



**T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARKLI GLİOMA TÜRLERİNDE BİYOİNFORMATİK ARAÇLAR
KULLANIMIYLA EPİTRANSKRİPTOM PENCERESİNDEN
BİYOBELİRTEÇLERİN TANIMLANMASI**

Gaye AÇCAN

MUĞLA-2022

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARKLI GLİOMA TÜRLERİNDE BİYOİNFORMATİK ARAÇLAR
KULLANIMIYLA EPİTRANSKRİPTOM PENCERESİNDEN
BİYOBELİRTEÇLERİN TANIMLANMASI**

Gaye AÇCAN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Turan DEMİRCAN

MUĞLA-2022

TEZ ONAYI

Gaye AÇCAN tarafından hazırlanan “Farklı Glioma Türlerinde Biyoinformatik Araçlar Kullanımıyla Epitranskriptom Penceresinden Biyobelirteçlerin Tanımlanması” başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında, Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Reşat ÜNAL
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

(İmza)

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Turan DEMİRCAN
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

(İmza)

Üye

Dr. Öğr. Deniz DURALI
İstanbul Medipol Üniversitesi

(İmza)

Tez savunma tarihi: 24.06.2022

Bu tez Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında, Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirmektedir.

Prof. Dr. Banu BAYAR
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan metinleri sahiplerinden yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / MSKÜ Açık Erişim Sisteminde erişime açılabilir.

- ☐ Tezimle ilgili patent başvurusu yapılacağından veya patent alma süreci devam ettiğinden Enstitü Yönetim Kurulu kararı ile tezimin mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl erişime açılmasının ertelenmesini talep ediyorum.
- ☐ Tezimde yeni teknik, materyal ve metotlar kullanıldığından ve henüz makaleye dönüşmemiş olduğundan Enstitü Yönetim Kurul kararı ile mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay tezimin erişime açılmasının ertelenmesini talep ediyorum.

24.06.2022

(İmza)

Gaye AÇCAN

ETİK BEYAN

Yüksek lisans olarak sunduğum “Farklı Glioma Türlerine Biyoinformatik Araçlar Kullanımıyla Epitranskriptom Penceresinden Biyobelirteçlerin Tanımlanması ” isimli çalışmada tezin planlanmasından yazımına kadar tüm süreçlerde etik ilkelere bağlı kaldığımı, tezime ilişkin bilgi ve belgeleri akademik ve bilimsel etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezimde kullandığım tüm görsel ve yazılı materyallerin kaynağını gösterdiğimi, yararlandığım eserlerin tümünün kaynaklar bölümünde yer aldığını, tezimin Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

24.06.2022

(İmza)

Gaye AÇCAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim ve öğrenim sürecimde, tecrübesini, sabrını esirgemeyen, aynı zamanda tez çalışmamda bana her zaman yardımcı olan, yol gösteren, emek ve desteğini eksik etmeyen, bilgi birikimi ile beni aydınlatan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Turan DEMİRCAN'a,

Hayatımın her anında, iyi günümde ve kötü günümde, ihtiyacım olan her durumda maddi ve manevi desteğini asla esirgemeyen, her koşulda arkamda olup bana destek veren ve elimi asla bırakmayan biricik anne ve babama,

Her zaman bana destek olan, yanımda olup bana güç veren, en önemlisi kendisini rol model olarak gördüğüm ve tanıdığım en güçlü kadın olan anneanneme,

Yürüdüğüm bu yolda beni her zaman motive eden, güzel enerjileri ile desteklerini esirgemeyen neşe kaynaklarım, canım kardeşlerim İlke ve Bora'ya

Eğitim hayatımda ve tez çalışmamda değerli katkıları olan, laboratuvar arkadaşlarıma,

Biyoinformatik alanında bana eşsiz bilgiler katan ve her zaman sabırla beni dinleyen ve yardımını esirgemeyen arkadaşım Enes'e

Beni hiç yalnız bırakmayan, destelerini, motivasyonlarını, sevgilerini eksik etmeyen ve her konuda yardımcı olan değerli arkadaşlarım İbrahim, Onur, Ezgi, Esra ve İrem'e

Sonsuz Teşekkürler.

Gaye AÇCAN

FARKLI GLİOMA TÜRLERİNDE BİYOİNFORMATİK ARAÇLAR KULLANIMIYLA EPİTRANSKRİPTOM PENCERESİNDEN BİYOBELİRTEÇLERİN TANIMLANMASI

