

Laringeal Karsinomda Ferroptoz ile İlişkili Genlerin Biyoinformatik Yöntemler Kullanılarak Belirlenmesi

Çağdaş AKTAN*

Öz

Amaç: Hücre içi demir birikimi ve lipid peroksidasyonu ile karakterize edilen ferroptoz, tümör baskılanmasında önemli rol oynayabilen yeni tanımlanmış bir hücre ölüm şeklidir. Laringeal skuamöz hücreli karsinom (LSHK) ve ferroptozis arasındaki ilişki hakkında yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmanın amacı, LSHK'nin tanı, tedavisinde ve ferroptozis ile ilgili belirteçleri in silico yöntemleri kullanarak saptamaktır.

Yöntem: Ferroptoz ile ilgili genler, FerrDb veri tabanından elde edildi. The Cancer Genome Atlas (TCGA) veri setlerinden LSHK hastalarının mRNA ekspresyon verileri ve ferroptoz ile ilgili bazı genleri taramak için kullanıldı. LSHK ile ilgili GSE143224 ve GSE84957 mikrodizi veri setleri GEO veri tabanından elde edilmiştir. Tüm veri setleri kullanılarak ferroptoz ve LSHK ile ilişkili genleri elde etmek için örtüşen veriler kullanılmıştır. LSHK grubu ve normal kontroller arasındaki diferansiyel olarak eksprese edilen genler (DEG'ler) ve ferroptoz ile ilgili DEG'ler, biyoinformatik yöntemler kullanılarak analiz edildi. Daha sonra STRING ve Cytoscape yazılımları kullanılarak Gene Ontology (GO), KEGG ve protein-protein etkileşimi (PPE) ağı analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Ferroptoz ile ilgili 259 gen, FerrDb veri tabanından alındı ve ferroptoz DEG'lerini tanımlamak için bunları TCGA-HNSC (523 örnek), GSE143224 (25 örnek) ve GSE84957 (18 örnek) ile analizleri yapıldı. Analiz sonrasında 13 adet yukarı regüle edilmiş (NOX4, BID, ABCC1, TNFAIP3, PANX1, SLC1A4, SLC3A2, FTL, TFRC, AURKA, HSF1, PML, CA9; $p < 0.05$) ve 3 adet aşağı regüle edilmiş gen (CHAC1, LPIN1, MUC1; $p < 0.05$) saptanmıştır. GO, KEGG ve PPE analizleri ile elde edilen hücresel stres, inflamasyon, oksidatif stres ve karsinogenez süreçlerine benzer sonuçlar ($p < 0.05$) ile bu genlerin LSHK' nin ilerlemesinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

Sonuç: Sonuç olarak, bu çalışmada LSHK'de ferroptoz ile yakından ilişkili olan ve LSHK hastalarını sağlıklı kontrollerden ayırt edebilen 16 potansiyel gen saptanmıştır. Çalışmamız, LSHK'nin moleküler mekanizmasını ve terapötik hedeflerini keşfetmek için daha geniş bir fikir sağlayabilir.

Anahtar Sözcükler: Laringeal kanser, ferroptoz, biyoinformatik.

Özgün Araştırma Makalesi (Original Research Article)

Geliş / Received: 09.06.2022 & Kabul / Accepted: 09.08.2022

DOI: <https://doi.org/10.38079/igusabder.1128423>

* Dr. Öğr. Üyesi, Beykent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, İstanbul, Türkiye.

E-posta: cagdasaktan@beykent.edu.tr ORCID <https://orcid.org/0000-0002-9125-6444>

Identification of Ferroptosis-Related Genes in Laryngeal Carcinoma Using an Integrated Bioinformatics Approach

Abstract

Aim: Ferroptosis, which is characterized by intracellular iron accumulation and lipid peroxidation, is a newly described form of regulated cell death that may play a key role in tumour suppression. There is still a lack of knowledge regarding the association between laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and ferroptosis. The aim of this study is finding ferroptosis-related markers in LSCC to explore new directions for LSCC diagnosis and treatment using in silico methods.

Method: The ferroptosis-related genes were obtained from FerrDb database. mRNA expression data from LSCC patients from The Cancer Genome Atlas (TCGA) datasets were used to screen for some genes related to ferroptosis. GSE143224 and GSE84957 microarray datasets about LSCC were obtained from the GEO database. Overlapping data was used to obtain genes associated with ferroptosis and LSHK using all datasets. The differentially expressed genes (DEGs) and ferroptosis-related DEGs between the LSCC group and normal controls were analyzed using bioinformatics methods. Then the Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and the protein-protein interaction (PPI) network analyses were performed using STRING and Cytoscape softwares.

Results: 259 ferroptosis-related genes were fetched from FerrDb database and intersected them with TCGA-HNSC (523 samples), GSE143224 (25 samples) and GSE84957 (18 samples) to identify ferroptosis DEGs. Finally, it was found that 13 upregulated (NOX4, BID, ABCC1, TNFAIP3, PANX1, SLC1A4, SLC3A2, FTL, TFRC, AURKA, HSF1, PML, CA9; $p < 0.05$) and 3 downregulated genes (CHAC1, LPIN1, MUC1; $p < 0.05$). The result of the enrichment gene dataset analysis (cellular stress, inflammation, oxidative stress and carcinogenesis; $p < 0.05$) indicated that the genes significantly enriched were involved in progression of LSCC.

Conclusions: In conclusion, 16 potential genes that are closely associated with ferroptosis in LSCC and may differentiate LSCC patients from controls. Our study may provide a broader idea for exploring the molecular mechanism and therapeutic targets of LSCC.

Keywords: Laryngeal carcinoma, ferroptosis, bioinformatics.

