



Farklı Glioma Alt Tiplerinde Sitoprotektif NRF2/KEAP1/P62/SQSTM1 Sinyal Yolunun Mutasyon ve Ekspresyon Profilinin Karşılaştırmalı Analizi: Bir *In Silico* Çalışma

Comparative Analysis of the Mutation and Expression Profile of the Cytoprotective NRF2/KEAP1/P62/SQSTM1 Signaling Pathway in Different Glioma Subtypes: An *In Silico* Study

✉ Dilara Fatma AKIN¹, ✉ Sedef Hande AKTAŞ²

¹Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Niğde, Türkiye

²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Translasyonel Tıp Araştırma ve Klinik Merkezi; Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı; Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

ÖZ

Amaç: NRF2/KEAP1/p62/SQSTM1 sinyalizasyon yolu, redoks homeostazında önemli rol oynayan antioksidan enzimlerin ve detoksifikasyon proteinlerinin ana düzenleyicisidir. Yapısal olarak aktif NRF2/KEAP1 yolunun, tümörigenezi ve metastatik süreçleri inhibe ettiği ve kemorezistansı teşvik eden hayatta kalma yanlısı genleri indüklediği için kanserde çok önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Yoluğun fonksiyonunun bozulduğu moleküler mekanizmalar ile beyin tümörleri gelişimi arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmanın amacı NRF2/KEAP1 yolunun genetik değişikliklerini ve ifade seviyesi farklılıklarını düşük dereceli glioma (LGG) ve glioblastoma multiforme (GBM) patolojisinde karşılaştırmalı olarak analiz etmektir.

Gereç ve Yöntem: GBM ve LGG hastalarına ve sağlıklı doku örneklerine ait gen ekspresyon profilleri ve DNA dizileri, kanser genom atlas veri tabanından indirildi. KEAP1, NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1 genlerinin mutasyon ve ifade profilleri kapsamlı olarak analiz edildi. Çalışmada sadece gen ekspresyonu ve mutasyon paternlerinin tespiti değil, aynı zamanda hedef genlerin sağkalım üzerine olan etkileri de belirlendi. Ayrıca belirlenen değişikliklerin hastalık yapıcı patojenik özellikleri tahmini için PolyPhen-2 ve SNAP araçları kullanıldı.

Bulgular: Her iki kanser grubu için KEAP1, NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1 genlerinde toplam 16 (12 missense mutasyon, 1 nonsense mutasyon, 1 delesyon, 2 translokasyon) mutasyon ve gen amplifikasyonu belirlendi ve mutasyon taşıma sıklığı %4,6 idi. LGG'li 1 hastada IDH1 R132H ve NRF2 S164* mutasyon birlikteliği belirlendi. LGG ve GBM alt tiplerinin her ikisi için de KEAP1, NRF2 ve HMOX1 gen ekspresyon seviyeleri, hasta örneklerinde sağlıklı örneklerle göre yüksek olarak belirlendi (p<0,05).

Sonuç: NRF2/KEAP1/p62/SQSTM1 sinyalizasyon yolu, anomalilerinin hedeflenmesi ile glioma tedavisinde özellikle kemoterapi duyarlılığı için yeni terapötik yaklaşımlar sağlanabilir.

Anahtar Kelimeler: NRF2/KEAP1/p62/SQSTM1 yolu, glioma, mutasyon, gen ekspresyonu, oksidatif stress

ABSTRACT

Aim: The NRF2/KEAP1/p62/SQSTM1 pathway is the master regulator of antioxidant enzymes and detoxification proteins, both of which play a critical role in redox homeostasis. It shows that this structurally active pathway has a crucial role in cancer as it inhibits tumorigenesis and metastatic processes and it induces pro-survival genes that promote chemoresistance. The relationship between the molecular mechanisms causing the pathway to malfunction and the development of brain tumors has yet to be fully clarified. The aim of this study is to analyze the genetic changes and expression level differences of the NRF2/KEAP1 pathway comparatively in low-grade gliomas (LGG) and glioblastoma multiforme (GBM) pathology.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Dilara Fatma AKIN, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Niğde, Türkiye

Tel.: +90 536 302 68 16 **E-posta:** dilarafatmaakin@gmail.com, dilarabali@ohu.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-0903-0017

Geliş tarihi/Received: 31.05.2022 **Kabul tarihi/Accepted:** 06.01.2023

Sunulduğu Kongre: Çalışma 14. Ulusal Tıbbi Genetik Dijital Kongresi'nde 20-22 Kasım 2020 tarihleri arasında özet olarak sunulmuştur.

©Telif Hakkı 2023 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi / Namık Kemal Tıp Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

©Copyright 2023 by the Tekirdağ Namık Kemal University Faculty of Medicine / Namık Kemal Medical Journal published by Galenos Publishing House.

Materials and Methods: Gene expression profiles and DNA sequences of GBM (n=591) and LGG (n=511) patients and healthy tissue were downloaded from the TCGA database. Not only were gene expression and mutation patterns determined in this study, but also the impacts of genes on survival were assessed. PolyPhen-2 and SNAP tools were used to estimate the pathogenic properties of the changes identified.

Results: A total of 16 mutations and gene amplification were identified in the *KEAP1*, *NRF2*, *p62/SQSTM1*, *HMOX-1*, and *MOAP1* for both cancer groups, and the mutation carrying frequency was 4.6%. IDH1 p.R132H and NRF2 p.S164* mutation association was determined in 1 patient with LGG. *KEAP1*, *NRF2*, and *HMOX1* expression levels for both LGG and GBM subtypes were determined to be high in patient samples compared to healthy samples (p<0.05).

Conclusion: By targeting the NRF2/KEAP1/p62/SQSTM1 pathway anomalies, new therapeutic approaches can be provided in the treatment of glioma, particularly for chemotherapy sensitivity.

Keywords: NRF2/KEAP1/p62/SQSTM1 signaling pathway, glioma, mutation, gene expression, oxidative stress

GİRİŞ

Beyin dokusu sınırlı antioksidan kapasiteye sahiptir ve daha yüksek enerji gereksinimi ve daha yüksek lipid ve demir içeriği nedeniyle oksidatif strese karşı son derece savunmasızdır. Ayrıca serbest oksijen radikallerinin yoğunlaştığı bir ortamda nörotransmitterlerin oto-oksidasyon özellikleri ve oksitlenmiş nörotransmitterler reaktif oksijen türlerinin (ROS) daha fazla üretilmesine neden olma potansiyeline sahiptir¹⁻³. Bu durum beyinde morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerin yanı sıra bilişsel işlev bozukluklarına ve geriliğe neden olur. Beş yüzden fazla sitoprotektif genin işlemlerini kontrol eden NRF2 transkripsiyon faktörünün transaktivasyonundan sorumlu olan NRF2/KEAP1/p62/SQSTM1 yolağı, hücreleri ve dokuları elektrofilik, oksidatif ve ksenobiyotik stresten korumada önemli bir hücresel bileşendir⁴⁻⁶. NRF2, normal koşullar altında sitoplazmada KEAP1'e bağlanır. Hücreler oksidatif strese maruz kaldıkça, NRF2'nin sitoplazmada bağlı olduğu KEAP1'den ayrıldığı ve hedef genine bağlandığı ve transkripsiyonu uyardığı çekirdeğe hareket ettiği bulunmuştur^{7,8}. NRF2'nin KEAP1'e bağlı regülasyonuna ek olarak, çeşitli alternatif KEAP1'den bağımsız mekanizmalar, NRF2'nin regülasyonuna katkıda bulunur. Bunlar, hücresel NRF2 proteinini ve NRF2 ve KEAP1'in aktivitesinde bir artışa neden olan etkileşimini engelleyen p62/SQSTM1'in KEAP1'e bağlanmasını içerir⁷⁻⁹. Anormal NRF2/KEAP1 yolağı, tedavi direncinin gelişmesine neden olur ve sitoprotektif genlerin konstitütif ekspresyonu nedeniyle kanser hücrelerine bir büyüme avantajı sağlar^{3,5-8}. Kötü huylu hücrelerin, artan NRF2 yolağı aktivitelerinden yararlandıkları bilinmektedir. Bu durum ilk olarak akciğer kanserinde ve daha sonra yumurtalık, pankreas, karaciğer, pediatrik lösemi ve mesane kanserleri gibi diğer çeşitli kanser türlerinde keşfedildi⁶⁻⁹.