ÖZET

Yeni trend başlıklar arasında bulunan ve önemi gittikçe artan m6A, m5C ve m1A epitranskriptom yolakları, kanserin gelişimi, metastazı, agresifliği, invazyonu ve kanser hücrelerinin farklılaşması gibi kritik süreçlerde rol oynadığı, yapılan çalışmalar ile bildirilmişti. Bilinen en ölümcül evre IV glioma türü olan Glioblastoma Multiforme'in agresifliğinin altında yatan mekanizma henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışma, m6A, m5C ve m1A epitranskriptom yolak düzenleyicilerinin glioma vakalarındaki önemli rollerini ortaya çıkarmayı ve Glioblastoma Multiforme'nin epitranskriptom dinamiklerini Düşük Dereceli Glioma gibi daha naif gliomlarla karşılaştırarak biyobelirteç genlerini tespit etmeyi amaçladı. Glioblastoma Multiforme ve Düşük Dereceli Glioma vakalarındaki farklılıkları ortaya çıkarmak için cBioporal ve TCGA veri tabanlarından alınan veriler kullanılarak m6A, m5C ve m1A yolak düzenleyicileri DNA düzeyinde ve mRNA düzeyinde incelendi. Ayrıca, akış aşağı süreçlerdeki farklılıklarını aydınlatmak ve düzenleyici genlerin biyobelirteç özelliklerini test etmek için transkriptom ve klinik veriler kullanılarak bir dizi biyoinformatik analiz yapıldı. Glioma vakalarında m5C(%11) yolu düzenleyicileri, m6A(%8) ve m1A(%2) yolu düzenleyicilerinden daha fazla mutasyona uğradığı görüldü. GBM vakalarında %85 skor ile DNMT3L geni ve Düşük Dereceli Glioma vakalarında ~%8 ile EIF3A, EIF3B, NOP2, DNMT3A genleri en yüksek mutasyon frekansı olarak kaydedildi. Ek olarak, m6A, m5C ve m1A yollarının farklı biyolojik süreçlerde rol aldığı ve her birinin hücrede farklı temel yolları etkilediği gözlemlendi. Dahası, Glioblastoma Multiforme ve Düşük Dereceli Glioma arasında EIF3A ve TET1 genlerinin prognostik ve diagnostik değerlerinin oldukça güçlü olduğunu ve her ikisinin de yüksek ekspresyon seviyesinin WHO seviyeleriyle negatif korelasyon gösterdiği görüldü. EIF3A ve TET1 genlerinin, gliomalar için geliştirilecek yeni terapötik yaklaşımlarda biyobelirteç olarak kullanılma potansiyellerinin güçlü olduğunu ortaya koyduk.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma Multifome, Lower Grade Glioma, Epitranskriptom, Biyobelirteç

IDENTIFICATION OF BIOMARKERS IN DIFFERENT GLIOMA TYPES USING BIOINFORMATIC TOOLS FROM THE EPITRANSCRIPTOME PERSPECTIVE

ABSTRACT

It has been reported that m6A, m5C and m1A epitranscriptomics pathways were involved in crucial processes such as cancer development, metastasis, aggressiveness, invasion and differentiation of cancer cells. The mechanism underlying the aggressiveness of Glioblastoma Multiforme, has not yet been completely elucidated, the deadliest type of stage IV glioma known. This study aimed to uncover crucial roles of m6A, m5C and m1A pathway regulators and detect biomarker genes with compare the epitranscriptome of Glioblastoma Multiforme with more naive gliomas such as Lower-Grade Glioma. To reveal the differences in Glioblastoma Multiforme and Lower-Grade Glioma cases, m6A, m5C and m1A pathway regulators were examined at DNA level and mRNA level utilizing data from cBioportal and TCGA databases. Moreover, a series of bioinformatic analyzes were performed using transcriptome and clinical data to elucidate downstream distinctness and test the biomarker properties of regulator genes. The m5C(11%) pathway regulators were more mutated than m6A(8%) and m1A(2%) pathway regulators in glioma cases. Additionally, in Glioblastoma Multiforme cases DNMT3L gene with a rate of 85% and in Lower-Grade Glioma cases, EIF3A, EIF3B, NOP2, DNMT3A genes with the rate of ~8% were observed as the highest mutation frequency. We demonstrate that m6A, m5C and m1A pathways were involved in different biological processes, and each of them affected distinct essential pathways in the cell. Furthermore, our results stated that, EIF3A and TET1 genes showed strong prognostic and diagnostic values between Glioblastoma Multiforme and Lower-Grade Glioma cases, and high expression levels of both showed negative correlation with WHO levels. We suggested that EIF3A and TET1 genes can be used as biomarkers, in new therapeutic approaches for glioma.

Keywords: Glioblastoma Multiforme, Lower-Grade Glioma, Epitranscriptome, Biomarker

