

# Entegre miRNA/mRNA Düzenleyici Ağ Analizi ile Glioblastomada Temozolomid Direnç Faktörlerinin Belirlenmesi

Investigation of the Role of miRNA/mRNA Regulation in Underlying Mechanisms of Temozolomide Resistance in Glioblastoma

Yalda Hekmatshoar<sup>1</sup> , Aynur Karadağ Gürel<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Altınbaş Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul/Türkiye

<sup>2</sup> Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uşak/Türkiye

## ÖZET

**AMAÇ:** Glioblastoma multiforme (GBM), beyin tümörünün en yaygın ve agresif türüdür. Prognozu genellikle kötüdür ve çoğu hasta yalnızca bir yıl kadar hayatta kalır. Hastaların sadece %5'i 5 yıldan daha uzun süre hayatta kalabilmektedir. Temozolomid (TMZ), GBM ve astrositomları tedavi etmek için kullanılan oral alkilleyici bir ajandır ve hastaların en az %50'si TMZ'ye yanıt vermemektedir. TMZ dirençli GBM'de direnci geliştiren moleküler mekanizmaları anlamak, daha iyi teşhis ve tedavi stratejileri geliştirmek için kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada, glioblastomada TMZ'ye direncin altında yatan mekanizmaların düzenlenmesinde miRNA/mRNA'ların rolü araştırılmıştır.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** TMZ dirençli GBM hücreleri ve dirençli olmayan hücreler arasındaki miRNA ve gen ekspresyonunu karşılaştırmak amacıyla GSE100736 ve GSE100775 numaralı iki veri seti Gen Expression Omnibus'tan (GEO) veri tabanından elde edilmiştir. Diferansiyel olarak eksprese edilen genler miRNA'lar ve mRNA'lar GEO2R analiz programı ile tanımlanmıştır. Analizler sonucunda seçilen genler ve miRNA'lar  $P < 0.05$  ve  $|\log_2 FC| > 1$  olarak seçilmiştir. İfade artan ve azalan miRNA'ların hedef genleri ifadesi değişen genler ile karşılaştırılarak GO, KEGG analizleri yapılmıştır. Daha sonra protein-protein etkileşimi (PPI) ağı oluşturmak için STRING 11.5 ve Cytoscape 3.9.1 kullanılmıştır.

**BULGULAR:** Bu ağ analizi yoluyla anahtar genler tanımlanmıştır. GSE100736 numaralı veri analizi sonrasında 5257 genin ifadesinin azaldığı, 1705 genin ifadesinin arttığı, GSE100775 nolu miRNA analizinde 150 miRNA'nın ifadesi artarken 97 miRNA'nın ifadesi azalmıştır. Önemli ölçüde zenginleştirilen ana yollar, kanserde en yüksek sayıda hedef gen, ardından fokal adezyon, PI3K-Akt sinyali, kanserde mikroRNA'lar içeren yolları içermektedir. Kanserdeki yollar, kritik rol oynayan Wnt, p53, VEGF, kalsiyum, HIF-1, PPAR, Notch, PI3K-Akt, MAPK, Östrojen, cAMP, TGF beta, Hedgehog, Jak-STAT ve mTOR yolları gibi farklı sinyal yollarını içermektedir.

**SONUÇ:** GBM direnç patogenezinde yer alan anahtar genlerin belirlenmesi, hastalığın tam olarak anlaşılması ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi açısından önemlidir. Önerilen miRNA'lar GBM için yeni terapötik hedefler ve prognostik biyobelirteçler olarak tahmin edilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** glioblastoma, ilaç direnci, mikroRNA, mRNA, biyoinformatik analiz

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and aggressive type of brain tumor. The prognosis is generally poor, with most patients surviving only about a year. Only 5% of patients can survive beyond five years. Temozolomide (TMZ) is an orally administered alkylating agent used to treat GBM and astrocytomas, but at least 50% of patients do not respond to TMZ. Understanding the molecular mechanisms underlying TMZ resistance in GBM is of critical importance for developing better diagnostic and treatment strategies. This study investigates the role of miRNA/mRNA regulation in the modulation of resistance mechanisms to TMZ in glioblastoma.

**MATERIALS AND METHODS:** Two datasets, GSE100736 and GSE100775, were obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database to compare miRNA and gene expression between TMZ-resistant and non-resistant GBM cells. Differentially expressed genes and miRNAs were identified using the GEO2R analysis tool, with selected genes and miRNAs having a significance level of  $P < 0.05$  and  $|\log_2 FC| > 1$ . Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses were conducted by comparing the target genes of upregulated and downregulated miRNAs with genes showing altered expression. Subsequently, STRING 11.5 and Cytoscape 3.9.1 were used to create a protein-protein interaction (PPI) network.

**RESULTS:** Key genes were identified through network analysis. After analyzing the GSE100736 dataset, 5257 genes were found to be downregulated, and 1705 genes were upregulated. In the GSE100775 miRNA analysis, the expression of 150 miRNAs increased, while 97 miRNAs decreased. Significantly enriched pathways included pathways with the highest number of target genes in cancer, followed by focal adhesion, PI3K-Akt signaling, and pathways involving microRNAs in cancer. Cancer pathways

**Yazışma Adresi/Address for Correspondence:** Aynur Karadağ Gürel, Uşak Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Uşak/ Türkiye

**E-Posta/E-Mail:** aynur.karadag@usak.edu.tr || Tel: +90 532 682 1113

**Received/Geliş Tarihi:** 04.12.2023 || **Accepted/Kabul Tarihi:** 27.12.2023

Bu Eser Creative Commons Atıf-Gayriticarî 4.0 Uluslararası Lisansı ile Lisanslanmıştır. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).



encompassed various signaling pathways critical in cancer, such as Wnt, p53, VEGF, calcium, HIF-1, PPAR, Notch, PI3K-Akt, MAPK, estrogen, cAMP, TGF-beta, Hedgehog, Jak-STAT, and mTOR pathways.

**CONCLUSION:** Identification of key genes involved in GBM resistance pathogenesis is crucial for a comprehensive understanding of the disease and the development of targeted therapies. The proposed miRNAs could be predicted as new therapeutic targets and prognostic biomarkers for GBM.