Gliomalar, beyin tümörlerinin en malign ve agresif şeklidir ve beyin kanserine bağlı ölümlerin çoğundan sorumludurlar. Gliomalar, malign beyin tümörlerinin %81'ini temsil eden en yaygın primer intrakraniyal tümördürler^{10,11}. Son veriler, glioblastoma hücreleri dahil olmak üzere çeşitli kanser hücreleri tiplerinde "ROS proliferasyonu, hayatta kalmayı ve migrasyonu teşvik etmede vazgeçilmez bir katılımcıdır" ifadesini

desteklemektedir^{2,3,11}. ROS'un aşırı üretiminin bu değişiklikleri teşvik etmede rol oynadığı bilinmektedir^{2,3,10,12}. Bu çalışmanın amacı, glioma alt tiplerinde NRF2/KEAP1/p62/SQSTM1 yolağı genlerindeki patojenik mutasyonların ve ekspresyon seviyesi profillerinin fonksiyonel etkilerini tahmin etmek ve ayrıca bu yolak unsurlarının glioma patogenezi ve progresyonu üzerindeki etkilerini netleştirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Veri Toplama

Glioblastoma multiform (GBM) ve düşük dereceli glioma (LGG) veri setleri cBioPortal veri tabanından temin edilmiş olup, hasta grubumuza ait demografik, klinik ve genetik veriler Tablo 1'de özetlenmiştir.

Mutasyon Profil Analizi

cBio Cancer Genomics Portal (<http://cbioportal.org>), mutasyon verilerini sağlamak için Kanser Genom Atlas'tan (TCGA) alınan verileri kullanan açık erişimli bir biyoinformatik araçtır¹³. GBM (n=591) ve LGG (n=511) hasta örneklerinde KEAP1, NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1'de bulunan mutasyonları kapsamlı bir şekilde incelemek için web arayüzünden ilgili kanser türü olarak seçildi. Bu amaçla ilgilenilen genlerin ara yüzünün sağladığı özellikler kullanılarak cBioportal ile kapsamlı mutasyon profil analizleri gerçekleştirildi.

Mutasyon Etkisinin *In Silico* Analizi

KEAP1, NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1'de bulunan mutasyonların olası patojenitesi, PolyPhen-2, SNAP ve COSMIC veri tabanlarından alınan puanlar kullanılarak belirlendi. PolyPhen-2, yanlış anlamalı mutasyonun proteine zarar verme olasılığını tahmin eder ve kullanıcıya bu sonucu (büyük bir olasılıkla zarar verici, muhtemelen zarar verici, benin veya bilinmeyen) bir skor ile verir¹⁴. SNAP, çeşitli dizi ve varyant özelliklerini göz önünde bulundurarak etki ve nötr varyantlar/eş anlamalı olmayan SNP'ler arasında ayırım yapan çevrimiçi bir araçtır¹⁵. Ayrıca, tespit edilen mutasyonlar COSMIC veri tabanında tarandı ve patojenite puanları belirlendi¹⁶. Ayrıca

Tablo 1. GBM ve LGG'li hastaların demografik, klinik ve genetik verileri

Özellik	GBM n=591 (%)	LGG n=511 (%)
Cinsiyet		
Erkek/Kadın/NA	175/122/294	285/226
Tanı yaşı, yıl	59,6 (aralık, 21-89)	43 (aralık, 19-87)
İrk kategorisi		
Beyaz	252 (43,1)	474 (92,7)
Siyahi veya Afrikan Amerikan	31 (5,3)	21 (4,1)
Asya	4 (0,7)	7 (1,3)
UD	297 (50,2)	9 (1,7)
Örneklem tipi		
Primer	584 (98,8)	511 (100)
Rekürrens	7 (1,2)	-
Genel sağkalım durumu		
Yaşıyor	103 (17,4)	388 (75,9)
Ölmüş	478 (80,8)	125 (24,4)
UD	10 (1,7)	-
Radyasyon tedavisi		
Evet	236 (39,9)	296 (57,9)
Hayır	41 (6,9)	183 (35,8)
UD	314 (53,1)	34 (6,6)
Tümör hastalık anatomisi		
MSS	-	511 (100)
Beyin	298 (50,4)	-
UD	293 (49,5)	-
Tümör alt tipleri		
Glioblastoma multiform	591 (100)	-
Astrositom	-	192 (37,5)
Oligodendroglioma	-	189 (36,9)
Oligoastrositom	-	130 (25,4)
Neoplazma histolojik derece		
Derece I	-	-
Derece II	-	248
Derece III	-	263
Derece IV	-	-
UD	-	-
Genetik anormallikler	Olgu (sıklık %)	
IDH1 mutasyonu	25 (6,3)	394 (76,8)
IDH2 mutasyonu	1 (0,3)	21 (3,5)
NFE2L2 mutasyonu	1 (0,3)	1 (0,2)
SQSTM1 mutasyonu	3 (0,8)	2 (0,4)
HMOX1 mutasyonu	2 (0,5)	-
MOAP1 mutasyonu	2 (0,5)	1 (0,2)
SQSTM1-NTRK2 füzyonu	-	1 (0,2)
KEAP1 amplifikasyonu	7 (1,2)	12 (2,4)
NFE2L2 derin delesyonu	1 (0,2)	1 (0,2)

Tablo 1. Devamı

Özellik	GBM n=591 (%)	LGG n=511 (%)
Genetik anormallikler	Olgu (sıklık %)	
SQSTM1 amplifikasyonu	1 (0,2)	2 (0,4)
SQSTM1 derin delesyonu	1 (0,2)	2 (0,4)
HMOX1 amplifikasyonu	2 (0,5)	4 (0,8)
HMOX1 derin delesyonu	1 (0,3)	3 (0,6)
TXNRD2-HMOX1 füzyonu	1 (0,2)	-
MOAP1 derin delesyonu	1 (0,2)	-
1p statü		
Kazanılmış	41 (6,9)	12 (2,34)
Kayıp	8 (1,3)	173 (33,8)
Adlandırılmamış	477 (80,7)	307 (60)
UD	65 (10,9)	19 (3,72)
19q statü		
Kazanılmış	144 (24,3)	19 (3,7)
Kayıp	22 (3,7)	185 (36,2)
Adlandırılmamış	313 (52,9)	233 (45,5)
UD	112 (18,9)	74 (14,4)

UD: Uygun değil, MSS: Merkezi sinir sistemi, LGG: Düşük dereceli glioma, GBM: Glioblastoma multiform

tespit edilen mutant amino asitlerin evrimsel koruma analizleri, PolyPhen-2'deki "çoklu dizi hizalama" ile farklı türler arasında değerlendirildi.

