



Ruksolitinib ile Engellenen Glioblastoma İnvazyonunda AnjiyomiR'lerin Ekspresyon Profili

The Expression Profiles of Angio-miRs in Glioblastomas Invasion Inhibited by Ruxolitinib

Emre DELEN¹, Oğuzhan DOĞANLAR²

¹Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

²Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

ÖZ

Amaç: MikroRNA'lar (miR), insan genomunda gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rolü olan düzenleyicilerdir. Son yıllarda anjiyogenezde rol oynayan spesifik bir miR grubu tanımlanmış (anjiyo-miR) ve bazı anjiyo-miR'lerin gliomalarda etkin rol oynadıkları ortaya konmuştur. Bu çalışmada, glioblastoma hücrelerindeki anjiyo-miR'lerin ifade değerlerindeki değişiklikleri ve bu değişikliklerin invazyon ve tümör büyümesi ile ilişkisini araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, insan glioblastoma hücre hattı U-87 MG kullanılarak glioblastoma tümör sferoidleri elde edildi. Matrigel yöntemi ile tümör sferoidlerine 48 saat süresince 50 nM, 100 nM and 200 nM ruksolitinib uygulandı. Kırk sekiz saat tedaviden sonra glioblastoma tümör sferoidlerinde tümör hacmi ve invazyon oluşumu relatif yüzde tümör gelişimi ve relatif yüzde invazyon alanı ölçüldü. Aynı zamanda, niceliksel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) analizi yapıldı ve miR ifade değerleri belirlendi. Farklı şekillerde ifade edilen miRNA'ların modelini görüntülemek için normalize edilen miRNA ifade değerleri kullanılarak heatmap ve volcano plot analizleri ile seçilen en önemli (importance features) miRNA'lar gösterildi.

Bulgular: Tümör sferoidlerine 50 nM, 100 nM ve 200 nM ruksolitinib uygulamasının tümör hacmi ve invazyon üzerine etkisi değerlendirildiğinde, uygulanan her dozda anlamlı fark saptandı. Ancak 200 nM ruksolitinib dozunda tümör yayılımını engelleyici etkisinin en yüksek olduğu gözlemlendi. 200 nM ruksolitinib uygulaması ile qRT-PZR testi ile elde edilen miR ifade değerleri incelendiğinde 10 miR'nin ifade değerlerinin arttığı, 4 tanesinin ifade değerlerinin ise azaldığı belirlendi.

Sonuç: Sonuç olarak anjiyo-miR ifade değerleri gliomaların prognostik sürecini daha iyi anlamamızı sağlayabilmeleri açısından önemlidirler. Çoklu susturma özellikleri sayesinde glioblastomalar için yeni terapötik hedefler ve prognostik biyobelirteçler olarak kullanılabilmesi açısından ileri çalışmalarla kliniğe katkı sağlayabilirler.

Anahtar Kelimeler: miR, glioblastoma, anjiyogenez, invazyon

ABSTRACT

Aim: MicroRNAs (miR) have an essential role on the regulated gene expression in the human genome. In recent years, a specific miR group was called to angio-miRs due to their role in the angiogenesis, and recent study showed that they involved in the pathogenesis of gliomas. In this study, we investigated the changes in the expression profiles of angio-miRs in glioblastoma cells and identified relationship between these genes and invasion and tumor growth.

Materials and Methods: In this study, glioblastoma tumor spheroids were obtained using the human glioblastoma cell line U-87 MG. 50 nM, 100 nM and 200 nM ruxolitinib were applied to tumor spheroids for 48 hours by using Matrigell method. Tumor volume and invasion formation relative % tumor growth and relative % invasion area were measured in glioblastoma tumor spheroids after 48 hours of treatment. At the same time, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PZR) analysis was performed and miR expression profiles were determined. The most important (importance features) miRNAs selected along with the heatmap and volcano plot analyzes were used to display the pattern of the differentially expressed miRs using normalized miR expression profiles.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Emre DELEN, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

Tel.: +90 530 614 46 46 **E-posta:** emredelen1979@yahoo.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0001-5573-9492

Geliş tarihi/Received: 07.09.2021 **Kabul tarihi/Accepted:** 13.10.2021

Results: When the effect of 50 nM, 100 nM and 200 nM ruxolitinib administration to tumor spheroids on tumor volume and invasion was evaluated, a significant difference was found at each dose applied. However, at the dose of 200 nM ruxolitinib, it was observed that the inhibitory effect of tumor invasion was the highest. When miR expression profiles obtained by qRT-PZR test with 200 nM ruxolitinib administration were evaluated, it was determined that the expression profiles of 10 miRs increased and the expression profiles of 4 miRs decreased.

Conclusion: In conclusion, angio-miR expression profiles are important because they enable us to better understand the prognostic process of gliomas. Because of their multiple silencing properties, they may contribute to the clinic with further studies in terms of their use as new therapeutic targets and prognostic biomarkers for glioblastoma.

Keywords: miR, glioblastoma, angiogenesis, invasion

GİRİŞ

MikroRNA'lar (miR) 21-25 nükleotid uzunluğunda tek iplikli, insan vücudunda yer alan küçük RNA dizileridir. Protein kodlamayan bu küçük RNA dizileri, protein sentezinin post-transkripsiyonel modifikasyon basamağında gen ifadesini engelleyerek fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol alırlar¹. Bu patolojik süreçler arasında, glioblastomalar dahil olmak üzere pek çok kanser türü yer alır². miR'lerin bu patolojiler ile yakın ilişkisi, bunların yeni tedavi ajanları olarak öne sürülmesine yol açmıştır³. Güncel çalışmalar bu küçük RNA'ların sadece tedavi aşamasında değil, değişen ifade değerleri ile biyo-belirteç olarak da kullanılabileceğini ortaya koymaktadır⁴. Sonuç olarak son yıllarda, miR'ler, özellikle tedavi edilemeyen kanser çeşitleri için laboratuvar ve klinik çalışmalar da sık çalışılan konulardan biri haline gelmiştir¹⁻⁴.

Glioblastomalar; glial hücrelerden köken alan, hızlı büyüyen, gelişen teknolojik imkanlara rağmen agresif yapısı ile halen ölümcül seyreden beyin kanserlerindendir. Sahip oldukları heterojen moleküler özellikleri ile 100'den fazla alt tipi tanımlansa da hepsinin ortak özelliği yüksek anjiyogenetik ve invazyon kapasiteleridir^{5,6}. Glioblastoma hücreleri, etrafında yer alan sağlam beyin dokusuna invazyon yapar ve peşi sıra gerçekleşen anjiyogenezis ile yayılırlar. Bu agresif yayılımın glioblastomaların tedavisindeki temel güçlüğün nedeni olduğu düşünülmektedir⁷. Buradan yola çıkarak, hastalığın tedavisinde, bu yüksek anjiyogenetik süreçte dahil olan sitokinleri ve ilişkili sinyalizasyon yollarını hedef almak akılcı bir yol olarak görülmektedir. Ancak, bu tedavi girişimlerine ait faz-2 ve faz-3 çalışmalar yapılmış, bazı olumlu sonuçlar elde edilse de henüz rutin tedaviye girmiş bir tedavi protokolü belirlenememiştir⁸. Bunun için gliomaların yüksek anjiyogenik ve invazyon özelliklerinin altında yatan kompleks moleküler mekanizmanın daha iyi anlaşılmasına ihtiyaç vardır.