**Keywords:** glioblastoma, drug resistance, microRNA, mRNA, bioinformatic analysis

## GİRİŞ

Glioblastoma multiforme (GBM), beyin kanseri ölümünün ana nedenini oluşturan, en yaygın ve kötü huylu glioma türüdür ve tanıdan itibaren ortalama hasta sağ kalımı yaklaşık 15 ay olarak bildirilmiştir (1). ABD'de kansere bağlı ölümlerin 12. önde gelen nedeni olarak kabul edilmektedir (2). GBM'nin tedavisi cerrahi, kemoterapi ve radyasyon terapilerini içermektedir, ancak kemoterapötik ajanlara direnç ve ameliyat sonrası yüksek nüks sıklığı, bu hastalığın terapötik müdahalesinde zorluk oluşturmaktadır (3). Son birkaç on yılda GBM araştırmalarında ilerlemeler olmasına rağmen GBM'nin moleküler belirleyicileri tam olarak anlaşılabilmiştir. Bu nedenle, erken tanıya ve bu hastalıkla mücadele için yeni stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olabilecek GBM'nin başlangıcı ve ilerlemesine ilişkin açık bir mekanizmanın tanımlanması ve oluşturulması önemlidir. mikroRNA'lar (miRNA'lar) 1993'te keşfedilmiş olsa da, kanser ile olan ilişkileri ilk kez 2002'de rapor edilmiştir. MiRNA'lar, mRNA'nın 3' çevrilmemiş bölgelerindeki bağlanma bölgelerinin kısmi tamamlayıcılığı yoluyla gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde rol oynayan, 17-25 bp arasında değişen, kodlamayan küçük RNA'lardır (4). mikroRNA'lar, mRNA bölünmesi veya transkripsiyonel baskılama yoluyla gen ekspresyonunu düzenleyebilir (5). Bazı miRNA'lar, onkogenleri aşağı doğru düzenleyerek tümör baskılayıcı olarak görev yapabilirken, oncomir olarak adlandırılan diğerleri, tümör baskılayıcı genlerin ekspresyon seviyelerini düşürerek tümör oluşumunu teşvik etme görevi görmektedir (6). MirBase'e göre insanlarda 1.917 öncü ve 2.654 olgun miRNA bulunmaktadır; her bir miRNA, birkaç mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebilir. Bu mRNA'ların her biri, farklı miRNA'lar tarafından düzenlenir; bu, mRNA'ları ve onun miRNA düzenleyicilerini haritalamak için odaklanmış bir çalışma gerektiren çok karmaşık bir düzenleyici mekanizmanın varlığına işaret eder. Düzensiz miRNA ekspresyon modelleri, pankreas, meme, kolon, akciğer ve cilt kanserleri gibi çok çeşitli insan malignitelerinde ve hastalıklarında gözlemlenmiştir (7, 8, 9, 10).

GBM modellerinde miRNA paternlerinin oluşturulmasına yönelik çalışmalar devam etse de tanı ve prognostik amaçlarla kullanılabilecek yeni biyobelirteçlerin belirlenmesi henüz karşılanmamış çok önemli bir ihtiyaçtır. Bu nedenle mevcut çalışma, GEO veri tabanından toplanan TMZ dirençli GBM hücrelerinde miRNA ekspresyon profili ve mRNA veri setlerinin araştırılmasına ve ardından ilaca direnç gösteren ve göstermeyen ve GBM hücreleri arasında farklı şekilde eksprese edilen miRNA'ların tanımlanmasına odaklanmıştır. Ayrıca, bu çalışma aynı zamanda GBM gelişimi ve ilerlemesinin altında yatan mekanizmanın daha iyi anlaşılması için hedeflerinin araştırılmasını ve hedef gen etkileşim ağlarının inşasını da ayrıntılarıyla anlatmaktadır. Son zamanlarda biyoinformatik analiz, çeşitli hastalıkların potansiyel moleküler mekanizmalarını ve terapötik hedeflerini incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (8, 9, 10). Artan sayıda miRNA/mRNA çiftinin, yüksek verimli mikrodizin ve biyoinformatik analiz yoluyla çeşitli kanser süreçlerinde önemli roller oynadığı bulunmuştur.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Mikrodizi verileri

Glioblastoma multiforme (GBM), en sık görülen ve ölümcül malign primer beyin tümörüdür. Temozolomid (TMZ), GBM'yi tedavi etmek için umut verici bir kemoterapötik ajandır. Ancak TMZ'ye karşı direnç yüksek sıklıkta hızla gelişir. GBM hücrelerinin TMZ'ye direncinin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılabilmiştir. Kodlamayan RNA'lar birçok kanserde anormal bir şekilde eksprese edilir ve ilaca direnç de dâhil olmak üzere patogenezinde oldukça rol oynamaktadır. GBM hücrelerinin TMZ'ye direncinde miRNA'ların rolünü sistematik olarak incelemek için, miRNA gen ekspresyonu mikrodizilerini kullanarak TMZ'ye dirençli hücre hattının ve TMZ'ye duyarlı hücre hattının gen ekspresyon profillerini oluşturduk. Analiz için GEO veri kümesinden GSE100775 ve GSE100736 erişim numarasına sahip GBM miRNA ekspresyon verileri ve gen ekspresyon verileri seçilmiştir. Mikrodiziler üzerinde RNA ekstraksiyonu ve hibridizasyonu için TMZ'ye dirençli hücreler ve TMZ'ye

duyarlı hücreler kullanılmıştır. Mevcut analizler için GSE100775 nolu veri Phalanx Human miRNA OneArray v7.1 platformuna dayalı olarak gerçekleştirilen miRNA ekspresyon verileri alınmıştır. GSE100736 verisinde, Phalanx Human lncRNA OneArray v1\_mRNA (Agilent-074432) çipini temel alan bir platformda gerçekleştirilmiştir.

#### Mikrodizin veri analizi

GEO2R (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r>), normal örneklerle karşılaştırıldığında GBM örneklerindeki ifadesi değişen miRNA'ları tanımlamak için GEO veri setindeki iki örnek grubunu karşılaştıran çevrimiçi bir araçtır. R platformundaki Bioconductor projesinin iki paketi olan GEOquery ve limma, GEO veri kümelerinden miRNA'ları tespit etmek için sağlanan işlenmiş mikro dizi verilerinin doğru analizini sağlar. Yanlış keşif oranı (FDR), Benjamini-Hochberg yöntemine dayalı olarak düzeltilmiş P değerleri (adj P değeri) uygulanarak en aza indirildi.  $|\log_2 \text{Kat artış Değişimi (logFC)}| > 1$  ve adj P-değeri  $< 0,05$ , örneklerdeki ifadesi artmış veya azalmış miRNA'ların tespiti için kesme değerleri olarak alınmıştır (9,10).

#### MiRNA'ların hedef genlerinin belirlenmesi

MiRNA'ların doğrulanmış hedef genleri, literatürden elde edilen, manuel olarak kütürlüğünde miRNA hedef gen etkileşimlerinin bir veri tabanı olan miRDB (<https://mirdb.org/>) ve MirTarbase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>) kullanılarak ortak olan hedef genler belirlendi (8).

#### Gen ontolojisi (GO) ve yolak analizi

Ek Açıklama, Görselleştirme ve Entegre Keşif Veritabanı (DAVID) (<http://david.ncicf.gov/>), genomik deneylerden elde edilen, gen fonksiyonunun yüksek verimli analizine yönelik bir web aracıdır. Bu çalışmada DAVID, gen ontolojisi (GO) ve Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) yolu analizini gerçekleştirmek için kullanıldı (11). GO, ontoloji terimlerini moleküler fonksiyon, hücresel bileşenler ve biyolojik süreçler halinde sınıflandırır. Belirli yollara haritalanabilecek düzensiz miRNA hedef genlerinin zenginleşmesini tanımlamak için KEGG yolu veri tabanı analizi yapıldı. Hem GO hem de KEGG yolu analizi, önemli zenginleşmenin seçimi için (FDR)  $< 0,05$  olarak seçildi.