Gen Ekspresyonu ve Sağkalım Analizleri

GEPIA, tümör veya normal dokularda diferansiyel ekspresyon analizi, kanser türlerine veya patolojik evrelere göre profil oluşturma, sağkalım analizi, benzer gen tespiti ve korelasyon analizi gibi özelleştirilebilir analizler sağlamak için geliştirilmiş interaktif bir araçtır¹⁷. KEAP1, NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1 ekspresyonlarının profilleri, TCGA verilerinden elde edilen GBM (n=163), LGG (n=518) örneklemelerinin ve 207 sağlıklı dokunun verileri kullanılarak GEPIA ile oluşturulan kutu diyagram grafiklerinde analiz edildi. Farklı gen ekspresyon seviyelerine göre genlerin sağkalım analizleri (genel/hastalısız) GEPIA kullanılarak yapıldı. Sağkalım grafikleri oluşturmak için %95 güven aralığına sahip Log-rank testine dayalı genel sağkalım (OS) ve hastalısız sağkalım (DFS) analizleri yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Çalışma verilerinin değerlendirilmesinde kullanılan tüm istatistiksel analizler GEPIA veri tabanında yapıldı. Diferansiyel ekspresyonu ölçmek için tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. GEPIA, gen ekspresyonuna dayalı olarak nüksüz sağkalım olarak da adlandırılan OS veya DFS analizini yapar. GEPIA, hipotez testi için Log-rank testini, Mantel-Cox testini kullanır. Düşük ve yüksek ekspresyon gruplarını karşılaştırmak için Log-

rank testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel olarak anlamlı değer $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

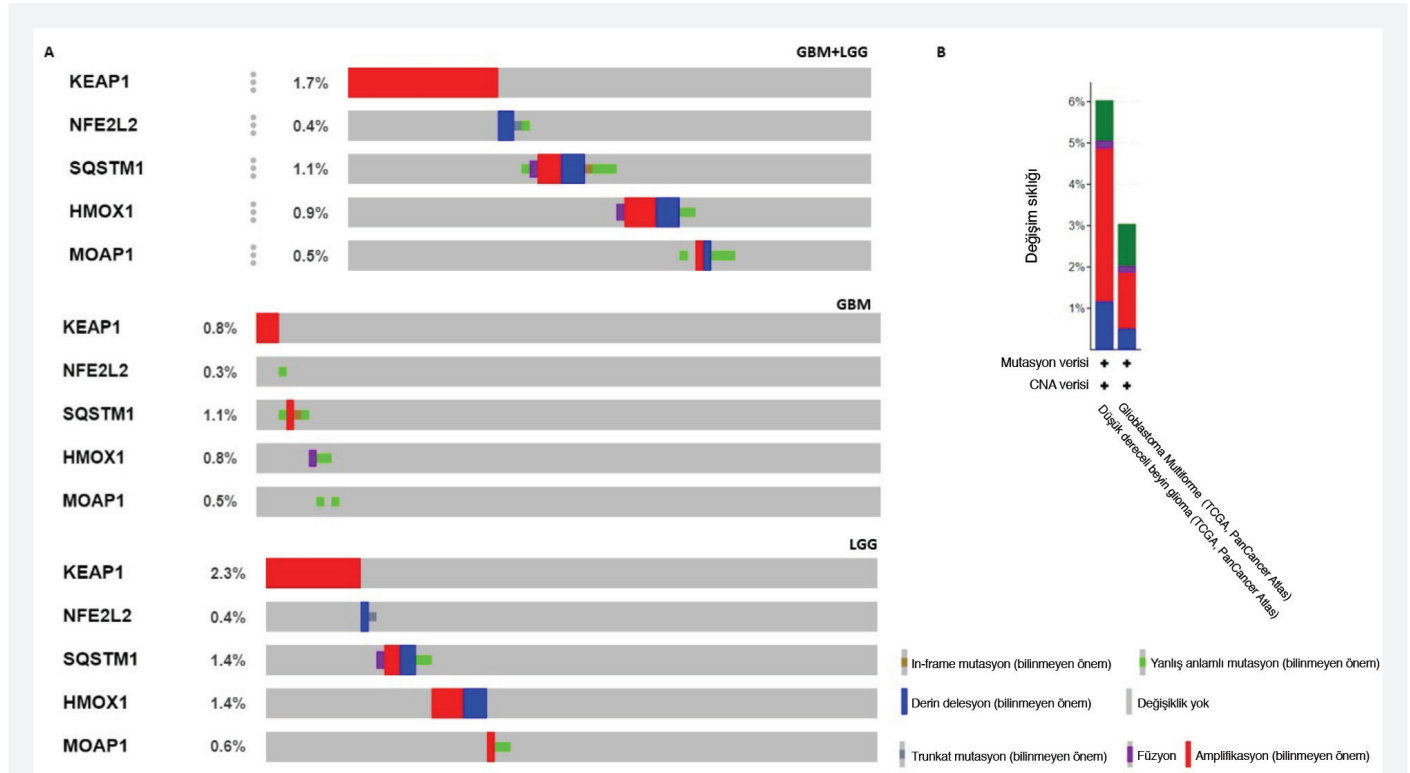
Mutasyon Profil Analizi Bulguları

GBM ve LGG hasta örneklerinde KEAP1, NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1'deki genetik değişiklikleri belirlemek amacıyla 1106 hastanın genom dizilim verilerini analiz etmek için cBioPortal arayüzü kullanıldı. GBM ve LGG hastalarının %4,6'sında KEAP1, NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1'de en az bir genetik değişiklik olduğu bulundu. Tüm çalışma genlerinde toplam 16 genetik değişiklik (12 yanlış anlamlı, 1 anlamsız, 1 delesyon, 2 translokasyon) tespit edildi (Tablo 2). Analiz edilen genler arasındaki değişim sıklığı incelendiğinde hasta grupları arasında mutasyonu fazla olan genin KEAP1 (%1,7), mutasyonu az olan genin ise NRF2 (%0,4) olduğu belirlendi (Şekil 1). KEAP1'de herhangi bir nükleotit değişikliği saptanmazken, her iki glioma alt tipinde genin amplifikasyonu bulundu. GBM ve LGG hasta örneklerinde çalışma genlerine ait proteinlerin domainlerinde saptanan mutasyonların lokalizasyonu Şekil 2'de temsili olarak gösterilmiştir.

LGG Hastalarında Mutasyon Profil Analiz Bulguları

LGG genetik anomalilerini taşıma sıklığı %6,1 olarak belirlendi. LGG grubunda altı mutasyon (NRF2, p.S164*; SQSTM1, p.R107Q ve p.A2V; MOAP1, p.K164N ve p.R204T) tespit edildi. Bulgularımıza göre, NRF2 geninde bulunan anlamsız p.S164* mutasyonunun, NRF2 polipeptidinin 164. amino asitte erken sonlanmasına neden olduğu ve bunun sonucunda trunkat bir protein oluşumuna neden olduğu düşünüldü. Glioma için NRF2 p.S164* ve IDH1 p.R132H yanlış anlamlı mutasyon karakteristiğinin bir arada bulunduğu Astrositom alt tipinde bir hasta vardı.

Astrositom alt tipi SQSTM1 olan iki farklı hastada SQSTM1, p.R107Q ve p.A2V yanlış anlamlı mutasyonlar tanımlandı. p.A2V mutasyonunu taşıyan hastanın IDH1 p.R132H mutasyonunu da taşıdığı belirlendi. Nöral gelişimden sorumlu bir tirozin kinaz olan NTRK2 ile p62/SQSTM1 t (5;9) (q35;q21) füzyon geni, oligodendroglioma alt tipine sahip bir hastada tanımlandı. Astrositom alt tipinde IDH1 p.R132H yanlış anlamlı mutasyon taşıyan iki farklı hastada, apoptozda anahtar rol oynayan BH3 benzeri bir protein olan apoptoz modülatörü 1 (MOAP-1), PNMA alanında p.K164N ve p.R204T mutasyonları ile tanımlandı.