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	
2. GENEL BİLGİLER	3
3. YÖNTEM	12
3.1. Araştırma Modeli	12
3.2. Araştırma Evren ve Örneklemi/Araştırma Materyali.....	13
3.3. Veri Toplama Araçları	13
3.4. Veri Toplama Süreci	16
3.5. Deneysel Kurgu.....	17
3.6. İstatistiksel Analiz.....	17
3.7. Etik Onay	18
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları	18
4. BULGULAR	19
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	47
6.1. Sonuçlar	47
6.2. Öneriler	47
KAYNAKLAR	49
EKLER	60
Ek 1: ÖZ GEÇMİŞ.....	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ALKBH1:** AlkB Homolog 1, Histon H2A Dioksijenaz
- ALKBH2:** AlkB Homolog 2, Alfa-Ketoglutarat Bağımlı Dioksijenaz
- ALKBH5:** AlkB Homolog 5 RNA Demetilaz
- CCGA:** Dolaşan Hücresiz Genom Atlası
- CGP:** Kapsamlı Genomik Profil Oluşturma
- COSMIC:** Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğu
- DGCR8:** DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8
- DNA:** Deoksiribo Nükleik Asit
- DNMT1:** DNA Metiltransferaz 1
- DNMT3A:** DNA Metiltransferaz 3A
- DNMT3B:** DNA Metiltransferaz 3B
- DNMT3L:** DNA Metiltransferaz 3L
- EGFR:** Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
- EIF3A:** Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 3 Alt Birim A
- EIF3B:** Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 3 Alt Birim B
- ELAVL1:** ELAV Benzeri Protein 1
- FC:** Kat Sayısı
- FTO:** FTO Alfa-Ketoglutarat Bağımlı Dioksijenaz
- GBM:** Glioblastoma Multiforme
- HNRNPA2B1:** Heterojen Nükleer Ribonükleoprotein A2/B1
- HNRNPC:** Heterojen nükleer Ribonükleoproteinler C1/C2
- HSD17B10:** Hidroksisteroid 17-Beta Dehidrojenaz 10
- ICGC:** Uluslararası Kanser Genom Konsorsiyumu
- IDH:** İzositrat Dehidrojenaz
- LGG:** Lower-Grade Glioma
- LOH:** Heterozigozite Kaybı
- MECP2:** Metil-CpG Bağlayıcı Protein 2
- METTL3:** Metiltransferaz Benzeri 3
- METTL4:** Metiltransferaz Benzeri 4
- METTL14:** Metiltransferaz Benzeri 14
- MDM2:** Murin Çift Dakika 2

MGMT: O(6)-metilguanin-DNA metil transferaz

MSKCC: Memorial Sloan Kettering Kanser Merkezi

m1A: N1-metiladenosin

m5C: 5-metilsitozin

m6A: N6-metiladenosin

NCDB: Ulusal Kanser Veri tabanı

NOP2: NOP2 Nükleolar Protein

NSUN2: NOP2/Sun RNA Metiltransferaz 2

NSUN3: NOP2/Sun RNA Metiltransferaz 3

NSUN4: NOP2/Sun RNA Metiltransferaz 4

NSUN5: NOP2/Sun RNA Metiltransferaz 5

PDGFA/PDGFRa: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü A/ Reseptör Alpha

PRORP: Yalnızca Protein RNase P Katalitik Alt Birimi

RB: Retinoblastoma

RBM15: RNA Bağlama Motifi Proteini 15

RNA: Ribonükleik Asit

SRSF2: Serin ve Arginin Açısından Zengin Ekleme Faktörü 2

TET1: Tet Metilsitozin Dioksijenaz 1

TET2: TET Metilsitozin Dioksijenaz 2

TET3: TET Metilsitozin Dioksijenaz 3

TCGA: Kanser Genom Atlası

TP53: Tümör Protein 53

TRMT1: tRNA Aspartik Asit Metiltransferaz 1

TRMT10C: tRNA Methyltransferase 10C, Mitochondrial RNase P Subunit

TRMT6: tRNA Metiltransferaz 6 Katalitik Olmayan Alt Birim

TRMT61B: tRNA Metiltransferaz 61B

UHRF1: Ubiquitin, PHD ve Yüzük Parmağı Etki Alanları 1 Benzeri

VIRMA: Vir Benzeri M6A Metiltransferaz İlişkili

WHO: World Health Organization

WTAP: WT1 İlişkili Protein

YTHDC1: 1 İçeren YTH Etki Alanı

YTHDC2: 2 İçeren YTH Etki Alanı

YTHDF1: YTH N6-Metiladenosin RNA Bağlayıcı Protein 1

YTHDF2: YTH N6-Metiladenosin RNA Bağlayıcı Protein 2

YTHDF3: YTH N6-Metiladenosin RNA Bağlayıcı Protein 3

?: Yüzde

<: Küçüktür

>: Büyüktür

| |: Mutlak Değer



ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekil 4.1.1. m6A, m5C ve m1A Regülatörlerinin Gliomalarda Görülen Mutasyonları.....	20
Şekil 4.1.2. m6A, m5C ve m1A Modifikasyonlarının Alterasyon Frekans Analizi...	22
Şekil 4.1.3. GBM ve LGG Vakalarının Karşılaştırmalı Alterasyon Analizi.....	24
Şekil 4.2.1. Gen Ontolojisi Zenginleştirme Analizi.....	27
Şekil 4.2.2. KEGG Analizi.....	29
Şekil 4.2.3. GSEA Analizi.....	31
Şekil 4.3.1. PCA Analizi.....	32
Şekil 4.3.2. GBM ve LGG Vakalarında m6A, m5C ve m1A Regülatörlerinin mRNA Seviyelerinin İstatistiksel Olarak Belirlenmesi.....	34
Şekil 4.3.1 GBM vakalarında Regülatörlerin Genel Hayatta Kalma Analizleri....	38
Şekil 4.3.2. LGG vakalarında Regülatörlerin Genel Hayatta Kalma Analiz.....	39
Şekil 4.4.1. ROC Analizi.....	40