Giriş

Laryngeal kanser erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmekte olup dünya genelinde görülen en yaygın ikinci baş boyun kanserlerinden birisidir¹. Bununla birlikte, Kafkas ırkıyla karşılaştırıldığında Afrika kökenli Amerikalılarda hastalığın daha genç yaşta ortaya çıkması ve daha yüksek insidans ve mortaliteye sahip olması gibi laryngeal kanserde gözlemlenen ırksal/etnik farklılıklar da bulunmaktadır. Laryngeal kanserin patogeneğinde birçok risk faktörü rol oynamaktadır. Bunlardan en önemlisi tütün ve alkol kullanımındır. Yapılan çalışmalara göre, sigara içen kişiler sigara içmeyenlerle karşılaştırıldığında sigara içenlerde laryngeal kanserin

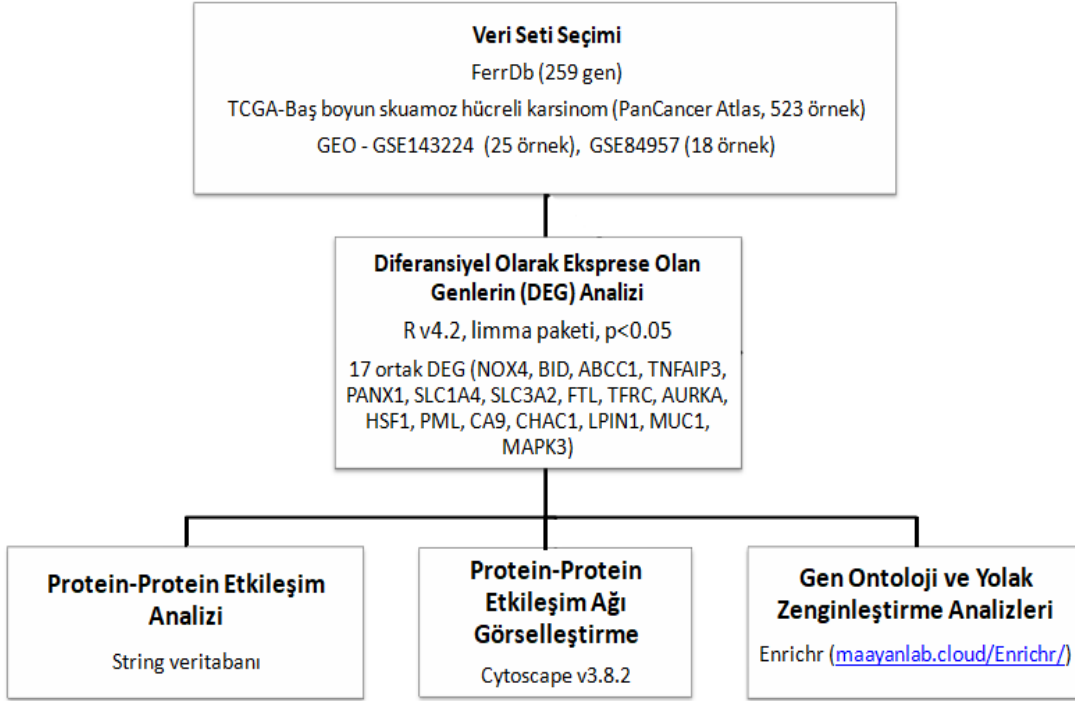
gelişme olasılığı yaklaşık 15 kat daha yüksek iken aşırı sigara tüketiminde ise bu riskin yaklaşık 30 kata kadar çıktığı saptanmıştır². Bununla birlikte laringeal kanserin sadece %5' inin tütün ve alkol tüketmeyen bireylerde meydana geldiği tahmin edilmektedir³. Tütün ve alkol tüketiminin yanı sıra çeşitli çevresel etkenlere maruziyet (asbest, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve tekstil tozu gibi), beslenme alışkanlıkları, gastroözofageal ve laringofaringeal reflü hastalıkları ve Human Papilloma Virüs (HPV) enfeksiyonu da risk faktörleri arasında yer almaktadır². Glottik tümörler hastalığın başlangıcında ses kalitesinde meydana gelen değişiklikler sebebiyle erken evrelerde teşhis edilebilir iken supraglottik ve subglottik tümörler, semptomları daha az belirgin olduğu için sıklıkla ileriki evrelerde saptanabilmektedirler. Hastalığın tedavisi ise genellikle cerrahi ve radyoterapi ile gerçekleştirilebilmektedir⁴.

Apoptoz ve nekroz gibi bilinen hücre ölüm mekanizmaları dışında ferroptoz olarak adlandırılan demire bağımlı ve apoptotik olmayan yeni bir hücre ölüm mekanizması keşfedilmiştir⁵. Bu hücre ölüm tipi, inme, beyin hasarı ve tümörlerin gelişiminde rol oynayan önemli mekanizmalardan biridir⁶⁻⁸. Ferroptoz ile hücrelerde aşırı demir birikimi ile lipid peroksidasyonun artması sonucu hücre ölümü gerçekleşmekte ve bu değişikliklerle de apoptoz, nekroz ve otofaji gibi diğer hücre ölümü biçimlerinden ayırt edilebilmektedir^{9,10}. Ferroptozda rol oynayan bazı genler tanımlanmış olmasına rağmen, mekanizması ve hastalıklarla olan ilişkisi üzerine yapılan çalışmalar hala sınırlıdır.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda ferroptoz ile ilişkili genlerin tespit edilerek TCGA ve GEO veri tabalarında bulunan verilerle karşılaştırıp merkezi genlerin belirlenmesi ve aralarındaki ilişkilerin, hastalık sürecine etkileri gibi faktörlerin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada kullanılan ferroptoz ile ilişkili genler ferroptoz veri tabanından (FerrDb; <http://www.zhounan.org/ferrdb>) (Zhou and Bao, 2020) elde edilmiştir. The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<https://portal.gdc.cancer.gov/repository>) ve Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) veri tabanları laringeal kanserli hastaların mRNA ekspresyon verileri, klinik bilgileri, hastalık ilerlemesi ve ferroptoz ile ilgili bazı genleri taramak için kullanıldı. Laringeal kanser ile ilgili GSE143224 ve GSE84957 mikrodizi veri setleri GEO veri tabanından elde edilmiştir. Laringeal kanserli hasta grubu ve normal kontrol grubu arasında diferansiyel olarak eksprese edilen genler (DEG'ler) R yazılımı üzerinden limma paketi kullanılarak analiz edildi. $p < 0.05$ olan veriler anlamlı olarak kabul edildi. Tüm veri setleri kullanılarak ferroptoz ve laringeal kanser ile ilişkili genleri elde etmek için örtüşen/ortak veriler kullanılmıştır (Şekil 1).

Şekil 1. İş akış şeması

Etik Bildirim: Araştırmamızda kullanılan veri setleri GEO ve TCGA veri tabanlarında araştırmacıların erişimine açık dosyalar olarak sunulduğundan, çalışmamızda insan/hayvan örnekleri kullanılmadığından etik kurul onayı gerekmemektedir.