Şekil 1. GBM ve LGG kanserli hasta grubunda (A, B) KEAP1, NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP-1 genlerindeki mutasyonların dağılımı

GBM: Glioblastoma multiforme, LGG: Düşük dereceli glioma

GBM Hastalarında Mutasyon Profil Analizi Bulguları

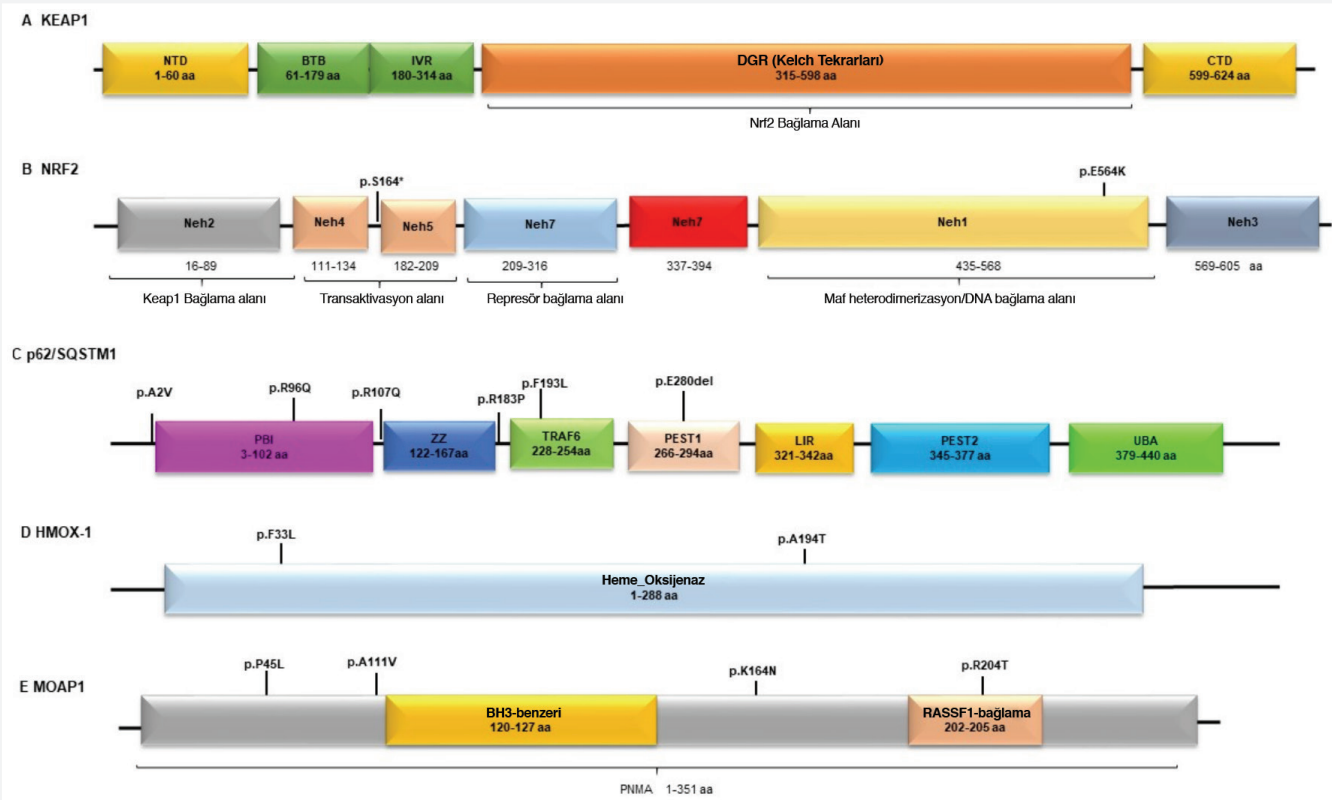
GBM genetik anomalilerinin taşıma prevalansı %3,5 olarak saptandı. GBM grubunda on mutasyon NRF2, p.E564K; p62/SQSTM1 p.R96Q; p.E280del, p.F193L; p.R183P, *HMOX-1*, p.A194T; p.F33L, *TXNRD2-HMOX1* füzyon geni; *MOAP-1*, p.P45L; p.A111V tespit edildi. NRF2-p62/SQSTM1; HMOX1-MOAP1 birlikteliği olan mutasyon taşıma sıklığı, GBM hasta grubu için istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0,037$ ve $p=0,055$). p62/SQSTM1'de tanımlanan mutasyonlar, PBI, LIR ve TBS alanlarındaydı. p.R183P mutasyonu, TBS Alanındaydı. Aynı alanda p.F193L ve PBI alanında p.R96Q mutasyonu, IDH2 p.G383V ve p.K251N yanlış anlamlı mutasyonları taşıyan 23 yaşında bir kadın hastada tanımlandı. Aynı hastada DNA bağlama alanı p.E564K yanlış anlamlı mutasyonunda NRF2 olduğu belirlendi. SOSTM1 p.E280del çerçeve kayması delesyon, LIR alanındaydı. Ek olarak füzyon geni t(5;9)(q35;q21), nöral gelişimden sorumlu bir tirozin kinaz olan p62/SQSTM1 ve NTRK2 ile tanımlandı. HMOX1 mutasyonları sadece GBM hasta grubunda tespit edildi. HMOX-1'de tespit edilen tüm yanlış anlamlı mutasyonlar, Heme oksijenez alanında bulunuyordu.

MOAP1'deki iki yanlış anlamlı mutasyon (p.P45L ve p.A111V), PNMA alanında tanımlandı.

Mutasyon Etkisinin *In Silico* Analizinin Bulguları

PolyPhen-2, SNAP Veri tabanı ve COSMIC programlarının analiz sonuçlarına göre çalışmamızda tespit edilen mutasyonlardan özellikle NRF2 p.E564K, SQSTM1 p.R96Q ve HMOX1 p.F33L mutasyonlarının, 1'e yakın olmaları ve "etkilenmeleri" nedeniyle skorlarının patojenik olabileceği ve hastalık yapıcı özelliklere sahip olduklarının öngörülebildiği belirlendi.

Özellikle Tablo 2'de GBM hasta grubunda bulunan mutasyonların tamamının patojenik olduğu görülmektedir. Çoklu dizi hizalama analizi sonucunda, tespit edilen 12 mutasyondan 10'unun, farklı türler arasında korunan kritik noktada bulunan amino asitlerini değiştirdiği keşfedildi. Ayrıca NRF2'de bulunan, p.E564K, p.S164*; SQSTM1 p.R96Q, p.R183P ve p.R107Q; HMOX1 p.A194T, p.F33L mutasyonları COSMIC veri tabanında somatik mutasyonlar olarak mevcuttur ve farklı solid kanser türleri için özellikle belirtilmektedirler.



Şekil 2. GBM ve LGG hastalarında tespit edilen KEAP1, NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1 proteinlerinin ve mutasyonlarının alan mimarisinin şematik gösterimi (A) İnsan Keap1, 624 amino asit içeren bir polipeptittir. (B) İnsan NRF2'si, yedi Neh alanı içeren 605 amino asit içeren bir polipeptittir. (C) İnsan p62/SQSTM1, 440 amino asit içeren bir polipeptittir. (D) İnsan HMOX-1, 288 amino asit içeren bir polipeptittir. (E) İnsan MOAP1, 351 amino asit içeren bir polipeptittir

GBM: Glioblastoma multiform, LGG: Düşük dereceli glioma

Tablo 2. LGG ve GBM hastalarında NRF2, p62/SQSTM1, HMOX1 ve MOAP1 genlerinin mutasyonları