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.3.1. Limma Analiz sonuçları.....	35
---	-----------



1. GİRİŞ

Glioblastoma Multiforme (GBM), bilindiği üzere en yaygın ve ölümcül evre IV glioma türüdür (Iacob ve Dinca 2009). GBM heterojen yapıda, oldukça agresif ve hızla büyüyen bir tümördür. Çeşitli tedavi uygulamalarına rağmen genellikle ölümlerle sonuçlanır. Buna rağmen GBM hastalarında metastaz potansiyeli düşüktür. Bunun altında yatan nedenler arasında, kan-beyin bariyerinin varlığı ve tümörün çok hızlı gelişip sağ kalım oranının düşük oluşunun altı çizilmektedir (Tysnes ve Mahesparan, 2001).

Düşük Dereceli Gliomalar (LGG) 2016 Dünya Sağlık Örgütü'nün Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri Sınıflandırmasına göre evre I- III gliomaları kapsayan, nispeten yavaş büyüyen primer beyin tümörüdür (Wijnenga, French, Dubbink, Dinjens ve van den Bent, 2018). Ek olarak LGG, primer beyin tümörlerinin %15'ini oluşturmaktadır (Pouratian ve Schiff, 2010). GBM'e göre prognozu önemli ölçüde iyi olmasına karşın, artan tümör çapı (>4-6 cm) ve yaşla (40) birlikte çeşitli etkenlerin varlığında agresif hale gelerek ölümcül sonuçlar doğurabilmektedir (Pouratian ve Schiff, 2010).

LGG hastalarının medyan sağ kalımı 7 yıla kadar ulaşabilmektedir (Claus, Walsh, Wiencke, Molinaro ve Wrensch, 2015). Buna karşın Glioblastoma hastalarının medyan sağ kalımları LGG'ye göre 8-15 ay ile oldukça düşüktür (P. Zhu, Du, Lu ve J. Zhu, 2017). Günümüzün gelişen teknoloji ve tedavileri göz önüne alındığında bile, teşhisi konulan GBM hastaları için genel sağ kalım oranları; 1 yılda en fazla %35'e, 2 yılda %13,3'e ve 5 yılda ise sadece %5,5 e ulaşabilmektedir (Thakkar, Dolecek, Horbinski ve Villano, 2014). Öte yandan, cinsiyete dayalı bir hayatta kalma oranı görülmezken, yaşa bağlı olarak değişen bir sağ kalım söz konusudur. Genç yaştaki GBM hastalarının yaşama yüzdesi, daha yaşlı GBM hastalarından oldukça daha yüksektir (Adamson, Kanu, Mehta, Di ve Bigner, 2009).

GBM vakalarının profilleri genetik mekanizmaların yanı sıra, klinik, immünolojik, metabolik ve epigenetik gibi çok çeşitli süreçlerde tanımlanmaya çalışılmıştır (Huang, Zhang, Gu ve Xiong, 2017; Indraccolo, Lombardi, Fassin ve Zagonel, 2019; Neftel, Laffy ve Suvà, 2019). Son yıllarda gerçekleştirilen araştırmalarında, RNA çalışmaları kanser tedavisi için umut vaat ettiği gösterilmiştir

(Sullenger ve Nair, 2016). Özellikle epigenetik süreçler ve mekanizmaları, hücre proliferasyonu, patolojik süreçler, kanserin başlangıcı ve gelişimi gibi birçok kritik noktada öne çıkmaktadır (Dong ve Cui, 2020). Artan kanıtlar, epigenetik modifikasyonların, gen ekspresyonunun anormal düzenlenmesi yoluyla tümör oluşumunu ve kanser gelişimini de etkilediğini göstermektedir. Özellikle transkripsiyon sonrası epigenetik düzenlemeyi temsil eden “epitranskriptom” olarak adlandırılan RNA modifikasyonları, kanser hücrelerinin farklılaşması, gelişmesi, proliferasyonu ve invazyonu gibi süreçlerde kritik rol üstlendikleri açığa kavuştuktan sonra, trend çalışma alanlarından biri olmaya başlamıştır (Heard ve Martienssen, 2014).

Epigenetik bilginin oluşturulması ve aktarılmasını sağlayan mekanizmalar; Metilasyon modifikasyonları, transkripsiyon sonrası histon modifikasyonları ve kodlanmayan RNA’lar olarak kategorize edilebilir (Biswas ve Rao, 2017). Protein, DNA ve RNA’ların kimyasal modifikasyonları, gen ekspresyonu regülasyonu, çeşitli hastalıkların seyri ve hücre gelişimi gibi hayati önem arz eden birçok süreçte önemli rol aldıkları bilinmektedir (Li ve Mason, 2014). Bu durum tedavisi çok zor olan ya da henüz tam tedavisi bulunamayan glioma gibi kanser türleri için farklı bir çalışma sahası ve yeni epigenetik biyobelirteçlerin bulunabilmesi gibi imkanlar sunmaktadır.