#### Hedef genlerin protein etkileşim ağı (PPI) analizi ve küme seçimi

PPI, tahmin edilen ve bilinen protein-protein etkileşimlerinin bir veri tabanı olan Etkileşimli

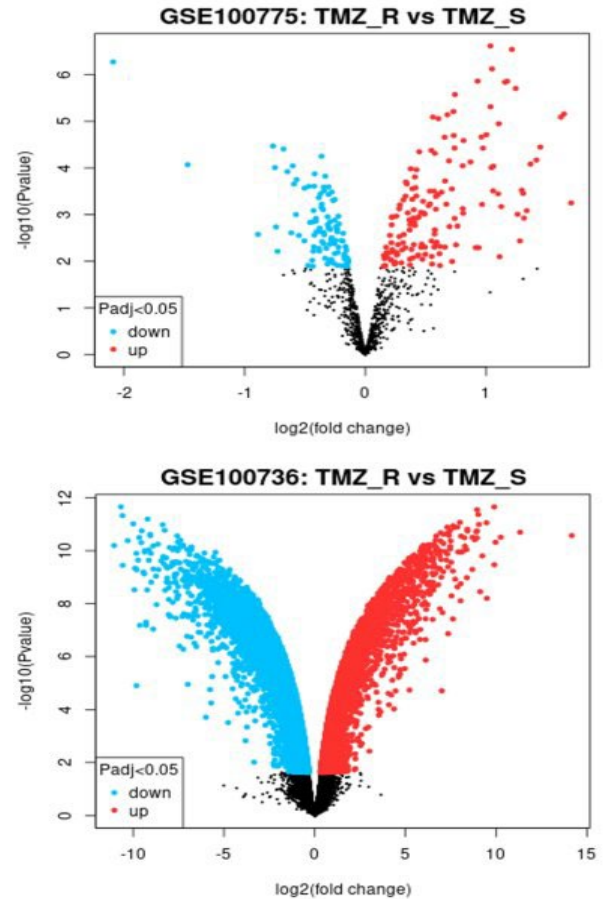
Genlerin/Proteinlerin Alınması için Arama Aracı (STRING, <http://string.embl.de/>) (12) kullanılarak oluşturuldu. PPI ağı yüksek güven puanıyla (güven puanı  $\geq 7$ ) oluşturuldu ve Cytoscape 3.9.1 yazılımıyla görselleştirildi. Ağdaki işlevsel modülleri tespit etmek için bir Cytoscape eklentisi olan Cytohubba kullanıldı (13). Hub gen olarak ilk 10 gen MCC skoruna göre belirlendi.

#### **BULGULAR**

##### İfadesi değişen miRNA ve Genler

Analizler sonucunda seçilen genler ve miRNA'lar  $P < 0.05$  ve  $|\log_2 \text{FC}| > 0$  olarak seçilmiştir. (Tablo 1). GSE100736 nolu veri analizi sonrasında 5257 genin ifadesinin azaldığı 1705 genin ifadesinin GSE100775 nolu miRNA analizinde 247 miRNA ifadesinde değişiklik olmuştur. MiRNA ve mRNA verilerine ait volkanoblot şekilleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Bunlardan 150 miRNA'nın ifadesi artarken 97 miRNA'nın ifadesi azalmıştır arttığı görülmüştür. İfadesi en çok artan ve azalan ilk 10 miRNA Tablo 1'de verilmiştir. GSE100736 nolu veri analizi ile ifadesi en çok değişen ilk 20 gen Tablo 2'de verilmiştir.

**Şekil 1.** GSE100775 ve GSE100736 nolu verilere ait volkanoblot şekilleri. Kırmızı noktalar artan mavi noktalar azalan gen ve miRNA'ları göstermektedir.



MiRNA gen düzenleyici ağının tanımlanması

MiRNA'lar translyasyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynadığından, artan ve azalan 3 miRNA'nın (Tablo 1) hedef genlerine bakılmıştır. MiRNA'ların hedef genlerine miRDB ve MirTarbase'in veri tabanlarının ortak genleri ile ulaşılmıştır ve GSE100736 nolu veri analizi sonucu elde edilen artan azalan gen verileri ile

karşılaştırılmıştır. MiRNA'lar ve hedef gen sayıları Tablo 3'de verilmiştir. Daha sonra hedef genler ile mRNA datasında ifadesi artan ve azalan genler karşılaştırılmıştır. MiRNA ve hedef mRNA arasındaki ifadenin ters bir ilişkisi vardır. İfadesi artan miRNA'ların hedef genleri ile ifadesi azalan genler ve ifadesi azalan miRNA'ların hedef genleri ile de ifadesi artan genler karşılaştırılmıştır. İfadesi artan ve azalan ilk 3 miRNA'nın hedef gen sayıları Tablo 3'te verilmiştir.

**Tablo1.** İfadesi en çok değişen ilk 10 miRNA

İfadesi azalan miRNA'lar				İfadesi artan miRNA'lar			
miRNA_ID	adj.P.Val	P.Value	logFC	miRNA_ID	adj.P.Val	P.Value	logFC
hsa-miR-9-5p	0,000169	5,29E-07	-2	hsa-miR-106b-5p	0,006619	5,67E-04	1,7
hsa-miR-4259	0,002271	8,54E-05	-1,4	hsa-miR-193b-3p	0,000518	6,95E-06	1,6
hsa-miR-4632-5p	0,017284	2,64E-03	-0,8	hsa-miR-17-5p	0,000518	8,10E-06	1,6
hsa-miR-9-3p	0,001384	3,39E-05	-0,7	hsa-miR-92a-3p	0,001384	3,56E-05	1,4
hsa-miR-92b-5p	0,002316	9,85E-05	-0,7	hsa-miR-19b-3p	0,002031	6,78E-05	1,4
hsa-miR-3665	0,013367	1,84E-03	-0,7	hsa-miR-6765-3p	0,008164	8,27E-04	1,3
hsa-miR-4530	0,030175	6,11E-03	-0,7	hsa-miR-1260b	0,010126	1,19E-03	1,3
hsa-miR-138-5p	0,00139	3,92E-05	-0,6	hsa-miR-20a-5p	0,004936	3,53E-04	1,3
hsa-miR-1908-5p	0,002622	1,20E-04	-0,6	hsa-miR-106a-5p	0,00465	3,02E-04	1,2
hsa-miR-22-3p	0,016412	2,45E-03	-0,6	hsa-miR-3175	0,022019	3,66E-03	1,2