Protein Etkileşim Ağ Analizi ve Merkezi Genlerin Tanımlanması

DEG'lerin protein-protein etkileşimlerini (PPE) analiz etmek için Cytoscape (Cytoscape v3.8.2) yazılımı ve yazılım içerisinde yer alan STRING (<https://string-db.org/>) eklentisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. STRING eklentisinde confidence (score) cutoff 0.4 olarak belirlendi. Analiz sonucunda $p < 0.05$ olan veriler anlamlı olarak kabul edildi (Şekil 1).

Ortak DEG'lerin Fonksiyonel Analizleri

Tüm veri setlerinde ortak olarak saptanan DEG'lerin moleküler yollarda ve biyolojik süreçlerde kümelenmelerini ve fonksiyonlarını analiz etmek için Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) ve Gene Ontology (GO) veri tabanları kullanıldı. $p < 0.05$ olan veriler anlamlı olarak kabul edildi (Şekil 1).

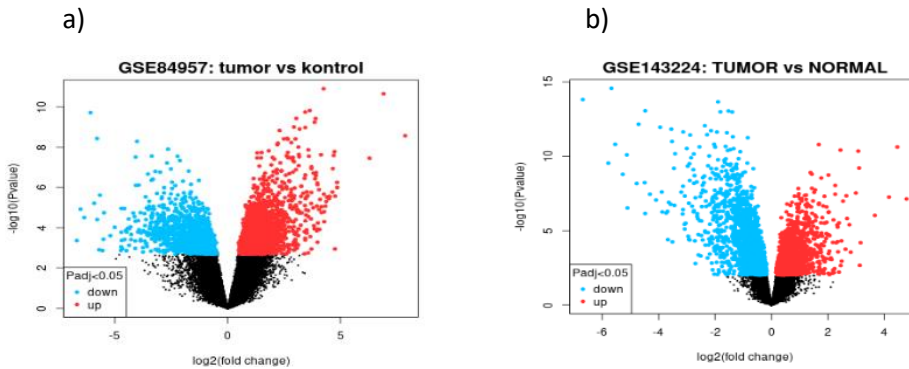
Bulgular

DEG Analizleri ve Ortak DEG'lerin Tanımlanması

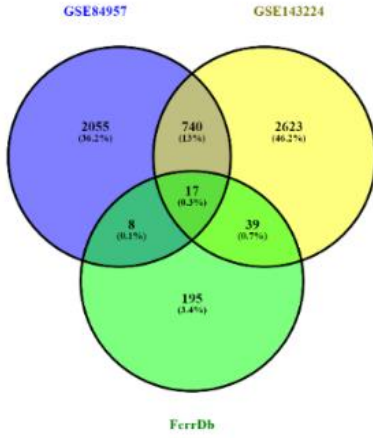
Ferroptoz ile ilgili 259 gen FerrDb veri tabanından elde edildi. Larinks kanserinde rol oynadığı düşünülen ferroptoz DEG'lerini tanımlamak için FerrDB' den elde edilen genlerin TCGA-HNSCC (TCGA-Baş boyun skuamoz hücreli karsinom) (PanCancer Atlas, 523 örnek), GSE143224 (25 örnek) ve GSE84957 (18 örnek) veri setleri ile analizleri yapıldı (Şekil 2). FerrDb, GSE143224 ve GSE84957 veri setleri karşılaştırıldığında 17 ortak DEG elde edilmiştir ($p < 0.05$). 17 ortak DEG TCGA-HNSCC veri setinin larinks kanser kökenli hasta verileri (119 hasta) ile karşılaştırıldığında TFRC (%24) ve HSF1 (%11)' in en yüksek genetik değişikliklere sahip olduğu diğer genlerin ise < 4.01 genetik değişikliklere sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 2).

Analiz sonrasında 13 adet yukarı regüle edilmiş (NOX4, BID, ABCC1, TNFAIP3, PANX1, SLC1A4, SLC3A2, FTL, TFRC, AURKA, HSF1, PML, CA9; $p < 0.05$) ve 3 adet aşağı regüle edilmiş gen (CHAC1, LPIN1, MUC1; $p < 0.05$) saptanmıştır (Şekil 1, Tablo 1). MAPK3 geni GEO veri setlerinde anlamlı bir şekilde aşağı regüle olduğu saptanırken TCGA veri setinde anlamlı bir değişim göstermediğinden DEG listesinden çıkarılmıştır (Şekil 2).

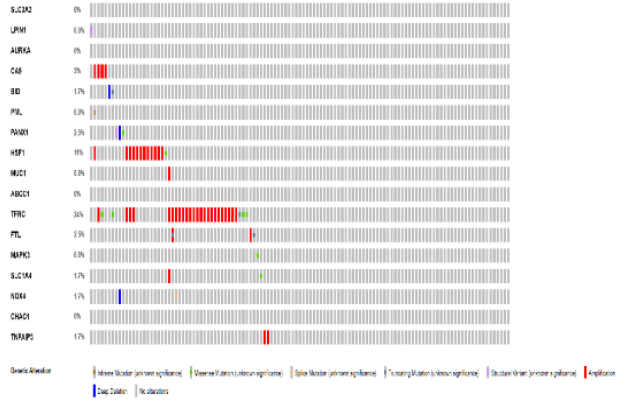
Şekil 2. a) GSE84957 veri setinde tümör örneklerinin kontrol grubu örnekleri ile karşılaştırıldığında elde edilen yukarı (up) ve aşağı (down) regüle edilen genler, b) GSE143224 veri setinde tümör örneklerinin kontrol grubu örnekleri ile karşılaştırıldığında elde edilen yukarı (up) ve aşağı (down) regüle edilen genler, c) GSE84957, GSE143224 ve FerrDB veri setlerinde saptanan ortak DEG'ler, d) Ortak DEG'lerin genetik değişimleri



c)



d)



Tablo 1. Veri setlerinde saptanan ortak DEG'ler

	GSE84957	GSE143224	TCGA	
Gen Adı	Gen Düzenlenmesi	Gen Düzenlenmesi	Gen Düzenlenmesi	Kromozom lokasyonu
SLC3A2	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	chr11
LPIN1	Aşağı (Down)	Aşağı (Down)	Aşağı (Down)	chr2
AURKA	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	chr20
CA9	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	chr9
BID	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	chr22
PML	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	chr15
PANX1	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	chr11
HSF1	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	chr8
MUC1	Aşağı (Down)	Aşağı (Down)	Aşağı (Down)	chr1
ABCC1	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	chr16
TFRC	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	chr3
FTL	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	chr19
MAPK3	Aşağı (Down)	Aşağı (Down)	-	chr16
SLC1A4	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	chr2
NOX4	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	chr11
CHAC1	Aşağı (Down)	Aşağı (Down)	Aşağı (Down)	chr15
TNFAIP3	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	Yukarı (Up)	chr6