170’den fazla epitranskriptom modifikasyon mekanizması tanımlanmıştır (Lyons, Fay ve Ivanov, 2018). Bu modifikasyonlardan RNA’da en çok sık görülen N6-metiladenosin (m6A) modifikasyonunu ve yakın tarihli gerçekleştirilen çalışmalarda kanserle ilişkisi ortaya koyulan N1-metiladenosin (m1A), ve 5-metilsitozin (m5C) modifikasyonları öne çıkmaktadır (Gillette ve Hill, 2015; Wu, Chen, Liu ve Zhou, 2021). Çalışmamızda, kanserle ilişkisi gittikçe güçlenen epitranskriptom modifikasyonları ile primer beyin tümörlerinden biri olan gliomaların ilişkisini aydınlatmayı amaçladık.

Çalışmamızın hipotezleri şunlardır;

H1: m6A, m5C ve m1A modifikasyonları gliomada kritik bir rol oynamaktadır

H2: Gliomada m6A, m5C ve m1A regülatör genleri mutasyona uğramıştır

H3: Farklı agresiflik düzeyindeki gliomalarda m6A, m5C ve m1A regülatör genlerinin ekspresyon seviyeleri farklılık gösterir.

H4: GBM’de ekspresyon seviyesi düşük, LGG’de ekspresyon seviyesi yüksek ya da tam tersi değer gösteren regülatör genler, biyobelirteç olarak kullanılabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glioma

Gliyal hücreler beynin destekleyici hücre grubunu oluşturmaktadırlar, bununla beraber, gliomalar, bu destek görevi üstlenen glial hücrelerin kanserleşmesinin ya da tümörleşmesinin tanımı olarak nitelendirilebilir (Urbańska, Sokołowska, Szmidt, ve Sysa, 2014). Gliomalar, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) baz aldığı, prognoz seyri, tedavi süreci, metastaz potansiyeli, sağ kalım oranı gibi birçok patolojik ve histolojik özelliklere dayanarak I-IV evreler arasında kategorize edilebilmektedir (Louis, Perry, Burger, Ellison, Reinferberger, von Deimling ve Wesseling, 2014; Louis, Ohgaki, Wiestler, Cavenee, Burger, Jouvet, ve Kleihues, 2007).

2.1.1. Glioblastoma Multiforme

Glioblastoma multiforme oldukça agresif ve invazif bir glioma türüdür. WHO'nun bildirileri baz alınarak evde IV gliomalarda kategorize edilmektedir (Iacob ve Dinca 2009). Glioma türlerinin en ölümcül tipi olan GBM vakalarında, tanı koyulduktan sonra ortalama olarak maksimum 15 ay hayatta kalabilmektedirler (P. Zhu, Du, Lu ve J. Zhu, 2017). Klinik GBM vakalarının oluşması primer ve sekonder olarak iki gruba ayrılmaktadır. Primer (de novo) olarak gelişen GBM vakalarında, sağlıklı glial hücrelerin çeşitli kanserleşme aşamalarıyla oluşması söz konusu iken, sekonder GBM vakaları düşük dereceli gliomaların progresyonlarının ilerlemesi ile meydana gelmektedir. Yapılan araştırmalar doğrultusunda de novo GBM vakalarının görülmesi sekonder vakalardan oldukça sık olduğu ortaya koymuştur. Aynı zamanda, primer GBM'lerin sekonder GBM'e göre daha agresif ve invazivdir. Sekonder GBM hastaların prognozu de novo GBM'e göre önemli ölçüde daha iyi yöndedir (Tso, Freije, Day, Chen ve Nelson, 2006; Urbańska, Sokołowska, Szmidt ve Sysa, 2014). Yeniden düzenlenen WHO (2016) glioma sınıflandırması, ağırlıklı olarak moleküler biyobelirteçlere dayanmaktadır ve önceki (2007) sınıflandırmayı prognoz tahmini açısından geride bırakmaktadır. Bu durum göz önüne alındığında farklı glioma türleri arasında altta yatan mekanizmanın belirlenmesi ve buna yönelik moleküler biyobelirteçlerin saptanması önem arz etmektedir (Wijnenga, French, Dubbink, Dinjens ve van den Bent, 2018).

Gelişen bilimin meşalesi ile bu iki farklı yoldan gelişebilen GBM'in moleküler mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır. De novo olarak ortaya çıkan GBM vakalarının altında yatan moleküler mekanizmaların arasında, p16 geninin silinmesi, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) geninin mutasyona uğraması, bununla beraber MDM2'nin ise aşırı eksprese edilmesi gibi genetik değişimlerin altı çizilmektedir. Sekonder GBM vakalarında görülen genetik değişikliklerin bazıları TP53, retinoblastoma (RB) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü A/ reseptör alpha (PDGFA/PDGFRa) genlerinin mutasyonu ve aşırı ekspresyonu olarak görülmüştür. GBM vakalarının geneli ele alındığında, 10q kromozom kolundaki heterozigotluk (LOH) kaybıyla ve P53 genin mutasyonu/delesyonuyla sıklıkla karşılaşılmaktadır (Siegal, 2015).