**Tablo2.** İfadesi en çok artan ve azalan ilk 20 gen

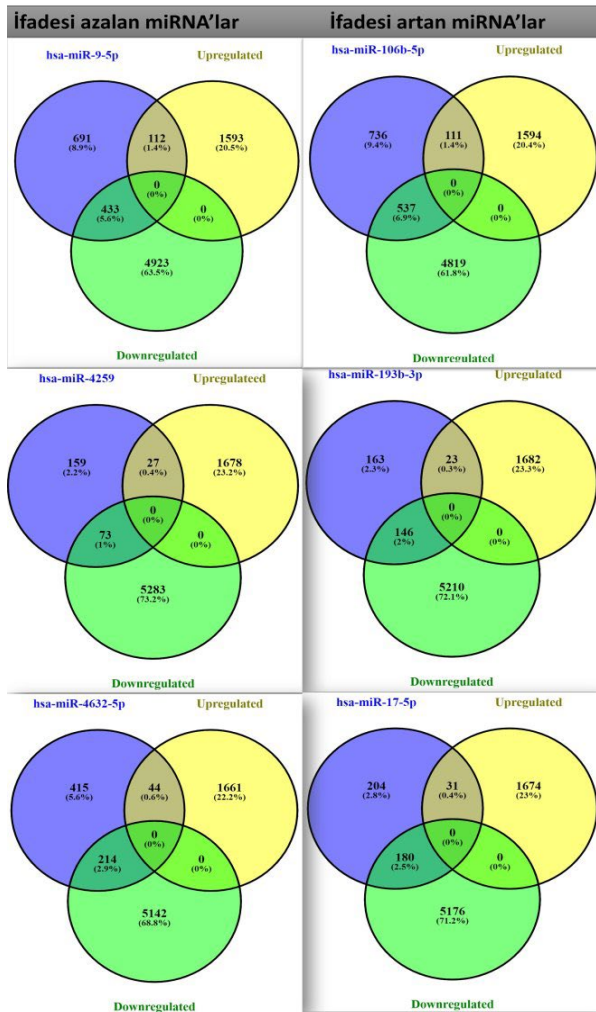
İfadesi azalan genler				İfadesi artan genler			
Gen sembolü	adj.P.Val	P.Value	logFC	Gen Sembolü	adj.P.Val	P.Value	logFC
SOX2	6,13E-08	6,34E-11	-11	H19	4,68E-08	2,66E-11	14
SPP1	4,66E-08	2,17E-12	-10	C4BPB	4,66E-08	2,00E-11	11
UCHL1	4,66E-08	-10	-10	CDKN2C	4,73E-08	3,09E-11	10
GJA1	1,07E-07	3,55E-10	-10	KRT17	5,73E-08	4,80E-11	9,9
COL1A2	4,66E-08	9,54E-12	-10	S100P	4,66E-08	2,19E-12	9,9
IRX1	3,38E-07	3,00E-09	-9,94	CDA	1,04E-07	3,37E-10	9,9
LYPD1	1,25E-07	4,58E-10	-9,9	MAOB	5,30E-07	6,29E-09	9,49
IGFBP2	7,00E-08	1,26E-10	-9,83	STEAP4	4,66E-08	8,69E-12	9,47
EPHA3	4,73E-08	3,17E-11	-9,67	CHCHD10	8,11E-08	1,56E-10	9,24
KHDRBS3	2,63E-06	6,64E-08	-9,64	FAF1	3,77E-07	3,53E-09	9,12
PLAU	5,77E-08	4,93E-11	-9,56	MIF	4,66E-08	1,01E-11	9,05
TENM2	4,66E-08	1,76E-11	-9,54	WISP2	4,66E-08	4,23E-12	9,01
RARB	1,49E-07	6,41E-10	-9,44	MARC1	4,66E-08	2,79E-12	8,95
AUTS2	6,76E-08	1,12E-10	-9,38	SERPINB1	4,66E-08	1,76E-11	8,94
NRN1	6,66E-08	9,91E-11	-9,37	SLPI	4,73E-08	3,27E-11	8,94
BCHE	2,64E-06	6,68E-08	-9,29	ALPP	4,66E-08	1,94E-11	8,9
GPM6A	3,40E-07	3,03E-09	-9,24	HSPA1A	5,31E-08	3,82E-11	8,82
NEFL	4,66E-08	6,33E-12	-9,21	SLC43A3	4,73E-08	3,12E-11	8,69
CNN3	6,47E-08	9,29E-11	-9,16	EREG	1,30E-07	5,09E-10	8,69
PTN	9,03E-08	2,27E-10	-9,15	KYNU	4,66E-08	1,53E-11	8,42

**Tablo 3.** İfadesi değişen ilk 3 miRNA'ların hedef gen sayısı

İfadesi azalan miRNA'lar		İfadesi artan miRNA'lar	
miRNA_ID	Hedef gen sayısı	miRNA_ID	Hedef Gen sayısı
hsa-miR-9-5p	1236	hsa-miR-106b-5p	1384
hsa-miR-4259	259	hsa-miR-193b-3p	332
hsa-miR-4632-5p	673	hsa-miR-17-5p	1333

En çok ifadesi artan hsa-miR-106b-5p'nin hedef genleri ile ifadesi azalan genler karşılaştırıldığında 1384 hedef gen 537 tanesinin ifadesi azalan genler olduğu ortaya çıkmıştır. Hsa-miR-193b-3p'nin 332 hedef geninden 146'sı yine ifadesi azalan genlerle örtüşürken hsa-miR-17-5p'in 415 hedef genin 180'i ifadesi azalan genlerle örtüşmüştür. İfadesi azalan miRNA'lardan hsa-miR-9-5p'in 1236 hedef gen 112 ifadesi artan genle, hsa-miR-4259'un 259 hedef geninden 27'si ve hsa-miR-4632-5p'nin 673 hedef geninden 44'ü ifadesi artan genlerle örtüşmüştür. MiRNA'ların hedef genlerinin ifadesi artan ve azalan genler ile karşılaştırılması Şekil 2'de verilmiştir.

**Şekil 2.** İfadesi azalan miRNA'ların Hedef genlerinin ifadesi artan ve azalan genler ile karşılaştırılması ve ortak genler



Gen ontolojisi (GO) fonksiyonel açıklaması ve hedef genlerin yol zenginleştirilmesi

Hedef genlerin ifadesi değişen genlerle örtüşen genlerin biyolojik yollar hakkında bilgi edinmek için, genomik deneylerden elde edilen genlerin işlevsel açıklamalarına yönelik internet üzerinden erişilebilen bir program olan DAVID yazılımını kullanarak GO kategorileri ve yolak zenginleştirme analizi yapıldı. Gen listesi, biyolojik süreç (BP), hücresel bileşen (CC) ve moleküler fonksiyon (MF) gibi alt ontolojiler halinde gruplandırılan farklı GO terimlerinde zenginleştirme açısından analiz edildi. Hsa-miR-4259 (27 örtüşen gen) ve hsa-miR-4632-5p (44 örtüşen gen) yollarına dağılmamıştır. Hsa-miR-9-5p'nin gen sayısının azlığından dolayı KEGG yollarına ayrılmamıştır. GO:0031012~extracellular matrix, GO:0030198~extracellular matrix organization, GO:0005788~endoplasmic reticulum lümen, GO:0030199~collagen fibril organization, GO:0005178~integrin binding GO terimlerinde zenginleştiği görülmüştür. Analiz sonuçları hedef genler için önemli GO terimi ve KEGG yolları Tablo 4, 5 ve 6'da verilmiştir.

Önemli ölçüde zenginleştirilen ana yollar, kanserde en yüksek sayıda hedef gen, ardından fokal adezyon, PI3K-Akt sinyali, kanserde mikroRNA'lar içeren yolları içermektedir. Kanserdeki yollar, kritik rol oynayan Wnt, p53, VEGF, kalsiyum, HIF-1, PPAR, Notch, PI3K-Akt, MAPK, Östrojen, cAMP, TGF beta, Hedgehog, Jak-STAT ve mTOR yolları gibi farklı sinyal yollarını içermektedir. İnvazyon ve metastaz, hücre proliferasyonu, adezyon, anjiyogenez, apoptoz ve kemoterapiye dirençteki rolleri vardır. PI3K-Akt sinyali GBM'nin gelişiminde ve ilerlemesinde hayati bir rol oynar. Yolak zenginleştirme analizi böylece GBM gelişiminde bu miRNA'ların önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Farklı ifade edilen miRNA hedef genlerinin PPI ağ yapısı ve modül analizi

Hedef genler arasındaki etkileşimi anlamak için, gerekli minimum etkileşim puanı kriteri yüksek güven (0,4) olarak ayarlanan STRING veritabanı kullanılarak PPI ağı

oluşturuldu. PPI zenginleştirilmesi, miRNA'ların hedef genleriyle ifadesi değişen genlerin ortak olanları üzerinden yapıldı. PPI etkileşim ağı, Cytoscape tabanlı bir eklenti olan

cytohubba kullanılarak hub genlerin tanımlanması için araştırıldı. Her miRNA için 10 hub gen tanımlandı (Şekil 3-4).