No	Gen	Nt alterasyon	Rs sayı	Alterasyon tipi	Lokalizasyon	AA pozisyonu	IDH1/2 Mutasyonu ile birlikte bulunma	Kanser tipi	Tümör tipi	Klinik önem		
										PolyPhen-2 (skor)	SNAP (skor)	COSMIC tahmin
C-1	NRF2	c.1687G>A	COSV67960917	Yanlış anımlı mutasyon	Neh1 DNA baglama alanı	p.E564K	p.G383V p.K251N	GBM	Primer	Büyük bir olasılıkla zarar verici (1.00)	Etki (51)	Patojenik (0.94)
C-2	NRF2	c.491C>G	COSV67962580	Anlamsız mutasyon	Neh5 alanı	p.S164*	p.R132H	LGG	Primer	NA	NA	Patojenik (0.91)
C-3	SQSTM1	c.287G>A	COSV62435109	Yanlış anımlı mutasyon	PBI alanı	p.R96Q	p.G383V p.K251N	GBM	Primer	Büyük bir olasılıkla zarar verici (1.00)	Etki (60)	Patojenik (0.99)
C-4	SQSTM1	-	-	Delesyon	LIR alanı	p.E280del	-	GBM	Primer	NA	NA	UNK
C-5	SQSTM1	c.579C>T	COSV100657686	Yanlış anımlı mutasyon	TBS alanı	p.F193L	p.G383V p.K251N	GBM	Primer	Benin (0.12)	Etki (30)	Nötr (0.02)
C-6	SQSTM1	c.548G>C	COSV100657714	Yanlış anımlı mutasyon	TBS alanı	p.R183P	-	GBM	Primer	Benin (0.22)	Etki (38)	Patojenik (0.97)
C-7	SQSTM1	c.320G>A	COSV62434138	Yanlış anımlı mutasyon	-	p.R107Q	-	LGG	Primer	Muhtemelen zarar verici (0.65)	Nötr (-10)	Patojenik (0.90)
C-8	SQSTM1	c.5C>T	COSV62435509	Yanlış anımlı mutasyon	PBI alanı	p.A2V	p.R132H	LGG	Primer	Benin (0.33)	Nötr (-94)	UNK
C-9	SQSTM1	t(5;9) (q35;q21)	-	Füzyon geni	-	SQSTM1-NTRK2	-	LGG	Primer	NA	NA	UNK
C-10	HMOX1	c.580G>A	COSV53340335	Yanlış anımlı mutasyon	Heme oxygenase alanı	p.A194T	p.R132H	GBM	Primer	Benin (0.02)	Nötr (-83)	Patojenik (0.76)
C-11	HMOX1	c.99C>A	COSV99330761	Yanlış anımlı mutasyon	Heme oxygenase alanı	p.F33L	-	GBM	Primer	Muhtemelen zarar verici (0.86)	Etki (30)	Patojenik (0.96)
C-12	HMOX1	-	-	Füzyon geni	Heme oxygenase alanı	TXNRD2-HMOX1	-	GBM	Primer	NA	NA	UNK
C-13	MOAP1	c.134C>T	COSV52092948	Yanlış anımlı mutasyon	PNMA alanı	p.P45L	-	GBM	Primer	Büyük bir olasılıkla zarar verici (0.98)	Etki (66)	Nötr (0.03)
C-14	MOAP1	c.332C>G	COSV52092285	Yanlış anımlı mutasyon	PNMA alanı	p.A111V	-	GBM	Primer	Muhtemelen zarar verici (0.61)	Nötr (-83)	Nötr (0.05)
C-15	MOAP1	c.492G>C	COSV993365609	Yanlış anımlı mutasyon	PNMA alanı	p.K164N	p.R132H	LGG	Primer	Büyük bir olasılıkla zarar verici (0.99)	Etki (17)	Nötr (0.46)
C-16	MOAP1	c.614G>A	COSV52093035	Yanlış anımlı mutasyon	PNMA alanı	p.R204T	p.R132H	LGG	Primer	Büyük bir olasılıkla zarar verici (0.96)	Etki (55)	Nötr (e 0.04)

UNK: Bilinmiyor, NA: Mevcut değil, SNP: Tek nükleotid polimorfizm, C: Değişim, UTR: Çevrilmemiş bölge, LGG: Düşük dereceli glioma, GBM: Glioblastoma multiforme

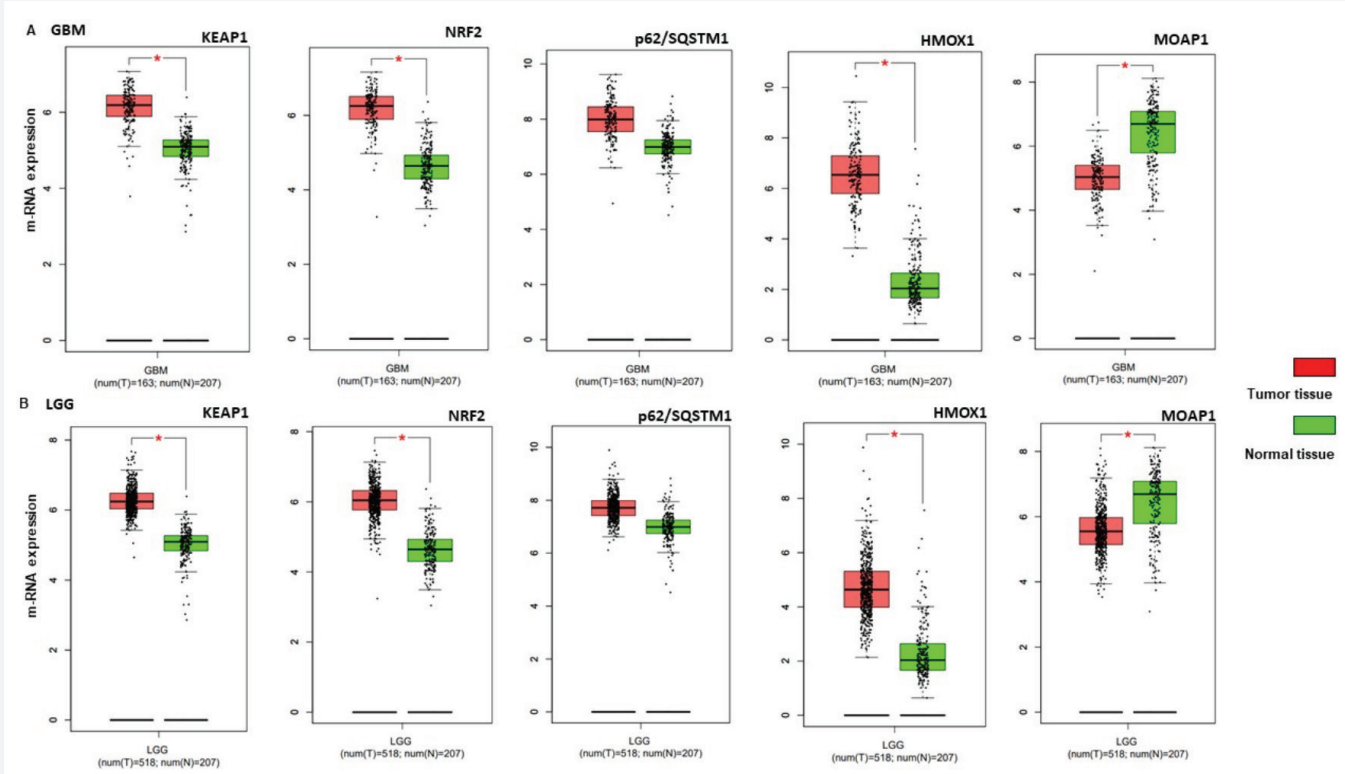
Gen Ekspresyonu ve Sağkalım Analizi Bulguları

GBM (n=163), LGG (n=518) hastalarının sağlıklı gruba göre karşılaştırılması sonucunda KEAP1, NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1 gen ekspresyon profilleri belirlendi. Analiz sonuçlarına göre KEAP1, NRF2 ve HMOX1 ekspresyon seviyeleri hasta numunelerinde sağlıklı numunelere göre istatistiksel olarak anlamlı ve her iki kanser grubunda daha yüksek, MOAP1 ekspresyonu ise hasta numunelerinde sağlıklı gruba göre daha düşük bulundu ($p<0,005$) (Şekil 3). LGG grubundaki NRF2 için p değeri, OS analizi bulgularına göre anlamlı bulundu. Düşük düzeyde NRF2 ekspresyonuna sahip olanların, yüksek düzeyde olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha uzun OS süresine sahip olduğu bulundu ($p=0,00027$). Ancak DFS analiz sonuçlarımıza göre, LGG hasta grubunda yüksek NRF2 ekspresyonu, düşük NRF2 ekspresyonu olan bireylere göre istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,0011$). HMOX1'in düşük gen ekspresyonuna sahip bireyler, LGG hasta grubunda yüksek gen ekspresyonuna ($p=0,025$) sahip olanlardan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha uzun bir OS süresine sahipti.

Düşük düzeyde MOAP1 ekspresyonu olan bireyler, yüksek düzeyde ekspresyona sahip olanlara göre daha uzun OS'ye sahipti ($p=0,008$, Şekil 4). SQSTM1 gen ekspresyonu düşük olan bireyler, GBM hasta grubunda gen ekspresyonu yüksek olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha uzun DFS periyoduna sahipti ($p=0,0043$, Şekil 5). Ayrıca, yüksek HMOX1 ekspresyonu seviyeleri dışında diğer tüm genlerde ve her iki kanser alt tipinde yüksek ekspresyon seviyelerine sahip bireyler, uzun OS'ye sahipti. Her bir gen için mutasyonlu ve mutasyonsuz bireylerin m-RNA düzeylerinin karşılaştırılması sonucunda gruplar arasında istatistiksel fark bulunmadı. Sonuçlar Şekil 5'te sunulmuştur.