Laringeal Kanser ve Ferroptoz ile İlişkili Genlerin Gen Ontoloji ve Yolak Zenginleştirme Analizleri

Ferroptoz ve larinks kanseri ile ortak rolü olduğu düşünülen DEG'lerin potansiyel biyolojik fonksiyonları GO ve KEGG zenginleştirme yöntemleri kullanılarak analiz edildi. Bu analiz için tespit edilen 16 DEG Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) web yazılımına yüklenerek gerçekleştirildi. GO analiz sonucuna göre yukarı regüle olan 13 genin “vascular transport (GO:0010232)”, “positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway (GO:2001238)” “iron ion homeostasis (GO:0055072)” ve “mitotic G1 DNA damage checkpoint signaling (GO:0031571)” gibi birçok biyolojik süreçte görev aldıkları saptanmıştır (Tablo 2). Bununla birlikte aşağı regüle edilen 3 genin GO analiz sonucuna göre bu genlerin “positive regulation of histone H4 acetylation (GO:0090240)”, “regulation of DNA-templated transcription in response to stress (GO:0043620)”, “DNA damage response, signal transduction resulting in transcription (GO:0042772)” ve “negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator (GO:1902254)” gibi önemli kanser biyolojik süreçlerinde rol oynadıkları saptanmıştır (Tablo 3).

Tablo 2. Yukarı regüle olan ortak DEG'lerin biyolojik süreçlerle ilişkili en anlamlı 20 gen ontoloji analiz sonuçları (p<0.05)

Biyolojik süreç tanımları	p değeri	Genler
Vascular transport (GO:0010232)	1.98E-05	ABCC1;TFRC;SLC1A4
Transport across blood-brain barrier (GO:0150104)	2.13E-05	ABCC1;TFRC;SLC1A4
Regulation of protein-containing complex assembly (GO:0043254)	5.21E-05	TFRC;HSF1;BID
Nitrogen compound transport (GO:0071705)	9.71E-05	ABCC1;SLC3A2;SLC1A4
Amino acid import across plasma membrane (GO:0089718)	1.07E-04	SLC3A2;SLC1A4
L-alpha-amino acid transmembrane transport (GO:1902475)	1.36E-04	SLC3A2;SLC1A4
L-amino acid transport (GO:0015807)	1.46E-04	SLC3A2;SLC1A4
Neutral amino acid transport (GO:0015804)	1.46E-04	SLC3A2;SLC1A4
Positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway (GO:2001238)	1.57E-04	BID;PML
Amino acid transport (GO:0006865)	4.69E-04	SLC3A2;SLC1A4
DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in cell cycle arrest (GO:0006977)	5.89E-04	PML;AURKA

Carboxylic acid transport (GO:0046942)	6.10E-04	SLC3A2;SLC1A4
Cellular iron ion homeostasis (GO:0006879)	6.32E-04	TFRC;FTL
Positive regulation of mitochondrion organization (GO:0010822)	6.32E-04	BID;AURKA
Positive regulation of apoptotic signaling pathway (GO:2001235)	6.54E-04	BID;PML
Iron ion homeostasis (GO:0055072)	6.98E-04	TFRC;FTL
Regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway (GO:2001236)	7.69E-04	BID;PML
Mitotic G1 DNA damage checkpoint signaling (GO:0031571)	7.93E-04	PML;AURKA
Anion transmembrane transport (GO:0098656)	8.42E-04	ABCC1;SLC3A2
DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator (GO:0030330)	0.001025972	PML;AURKA

Tablo 3. Aşağı regüle olan ortak DEG'lerin biyolojik süreçlerle ilişkili en anlamlı 20 gen ontoloji analiz sonuçları (p<0.05)

Biyolojik süreç tanımları	p değeri	Genler
Positive regulation of histone H4 acetylation (GO:0090240)	0.001049661	MUC1
Glutathione catabolic process (GO:0006751)	0.001049661	CHAC1
Regulation of DNA-templated transcription in response to stress (GO:0043620)	0.001349432	MUC1
Regulation of histone H4 acetylation (GO:0090239)	0.001349432	MUC1
Negative regulation of cell adhesion mediated by integrin (GO:0033629)	0.001499295	MUC1
Negative regulation of transcription by competitive promoter binding (GO:0010944)	0.001499295	MUC1
DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in transcription of p21 class mediator (GO:0006978)	0.001499295	MUC1
Negative regulation of protein maturation (GO:1903318)	0.001649143	CHAC1
DNA damage response, signal transduction resulting in transcription (GO:0042772)	0.001649143	MUC1
Glutathione biosynthetic process (GO:0006750)	0.001649143	CHAC1
Nonribosomal peptide biosynthetic process (GO:0019184)	0.001798976	CHAC1

Mitotic nuclear membrane disassembly (GO:0007077)	0.001798976	LPIN1
Negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator (GO:1902166)	0.001948794	MUC1
Regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator (GO:1902165)	0.002098597	MUC1
Nuclear membrane disassembly (GO:0051081)	0.002098597	LPIN1
Phosphatidylethanolamine biosynthetic process (GO:0006646)	0.002248385	LPIN1
Negative regulation of protein processing (GO:0010955)	0.002248385	CHAC1
Negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator (GO:1902254)	0.002547917	MUC1
Cellular modified amino acid catabolic process (GO:0042219)	0.002547917	CHAC1
Triglyceride biosynthetic process (GO:0019432)	0.00269766	LPIN1

Yukarı regüle edilen 13 genin KEGG yolak analiz sonucuna göre bu genlerin “Ferroptosis”, “Necroptosis”, “Sphingolipid signaling pathway”, “Epstein-Barr virus infection” ve “Pathways in cancer” gibi önemli kanser gelişim yollarında rol oynadıkları saptanmıştır (Tablo 4).