**Tablo 4 .Hsa-miR-17-5p 2'nin miRNA -mRNA örtüşen genlerin zenginleştiği GO ve KEGG yolları**

Kategori	Gen Ontolojisi	Gen sayısı	Genler
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006468~protein phosphorylation	14	MAP3K2, EPHA5, EPHA4, BMPR2, LIMK1, PIK3R1, SMAD5, TGFB2, RPS6KA4, CREB1, STK17B, WNK3, MKNK2, AAK1
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005905~clathrin-coated pit	4	BMPR2, AAK1, VLDLR, LDLR
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0030229~very-low-density lipoprotein particle receptor activity	3	VLDLR, LRP8, LDLR
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004672~protein kinase activity	10	MAP3K2, EPHA4, PDK, CCND1, STK17B, LIMK1, WNK3, MKNK2, AAK1, MAP3K14
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005041~low-density lipoprotein receptor activity	3	VLDLR, LRP8, LDLR
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0046872~metal ion binding	37	MTMR3, BMPR2, BNC2, PRDM6, GLIS3, ZBTB20, ZBTB4, ZBTB41, ZC3H12C, LASP1, SALL1, MKNK2, ZNF800, ANKDY1, ITGB8, USP46, ZBTB18, MAP3K2, ANKIB1, ITGA4, OSR1, LIMK1, MEX3D, SMAD5, PGM2L1, TOPORS, TGFB2, CNOT4, REST, RUFY2, MKRN1, CAPRN2, RLIM, TRIM36, ADAM9, WDFY3, CREB5
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004674~protein serine/threonine kinase activity	10	RPS6KA4, MAP3K2, BMPR2, STK17B, LIMK1, WNK3, MKNK2, AAK1, MAP3K14, TGFB2
KEGG_PATHWAY	hsa04360:Axon guidance	11	EPHA5, EPHA4, SEMA7A, FZD3, BMPR2, DPYSL2, SEMA4B, LIMK1, PIK3R1, SSH2, SSH1
KEGG_PATHWAY	hsa04668:TNF signaling pathway	6	RPS6KA4, CREB1, IRF1, PIK3R1, MAP3K14, CREB5
KEGG_PATHWAY	hsa05165:Human papillomavirus infection	9	RBL2, FZD3, CREB1, CCND1, ITGA4, IRF1, ITGB8, PIK3R1, CREB5
KEGG_PATHWAY	hsa04810:Regulation of actin cytoskeleton	7	TIAM1, ITGA4, LIMK1, ITGB8, PIK3R1, SSH2, SSH1
KEGG_PATHWAY	hsa04068:FoxO signaling pathway	5	RBL2, CCND1, S1PR1, PIK3R1, TGFB2
KEGG_PATHWAY	hsa04380:Osteoclast differentiation	5	CREB1, CTSK, PIK3R1, MAP3K14, TGFB2
KEGG_PATHWAY	hsa05203:Viral carcinogenesis	6	RBL2, KAT2B, CREB1, CCND1, PIK3R1, CREB5
KEGG_PATHWAY	hsa04550:Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	5	FZD3, REST, BMPR2, PIK3R1, SMAD5

**Tablo 5. Hsa-miR-193b-3p miRNA -mRNA örtüşen genlerin zenginleştiği GO ve KEGG yolları**

Kategori	Gen Ontolojisi	Gen sayısı	Genler
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006468~protein phosphorylation	11	MAPK10, EPHA5, TGFB2, TAOK1, AAK1, TESK2, PIK3R1, PAK3, PRKACB, ACVR2A, PAK4
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005634~nucleus	55	CLSTN1, UBP1, TESK2, ETS1, PHF6, DCAF7, ING5, ALKBH5, CCND1, ZNF385B, PRKACB, HSBP1, ETV1, SIRT7, HNRNPUL2, SYF2, TBL1XR1, SPOPL, TRIB2, CLOCK, USP13, INO80D, CFBF, ARHGAP19, PIK3R1, ZBTB5, LPP, ATXN1, ERBB4, DHRS7B, TP53INP1, CAMTA1, SF3B1, E2F6, RUNX1T1, CBX7, ZNF582, HACE1, PLEKHA2, MDH2, SIAH1, MICAL2, ARID3B, FLI1, MAPK10, ZBTB6, PER3, ZNF37A, ABI2, ZNF71, NOVA1, TCF4, PDCD2, NF2, CCNJL
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004712~protein serine/threonine/tyrosine kinase activity	9	EPHA5, ERBB4, TAOK1, KIT, AAK1, TESK2, PAK3, PRKACB, PAK4
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004672~protein kinase activity	8	MAPK10, CCND1, TAOK1, AAK1, TESK2, TRIB2, PRKACB, PAK4
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004674~protein serine/threonine kinase	8	MAPK10, TAOK1, AAK1, TESK2, PAK3, PRKACB, ACVR2A, PAK4

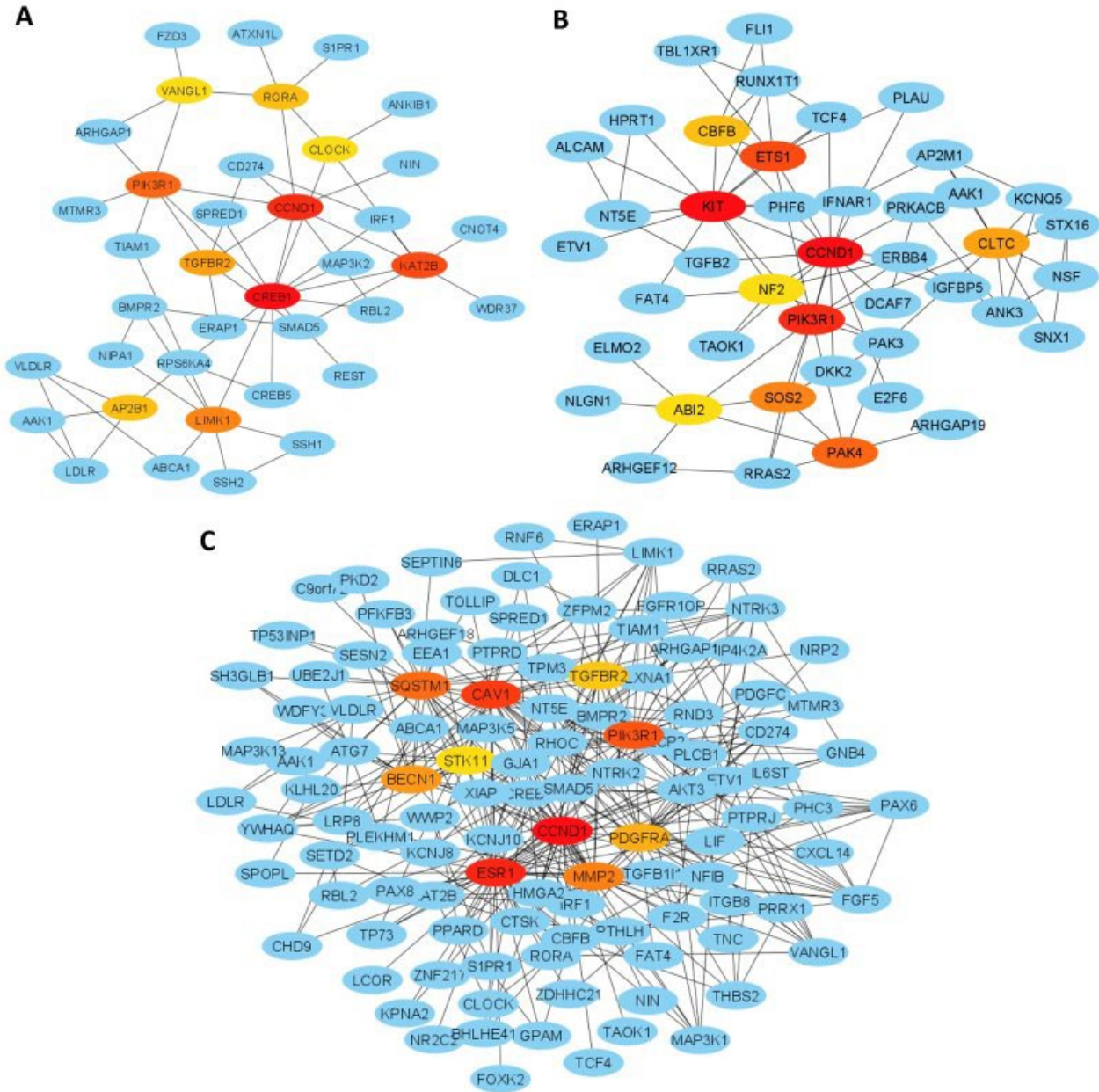
Kategori	Gen Ontolojisi	Gen sayısı	Genler
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	20	ZNF582, CBF, UBP1, ETV1, HOXD13, CTDSPL2, SIRT7, ARID3B, ZBTB5, ETS1, PHF6, FLI1, ZBTB6, ZNF37A, ZNF71, TBL1XR1, CAMTA1, TCF4, CLOCK, E2F6
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0046777~protein autophosphorylation	5	ERBB4, TAOK1, KIT, AAK1, PRKACB
KEGG_PATHWAY	hsa04014:Ras signaling pathway	11	MAPK10, RALGAPB, KIT, RRAS2, PIK3R1, PAK3, RGL1, ETS1, PRKACB, SOS2, PAK4
KEGG_PATHWAY	hsa05200:Pathways in cancer	11	MAPK10, TGFB2, ARHGEF12, CCND1, KIT, PIK3R1, ETS1, PRKACB, SOS2, RUNX1T1, IFNAR1
KEGG_PATHWAY	hsa05205:Proteoglycans in cancer	10	TGFB2, ARHGEF12, CCND1, PLAU, ERBB4, RRAS2, ANK3, PIK3R1, PRKACB, SOS2
KEGG_PATHWAY	hsa04010:MAPK signaling pathway	9	MAPK10, TGFB2, ERBB4, TAOK1, STMN1, KIT, RRAS2, PRKACB, SOS2
KEGG_PATHWAY	hsa04310:Wnt signaling pathway	7	MAPK10, CCND1, TBL1XR1, DAAM2, SIAH1, PRKACB, DKK2
KEGG_PATHWAY	hsa04810:Regulation of actin cytoskeleton	7	ARHGEF12, ABI2, RRAS2, PIK3R1, PAK3, SOS2, PAK4
KEGG_PATHWAY	hsa05211:Renal cell carcinoma	6	TGFB2, PIK3R1, PAK3, ETS1, SOS2, PAK4
KEGG_PATHWAY	hsa04012:ErbB signaling pathway	6	MAPK10, ERBB4, PIK3R1, PAK3, SOS2, PAK4
KEGG_PATHWAY	hsa04510:Focal adhesion	6	MAPK10, CCND1, PIK3R1, PAK3, SOS2, PAK4