Son yıllarda, kanser biyolojisi alanında anjiyo-miR olarak adlandırılan, tümör anjiyogenezi ile yakından ilişkili pek çok miR tanımlanmıştır¹. Bunların arasında miR_7, miR_296, miR_15b ve miR_93 gibi anjiyo-miR'lerin glioblastomalarda rol oynadığı bildirilmiştir⁹. Bizim laboratuvarımızda da daha öncesinde ruxolitinibin gliomaların invazyonunu etkin bir şekilde engellediği raporlanmıştır¹⁰. Bir diğer çalışmamızda da bu etkinin miR_17 ve miR_20a ile yakından ilişkisi ortaya

konmuştur¹¹. Bu çalışma da ise, yine ruxolitinib kullanarak glioblastoma üç boyutlu tümör kümelerinde engellenen invazyon karakteristikleri ile 34 adet anjiyo-miR'nin ifade değerleri arasındaki ilişki araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ruksolitinib Temini ve Hücre Hattının Hazırlanması

Ruksolitinib (CAS 941678-49-5) Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) firmasından, insan glioblastoma hücre hattı U-87 MG (ATCC® HTB-14™) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan; (Manassas, VA, USA) satın alındı. Çalışma süresince hücreler %10 fetal sığır serumu (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, ABD), 1 mM glutamin ve %1 (nihai konsantrasyon) penisilin/streptomisin (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) ile desteklenen Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM; catalog no. 30-2003) kullanılarak yetiştirildi ve tüm çalışma boyunca 37 °C'de nemlendirilmiş bir inkübatörde ve %5 CO₂'de tutuldu.

Glioblastoma Tümör Kümelerinin Oluşturulması ve Matrigel İnvazyon Deneyi Protokolü

Tümör kümeleri, küçük modifikasyonlarla, asılı damlacık yöntemi kullanılarak oluşturuldu^{10,11}. Tek hücreli süspansiyonlar, tripsinize edilmiş tek tabaka hücre kültürlerinden elde edildi ve %0,5 metil selüloz ilavesi ile tam EMEM ortamı kullanılarak istenen hücre yoğunluğuna seyreltildi. 20 µL hücre süspansiyonu, yapışkan olmayan, steril polistiren petri kaplarının üst kapağının iç yüzeyine 40 damla (damla başına 750-1,000 hücre nihai konsantrasyon) olacak şekilde pipetlendi. Petri kaplarının tümör damlacıklarıyla birlikte üst kapakları ters çevrildi ve alt tabağa 2 mL fosfat tamponlu salin yerleştirildi. Hücreler 72 saat inkübe edildikten sonra ZEISS Axio Vert.A1 (Oberkochen, Almanya) invert mikroskop kullanılarak tümör küme oluşumu gözlemlendi. Tüm tümör küreleri 15 mL Falkon tüplerinde toplandı ve tüm deneylerde aynı yaştaki taze tümör küreleri kullanıldı.

Matrigel invazyon deneyi için 24 kuyucuklu plakalar kullanıldı. Plakalar ekstrasellüler matriks ile kaplandı ve bu matriksin fazlası çekilerek ince bir tabaka halinde olması sağlandı. Sonrasında bir önceki bölümden toplanan tümör kümelerinden 40 uL alındı ve 100 µL matrigel matris (Corning, Corning, NY,

ABD) ve 100 µL kollajen tip I (Sigma Aldrich) ile önceden soğutulmuş Eppendorf tüplerinde miks haline getirildi. Elde edilen bu miksten her bir kuyucuğa 40 µL (3-5 tümör kümesi) konuldu. Sonrasında plate 24 saat inkubatörde bekletildi, daha sonra her çukura 1 mL hücre kültürü ortamı eklendi. Yirmi dört saat sonra tümör kümeleri, 48 saat boyunca araç veya 50, 100 veya 200 nM ruksolitinin ile tedavi edildi. Her muamele için beş kopya yapıldı. Kırk sekiz saatlik tedaviden sonra, dijital kamera ile donatılmış 20X büyütmede (ZEISS Axio Vert.A1) ters faz kontrastlı ışık mikroskobu kullanılarak 48 saat süreyle hücre istilası kaydedildi. Tümör hacmi ve tümör invazyonu önceki çalışmalarımıza göre hesaplandı^{10,11}.

miR İzolasyonu ve Kantitatif Real Time-polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-qPCR) Analizleri

Anjiyo-miRNA'lar (anjiyo-miR'ler) olarak adlandırılan bir miRNA grubu, hedef genler ve ekspresyon profili açısından iyi tanımlanmış ve glioblastoma multiforme (GBM) patogenezinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Tüm genom çapında mikrodizi çalışmaları, 50'den fazla miR'nin hipoksi ile ilgili pro- veya anti-anjiyogenez sinyallemesine dahil olduğunu ortaya koymuştur¹²⁻¹⁵. Çalışmamızda bu grupta belirlenen 34 anjiyo-miR kullanılmıştır. Ruksolitinin uygulamasından 48 saat sonra, tümör kürelerinden, miR'lerin izolasyonu mirVana™ miR Isolation Kit, with phenol kullanılarak kit protokolüne göre yapıldı. cDNA'lar, kit protokollerine göre bir TaqMan™ advanced miR cDNA sentez kiti kullanılarak sentezlendi. Niceliksel qRT-PZR analizi, FastStart TaqMan® Probe Master (life technologies) kullanılarak bir Quant studio 5 real time PZR (life technologies) üzerinde gerçekleştirildi. Kullanılan TaqMan problemleri ve miR sekansları Tablo 1'de verilmiştir. miR ifade değerlerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplandı, düzeltme faktörü ve endojen kontrol olarak RNU6B (Assay ID: 001093) kullanıldı¹⁶.