Bununla birlikte aşağı regüle edilen 3 genin KEGG yolak analiz sonucuna göre bu genlerin “Glutathione metabolism” ve “mTOR signaling pathway” gibi önemli kanser gelişim yollarında rol oynadıkları saptanmıştır (Tablo 5).

Protein-Protein Etkileşim Ağının Oluşturulması

Cytoscape yazılımı içerisinde bulunan STRING uygulaması kullanılarak analiz edilen 16 ortak DEG’ in diğer proteinlerle etkileşimleri 96 gen ve bunlar arasındaki 1460 bağlantı ile oluşturulmuştur. Degree \geq 10 olan TNFAIP3 (37), BID (37), TFRC (12) ve AURKA (10) genleri merkezi genler olarak kabul edildi. Bu genlerin tümünün laringeal kanser hastalarında kontrol grubuna göre yukarı regüle olduğu tüm veri setlerimizde saptanmıştır (Şekil 3).

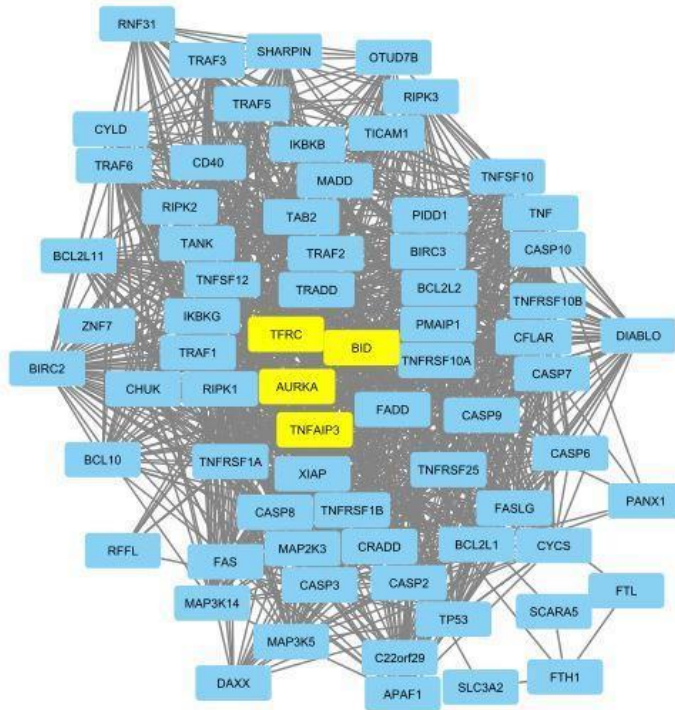
Tablo 4. Yukarı regüle olan ortak DEG' lerin kümелendikleri en anlamlı 20 KEGG yolağı analiz sonuçları ($p < 0.05$)

KEGG Yolağı	p değeri	Genler
Ferroptosis	2.25E-06	TFRC;SLC3A2;FTL
Necroptosis	1.33E-04	TNFAIP3;BID;FTL
Sphingolipid signaling pathway	0.002623316	ABCC1;BID
Measles	0.003557411	TNFAIP3;BID
Influenza A	0.005389102	BID;PML
NOD-like receptor signaling pathway	0.005949929	PANX1;TNFAIP3
Epstein-Barr virus infection	0.007358162	TNFAIP3;BID
Nitrogen metabolism	0.010996994	CA9
Endocytosis	0.0112551	TFRC;PML
Vitamin digestion and absorption	0.015492656	ABCC1
Alzheimer disease	0.023150999	NOX4;BID
ABC transporters	0.028866726	ABCC1
Legionellosis	0.036433558	HSF1
Pathways of neurodegeneration	0.03692803	NOX4;BID
Mineral absorption	0.038316744	FTL
Viral myocarditis	0.038316744	BID
Herpes simplex virus 1 infection	0.040255484	BID;PML
Acute myeloid leukemia	0.042697641	PML
Pathways in cancer	0.045225356	BID;PML
p53 signaling pathway	0.046438025	BID

Tablo 5. Aşağı regüle olan ortak DEG'lerin kümelendikleri en anlamlı 20 KEGG yolağı analiz sonuçları ($p < 0.05$)

KEGG Yolağı	p değeri	Genler
Glutathione metabolism	0.008525987	CHAC1
Glycerolipid metabolism	0.009122478	LPIN1
Glycerophospholipid metabolism	0.014628688	LPIN1
mTOR signaling pathway	0.022923562	LPIN1

Şekil 3. TFRC, BID, AURKA ve TNFAIP' ün ağ etkileşim analiz sonucu



Tartışma

Laringeal karsinom solunum yollarının en sık görülen tümörlerinden biridir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla bu hastalığın tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Lokalize hastalıklarda cerrahi, tedavinin önemli bir parçası olmasına rağmen, radyoterapi ve sistemik tedavi gibi cerrahi olmayan yöntemler de uygulanabilir seçenekler haline gelmiştir. Ayrıca hastalığın metastaza uğramış durumlarında yeni ilaçların kullanımı hastalar için umut verici olmaktadır. Bu nedenle laringeal karsinom tedavisi için yeni ilaç hedeflerinin saptanması gerekmektedir. Ferroptoz, son

yıllarda keşfedilen yeni bir hücre ölüm tipi olup hücre ölümü sürecinde genellikle büyük miktarda demir birikimi ve lipid peroksidasyonu gerçekleşmektedir. Ferroptozu indükleyen faktörler, glutatyon peroksidazı doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilirler, bu da antioksidan kapasitede bir azalmaya ve hücrelerde lipid reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine neden olarak oksidatif hücre ölümüne yol açmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, ferroptozun, tümörler, sinir sistemi hastalıkları, iskemi-reperfüzyon hasarı, böbrek hasarı ve kan hastalıkları gibi birçok hastalığın patofizyolojik süreçleriyle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir¹¹. Bu durum da her iki sürecin moleküler mekanizmalarının araştırılmasını ve hastalığın gelişiminde rol oynayabilecek biyobelirteçlerin ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada ferroptoz ile ilişkili olabilecek genlerin TCGA ve GEO veri tabanlarındaki ekspresyonları analiz edilerek, laringeal karsinom tanı ve tedavisi için önemleri araştırılmıştır.