**Tablo 6.** Hsa-miR-106b-5p miRNA -mRNA örtüşen genlerin zenginleştiği GO ve KEGG yolları

Kategori	Gen Ontolojisi	Gen sayısı
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	49
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	66
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006468~protein phosphorylation	26
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006914~autophagy	10
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0000785~chromatin	41
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0046872~metal ion binding	90
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005524~ATP binding	59
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003677~DNA binding	52
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0000981~RNA polymerase II transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	49
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003700~transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	29
GOTERM_MF_DIRECT	GO:1990837~sequence-specific double-stranded DNA binding	24
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004712~protein serine/threonine/tyrosine kinase activity	23
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0001228~transcriptional activator activity, RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific binding	20
KEGG_PATHWAY	hsa04151:PI3K-Akt signaling pathway	20
KEGG_PATHWAY	hsa04010:MAPK signaling pathway	17
KEGG_PATHWAY	hsa04810:Regulation of actin cytoskeleton	15
KEGG_PATHWAY	hsa04140:Autophagy - animal	13
KEGG_PATHWAY	hsa04510:Focal adhesion	12
KEGG_PATHWAY	hsa05207:Chemical carcinogenesis - receptor activation	12
KEGG_PATHWAY	hsa04668:TNF signaling pathway	10
KEGG_PATHWAY	hsa04550:Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	10

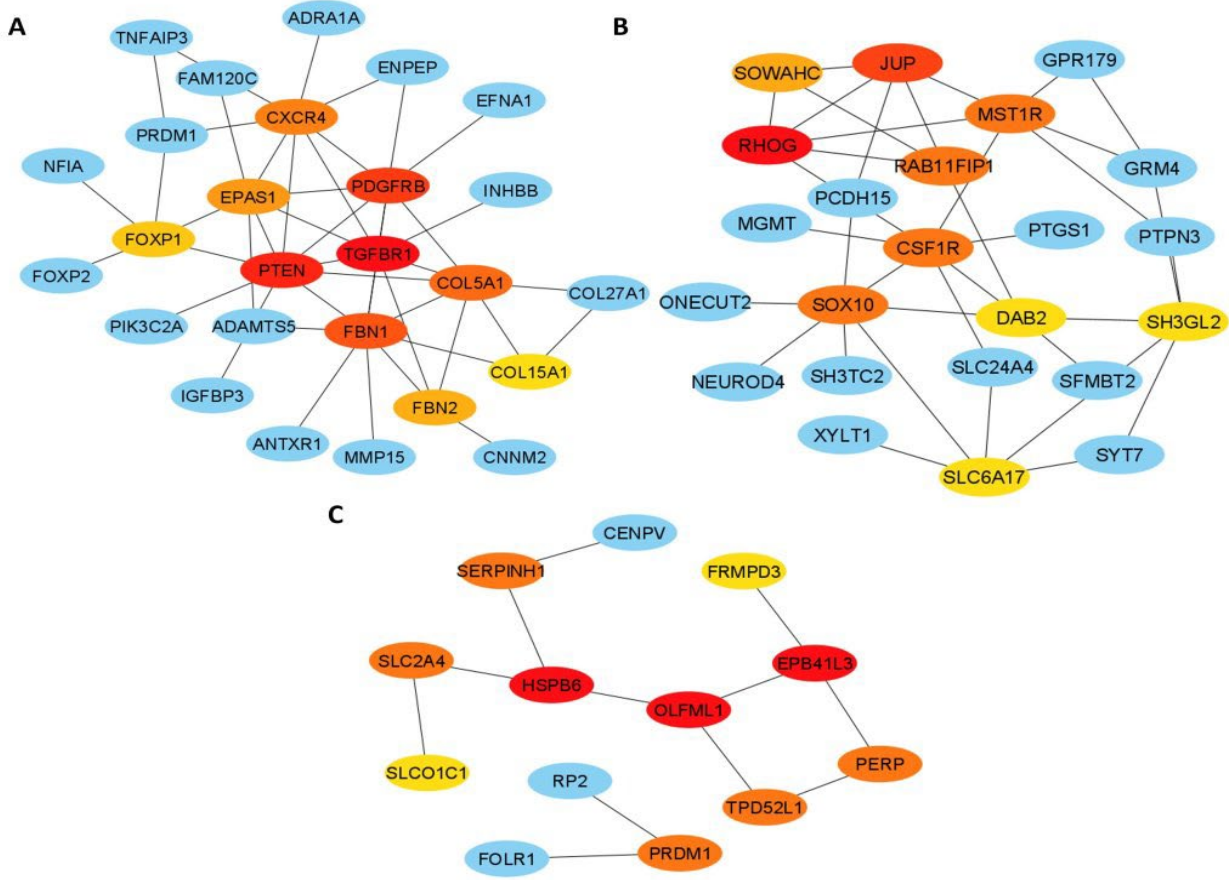


**Şekil 3.** Birlikte ifade edilen DEG'lerin protein-protein etkileşimi. İfadesi artan genlerin Cytoscape cytohubba analizi sonucu öne çıkan 10 hub gen. A. hsa-miR-17-5p'nin cytoscape Cytohubba analizi. B. hsa-miR-193b-3p Cytoscape Cytohubba analizi C. Hsa-miR-106b-5p2nin cytoscape analizi