TARTIŞMA

Çalışmamızda sitoprotektif yolda kilit aktörler olan KEAP1, NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1'in mutasyon profilleri ve gen ekspresyon paternleri GBM ve LGG hasta örneklerinde değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Öncelikle TGCA veri setlerinde bulunan toplam 1102 GBM ve LGG hastasının genom dizileme sonuçlarından, ilgilenilen



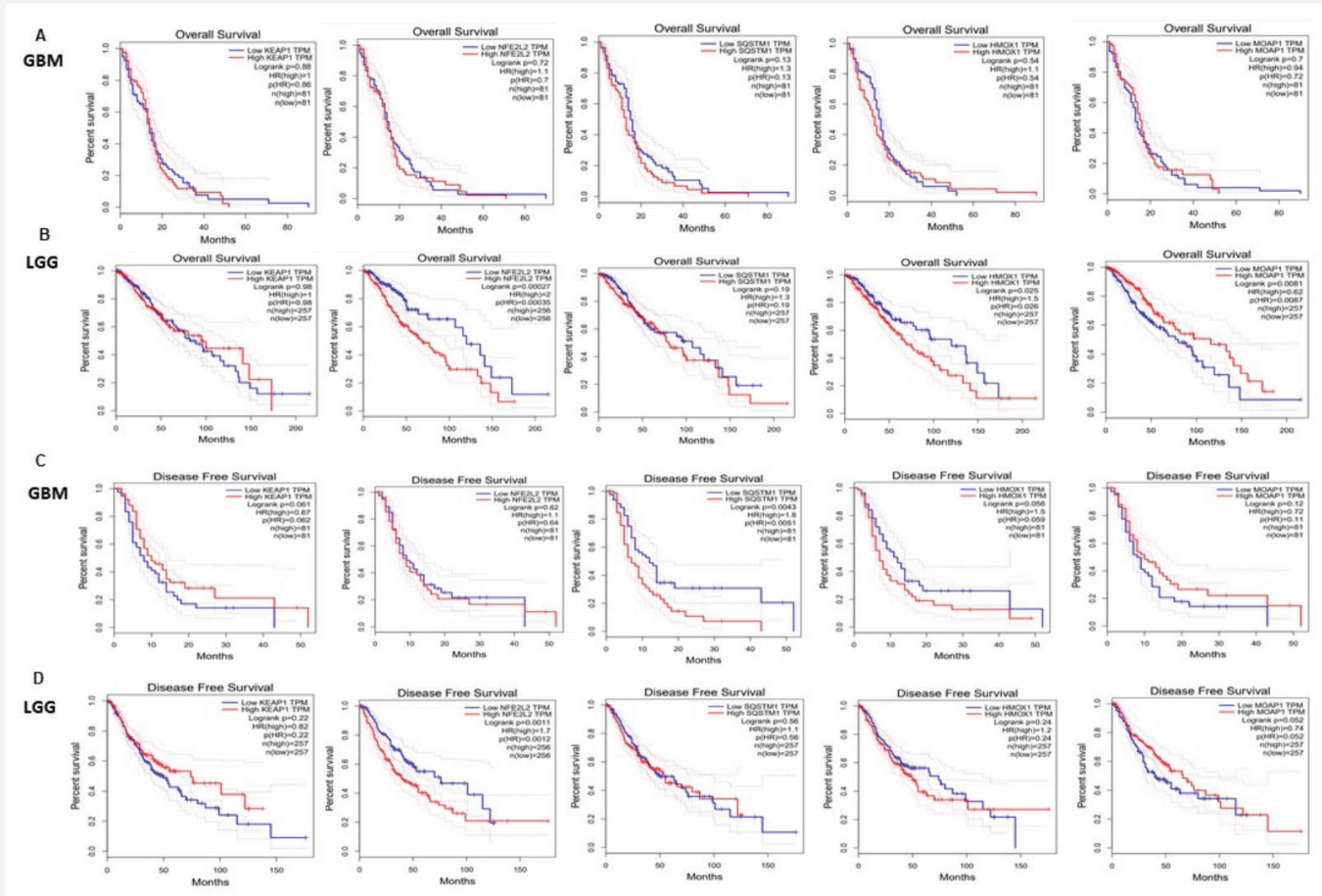
Şekil 3. GBM (A) ve LGG (B) hastalarında GEPIA kullanılarak beyin dokularında NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1 genlerinin dokuya özgü diferansiyel ekspresyonunun karşılaştırmalı analizi. Tümör ve normal dokular arasında NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1 genlerinin m-RNA ekspresyonu. Gen ekspresyon seviyelerini ölçmek için TPM (Milyon Başına Transkript) kullanıldı. Ekspresyon verileri önce diferansiyel analiz için log2 (TPM+1) dönüştürülür ve log2FC medyan (Tümör) – medyan (Normal) olarak tanımlanır. Önceden ayarlanmış eşiklerden daha yüksek [log2FC] değerlerine ve daha düşük q değerlerine sahip genler, diferansiyel olarak ekspresyon edilmiş genler olarak kabul edilir. İstatistiksel olarak anlamlılık değeri $p<0,05$ olarak kabul edildi. Log2(TPM + 1) log ölçeği için kullanıldı

GBM: Glioblastoma multiform, LGG: Düşük dereceli glioma

KEAP1, NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1 genlerinin mutasyon profilleri kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir. Çalışmamızda GBM ve LGG hastalarında NRF2/KEAP1 sinyal yolağında saptanan 16 mutasyondan 12'si yanlış anlamlı mutasyon, 1'i anlamsız mutasyon, 1'i delesyon ve 2'si translokasyon bulundu. Hasta gruplarının LGG için %6,1, GBM için %3,5 oranında mutasyon taşıdığı ve her iki tümör tipi için de en fazla genetik anormallik taşıyan genin %1,7 oranında KEAP1 olduğu belirlendi. Çalışma genlerinde, özellikle genlerin önemli alanlarını kodlayan dizilerde mutasyonlar tespit edilmiştir. Çalışmamızda tespit ettiğimiz NRF2 p.E564K, p62/SQSTM1 p.R96Q ve HMOX1 p.F33L yanlış anlamlı mutasyonların, türler arası evrimsel analizi sonuçlarına göre evrim sürecinde korunan kritik amino asitleri etkilediği belirlendi. Evrimsel analiz sonuçlarına göre, söz konusu yanlış anlamlı mutasyonların, evrimsel süreç boyunca korunmuş amino asitler üzerindeki etkileri ve bunların alanlarından, fonksiyonel patojenik etki analizleri sonucunda elde edilen olası patojenik özellikleri ve antioksidan yanıt genlerinin

ekspresyonunu değiştirme olasılığından dolayı glioma gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir.

NRF2-ECH homoloji alanları olarak bilinen yüksek oranda korunmuş yedi alan vardır^{6,8,9,18}. NRF2'de tanımladığımız p.E564K mutasyonu, proteinin Maf heterodimerizasyon/DNA bağlama alanı/Neh1'ü üzerinde bulunur. Neh1, NRF2 dimerizasyon partnerleri, sMaf proteinleri ile DNA bağlanması ve heterodimer oluşumu için gerekli olan iyi korunmuş bir CNC-bZIP bölgesi ve ayrıca NRF2 nükleer translokasyonu için gerekli bir nükleer lokalizasyon sinyali içerir. Ayrıca Neh1, NRF2 protein stabilitesini düzenlemek için E2 ubiquitin-konjugasyon enzimi UbcM2 ile etkileşime girebilir^{5,6,8,9,18}. NRF2'nin bir transkripsiyon faktörü olduğu düşünülürse, p.E564K mutasyonu, detoksifikasyondan sorumlu genlerin aktivasyonunu/konstitütif ekspresyonunu etkileyecek bir konumdur ve aynı mutasyon NLS sinyalini içeren alanda yer aldığı için proteinin lokalizasyonu açısından potansiyel bir sorun oluşturabilir.