Ferroptoz ve laringeal kanser arasındaki ortak mekanizmaları araştıran çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bazı çalışmalar ferroptoz ve apoptozun baş boyun kanserinde hücre ölümüne katkıda bulunabileceğini göstermiştir^{12,13}. Bununla birlikte ferroptoz ile ilişkili genler ve hastanın prognozu arasındaki korelasyon çalışmaları da bulunmaktadır. Ferroptoz ile ilişkili genlerin hemen hemen yarısı, laringeal kanser tümör dokuları ve normal dokular arasında farklı şekilde eksprese edildiği saptanmıştır ve ferroptoz ile ilişkili üç gen (FTH1, PHKG2, TFRC) kullanılarak, laringeal kanser hastaları ile prognostiği tahmin etmek için yeni bir model oluşturulmuştur¹⁴. Wu ve ark. yapmış oldukları çalışma ile laringeal karsinom hücre ve dokularında SLC3A2' nin mRNA, protein ekspresyonunu ve laringeal karsinom hücre ferroptozunda fonksiyonel düzenleyici mekanizmasını araştırmışlardır. Araştırmacıların yapmış oldukları analizler sonrasında SLC3A2' nin laringeal karsinomda mTOR yolu aracılığıyla ferroptozu negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir¹⁵. Bizim çalışmamızda farklı veri setlerinin kullanılması ve farklı gen setlerinin elde edilmesi çalışmanın özgün değerini oluşturmaktadır.

TNFAIP3 hem NF-κB sinyal yolağını hem de tümör nekroz faktör aracılı apoptozu inhibe ederek sitokin aracılı immün ve inflamatuvar yanıtlardan sorumlu çinko parmak bir proteindir^{16,17}. Yapılan çalışmalar, TNFAIP3'ün çeşitli malignitelerde önemli bir tümör baskılayıcı gen olarak davrandığını göstermiştir. TNFAIP3, Twist1 ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla hepatoselüler karsinom proliferasyonunu baskılamaktadır. TNFAIP3 eksikliğinin, Epstein-Barr virüsü ile ilişkili lenfoproliferatif bozukluklar/lenfomalar ile aralarında sıkı bir bağlantı olduğu saptanmıştır. Ayrıca birkaç insan B hücreli lenfomada bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü ve dendritik hücrelerde hücre farklılaşmasında da görev aldıkları belirtilmektedir. Bu genin düşük ekspresyonunun birçok kanser türünde uzak metastatik grupta metastatik olmayan gruba göre daha sık gözleendiği, hastaların uzak metastazı ile negatif bir korelasyon gösterdiği ve kötü hasta prognozu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir¹⁶. TNFAIP3' ün aşırı ekspresyonunun, serbest oksijen radikal oluşumunu ve erastin tarafından indüklenen ferroptozu artırdığı saptanmıştır^{18,19}. Bizim

çalışmamızda da, TNFAIP3' ün hem GEO hem de TCGA veri setlerinde kontrole göre anlamlı bir şekilde daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır, bu da TNFAIP3' ün işleviyle ilgili bir duruma işaret ediyor olabilmekte, karsinogenez sürecindeki tümör ilerlemesini inhibe edebilmek için TNFAIP3 ifadesini indüklediği negatif bir geri besleme döngüsünde olduğunu düşündürmektedir.

Ye ve ark. YTHDF1'in yüksek ekspresyonunun, hipofaringeal skuamöz hücreli karsinomda (HFSHK) demir birikimi oluşumunu artırmak için TFRC geninin mRNA'sı üzerindeki m6A modifikasyonlarını arttırdığını göstermiştir. TFRC mRNA'sı üzerindeki bu modifikasyonların tümör oluşumunu ve proliferasyonunu etkilediğini, ayrıca, YTHDF1 ve demirle ilgili genlerin (FTH1 ve TFRC), tümör dokularında önemli ölçüde yukarı doğru düzenlendiği gösterilmiştir²⁰. Bu nedenle, bu genlerin HFSHK için potansiyel bir terapötik hedef olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Yapılan başka bir çalışmada TFRC geninin insan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde meme epitelyal MCF-12A hücrelerinden daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, TFRC antisens oligonükleotitleri, hücre içi toplam demir ve TFRC mRNA seviyelerini düşürdüğü, kültür ortamında 4T1 hücre proliferasyonunu ve meme adenokarsinomunun 4T1 fare modelinde tümör büyümesini ve pulmoner metastazı inhibe ettiği gösterilmiştir²¹. TFRC geninin karaciğer kanserindeki etkisini araştıran başka bir çalışmaya göre, TFRC gen ekspresyonunun kanser evresi ile doğru orantılı olarak arttığını ve proliferasyon geçiren lezyonlardaki seçici ekspresyonun, demir homeostazındaki varyasyonların tümörün ilerlemesinde rol oynadığını göstermiştir²². Epiteliyal over kanserinde ise TFRC'nin aşırı eksprese edildiği ve hastaların prognozu ile negatif olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir. TFRC yıkımı, in vitro olarak epiteliyal over kanseri hücre proliferasyonunu, göçünü ve istilasını önemli ölçüde bastırır ve in vivo olarak tümör büyümesini ve metastazını engellemektedir. Ayrıca epiteliyal over kanseri hücrelerinde TFRC aracılı proliferasyon ve metastazın, AXIN2 gen ekspresyonunun pozitif düzenlenmesinden kaynaklandığı gösterilmiştir. Çalışmadaki bu bulgular değerlendirildiğinde, TFRC' nin epiteliyal over kanserinde önemli bir prognoz göstergesi olduğu ve insan epiteliyal over kanserinde potansiyel yeni bir terapötik hedef olarak gelecekteki gelişiminin umut verici olabileceği gösterilmiştir²³. TFRC' nin pankreas kanseri dokusunda yüksek oranda eksprese edildiği de saptanmıştır. TFRC' nin yukarı regüle edilmiş ifadesi, pankreas kanserli hastalarda sağkalım ile negatif korelasyon göstermektedir. Yapılan in siliko analiz ile, TFRC' nin pankreas kanserinin oluşumunda ve gelişiminde esas olarak sinyal yolları aracılığıyla bir rol oynadığını göstermiştir. Son olarak, TFRC, immünoterapiyi etkileyebilecek immün fenotipler ve immün hücre infiltrasyonu ile de ilişkili olabilmektedir²⁴. Bizim çalışmamızda da TFRC geninin laringeal kanserli hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu saptanmıştır. TFR1'in keşfinden bu yana birçok önemli araştırma yapılmasına rağmen, birkaç önemli konu hala çözüme kavuşturulamamıştır. İlk olarak, TFR1'in hücresel düzeyde ek sinyal yolları veya proteinlerle etkileşime girip girmediği belirsizliğini koruyor, bu da TFR1' e dayalı tedavilerin geliştirilmesi için gerekli olabilecek konulardan biri olmaktadır. Eristin veya