**Şekil 4.** Birlikte ifade edilen DEG'lerin protein-protein etkileşimi. İfadesi azalan genlerin Cytoscape cytohubba analizi sonucu öne çıkan 10 hub gen. A. hsa-miR-9-5p'nin cytoscape Cytohubba analizi. B. hsa-miR-4632-5p Cytoscape Cytohubba analizi C. Hsa-miR-4259'nin cytoscape analizi



## TARTIŞMA

GBM, hayatta kalma oranının azalması ve yüksek derecede nüksetme ile son derece ölümcül bir beyin kanseri türüdür. Etkili tedavi stratejileri bulmak için önemli çabalar sarf edilmiş olmasına rağmen, hastanın hayatta kalmasında anlamlı bir iyileşme gözlemlenmemiştir (11). Bu nedenle hastalığın ilerlemesinde önemli rol oynayan moleküler belirteçlerin anlaşılmasını gerektiren yeni tedavi yaklaşımlarının belirlenmesine acil ihtiyaç vardır. Tümör baskılayıcı genlerin veya onkogenlerin endojen düzenleyicileri olan miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler, kanserin ilerlemesinde veya gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır (9, 12). GEO'dan alınan mikrodizin ekspresyon verilerinin analizi, GSE100736 nolu veri analizi sonrasında 5257 genin ifadesinin azaldığı 1705 genin ifadesinin GSE100775 nolu miRNA analizinde 247 miRNA ifadesinde değişiklik olmuştur. Bunlardan 150 miRNA'nın ifadesi artarken 97miRNA'nın ifadesi azalmıştır.

İfadesi değişen miRNA'lar arasında en yüksek ortalama azalmış regülasyonu gösteren hsa-miR-9-5p, hsa-miR-4259 ve hsa-miR-4632-5p, artmış regülasyon gösteren ise hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-17-5p ve hsa-miR-193b-3p'nin farklı kanser türlerinin düzenlenmesinde yer aldığı zaten rapor edilmiştir. İfadesi azalan miRNA'lardan hsa-miR-9-5p'nin yüksek oranda korunmuş bir miRNA'dır ve miR-9 ekspresyonunun anormal düzenlenmesinin hastalık patolojisi üzerinde çeşitli etkileri vardır. MiR-9, çeşitli kanserlerde ikili bir tümör baskılayıcı veya oncomiR aktivitesi oynayabilir. Çalışmamızda daha önce GBM ile ilişkili olarak söylenen TGFBR1, PTEN, PDGFRB, FBN1 COL5A1, CXCR4, EPAS1, FBN2, COL15A1, FOXP1 genleri hub genler olarak öne çıkmıştır. Yapılan çalışmalarda SOX2, PTCH1, FOXP1, CAMTA1 genleri miR-9-5p'nin proliferasyon, stemness, kemorezistansa etkili genler olarak ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda bulduğumuz öne çıkan yeni genler daha önce çalışılmamış ilk kez önerilmektedir (13-16). Gen ontoloji analizlerinde ise hücre dışı matrikste önemli genler

zenginleşmiştir. Hsa-miR-4259 ise daha önce GBM de çalışılmamış ilk kez çalışmamızda öne çıkan miRNA'lar arasında çıkmıştır. Hsa-miR-4259 Yanlış eşleşme onarımında görev alan MLH3 ve P53 sinyal yolağında rol alan PERP genlerinin düzenlenmesinde rol alarak hücre çoğalmasını ve metastazını etkileyebilir. GBM TMZ direncinde rol oynayabilir ve prognostik bir biyobelirteç ve terapötik aday olarak hizmet edebilir. Bu çalışmada belirlenen düzensizleşmiş miRNA'lar, gliomaların tümörogenezine ve malign ilerlemesine katkıda bulunur ve ileri düzeydeki glioma patolojik sınıflandırması ve prognozu için kullanışlı işaretçiler olarak hizmet edebilir. Zhu ve ark. 2015, yaptıkları bir çalışmada (17) hsa-miR-4632-5p'nin ifadesi değişen miRNA'lar arasında olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada belirlenen düzensizleşmiş miRNA'lar, gliomaların tümörogenezine ve malign ilerlemesine katkıda bulunacağı ve ileri düzeydeki glioma patolojik sınıflandırması ve prognozu için kullanışlı işaretçiler olarak hizmet edebileceği önerilmiştir. Hsa-miR-4632-5p'nin GBM TMZ direncinde rol oynadığını gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

İfadesi artan miRNA'lardan hsa-miR-106b-5p Shi ve ark., 2022' de (18) yaptıkları çalışmada da çalışmamıza benzer şekilde ifadesi artan miRNA'lar arasında çıkmıştır. Glioblastoma kök hücrelerinin serum kaynaklı farklılaşmasının, bu kümeye ait miRNA'ların ekspresyon seviyelerini azalttığı daha önce gösterilmiştir (19). Brett ve ark., 2011 yetişkin fare nöronal kök/progenitor hücrelerinde miR-106b~25 kümesinin tamamının ekspresyonunun, bunların yeni nöronlar üretme yeteneklerini arttırdığını göstermiştir (20). CD44+ mide kanseri kök benzeri hücrelerinde, kümenin tamamı önemli ölçüde yukarı doğru düzenlenmiştir ve miR-106b'nin inhibisyonu, TGF- $\beta$ /Smad sinyal yolunun baskılanması yoluyla kendini yenileme kapasitesinin ve hücre istilasının azalmasına yol açmıştır (20). Çalışmamızda yapılan entegre analiz sonucunda CCND1, ESR1, CAV1, PIK3R1 SQSTM1, MMP2, BECN1, PDGFRA2 ve STK11 genlerinin düzenlenmesinde rol almaktadır. hsa-miR-17-5p ise en düzensiz miRNA olup GBM'de bilinen bir onko-miRNA'dır (21). Diğer çalışmalarla tutarlı olarak miR-17-5p, GSC proliferasyonunu uyardığı için GSC'lerde yüksek oranda eksprese edilmiştir (22-24). GBM'de miR-17-92 kümesi yüksek oranda eksprese edilir ve kötü prognozla ilişkilidir (21). Düzenlediği hub genler ise KIT, CCDN1, PIK3R1, ETS1, PAK4, SOS2, CLTC, CFBF, ABI2 ve NF2

genleri olarak öne çıkmıştır. TMZ direncinde rol oynadıkları önerilmektedir. Son olarak ifadesi artan bir diğer miRNA hsa-miR-193b-3p'dir. hsa-miR-193b-3p'nin, glioma ve kolorektal kanserde daha yüksek ekspresyonunun keşfedilmesine rağmen bir tümör baskılayıcı olduğu görülmektedir (25-26) . Hsa-miR-193b'nin azalmış ekspresyon seviyeleri prostat, akciğer, pankreas, mide ve karaciğer kanserlerinin yanı sıra kanser hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu, invazivliği veya metastazı üzerinde inhibe edici bir etki gösterdiği melanomda da gözlenmiştir (27-29). Çalışmamızda hsa-miR-193b'nin ifadesinin arttığı ve özellikle hücre canlılığı hem de çoğalması üzerinde etkili yollarda zenginleştiği görülmüştür.