2.1.2 Düşük Dereceli Glioma

Düşük dereceli gliomalar, GBM'e göre daha az agresif seyreden glioma türüdür ve daha yavaş kanser gelişimi göstermektedirler. WHO'nun yayınladığı bildirilere göre evre I, II ve III kanserleri kapsamaktadırlar (Lapointe, Perry ve Butowski, 2018, Wijnenga, French, Dubbink, Dinjens ve van den Bent, 2018). LGG hastalarının hayatta kalma süreleri ortalama olarak 5-7 yıl arası olmasına rağmen, bu süre 15 yıla kadar da uzayabilmektedir (Wu, F, Wang, Z, Wang, Li ve Zhang, 2020). Görülme yaş aralığı değişmekle beraber genelde 35-44 yaşlarında yüksek insidansa sahiptir (Pouratian ve Schiff, 2010).

LGG vakalarında, sıklıkla izositrat dehidrojenaz (IDH) geninde mutasyonlar ve 1p/19q kromozom kollarında kodelesyon ile karşılaşılmaktadır. Bu mutasyonlara bağlı olarak LGG 3 moleküler alt tipte de sınıflandırılabilir (Matsui, Maruyama, Nitta ve Muragaki, 2020). LGG alt tipleri üzerinde yapılan çalışmalar doğrultusunda, O(6)-metilguanin-DNA metil transferaz (MGMT) genin promotorunun metilasyonunun arttığı bildirilmiştir (Jiang, Mao, Ma ve Wang, 2020).

2.2. Epitranskriptom

En sade hali ile epitranskriptom, bir hücrede bulunan bütün RNA çeşitlerinde meydana gelen ve tersine döndürülebilen, biyokimyasal modifikasyonların tamamını nitelemektedir. Günümüzde tanımlanmış 170'ten fazla RNA modifikasyonu bulunmaktadır (Rosselló-Tortella, Ferrer ve Esteller, 2020). Bu proses; yazarlar (writers),

okuyucular (readers) ve siliciler (erasers) olarak isimlendirilen protein aileleri ile regüle edilmektedir. Yazar protein ailesi genom çapında modifikasyonları oluşturan enzimler iken silici enzimler ise tam tersi olarak genomdaki bu değişiklikleri silmede görev almaktadırlar. Yazarların gerçekleştirdiği modifikasyonları tanıyan ve bağlanabilen protein ailesi ise okuyuculardır. İlginçtir ki, temelde aynı görevleri yapsalar da farklı epitranskriptom yollarında farklı yazarlar, siliciler ve okuyucular görev almaktadır. Beraber çalışan bu protein aileleri birlikte hücrenin farklı çevrelere adaptasyonu, farklılaşması, proliferasyonu ve kimi hastalıkların patolojinde regülasyonu sağlamaktadırlar (Gillette ve Hill, 2015).

Metilasyon

Kelime anlamı ile metilasyon, bir bileşiğe ya da atoma metil grubunun (CH_3) eklenmesidir. Metillenme veya metilasyon süreci daha sık kimya alanında karşılaşılsa da DNA, RNA ya da protein gibi moleküllere de entegre oldukları biyoloji alanında sürekli karşılaşılan bir durumdur. İnsan vücudunda bulunan tüm hücrelerin aynı genetik bilgiye sahip olmasına rağmen, farklı hücre tiplerine özelleşmesinin temelinde yatan mekanizmalardan biridir (Trixl ve Lusser, 2019).

2.2.1. m6A Modifikasyonu

Kodlanan ve kodlanmayan RNA'ların tümünde en yaygın modifikasyon N6-metiladenosin (m6A) modifikasyonudur (Gillette ve Hill, 2015). N6-m6A RNA modifikasyonunun kodlanmasında, m; metilasyonu, A; RNA'daki adenin nükleotinin, N6 ise Adenin nükleotininin altıncı pozisyondaki azot atomunu(N) temsil etmektedir, dolayısıyla m6A RNA modifikasyonu; RNA'daki adenin nükleotitinin 6. Pozisyondaki N atomunun metillenmesini ifade etmektedir (Zhou, Kong, Fan, Tao ve Zhu, 2020). RNA'da meydana gelen m6A modifikasyonu RNA'nın stabilitesini, translasyonunu ve splicing gibi prosesleri etkilediği ve bununla birlikte çeşitli hastalıklarda kritik rol aldığı bildirilmiştir (Paramasivam, Vijayashree, Priyadharsini ve Raghunandhakumar, 2020).

2.2.2. m5C Modifikasyonu

M5C modifikasyonu hem DNA hem de RNA molekülünde meydana gelebilmektedir. Bu modifikasyonda, nükleik asit dizininde bulunan sitozin nükleotidinin © 5. Pozisyonda bulunan karbon atomuna metil grubunun aktarılması gerçekleşmektedir (Xie, S, Chen, W, Chen ve Yan, 2020). M5C modifikasyonu, hücre içinde transkripsiyonun başlatılması, splicing, bir genin susturulması ya da ekspresyon seviyesinin artırılması gibi kritik süreçlerde kilit rol oynamaktadır. M5C modifikasyonu kanser hücrelerinin agresifliği, invazyonu ve proliferasyonu ile ilişkilendirilmiştir (He, Yu, Zhang ve Guo, 2021). Literatürde, m5C modifikasyon regülatör genlerinin mutasyona uğraması, çeşitli kanserlere ilişkilendirilmiştir (Nombela, Miguel-López ve Blanco, 2021; Q,Zhang, Liu, Chen ve B, Zhang, 2021; Xiang, Ma, Shen ve Xiao, 2020).