Cys2 yoksunluğu tarafından indüklenen ferroptoz, TF-demir komplekslerinin hücelere alınması için gerekli olan TFR1'i kodlayan TFRC geninin susturulmasıyla önlenmektedir. TFR1'in insan kanser hücrelerinde yukarı doğru düzenlendiği bilinmesine rağmen, ferroptozda hala belirsiz işlevlere ve mekanizmalara sahiptir²⁵. Bununla birlikte ilaç tedavileri TFR1 ekspresyonunu baskılayabildiğinden, TFR1'e özgü geri dönüşümlü bir antagonist geliştirmek, hem temel araştırma hem de klinik uygulama için tek ve en etkili strateji olacaktır.

BID, kaspaz-8 aracılığıyla mitokondriyal hasarın bir mediyatörü olarak görev yapan ve ferroptozu neden olan genlerden biridir. BID'in yukarı regülasyonu, mitokondriyal zarın geçirgenliğini artırabilir ve tümör hücresi apoptozunu artıracak olan mitokondriyal bölmeden apoptoz indükleyici faktör (AIF)'ün salınmasını kolaylaştırabilir. Bizim çalışmamızda da BID geni laringeal kanser dokularında kontrol grubuna göre yüksek seviyede ekspresyon göstermiştir.

Aurora kinaz A (Aurora-A-AURKA) geninin, tümör hücrelerinde farklı rolleri bulunmaktadır. Aurora-A, mitoz sırasında çeşitli molekülleri ve substratları düzenleyip çoğalma, göç, istila, metastaz, tümörigenez ve apoptoz gibi tümör gelişim süreçlerinde sinyal moleküllerini etkilemektedir^{26,27}. Birçok molekülün düzenlenmesi yanında p53/p73, p27, PP1, BRCA, Ras, MEK/ERK sinyal yolu, PLK1, TPX2, NF-κB sinyal yolu, Hippo sinyal yolu, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolu, RIPK1/3, MLKL, Wnt/β-katenin yolu ve p38 MAPK sinyal yolu gibi birçok biyolojik yolda önemli rolleri bulunmaktadır²⁸⁻³⁰. Oral skuamöz hücreli karsinomda, Aurora-A'nın inhibisyonu, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini ve tümör apoptozunu uyarmaktadır. Kolorektal kanserde, hnRNP Q1, Aurora-A transkripsiyonunu kontrol ederek hücre proliferasyonunu ve tümör oluşumunu etkilemektedir. Papiller tiroid kanserde, aktin bağlayıcı bir protein olan kofilin-1 (CFL-1), aktivasyonunu ve tümör göçünü katalize etmek için Aurora-A tarafından defosforile edilmektedir³¹⁻³³. Aurora-A, mitokondriyal füzyonu uyarmak için tümör hücrelerinin mitokondriyelerinde lokalize olabilir, böylece daha fazla ATP üretir ve tümör hücre proliferasyonu için faydalı olan tümör hücreleri için daha fazla enerji desteği sağlar³⁴. Aurora-A aşırı ekspresyonu, akciğer kanseri, hepatoselüler karsinom, servikal skuamöz hücreli karsinom, glioblastoma, nazofaringeal karsinom ve prostat kanseri gibi birçok kanserde radyoterapi direncini indükleyebilmektedir³⁵⁻³⁷. Bizim çalışmamızda da Aurora-A geninin laringeal kanserli hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu, kanser ve ferroptoz ile ilişkili yollarda rol oynadığı saptanmıştır.

İn siliko yöntemlerle tasarlanan bu çalışmanın bulguları bu alanda çalışacak diğer araştırmacıların deneysel çalışmalarına yön verebilmeleri için önemli veri sunmaktadır. Çalışma sonunda elde ettiğimiz bulgular literatürle uyumlu olarak görünse de çalışmamızın bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Yapılan analizler TCGA ve GEO veri tabanlarında yer alan hasta-kontrol veri setleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu nedenden dolayı, elde ettiğimiz verilerin

in vitro ve in vivo koşullarda fonksiyonel analizlerinin yapılması gerekmektedir. Yapılacak bu ileri deneyler ve analizler sonrasında da yeni ilaç hedefleri oluşturulabilecektir.

Sonuç

Ferroptoz ile ilişkili hastalık için optimal hedefe yönelik tedaviyi belirlemek ve geliştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Genel olarak, ferroptotik sinyalleri ve yolakları baskılamayı amaçlayan tedavi stratejilerinin aşırı demir yükü hastalıklarına fayda sağlaması beklenebilir. Ferroptoz yoluyla kemoterapinin duyarlı ve laringeal kanser hücrelerinin etkisiz hale getirilmesi, altta yatan mekanizmaları aydınlatmaya yardımcı olacak başlıca araştırma alanlarıdır. Bununla birlikte bazı hücre popülasyonları ferroptozu önlemek için değişikliklere uğrar ve bu tür değişikliklerin anlaşılması, ferroptozu duyarlılığın biyolojik belirteçlerini taramak için çok önemli olmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Tamaki A, Miles BA, Lango M, Kowalski L, Zender CA. AHNS Series: Do you know your guidelines? Review of current knowledge on laryngeal cancer. *Head Neck*. 2018;40(1):170-181.
2. Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, Higgins KA, Saba NF. An update on larynx cancer. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):31-50.
3. Belcher R, Hayes K, Fedewa S, Chen AY. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. *J Surg Oncol*. 2014;110(5):551-574.
4. Salvador-Coloma C, Cohen E. Multidisciplinary Care of Laryngeal Cancer. *J Oncol Pract*. 2016;12(8):717-724.
5. Zhang Y, Lu X, Tai B, Li W, Li T. Ferroptosis and Its Multifaceted Roles in Cerebral Stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021;15:615372.
6. Bu ZQ, Yu HY, Wang J, et al. Emerging Role of Ferroptosis in the Pathogenesis of Ischemic Stroke: A New Therapeutic Target? *ASN Neuro*. 2021;13:17590914211037505.
7. Guan Q, Zhou LL, Dong YB. Ferroptosis in cancer therapeutics: a materials chemistry perspective. *Journal of Materials Chemistry*. 2021;9(43):8906-8936.
8. Hu X, Xu Y, Xu H, et al. Progress in Understanding Ferroptosis and Its Targeting for Therapeutic Benefits in Traumatic Brain and Spinal Cord Injuries. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:705786.