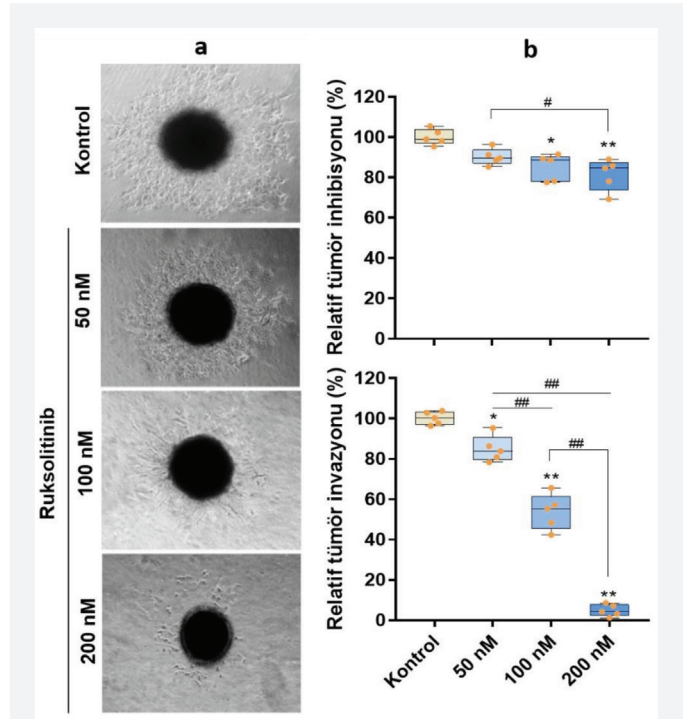
İstatistiksel Analiz

Kontrol ve deney grupları arasında invazyon oranı ve tümör hacmindeki farklılıklar ile miR ifadesindeki relatif kat değişim, tek yönlü varyans analizi ve Tukey HSD testi ile karşılaştırıldı. Korelasyon analizi için Pearson korelasyon katsayısı yöntemi kullanıldı. İstatistiksel analizler, anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olacak şekilde SPSS 20 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Ruksolitinin uygulanan ve uygulanmayan üç boyutlu tümör kümelerinde potansiyel biyobelirteçleri/önemli miR'leri belirlemek için, ısı haritası analizi, denetimsiz hiyerarşik kümeleme analizi, volkano plot ve feature importance (özellik önemliliği) analizi MetaboAnalyst 4.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

BULGULAR

Çalışmada, Ruksolitinin 50, 100 ve 200 nM dozlarında glioblastoma tümör kümeleri üzerine uygulanmış ve etkileri

48 saat sonra değerlendirilmiştir. Uygulanan her dozda istatistiksel olarak anlamlı bir etki gözlenmesine rağmen, 200 nM dozunda etkinin en yüksek düzeye ulaştığı ve bu etkinin önceki çalışmalarımız ile uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 1)^{10,11}. Bundan dolayı, qRT-PZR testi ile elde edilen miR ifade değerlerinin bu etki dozu ile arasındaki ilişki analiz edilmiş ve 10 miR'nin ifadesinin anlamlı düzeyde arttığı, 4 tanesinin ise anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir (Tablo 2). Kontrol grubuna göre 200 nM ruksolitinin uygulamasının miR ifadeleri üzerinde en yüksek etkiye sahip olduğu heatmap ile gösterilmiştir (Şekil 2). Bir sonraki adımda, ruksolitinin ile doğrudan ilişkili miR'lerin belirlenmesi için, öncelikle volcano plot sonrasında, OPLS- diskriminant analiz yapılmış ve burada en önemli bileşenler (important features) belirlenmiştir. Her iki analizde benzer şekilde istatistik olarak anlamlı sonuçlar veren ruksolitinin uygulamaları ile önemli düzeyde korelasyonu tespit edilen 9 adet miR Tablo 3'te özetlenmiştir. Bu belirlenen bu miR'lerin daha sonra tümör hacimleri ve invazyon oranları ile korelasyon analizleri yapılmış ve sonuçta 9 adet miR arasında, hem tümör invazyonu hem de tümör büyümesi ile istatistik olarak anlamlı düzeyde



Şekil 1. A) Matrigel yöntemi ile belirlenen GBM tümör sferoidleri ve invazyon oluşumu, b) 48 saat süresince 50 nM, 100 nM ve 200 nM ruksolitinin veya taşıtla muamele edilen GBM tümör kürelerinde relatif % tümör gelişimi ve relatif % invazyon alanı. Barlar ortalama±SE, n=5, * kontrole kıyasla istatistik olarak farklıdır, #diğer gruplardan istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

GBM: Glioblastoma multiforme

korelasyon gösteren 5 adet miR'[miR_15b(r:-0,659/-0,861); miR_19a_3p(r:-0,713/-0,455); miR_31_3p(r:-0,461/-0,533); miR_155_3p(r:-0,572/-0,625);miR_200b_5p(r:-0,673/-0,957) tespit edilmiştir (Şekil 3).

TARTIŞMA

Son yıllarda, moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler ile büyük hacimli datalar incelenmeye başlamış, böylelikle miR'lerin tümör invazyonu ile yakından ilişki olduğu ortaya konmuş ve kanser çeşidine özgü çeşitli miR'ler tanımlanmıştır¹⁷⁻¹⁹. Bu kanser çeşidine özgün miR'leri engellenmenin, kanserin tedavisinde kullanılabilecek yeni bir hedef olduğu ileri sürülmektedir¹. Sunulan bu çalışmada, yine daha önce

laboratuvarımızda kullandığımız ruksolitinin kullanılarak engellediğimiz U87 glioblastoma invazyonu ile ilişkili miR'leri belirlendi. Bu kapsamda 48 saat süreyle ruksolitinin uygulanan GBM tümör kürelerinde, 10 miR ifade değerlerinde artış, 4 adet miR ifade değerlerinde ise azalma olduğu belirlendi. U87 GBM kürelerinin invazyonu ve tümörögenезisi üzerinde miR_15b, miR_18a_5p, miR_19a_3p, miR_21_5p, miR_27a_5p, miR_31_3p, miR_132_5p, miR_155_3p ve miR_200b_5p'nin istatistik olarak anlamlı düzeyde etkisinin olduğunu saptandı.

miR_15b insan genomunda 3. kromozomda lokalize, son yıllarda kanser çalışmalarında sıklıkla çalışılan bir miR'dir. Xia ve ark.²⁰, miR_15b'nin glioblastomalarda hücre siklus