2.2.3. m1A Modifikasyonu

M1A modifikasyonu, nükleik asit dizininde yer alan herhangi bir adenin nükleitinin (A) birinci pozisyonunda yer alan azot atomuna metil grubunun bağlanması ile gerçekleşmektedir. M1A modifikasyonları RNA ve protein etkileşimleri, RNA molekülünün katlanmaları ve ikincil yapılarına dönüşümü ile ilişkilendirilmiştir (Xie, S, Chen, W, Chen ve Yan, 2020). Bununla beraber, kanser çalışmalarında m6A ve m5C modifikasyonlarına ek olarak m1A modifikasyonun da kanser hücrelerinin davranışlarının değişiminde büyük önem taşıdığı ve hücrenin daha çok bazal görevlerinde kritik rol oynadığı bildirilmiştir (Kennecke, Yu, Gil ve Woods, 2014; Y, Zhao, Q, Zhao, Kaboli ve Xiao, 2019; Zheng, Yu, Zhang, He ve Guo, 2021).

2.2.4. m6A, m5C ve m1A Modifikasyon Regülatörleri

Daha önceki çalışmalarda da açıklandığı gibi (Malvi, Wang, Shah ve Gupta, 2019) m6A, m5C ve m1A yolaklarındaki düzenleyiciler yazar, okuyucu ve silgi olarak 3 kategoride sınıflandırılmıştır. M6A yolu için, VIRMA, METTL14, METTL3, METTL4, RBM15, RBM15B, WTAP yazar, DGCR8, EIF3A, EIF3B, ELAVL1, HNRNPA2B1, HNRNPC, SFRS2, YTHDC1, YTHDC2, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 ve okuyucu ve ALKBH5 ve FTO, silgi genleridir. m5C yolunda, yazarlar DNMT1A, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L, NOP2, NSUN2, NSUN3, NSUN4, NSUN5 ve TRDMT1,

okuyucular MECP2 ve UHRF1 ve silgiler TET1, TET2 ve TET3 genleridir. m1A yolunda, HSD17B10, PRORP, TRMT10C, TRMT6 ve TRMT61B yazıcı ile ALKBH1 ve ALKBH2 silgi regülatörlerinden oluşur.

2.3. GBM ve Epitranskriptom Çalışmaları

Heterojen yapıda olan ve agresif bir süreç izleyen GBM'in mekanoizması, immünolojik, patolojik, genetik, metabolik ve epigenetik gibi farklı alanlarda aydınlatılmaya çalışılmıştır (Indraccolo, Lombardi, Fassan ve Zagonel, 2019, Nefte, Laffy, Filbin ve Suvà, 2019). Son zamanların trend konu başlıkları arasında bulunan RNA tabanlı araştırmalar, kanser ile mücadele için yeni, etkili ve ümit vaat eden bir çalışma alanı olarak görülmektedir. Kanser biyolojisi araştırmalarında da epitranskriptom perspektifi oldukça rağbet görmekte ve RNA'lar ile kanser arasındaki ilişki gün ışığına çıkartılmaya çalışılmaktadır (Cheng, He, Wang ve Wei, 2019).

Çeşitli kanserler üzerine gerçekleştirilen çalışmalar sıklıkla m6A modifikasyonu üzerine olsa da yakın zamanlı çalışmalar m5C ve m1A modifikasyonlarının da oldukça önem arz ettiğini ve kanser ile yakından ilişkili olabileceğine dair hipotezleri vurgulamaktadır (Wu, Chen, Liu ve Zhou, 2021).

RNA'da meydana gelen m6A modifikasyonu RNA'nın kararlılığını, okunmasını, işlenmesini etkilemektedir. Gerçekleştirilen çalışmalar, m6A modifikasyonunun, hücre homeostazında, tümörögenizde, kök hücrelerin aktivitesinde ve nöronal faaliyetlerde rol oynadığını göstermektedir (Dong ve Cui, 2020). GBM'de m6A modifikasyonu üzerine yürütülen bir çalışma, m6A modifikasyon regülatörlerinden METTL3 ve METTL14 genlerinin düşük ekspresyon seviyelerinin, glioblastoma kök hücrelerinin kendini yenileme kapasitelerini arttırdığını ve bölünmelerini teşvik ettiğini, aynı zamanda tümör oluşumunu hızlandırdığını tespit etmiştir (Cui, I, Shi, Ye, Li ve Y, Shi, 2017). Yine GBM ve m6A modifikasyonu üzerine gerçekleştirilen başka bir çalışma, m6A modifikasyon regülatör üyelerinden biri olan HNRNPC geninin yüksek ekspresyon seviyesinin hayatta kalma oranı ile ilişkisi olduğunu bununla beraber GBM kök hücrelerinde tümörögeniz ve proliferasyon gibi kritik süreçlerde rol üstlendiğini belirtmiştir. Çalışmaya göre, GBM vakalarında, HNRNPC geninin ekspresyon seviyesi ile vakanın hayatta kalma oranı arasında pozitif bir korelasyon olduğu savunulmuştur (Wang, Chen, Shen, Li, ve Lv, 2020).

