499 in the development of ovarian cancer in a Chinese population. *Int J Clin Exp Pathol* 2016; 9(5): 5706–5711.