Tablo 1. Mikro-RNA'ların isimleri, TaqMan probe ID ve olgun miRNA sekansları

mikro-RNA	Olgun mikro-RNA dizisi	TaqMan probeID
hsa-miR-15b	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	478313_mir
hsa-miR-18a-3p	ACUGCCCUAAGUGCUCCUUCUGG	477944_mir
hsa-miR-18a-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	478551_mir
hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAUCUAUGCAAACUGA	479228_mir
hsa-miR-19a-5p	AGUUUUGCAUAGUUGCACUACA	478750_mir
hsa-miR-21-3p	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU	477973_mir
hsa-miR-21-5p	UAGCUUUAUCAGACUGAUGUUGA	477975_mir
hsa-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	478532_mir
hsa-miR-31-3p	UGCUAUGCCAACAUUUGCCAU	478012_mir
hsa-miR-31-5p	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	478015_mir
hsa-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	477827_mir
hsa-miR-92a-5p	AGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCU	479205_mir
hsa-miR-101-3p	UACAGUACUGUGAUAAACUGAA	477863_mir
hsa-miR-101-5p	CAGUUAUACAGUGCUGAUGCU	478620_mir
hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	477887_mir
hsa-miR-130a-3p	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU	477851_mir
hsa-miR-130a-5p	GCUCUUUUCACAUUGUGCUACU	483130_mir
hsa-miR-132-3p	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG	477900_mir
hsa-miR-132-5p	ACCGUGGCUUUCGAUUGUUACU	478705_mir
hsa-miR-155-3p	CUCCUACAUUUAGCAUUAACA	477926_mir
hsa-miR-155-5p	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGUU	483064_mir
hsa-miR-191-3p	GCUGCGCUUGGAUUUCGUCCCC	477951_mir
hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG	477952_mir
hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA	477963_mir
hsa-miR-200b-5p	CAUCUUAUCUGGGCAGCAUUGGA	478753_mir
hsa-miR-210-3p	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	477970_mir
hsa-miR-210-5p	AGCCCCUGCCCACGCACACUG	478765_mir
hsa-miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGCGGGUUUC	477981_mir
hsa-miR-221-5p	ACCUGGCAUACAUGUAGAUUUU	478778_mir
hsa-miR-296-3p	GAGGGUUGGGUGGAGGCUCUCC	478790_mir
hsa-miR-296-5p	AGGGCCCCCUCAAUCCUGU	477836_mir
hsa-miR-424-5p	CAGCAGCAAUUCAGUUUUUGAA	478092_mir
miRNA: MikroRNA		

regülasyonun da görev alan tümör engelleyici ajan olarak rol oynadığını öne sürmüştür. Diğer çalışma da ise hastaların serum ve beyin omurilik sıvısında yapılan analizlerde yükselen miR_15b ifadesi bildirilmiştir^{21,22}. Son olarak Chen ve ark.²³ miR_15b'nin gliomagenезisteki etkisini sal-like protein 4 üzerinden gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda

da miR_15b'nin yükselen ekspresyon değerleri tespit edilmiş ve moleküler süreçte önemli bir rol aldığı düşünülmüştür.

miR_17-92 ailesi birden fazla proteinin kodlanmasında görev alan bir polisistronik miR ailesi olup 6 üyesi vardır²⁴. Biz çalışmamızda, bu ailede yer alan miR_18a ve miR_19a'nın

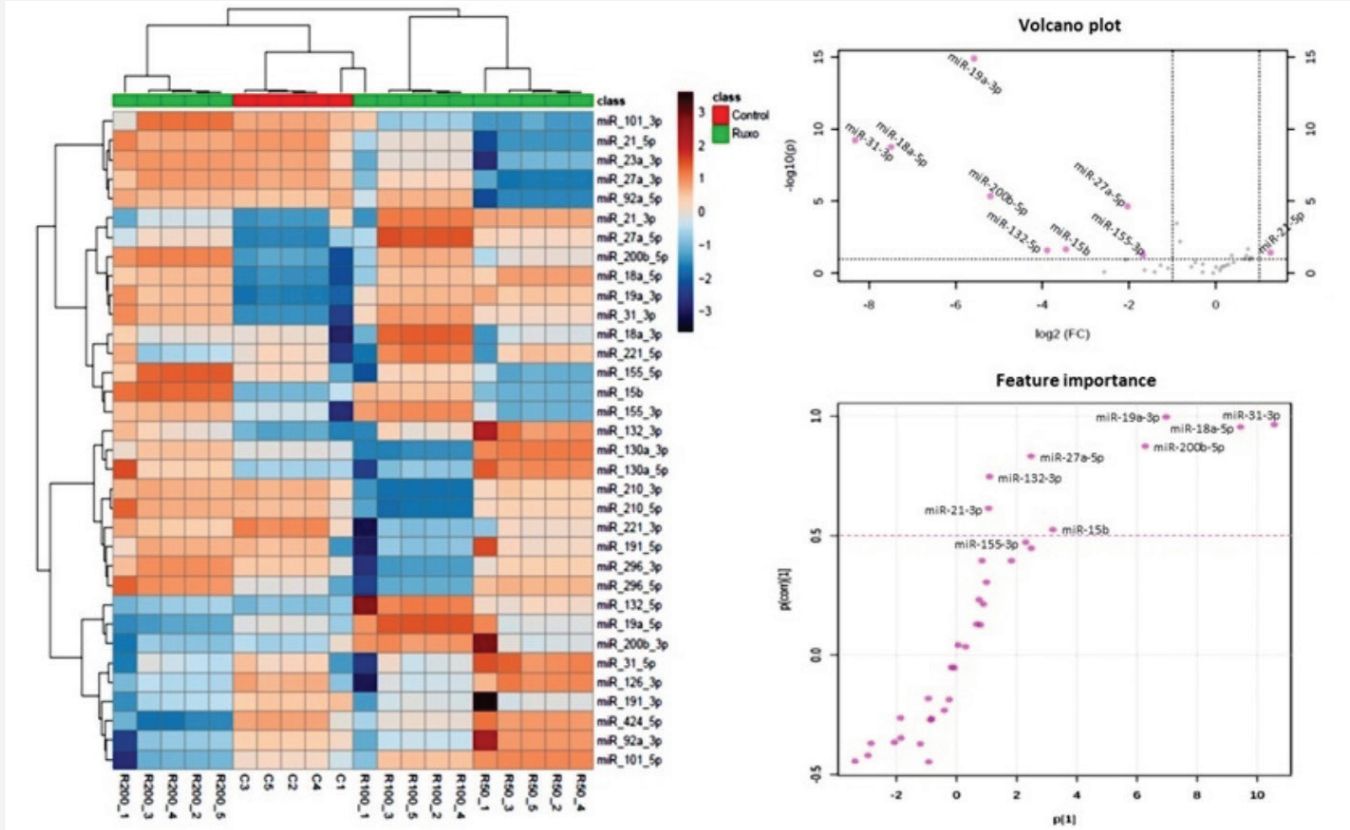
Tablo 2. GBM tümör kürelerinde 200 nM ruksolitinib uygulanan gruplarda, uygulanmayan kontrol gruplarına kıyasla belirlenen relatif miR ifade seviyeleri ve bunlarla ilişkili istatistik analiz sonuçları