## SONUÇ

TMZ, DNA'nın alkalileştirici bir maddesidir ve erken insan glioma gelişimi olasılığını azaltır. GBM'yi tedavi etmek için olası bir ilaçtır, ancak günümüzde TMZ kullanmanın hastaların ilaca direnç geliştirmesi gibi bir dezavantajı vardır. Bu nedenle, ilaç direncinde yer alan önemli düzenleyicilerin ve düzenleyici süreçlerin tutarlı bir şekilde anlaşılması önemlidir. Bu çalışma, mRNA'ların ekspresyonunu düzenleyen miRNA'ların önemini ortaya koymaktadır. Bu mRNA'lar, kanser hücrelerinin işlevinde ve ilaca dirençli hale gelmesinde önemli rol oynamaktadırlar.

Etik: Metodolojik olarak bu çalışma etik kurul onayı gerektirmemektedir.

Yazar katkı durumu; Çalışmanın konsepti; YH, AKG, dizaynı; YH, AKG, Literatür taraması; YH, AKG, verilerin toplanması ve işlenmesi; YH, AKG, istatistik; YH, AKG, yazım aşaması; YH, AKG.

Author contribution status; The concept of the study; YH, AKG, design; YH, AKG, literature review; YH, AKG, collecting and processing data; YH, AKG, statistics; YH, AKG, writing phase; YH, AKG.

Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

The author declares no conflict of interest.

Finansal Destek: yoktur / Funding: none

doi: <https://doi.org/10.33713/egetbd.1400022>

## KAYNAKLAR

1. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2014;23:1985-96.

2. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol* 2013;15
3. Nicholas MK. Glioblastoma multiforme: evidence-based approach to therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007;7:S23-7.
4. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215-33.
5. Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: processing, maturation, target recognition and regulatory functions. *Mol Cell Pharmacol* 2011;3:83-92.
6. Luo JW, Wang X, Yang Y, et al. Role of micro-RNA (miRNA) in pathogenesis of glioblastoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015;19:1630-9.
7. Chou CH, Shrestha S, Yang CD, et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 2018;46:D296-302.
8. Karadağ Gürel A, Gürel S. To detect potential pathways and target genes in infantile Pompe patients using computational analysis. *Bioimpacts*. 2022;12(2):89-105. doi: 10.34172/bi.2022.23467. Epub 2022 Jan 22. PMID: 35411297; PMCID: PMC8905584.
9. KARADAĞ A, GÜREL S (August 1, 2022) Pediatrik Obezite ile ilişkili Anahtar Genlerin ve Yolakların Tanımlanması. *Ege Tıp Bilimleri Dergisi* 5 2 51-57.
10. Gürel AK, Gürel S. Identification of novel potential molecular targets associated with pediatric septic shock by integrated bioinformatics analysis and validation of in vitro septic shock model. *J Surg Med*. 2022;6(12):932-938.
11. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44-57.
12. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 2015;43:D447-52.
13. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003;13:2498-504.
14. Sun Q, Dong H, Li Y, Yuan Fe, Xu Y, Mao S, Xiong X, Chen Q, Liu B. Small GTPase RHOE/RND3, a new critical regulator of NF- $\kappa$ B signalling in glioblastoma multiforme? *Cell Prolif*. 2019; 52(5):e12665.
15. Yuan Y, Li J, Xiang W, Liu Y, Mao Q. Analyzing the interactions of mRNAs, miRNAs, lncRNAs and circRNAs to predict competing endogenous RNA networks in glioblastoma. *J Neurooncol*. 2018;137(3):493-502.
16. Malzkorn B, Wolter F, Liesenberg M, Grzendowski K, Stuhler H, E. Meyer, et al. 2010. Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. *Brain Pathol*. 20: 539-550.
17. Munoz, J. L., S. A. Bliss, S. J. Greco, S. H. Ramkissoon, K. L. Ligon, and P. Rameshwar. 2013. Delivery of functional anti-miR-9 by mesenchymal stem cell-derived exosomes to glioblastoma multiforme cells conferred chemosensitivity. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2: e126.
18. Jeon, H. M., Y. W. Sohn, S. Y. Oh, S. H. Kim, S. Beck, S. Kim, et al. 2011. ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9\*-mediated suppression of SOX2. *Cancer Res*. 71: 3410-3421.
19. Schraivogel, D., L. Weinmann, D. Beier, G. Tabatabai, A. Eichner, J. Y. Zhu, et al. 2011. CAMTA1 is a novel tumour suppressor regulated by miR-9/9\* in glioblastoma stem cells. *EMBO J*. 30: 4309-4322.
20. Zhu, X., P., Mou K. J., Xu O.F., et al. Microarray analysis of the aberrant microRNA expression pattern in gliomas of different grades *ONCOLOGY REPORTS* 34: 318-324, 2015.
21. Shi Y, Zhang B, Zhu J, Huang W, Han B, Wang Q, Qi C, Wang M, Liu F. miR-106b-5p Inhibits IRF1/IFN- $\beta$  Signaling to Promote M2 Macrophage Polarization of Glioblastoma. *Onco Targets Ther*. 2020 Jul 30;13:7479-7492.
22. Aldaz, B. et al. Involvement of miRNAs in the differentiation of human glioblastoma multiforme stem-like cells. *PLoS One* 8, e77098 (2013).
23. Brett, J. O., Renault, V. M., Rafalski, V. A., Webb, A. E. & Brunet, A. The microRNA cluster miR-106b-25 regulates adult neural stem/progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *Aging* 3, 108-124 (2011).
24. Gruszka R., Zakrzewska M. The Oncogenic Relevance of miR-17-92 Cluster and Its Paralogous miR-106b-25 and miR-106a-363 Clusters in Brain Tumors. *Int. J. Mol. Sci*. 2018;19:879.
25. Ernst A., Campos B., Meier J., Devens F., Liesenberg F., Wolter M., Reifenberger G., Herold-Mende C., Lichter P., Radlwimmer B. De-repression of CTGF via the miR-17-92 cluster upon differentiation of human glioblastoma spheroid cultures. *Oncogene*. 2010;29:3411-3422.
26. Schraivogel D., Weinmann L., Beier D., Tabatabai G., Eichner A., Zhu J.Y., Anton M., Sixt M., Weller M., Beier C.P., et al. CAMTA1 is a novel tumour suppressor regulated by miR-9/9\* in glioblastoma stem cells. *EMBO J*. 2011;30:4309-4322.
27. Li H., Yang B.B. Stress response of glioblastoma cells mediated by miR-17-5p targeting PTEN and the passenger strand miR-17-3p targeting MDM2. *Oncotarget*. 2012;3:1653-1668. doi: 10.18632/oncotarget.810.
28. Khordadmehr, M.; Shahbazi, R.; Sadreddini, S.; Baradaran, B. MiR-193: A New Weapon against Cancer. *J. Cell. Physiol*. 2019, 234, 16861-16872.
29. Zhong, Q.; Wang, T.; Lu, P.; Zhang, R.; Zou, J.; Yuan, S. MiR-193b Promotes Cell Proliferation by Targeting Smad3 in Human Glioma. *J. Neurosci. Res*. 2014, 92, 619-626.