Şekil 4. Farklı NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1 seviyelerine göre GBM ve LGG hastalarının OS (A, B) ve DFS'nin (C, D) Kaplan-Meier analizi

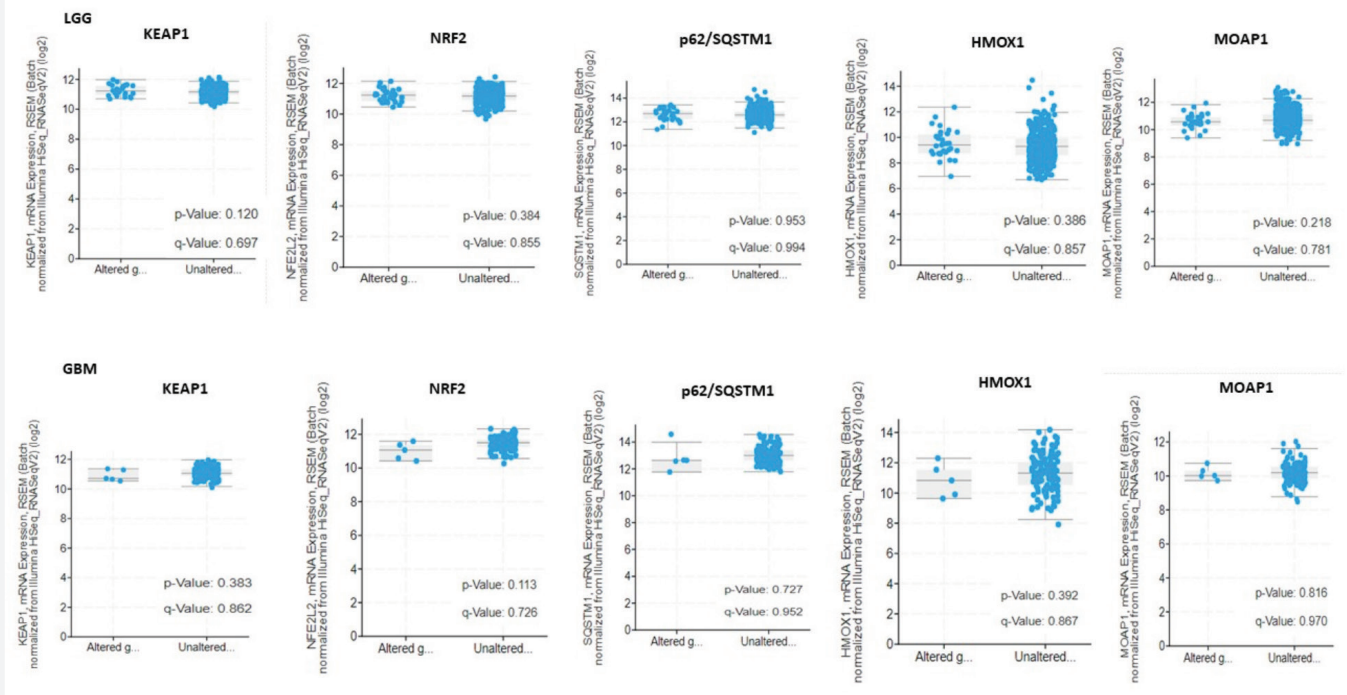
GBM: Glioblastoma multiforme, LGG: Düşük dereceli glioma, DFS: Hastalısız sağkalım, OS: Genel sağkalım

NRF2 p.S164* anlamsız mutasyonu kesik mutasyondur ve NRF2 protein sentezi tamamlanmadan önce 164. kodon kadar erken bir zamanda durdurma kodunun oluşumuna neden olması beklenir. IDH1, izositratın alfa-ketoglutarata (α -KG) dönüşümünü katalize ederek sitoplazmada ve peroksisomlarda NADPH üretimi ile enerji metabolizmasında yer alır. Çok sayıda çalışma, IDH1 mutasyonunun NADPH'de düşüşe ve hücrelerde ROS birikmesine neden olabileceğini bildirmiştir^{19,20}. Bununla birlikte, IDH1 mutasyonlarının biyolojik önemi ile hücrel redoks homeostazı arasındaki ilişki tam olarak bilinmemektedir. Özellikle IDH1 p.R132H'yi aşırı eksprese eden hücrelerin kemoterapötik temozolomide karşı daha duyarlı olduğu ve bu hücrelerde NRF2 ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir²⁰. NRF2'nin gliomada tedavi direnci ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir^{3,4,20}. Çalışmamızda LGG alt tipinde IDH1; NRF2 (p.R132H; p.S164*) mutasyonları ve GBM alt tipinde (p.G383V; p.K251N; p.E564K) mutasyonları taşıyan 2 birey bulunmaktadır. cBioPortal ile hastalarda incelendiğinde NRF2 ekspresyon seviyesinin hücrel düzeyde düştüğü belirlendi. Polipeptidin erken sonlanmasına neden olan, LGG'de p.R132H mutasyonunun ve NRF2 p.S164* mutasyonunun ilişkisi kemoterapi duyarlılığına neden olabilir.

Kanonik olmayan yolağın en iyi bilinen mekanizması, p62/SQSTM1 proteini aracılığıyla NRF2 aktivasyonudur. Çok alanlı ve çok işlevli bir protein olan p62/SQSTM1, otofaji

yolağı ve NRF2 aktivasyonu ile hücreleri stresten korur. p62 proteinini kodlayan p62/SQSTM1, OS yanıtı, apoptoz ve hücre farklılaşması dahil olmak üzere çeşitli temel hücrel süreçlerde yer alan bir adaptör proteindir^{4,21}. p62/SQSTM1, ubiquitin proteinlerini otofagozom membranına sabitleyerek istenmeyen moleküllerin parçalanmasını kolaylaştırır. Ayrıca, p62/SQSTM1, nörodejenerasyonla ilişkili çoklu yollar için bir sinyal merkezi görevi görür ve nörodegeneratif hastalıkların tedavisinde potansiyel bir terapötik hedef olarak görülür^{4,12,21}. Şekil 2'de gösterilen p.R96Q mutasyonu, protein-protein etkileşimleri için bir modülatör olan PB1 alanını etkiler. Aynı zamanda p.F193L ve p.R183P protein-protein etkileşimlerinde yer alan ZZ tipi çinko parmak alanında bulunur. p.E280del aynı zamanda PEST alanındadır ve çerçeve kayması mutasyona neden olacak ve fonksiyonel olmayan polipeptit üretimine yol açacak bir konumdur. Literatürde, tam uzunluktaki p62/SQSTM1'in, bir pozitif geri besleme döngüsü aracılığıyla NRF2 aktivasyonunu düzenlediği bilinmektedir^{4,12,21}.

NTRK1, 2 ve 3 dahil olmak üzere gen füzyonları, TRK reseptörlerinin yapısal aktivasyonuna veya aşırı ekspresyonuna neden olarak potansiyel olarak onkogeneze yol açar²². p62/SQSTM1-NTRK2 füzyon proteininde, çalışmamızda otofajide yer alan çok işlevli bir sinyal adaptörü olan SQSTM1'in ekson 1-5 ile NTRK2'nin 16-20 eksonlarına birleştiğini, bunun da p62/SQSTM1'in aminoterminal kısmını TrkB'nin kinaz alanına



Şekil 5. Her bir gen için mutasyon durumu gösterilmektedir ve kat değişimi, değiştirilmemiş gruplardaki (A) LGG (B) GBM'deki ekspresyon seviyelerine normalize edilen değiştirilmiş gruplardaki ekspresyon seviyelerini göstermektedir

GBM: Glioblastoma multiform, LGG: Düşük dereceli glioma

bağlayan bir okuma çerçevesinin oluşmasıyla sonuçlandığını saptadık.