				%95 GA	
miRNA	Ortalama değer	Standart sapma	p değeri	Düşme	Yükselme
İfadesi anlamlı düzeyde artan miR'ler					
miR_15b	12,567	2,988	0,041	-22,321	-0,520
miR_18a_5p	154,640	18,073	0,000	-218,814	-87,006
miR_19a_3p	44,298	4,543	0,000	-59,818	-26,688
miR_21_3p	2,559	0,389	0,047	-2,900	-0,019
miR_27a_5p	6,543	1,927	0,120	-12,505	1,553
miR_31_3p	226,034	46,217	0,012	-391,855	-54,810
miR_130a_5p	4,144	0,802	0,046	-5,920	-0,064
miR_132_3p	1,824	0,135	0,002	-1,316	-0,325
miR_155_3p	2,657	0,418	0,038	-3,204	-0,101
miR_200b_5p	33,275	5,785	0,005	-52,840	-10,623
İfadesi anlamlı düzeyde azalan miR'ler					
miR_21_5p	0,370	0,093	0,002	0,308	1,259
miR_210_3p	0,546	0,103	0,019	0,097	0,974
miR_221_3p	0,619	0,060	0,003	0,159	0,673
miR_424_5p	0,537	0,129	0,036	0,053	1,393
Anlamlı düzeyde değişim göstermeyen miR'ler					
miR_18a_3p	1,508	0,351	0,984	-1,501	1,472
miR_19a_5p	3,132	0,934	0,232	-5,443	1,390
miR_23a_3p	0,627	0,125	0,074	-0,049	0,996
miR_27a_3p	0,667	0,114	0,109	-0,081	0,757
miR_31_5p	1,038	0,087	0,932	-0,346	0,376
miR_92a_5p	1,114	0,373	0,885	-1,458	1,266
miR_92a_3p	0,906	0,108	0,614	-0,297	0,491
miR_101_3p	2,072	1,446	0,683	-6,324	4,221
miR_101_5p	1,403	0,226	0,347	-1,215	0,445
miR_130a_3p	6,394	1,568	0,064	-11,106	0,331
miR_126_3p	0,881	0,081	0,335	-0,174	0,490
miR_132_5p	13,145	7,780	0,384	-40,506	16,229
miR_155_5p	3,413	1,562	0,663	-7,154	4,641
miR_191_3p	1,190	0,603	0,861	-2,389	2,012
miR_191_5p	0,873	0,074	0,229	-0,146	0,580
miR_200b_3p	2,555	0,799	0,295	-4,428	1,408
miR_210_5p	0,728	0,113	0,159	-0,128	0,735
miR_221_5p	2,629	1,243	0,823	-5,289	4,247
miR_296_3p	1,054	0,218	0,958	-0,802	0,845
miR_296_5p	1,843	0,281	0,278	-1,717	0,518
GA: Güven aralığı, miRNA: MikroRNA					

GA: Güven aralığı, miRNA: MikroRNA

ifade değerlerinde artış saptadık (Tablo 2). miR_18a'nın özellikle apoptozis ile yakın ilişkisi ile insan prostat, meme ve kolorektal kanserlerinde ifadesinin arttığı bildirilmiştir^{19,25}. Glioblastomaların tümör gradenin artışı ile artan miR_18a

ifade değerleri arasında bir korelasyon bildirmişlerdir^{26,27}. Jiang ve ark.²⁸ ise iyi prognoz ile ilişkilendirdikleri receptor-related orphan receptor A proteinin, yüksek dereceli glioblastomadaki düşük ifade değerlerinin sorumlusu olarak miR_18a'yı hedef



Şekil 2. a) Normalize edilen miR ifadesi değerleri kullanılarak yapılan heatmap analizi (uzaklık ölçüm parametresi: euclidian, cluster algoritması: ward), b) Volcano plot analizinde kat değişim eşiği (x) 2 ve t-test önem seviyesi eşiği (y) 0,1 ile seçilen en önemli (important features) miRNA'lar. Kırmızı kesikli çizgi eşik değerın anlamlı düzeyde üstünde kalan miR'leri gösterir (hem kat artış, hem de p değerleri logaritmik transformasyona tabi tutulmuştur), c) OPLS-diskriminant analizi ile elde edilen değişken önemi gösteren, kovaryans korelasyon [p (corr)] yüklemle profilini birleştiren S-grafığı. Tüm biyomarker analizleri, 200 nM ruxolitinib ile tedavi edilen ve tedavi edilmeyen kontrol grupları arasında gerçekleştirildi

miRNA: MikroRNA

Tablo 3. Volcano plot ve gizli yapıları OPLS-DA ile belirlenen en önemli (important features) miR'ler

miRNA	Volcano plot				Önem özelliği	
	KD	log2(KD)	P değeri	-log10(p)	p[1]	p(corr)[1]
miR 15b	0,0910	-34,5750	0,0216	16,6640	320,8360	0,5251
miR_18a_5p	0,0056	-74,8870	1,74E-05	87,5930	944,6110	0,9546
miR_19a_3p	0,0209	-55,7790	1,31E-11	14,8820	69,7660	0,9965
miR_21_5p	23,9670	12,6110	0,0372	14,2940	106,7570	0,6144
miR_27a_5p	0,2433	-20,3910	2,27E-02	46,4320	247,7050	0,8329
miR_31_3p	0,0031	-83,1770	5,95E-06	92,2570	105,6860	0,9647
miR_132_5p	0,0674	-38,9060	0,0253	15,9630	109,7980	0,7473
miR_155_3p	0,3118	-16,8130	0,0528	1,2770	230,0530	0,4726
miR_200b_5p	0,0272	-51,9990	4,46E-03	53,5050	628,0550	0,8749

KD: Kat değişim, log: Logaritma, corr: Korelasyon, p: Önem seviyesi, OPLS-DA: Otogonal-ortogonal izdüşümler-diskriminant analizi