9. Ye F, Chai W, Xie M, et al. HMGB1 regulates erastin-induced ferroptosis via RAS-JNK/p38 signaling in HL-60/NRAS(Q61L) cells. *American Journal of Cancer Research*. 2019;9(4):730-739.
10. Nishizawa H, Matsumoto M, Chen G, et al. Lipid peroxidation and the subsequent cell death transmitting from ferroptotic cells to neighboring cells. *Cell Death & Disease*. 2021;12(4):332.
11. Li J, Cao F, Yin HL, et al. Ferroptosis: Past, present and future. *Cell Death Dis*. 2020;11(2):88.
12. Lin R, Zhang Z, Chen L, et al. Dihydroartemisinin (DHA) induces ferroptosis and causes cell cycle arrest in head and neck carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2016;381(1):165-175.
13. Kim EH, Shin D, Lee J, Jung AR, Roh JL. C1SD2 inhibition overcomes resistance to sulfasalazine-induced ferroptotic cell death in head and neck cancer. *Cancer Lett*. 2018;432:180-190.
14. Han F, Li W, Chen T, et al. Ferroptosis-related genes for predicting prognosis of patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2021;278(8):2919-2925.
15. Wu F, Xiong G, Chen Z, Lei C, Liu Q, Bai Y. SLC3A2 inhibits ferroptosis in laryngeal carcinoma via mTOR pathway. *Hereditas*. 2022;159(1):6.
16. Huang T, Yin L, Wu J, et al. TNFAIP3 inhibits migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma by suppressing epithelial mesenchymal transition. *Neoplasma*. 2017;64(3):389-394.
17. Catrysse L, Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends in Immunology*. 2014;35(1):22-31.
18. Meng Z, Zhao T, Zhou K, et al. A20 Ameliorates Intracerebral Hemorrhage-Induced Inflammatory Injury by Regulating TRAF6 Polyubiquitination. *Journal of Immunology*. Jan 15 2017;198(2):820-831.
19. Xiao FJ, Zhang D, Wu Y, et al. miRNA-17-92 protects endothelial cells from erastin-induced ferroptosis through targeting the A20-ACSL4 axis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;515(3):448-454.
20. Ye J, Wang Z, Chen X, et al. YTHDF1-enhanced iron metabolism depends on TFRC m(6)A methylation. *Theranostics*. 2020;10(26):12072-12089.

21. Jiang XP, Elliott RL, Head JF. Manipulation of iron transporter genes results in the suppression of human and mouse mammary adenocarcinomas. *Anticancer Research*. 2010;30(3):759-765.
22. Takahashi M, Shibutani M, Woo GH, et al. Cellular distributions of molecules with altered expression specific to the tumor promotion process from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model. *Carcinogenesis*. 2008;29(11):2218-2226.
23. Huang Y, Huang J, Huang Y, et al. TFRC promotes epithelial ovarian cancer cell proliferation and metastasis via up-regulation of AXIN2 expression. *American Journal of Cancer Research*. 2020;10(1):131-147.
24. Yang C, Li J, Guo Y, et al. Role of TFRC as a Novel Prognostic Biomarker and in Immunotherapy for Pancreatic Carcinoma. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022;9:756895.
25. Kazan HH, Urfali-Mamatoglu C, Gunduz U. Iron metabolism and drug resistance in cancer. *Biometals*. 2017;30(5):629-641.
26. Min YH, Kim W, Kim JE. The Aurora kinase A inhibitor TC-A2317 disrupts mitotic progression and inhibits cancer cell proliferation. *Oncotarget*. 2016;7(51):84718-84735.
27. Heo SK, Noh EK, Jeong YK, et al. Radotinib inhibits mitosis entry in acute myeloid leukemia cells via suppression of Aurora kinase a expression. *Tumour biology : The Journal of The International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2019;41(5):1010428319848612.
28. Yuan CX, Zhou ZW, Yang YX, et al. Inhibition of mitotic Aurora kinase A by alisertib induces apoptosis and autophagy of human gastric cancer AGS and NCI-N78 cells. *Drug Design, Development and Therapy*. 2015;9:487-508.
29. Xie CM, Lin XT, Wu D, Tan Y, Cheng CHK, Zhang J. Cardiac glycoside bufalin blocks cancer cell growth by inhibition of Aurora A and Aurora B activation via PI3K-Akt pathway. *Oncotarget*. 2018;9(17):13783-13795.
30. Fu Y, Zhang Y, Gao M, Quan L, Gui R, Liu J. Alisertib induces apoptosis and autophagy through targeting the AKT/mTOR/AMPK/p38 pathway in leukemic cells. *Molecular Medicine Reports*. 2016;14(1):394-398.
31. Dawei H, Honggang D, Qian W. AURKA contributes to the progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC) through modulating epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and apoptosis via the regulation of ROS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;507(1-4):83-90.

32. Lai CH, Huang YC, Lee JC, et al. Translational upregulation of Aurora-A by hnRNP Q1 contributes to cell proliferation and tumorigenesis in colorectal cancer. *Cell Death & Disease*. 2017;8(1):e2555.
33. Maimaiti Y, Jie T, Jing Z, et al. Aurora kinase A induces papillary thyroid cancer lymph node metastasis by promoting cofilin-1 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016;473(1):212-218.
34. Bertolin G, Bulteau AL, Alves-Guerra MC, et al. Aurora kinase A localises to mitochondria to control organelle dynamics and energy production. *eLife*. 2018;7.
35. Ma Y, Yang J, Wang R, et al. Aurora-A affects radiosensitivity in cervical squamous cell carcinoma and predicts poor prognosis. *Oncotarget*. 2017;8(19):31509-31520.
36. Willems E, Dedobbeleer M, Digregorio M, et al. Aurora A plays a dual role in migration and survival of human glioblastoma cells according to the CXCL12 concentration. *Oncogene*. 2019;38(1):73-87.
37. Moretti L, Niermann K, Schleicher S, et al. MLN8054, a small molecule inhibitor of aurora kinase a, sensitizes androgen-resistant prostate cancer to radiation. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 2011;80(4):1189-1197.