Bu da p62/SQSTM1'nin kontrolsüz aktivasyonuna yol açabilir^{4,12,21,22}. Bax bağlayıcı protein MOAP1'in p62 degradasyonu yoluyla p62/SQSTM1-KEAP1-NRF2 sinyalinin düzenlediği literatürde ancak yakın zamanda bildirilmiştir. MOAP1, p62'nin PB1-ZZ alanları ile etkileşime girer ve kendi oligomerizasyonuna ve sıvı-sıvı faz ayırmasına müdahale ederek p62'yi parçalar²³. p.R96Q mutasyonu, PBI alanında bulunduğundan, MOAP1-p62/SQSTM1 etkileşimini etkileme özelliğine sahip olabilir. Ekspresyonu NRF2 proteini tarafından düzenlenen HMOX-1, sitoprotektif bir ajan olarak kabul edilir ve ekspresyon aktivite seviyelerinin modülasyonu terapötik potansiyel sunar. HMOX-1, bir antioksidan, antienflamatuvar, anti-apoptotik faktör olarak kabul edilmiştir ve OS'nin neden olduğu doku hasarına karşı savunma mekanizmalarından birini oluşturduğu bilinmektedir. İnsan glioma tümörlerinde, HMOX-1'in normal beyin dokularına kıyasla ve tümörün ilerlemesi sırasında aşırı eksprese edildiği bilinmektedir, ancak HMOX-1'in glioblastoma tümör ilerlemesini nasıl etkilediğinin altında yatan moleküler mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır^{24,25}. Çalışmamızda tespit edilen p.F33L ve p.A96T mutasyonları Heme oksijenaz alanındadır. Evrimsel süreç boyunca türler arasında p.F33L mutasyonunun korunduğunu belirledik. Pölen ve ark.¹² NRF2/p62 aktivasyonunun, GBM'nin mezenkimal alt tipi için prognostik bir belirteç olabileceğini bildirmiştir. Bu çalışmada GBM alt grubundaki NRF2 ve p62'deki yanlış anlamli mutasyonların (C-1, C-3, C-4, C-5 ve C-6) mezenkimal alt tip gelişiminden sorumlu olabileceğini düşünüyoruz.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Glioma patogenezinin sorumlu genlerin kapsamlı moleküler profil analizlerini gerçekleştirdik. Çalışmamızın belirli sınırlılıkları olduğunun farkındayız. Bunun nedeni, bu çalışmanın biyoinformatik araçlar kullanılarak sınırlı bir deneysel tasarımla gerçekleştirilmesidir. Bu nedenle, KEAP1, NRF2, p62/SQSTM1, HMOX-1 ve MOAP1'in glioma patogenezi üzerindeki etkisini açıklığa kavuşturmak için ıslak bir laboratuvar çalışmasına ve daha büyük bir örneklem grubuna ihtiyaç vardır.

SONUÇ

Aynı hasta popülasyonundan oluşturulan iki tümör grubundaki sağlıklı hasta örneklemelerine göre de gen ekspresyon analizleri yapıldı. Gen ekspresyon profilleri analizimizin bir sonucu olarak, sağlıklı NRF2, KEAP1 ve HMOX-1 örnekleriyle karşılaştırıldığında bu yolağın her iki gliomada da yukarı regüle olduğu bulundu. MOAP1'in ekspresyon seviyesi, sağlıklı örneklem grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür ($p < 0,05$). Ancak, SQSTM1'in ekspresyon düzeyinde herhangi bir önemli değişiklik tespit etmedik.

Çalışmamız GBM ve LGG arasındaki moleküler farklılıkları ve ekspresyon profillerini belirleyerek yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesinde faydalı olabilecek sonuçlara sahiptir. Bu çalışma, gliomalarda saptanan NRF2/KEAP1/p62/SQSTM1 yolağı mutasyonlarının sıklığının ve moleküler özelliklerinin anlaşılması açısından önemlidir.

Teşekkür

Çalışmamızda kullanılan veriler TCGA Araştırma Ağı'nın halka açık veri tabanından elde edilmiştir: <https://www.cancer.gov/tcga>. Verilerin kullanılabilirliği için TCGA ve GEPIA veritabanlarına teşekkür ederiz.

Etik

Etik Kurul Onayı ve Hasta Onayı: *In silico* olarak biyoinformatik analiz edildiği için gerekmemektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: D.F.A., Dizayn: D.F.A., Veri Toplama veya İşleme: D.F.A., S.H.A., Analiz veya Yorumlama: D.F.A., S.H.A., Literatür Arama: D.F.A., S.H.A., Yazan: D.F.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Çalışmamız için hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.

KAYNAKLAR

- Shulman RG, Rothman DL, Behar KL, Hyder F. Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci.* 2004;27:489-95.
- Juurink BH, Paterson PG. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *J Spinal Cord Med.* 1998;21:309-34.
- Kanamori M, Higa T, Sonoda Y, Murakami S, Dodo M, Kitamura H, et al. Activation of the NRF2 pathway and its impact on the prognosis of anaplastic glioma patients. *Neuro Oncol.* 2015;17:555-65.
- Ma S, Attarwala IY, Xie XQ. SQSTM1/p62: A Potential Target for Neurodegenerative Disease. *ACS Chem Neurosci.* 2019;10:2094-114.
- Sajadimajd S, Khazaei M. Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. *Curr Cancer Drug Targets.* 2018;18:538-57.
- Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 System as a Molecular Target of Cancer Treatment. *Cancers (Basel).* 2020;13:46.
- Panieri E, Saso L. Potential Applications of NRF2 Inhibitors in Cancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:8592348.
- He F, Antonucci L, Karin M. NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer. *Carcinogenesis.* 2020;41:405-16.
- Akın-Balı DF, Aktas SH, Unal MA, Kankilic T. Identification of novel Nrf2/Keap1 pathway mutations in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol.* 2020;37:58-75.
- Sanchez-Perez Y, Soto-Reyes E, Garcia-Cuellar CM, Cacho-Diaz B, Santamaria A, Rangel-Lopez E. Role of Epigenetics and Oxidative Stress in Gliomagenesis. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2017;16:1090-8.

11. Ludwig K, Kornblum HL. Molecular markers in glioma. *J Neurooncol.* 2017;134:505-12.
12. Pölönen P, Jawahar Deen A, Leinonen HM, Jyrkkänen HK, Kuosmanen S, Mononen M, et al. Nrf2 and SQSTM1/p62 jointly contribute to mesenchymal transition and invasion in glioblastoma. *Oncogene.* 2019;38:7473-90.
13. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2:401-4.
14. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013;7:20.
15. Bromberg Y, Rost B. SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:3823-35.
16. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:941-7.
17. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:98-102.
18. Suzuki T, Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med.* 2015;88:93-100.
19. Li K, Ouyang L, He M, Luo M, Cai W, Tu Y, et al. IDH1 R132H mutation regulates glioma chemosensitivity through Nrf2 pathway. *Oncotarget.* 2017;8:28865-79.
20. Khurshed M, Aarnoudse N, Hulsbos R, Hira VW, van Laarhoven HWM, Wilmink JW, et al. IDH1-mutant cancer cells are sensitive to cisplatin and an IDH1-mutant inhibitor counteracts this sensitivity. *FASEB J.* 2018;32:fj201800547R.
21. Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem.* 2017;61:609-24.
22. Zhao R, Yao F, Xiang C, Zhao J, Shang Z, Guo L, et al. Identification of NTRK gene fusions in lung adenocarcinomas in the Chinese population. *J Pathol Clin Res.* 2021;7:375-84.
23. Tan CT, Chang HC, Zhou Q, Yu C, Fu NY, Sabapathy K, et al. MOAP-1-mediated dissociation of p62/SQSTM1 bodies releases Keap1 and suppresses Nrf2 signaling. *EMBO Rep.* 2021;2:e50854.
24. Castruccio Castracani C, Longhitano L, Distefano A, Di Rosa M, Pittalà V, Lupo G, et al. Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide Regulate Growth and Progression in Glioblastoma Cells. *Mol Neurobiol.* 2020;57:2436-46.
25. Liu Y, Liang Y, Zheng T, Yang G, Zhang X, Sun Z, et al. Inhibition of heme oxygenase-1 enhances anti-cancer effects of arsenic trioxide on glioma cells. *J Neurooncol.* 2011;104:449-58.