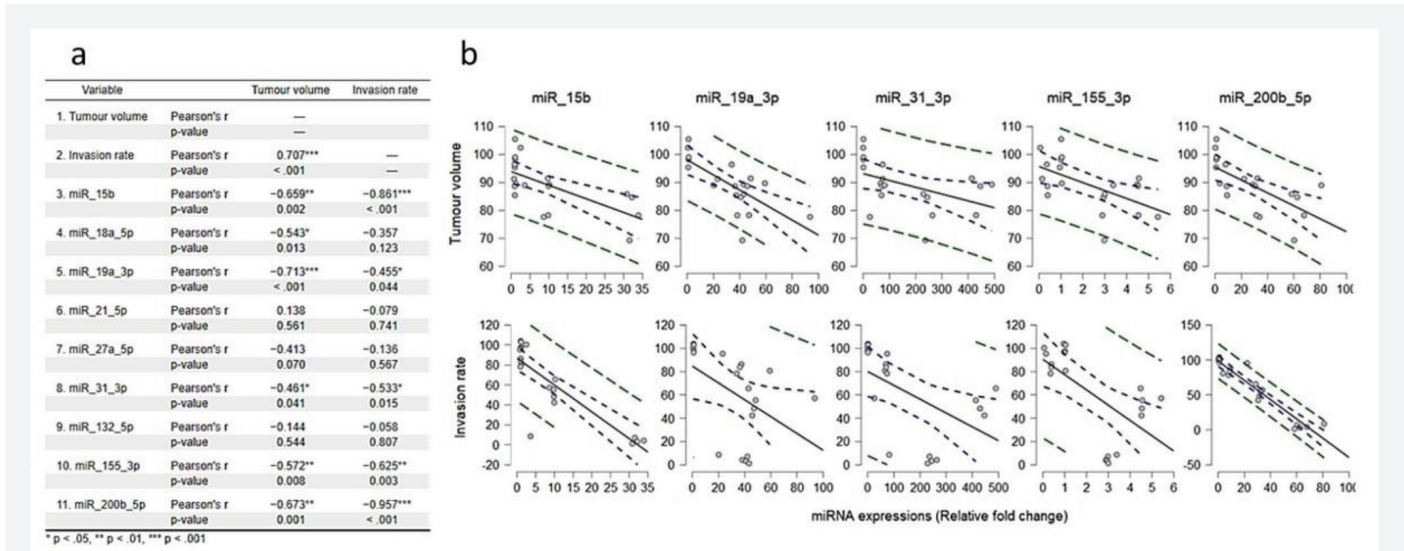
göstermişlerdir. Ailenin diğer üyesi miR_19a'nın pek çok kanser çeşidinde ifade edildiği ve kanserin progresyonunu gösteren bir biyo-belirteç olarak kullanabileceği ileri sürülmüştür²⁹. Fosfotaz ve tensin homoloğu (*PTEN*) iyi bilinen bir tümör baskılayıcı gendir ve miR_19a'nın hedef proteindir. miR_19a'nın inhibisyonu ile *PTEN*'nin aktivasyonun arttığı ve bu yolla glioma hücrelerinin invazyonun engellendiği raporlanmıştır³⁰. Malzkorn ve ark.'nın³¹ yaptıkları çalışmada, glioblastomama tanıli insanlardan elde edilen dokularda miR_19a ifade değerlerinde artış olduğunu ve miR_19a inhibisyonunun ise glioblastoma hücrelerinin hücre proliferasyonunu engellediğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışma da miR_19a'nın ekspresyon değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi (Şekil 3). Bu sonuçlar bize, ruksolitinibin tümör invazyonuna olan etkisinin miR_18a ile değil, daha çok miR_19a ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

miR_31 pek çok kanser çeşidi için kanser engelleyici özelliği ile bilinen, aynı zamanda meme kanserinde metastazını da engellediği raporlanan bir miR'dir^{32,33}. Akciğer ve kolon kanserinde ise onkojenik özellikleri bildirilmiştir^{34,35}. Glioblastomalarda ise normal beyin dokusuna ile karşılaştırıldığında azalmış ifadesi bildirilmiştir³⁶. miR_31'in hedef proteini radiksindir³⁰. Radiksin, hücre membranı ile hücre iskeleti arasında bağlanmadan sorumlu ezrin/radiksin/moesin protein ailesinin bir üyesidir³⁷. Wang ve ark.³⁸ azalmış miR_31a ve yüksek radiksin ifadesinin glioblastomalı hastalarda düşük Karnofsky performansı ve kötü sağkalım ile ilişkili olduğu bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise miR_31'in, glioblastomalarda oldukça etkin olduğu bilinen nükleer faktör-kappa B sinyalizasyonunu engellediği bildirilmiştir³⁹. Bizim çalışmamızda ruksolitinib uygulaması

ile miR_31a'nın artan ifadesi saptanmıştır (Tablo 2). Bu artan ifadenin aynı zamanda invazyonun engellenmesi ile korele olduğu görülmüştür (Şekil 3). Ruksolitinib bir janus kinaz (JAK) inhibitörüdür. JAK'nin yapısında da, miR_31'in hedef proteini olan radiksin olduğu sanılmaktadır⁴⁰. Bu veriler bize, ruksolitinibin invazyon engelleyici etkisinde, JAK/STAT sinyalizasyonunun ile miR_31'in arasında moleküler bir bağ olduğunu düşündürmektedir, ancak ileri çalışmalar ile doğrulanması gerekmektedir.

miR_155, literatürde 147 adet hedef geni tanımlanan iyi bilinen bir onkojenik miR'dir. Pek çok hedef genin varlığı klinik önemi konusunda giderek artan bir ilgi ile karşılanmaktadır⁴¹. Glioblastoma dahil, akciğer kanseri, meme kanseri, burkitt lenfoma, lösemi gibi pek çok kanser çeşidinde yükselmiş ifade değerleri raporlanmıştır⁴¹⁻⁴³. D'Urso ve ark.'nın⁴⁴ yaptıkları çalışmada, hem primer hem sekonder glioblastoma hastalarında miR_155'in ifadesinde artış tespit etmişler ve glioblastomadaki onkojenik etkisini miR_155'in hedef geni olan γ -aminobutyric acid A receptor 1 (GABRA 1) üzerinden gerçekleştirdiğini ileri sürmüşlerdir. GABRA 1, beyin fonksiyonlarındaki görevi iyi bilinen gama asetil amunobutirik asitin (GABA) reseptörüdür. GABA ise insan beyninde inhibitör etkili başlıca nörotransmitterlerdendir. Artan ifadesi ile birlikte glioblastomalarda, tümör hücre proliferasyonunu artırdığı bilinmektedir⁴⁵. Sunulan çalışmada ruksolitinib ile kuvvetli şekilde engellenen U87 invazyonunda, artmış miR_155 ifadesi tespit edilmiştir. Bu sonuç bize, ruksolitinibin invazyon engelleyici etkisini, onkojenik etkisi ile bilinen miR_155 üzerinden yapmadığını düşündürmektedir.

miR_200b, miR_200 ailesinin bir üyesi olup glioblastomalar dahil pek çok kanser çeşidinde görev aldığı bildirilmiştir⁴⁶.



Şekil 3. Tümör büyüklüğü, invazyon oranı ve en önemli anjiyo-miR ifadesi ilişkisine ait a) Pearson korelasyon katsayısına göre oluşturulan korelasyon matrisi b) Dağılım noktalar, %95 güven aralığı (mavi çizgi) ve %95 tahminsel aralık (yeşil çizgi)

Malign glioblastoma hücre hatları ve insan dokularında düşük ifade değerleri ile birlikte hücre hatlarında tümör büyümesini engellediği bildirilmiştir⁴⁷. Glioblastomalar üzerindeki engelleyici etkisinin hedef geni olan elementi bağlayan protein 1 (element-binding protein 1, *CREB1*) üzerinden gerçekleştirdiği bildirilmiştir⁴⁷. Liu ve ark.⁴⁸, miR_200b'nin azalan ifadesinin kötü prognoz ile ilişkilendirmişler ve bu etkinin miR_200b'nin bir diğer hedef geni *RAB* gen ailesi üzerinden gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir. Chang ve ark.⁴⁹ ise RAN ailesinin bir üyesi olan *RAB3C*'nin artmış ifadesinin kolorektal kanserlerde yüksek derece ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu, ruksolitinin uygulaması ile bu genin ifadesinin azalarak kanser hücre hareketini engellediğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda artmış miR_200b ifadesinde, ruksolitinin ile belirgin şekilde engellenen U87 hücre büyümesi ve invazyonu arasında kuvvetli bir korelasyon tespit ettik. ruksolitininin, bu miR'in hedef geni olan RAB ailesi ile de yakın ilişkisi göz önüne alındığında bize, miR_200b'nin ruksolitinin etkisi ile yakından ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Sunulan çalışma önemli olduğunu düşündüğümüz sonuçlar ortaya koysa da birtakım limitasyonlar içermektedir. En önemli limitasyon çalışmanın *in vitro* bir çalışma olmasıdır. Ek olarak elde edilen verilerin insan tümör dokuları üzerinden doğrulanması sonuçların daha da güvenilir olmasını sağlayabilir. Benzer olarak gen ifadesindeki değişiklikler ile beraber protein ifadelerindeki değişikliklerinde araştırılması, moleküler mekanizmanın aydınlatılmasına daha fazla katkı sağlayabilir. Bununla birlikte, verilerimizin GBM hastalarında ruksolitinin-anjiyo-miR ilişkisi bağlamında, önemli bazı potansiyel klinik senaryoları yansıttığını düşünüyoruz.

SONUÇ

Tümör sferoidlerinde modellenen GBM büyümesinin ve invazyonunun özellikle 200 nM ruksolitinin tedavisi ile önemli ölçüde inhibe edildiğini gösterdik. Ayrıca, ruksolitinin ile tedavi edilen gruplarda ruksolitinin ile anjiyo-miR'ler arasında güçlü bir etkileşim belirledik. Sonuçlarımız, araştırdığımız 34 adet anjiyo-miR içinde miR_15b, miR_19a, miR_31_3p, miR_155_3p ve miR_200b'nin istatistik olarak anlamlı düzeyde ruksolitinin tedavisi ile değiştiğini, tümünün tümör büyümesi ve invazyonu ile ilişkili olduğunu ortaya koydu. Toplu olarak, sonuçlarımız ruksolitininin, muhtemelen anjiyo-miR'lerin ekspresyon profilini değiştirerek ve bu şekilde anjiyogenez bağlantılı sinyalleri inhibe ederek, glioblastoma tümör sferoidlerinde etkili bir anti-tümör terapötik olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, çalışmamızın verilerin doğrulanması ve klinik anlamda kullanılabilir olması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışmamızda ticari hücre kullanılmıştır ve etik kurul onayı gerekmemektedir.

Hasta Onayı: Hasta onayı gerekmemektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: E.D., O.D., Konsept: E.D., O.D., Dizayn: E.D., O.D., Veri Toplama veya İşleme: E.D., O.D., Analiz veya Yorumlama: E.D., O.D., Literatür Arama: E.D., O.D., Yazan: E.D., O.D.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Salinas-Vera YM, Marchat LA, Gallardo-Rincón D, Ruiz-García E, Astudillo-De La Vega H, Echavarría-Zepeda R, et al. AngiomiRs: MicroRNAs driving angiogenesis in cancer (Review). *Int J Mol Med*. 2019;43:657-70.
2. Pang C, Guan Y, Zhao K, Chen L, Bao Y, Cui R, et al. Up-regulation of microRNA-15b correlates with unfavorable prognosis and malignant progression of human glioma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:4943-52.
3. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol*. 2008;28:5369-80.
4. Anindo MI, Yaqinuddin A. Insights into the potential use of microRNAs as biomarker in cancer. *Int J Surg*. 2012;10:443-9.
5. Cuddapah VA, Robel S, Watkins S, Sontheimer H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15:455-65.
6. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8:610-22.
7. Price SJ, Gillard JH. Imaging biomarkers of brain tumour margin and tumour invasion. *Br J Radiol*. 2011;84(Spec No 2):S159-67.
8. Batchelor TT, Reardon DA, de Groot JF, Wick W, Weller M. Antiangiogenic therapy for glioblastoma: current status and future prospects. *Clin Cancer Res*. 2014;20:5612-9.
9. Beyer S, Fleming J, Meng W, Singh R, Haque SJ, Chakravarti A. The Role of miRNAs in Angiogenesis, Invasion and Metabolism and Their Therapeutic Implications in Gliomas. *Cancers (Basel)*. 2017;9:85.
10. Delen E, Doğanlar O. The Dose Dependent Effects of Ruxolitinib on the Invasion and Tumorigenesis in Gliomas Cells via Inhibition of Interferon Gamma-Dependent JAK/STAT Signaling Pathway. *J Korean Neurosurg Soc*. 2020;63:444-54.
11. Delen E, Doğanlar O, Doğanlar ZB, Delen O. Inhibition of the Invasion of Human Glioblastoma U87 Cell Line by Ruxolitinib: A Molecular Player of miR-17 and miR-20a Regulating JAK/STAT Pathway. *Turk Neurosurg*. 2020;30:182-9.
12. Serocki M, Bartoszewski S, Janaszak-Jasiecka A, Ochocka RJ, Collawn JF, Bartoszewski R. miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target. *Angiogenesis*. 2018;21:183-202.
13. Caporali A, Emanuelli C. MicroRNA regulation in angiogenesis. *Vascul Pharmacol*. 2011;55:79-86.

14. Berthois Y, Delfino C, Metellus P, Fina F, Nanni-Metellus I, Al Aswy H, et al. Differential expression of miR200a-3p and miR21 in grade II-III and grade IV gliomas: evidence that miR200a-3p is regulated by O⁶-methylguanine methyltransferase and promotes temozolomide responsiveness. *Cancer Biol Ther.* 2014;15:938-50.
15. Barbano R, Palumbo O, Pasculli B, Galasso M, Volinia S, D'Angelo V, et al. A miRNA signature for defining aggressive phenotype and prognosis in gliomas. *PLoS One.* 2014;9:e108950.
16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-8.
17. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature.* 2007;449:682-8.
18. Iseki Y, Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Fukuoka T, Matsutani S, et al. MicroRNA-96 Promotes Tumor Invasion in Colorectal Cancer via RECK. *Anticancer Res.* 2018;38:2031-5.
19. Fang LL, Wang XH, Sun BF, Zhang XD, Zhu XH, Yu ZJ, et al. Expression, regulation and mechanism of action of the miR-17-92 cluster in tumor cells (Review). *Int J Mol Med.* 2017;40:1624-30.
20. Xia H, Qi Y, Ng SS, Chen X, Chen S, Fang M, et al. MicroRNA-15b regulates cell cycle progression by targeting cyclins in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;380:205-10.
21. Ivo D'Urso P, Fernando D'Urso O, Damiano Gianfreda C, Mezzolla V, Storelli C, Marsigliante S. miR-15b and miR-21 as Circulating Biomarkers for Diagnosis of Glioma. *Curr Genomics.* 2015;16:304-11.
22. Baraniskin A, Kuhnhen J, Schlegel U, Maghnouj A, Zöllner H, Schmiegel W, et al. Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as biomarker for the diagnosis of glioma. *Neuro Oncol.* 2012;14:29-33.
23. Chen LP, Zhang NN, Ren XQ, He J, Li Y. miR-103/miR-195/miR-15b Regulate SALL4 and Inhibit Proliferation and Migration in Glioma. *Molecules.* 2018;23:2938.
24. Chen L, Li C, Zhang R, Gao X, Qu X, Zhao M, et al. miR-17-92 cluster microRNAs confers tumorigenicity in multiple myeloma. *Cancer Lett.* 2011;309:62-70.
25. Hsu TI, Hsu CH, Lee KH, Lin JT, Chen CS, Chang KC, et al. MicroRNA-18a is elevated in prostate cancer and promotes tumorigenesis through suppressing STK4 in vitro and in vivo. *Oncogenesis.* 2014;3:e99.
26. Wu W, Zhou X, Yu T, Bao Z, Zhi T, Jiang K, et al. The malignancy of miR-18a in human glioblastoma via directly targeting CBX7. *Am J Cancer Res.* 2017;7:64-76.
27. Song Y, Wang P, Zhao W, Yao Y, Liu X, Ma J, et al. MiR-18a regulates the proliferation, migration and invasion of human glioblastoma cell by targeting neogenin. *Exp Cell Res.* 2014;324:54-64.
28. Jiang Y, Zhou J, Zhao J, Hou D, Zhang H, Li L, et al. MiR-18a-downregulated RORA inhibits the proliferation and tumorigenesis of glioma using the TNF- α -mediated NF- κ B signaling pathway. *EBioMedicine.* 2020;52:102651.
29. Peng Y, Huang D, Ma K, Deng X, Shao Z. MiR-19a as a prognostic indicator for cancer patients: a meta-analysis. *Biosci Rep.* 2019;39:BSR20182370.
30. Balachandran AA, Larcher LM, Chen S, Veedu RN. Therapeutically Significant MicroRNAs in Primary and Metastatic Brain Malignancies. *Cancers (Basel).* 2020;12:2534.
31. Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, Grzendowski M, Stühler K, Meyer HE, et al. Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. *Brain Pathol.* 2010;20:539-50.
32. Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szász AM, Wang ZC, et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell.* 2009;137:1032-46.
33. Luo LJ, Yang F, Ding JJ, Yan DL, Wang DD, Yang SJ, et al. MiR-31 inhibits migration and invasion by targeting SATB2 in triple negative breast cancer. *Gene.* 2016;594:47-58.
34. Liu X, Sempere LF, Ouyang H, Memoli VA, Andrew AS, Luo Y, et al. MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors. *J Clin Invest.* 2010;120:1298-309.
35. Cottonham CL, Kaneko S, Xu L. miR-21 and miR-31 converge on TIAM1 to regulate migration and invasion of colon carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2010;285:35293-302.
36. Hua D, Ding D, Han X, Zhang W, Zhao N, Foltz G, et al. uman miR-31 targets radixin and inhibits migration and invasion of glioma cells. *Oncol Rep.* 2012;27:700-6.
37. Sato N, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J Cell Sci.* 1992;103:131-43.
38. Wang S, Jiao B, Geng S, Song J, Liang Z, Lu S. Concomitant microRNA-31 downregulation and radixin upregulation predicts advanced tumor progression and unfavorable prognosis in patients with gliomas. *J Neurol Sci.* 2014;338:71-6.
39. Rajbhandari R, McFarland BC, Patel A, Gerigk M, Gray GK, Fehling SC, et al. Loss of tumor suppressive microRNA-31 enhances TRADD/NF- κ B signaling in glioblastoma. *Oncotarget.* 2015;6:17805-16.
40. Haan S, Margue C, Engrand A, Rolvinger C, Schmitz-Van de Leur H, Heinrich PC, et al. Dual role of the Jak1 FERM and kinase domains in cytokine receptor binding and in stimulation-dependent Jak activation. *J Immunol.* 2008;180:998-1007.
41. Mattiske S, Suetani RJ, Neilsen PM, Callen DF. The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21:1236-43.
42. Babar IA, Cheng CJ, Booth CJ, Liang X, Weidhaas JB, Saltzman WM, et al. Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:E1695-704.
43. Mallardo M, Poltronieri P, D'Urso OF. Non-protein coding RNA biomarkers and differential expression in cancers: a review. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008;27:19.
44. D'Urso PI, D'Urso OF, Storelli C, Mallardo M, Gianfreda CD, Montinaro A, et al. miR-155 is up-regulated in primary and secondary glioblastoma and promotes tumour growth by inhibiting GABA receptors. *Int J Oncol.* 2012;41:228-34.
45. Jung E, Alfonso J, Osswald M, Monyer H, Wick W, Winkler F. Emerging intersections between neuroscience and glioma biology. *Nat Neurosci.* 2019;22:1951-60.
46. Men D, Liang Y, Chen L. Decreased expression of microRNA-200b is an independent unfavorable prognostic factor for glioma patients. *Cancer Epidemiol.* 2014;38:152-6.
47. Peng B, Hu S, Jun Q, Luo D, Zhang X, Zhao H, et al. MicroRNA-200b targets CREB1 and suppresses cell growth in human malignant glioma. *Mol Cell Biochem.* 2013;379:51-8.
48. Liu Q, Tang H, Liu X, Liao Y, Li H, Zhao Z, et al. miR-200b as a prognostic factor targets multiple members of RAB family in glioma. *Med Oncol.* 2014;31:859.
49. Chang YC, Su CY, Chen MH, Chen WS, Chen CL, Hsiao M. Secretory RAB GTPase 3C modulates IL6-STAT3 pathway to promote colon cancer metastasis and is associated with poor prognosis. *Mol Cancer.* 2017;16:135.