Kanser Genom Atlası (TCGA) veri tabanından 33 farklı kanserin verileri kullanılarak, m5C modifikasyonunun farklı kanserler üzerinde etkisinin incelendiği bir çalışmada, m5C modifikasyon regülatör genlerinin, kanser hücrelerinin agresif davranışlarında, proliferasyonlarında ve prognozunda önemli ölçüde etkili olduğu görülmüştür. GBM ve LGG dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde m5C regülatörlerinden DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 ve ALYREF genlerinin yüksek ekspresyon seviyelerinin kötü prognoz ile yakından ilişkili olduğunu, bu genlerin kötü prognoz seyri tahminlerinde belirteç olarak kullanılabileceğini vurgulamıştır (He, Yu, Zhang ve Guo, 2021). M5C modifikasyonu üzerine gerçekleştirilen farklı bir çalışma ise, m5C modifikasyonunda görevli olan genlerin gliomalarda, kemoterapi ilaçlarından biri olan temozolomide (TMZ) direnci ile ilişkisi olduğunu belirtmiştir (Ramaiah, Naushad, Manyam ve Kutala, 2021).

M6A ve m5C modifikasyonlarının yanı sıra m1A modifikasyonun da kanser çalışmalarına konu olduğu epitranskriptom çalışmaları gittikçe artmaktadır (Konno, Taniguch ve Ishii, 2019). Epitranskriptomun önemi üzerine yapılan bir çalışmada m1A modifikasyonunda görevli olan FTO geninin m6A modifikasyonunda demetilasyon gerçekleştirebildiğini ve etkinliğini değiştirebildiği belirtmiştir. Ek olarak FTO geninin farklı hücre tiplerinde farklı seviyelerde görüldüğü ve RNA substratlarıyla etkileşime girdiği vurgulanmıştır (Wei, Liu, Lu, Fei, Ai ve He, 2018). Glioma hücrelerinin davranışlarını konu alan bir çalışma ise, m1A modifikasyon regülatörlerinde görülen düzensiz seviyelerinin, glioma hücrelerinde malign davranışları tetiklediğini not etmiştir. Aynı zamanda m1A modifikasyon regülatörlerinden biri olan TRMT6 geninin hücrede NOTCH, PI3K-AKT ve MTORC1 gibi farklı sinyal yollarını etkileyip glioma hücrelerinin invazyonunu ve malignitesini arttırdığı görülmüştür (B, Wang, Niu, Z, Wang ve Zhao, 2021). M1A modifikasyonunun önemini araştıran bir başka çalışma, m1A modifikasyonunun glioma hücrelerinde tümör malignitesinde önemli rol üstlendiğini belirtmiştir. Ek olarak, m1A modifikasyonunda görev alan genlerin düzensizlikleri ise glioma hastalarının hayatta kalma oranı arasında pozitif korelasyon görüldüğünü not etmiştir (Sun, Gong, Shang, Chen ve Hu, 2021).

M6A, m5C ve m1A modifikasyon mekanizmalarının GBM ve farklı kanserlerde malignite, proliferasyon ve invazyon gibi kritik süreçlerde kilit noktası olabileceğini gösteren çalışmaların artması, yeni ilaç tedavileri için umut ışığı olmaktadır. Dolayısıyla, epitranskriptom ve kanserin oldukça güçlü bir ilişkisinin olduğunu ve yeni kanser tedavi

yöntemlerinin geliştirilmesinde epitranskriptom perspektifinin kullanılma potansiyelinin güçlü olduğunu göstermektedir (Konno, Taniguch ve Ishii, 2019).

2.4. Biyoinformatik

Bilim dünyasının gelişmesi, bir önceki çalışmaların kaldığı yerden devam edip farklı bakış açıları ve yöntemler ile yeni keşiflerin üzerine eklenmesi ile sağlanır. Bir diğer söylem ile bilginin kümülatif ilerlemesi ile gelişir. Günümüz yeni nesil teknolojileri aracılığıyla biyoloji, fizik ve kimya gibi temel bilimlere ile bilgisayarların gücünü ve hızını birleştiren aynı zamanda son dönemlerde oldukça başvurulan “biyoinformatik” olarak isimlendirilen bir alan tanımlanmıştır (Huerta, Downing, Haseltine, Seto ve Liu, 2000).

Genom verilerini kullanmak ve depolamak, ilaç geliştirmek, moleküller arası etkileşimleri tespit etmek, sekans dizilimlerini tespit etmek, verileri görselleştirmek, yüksek boyutlu verilere daha kolay ve hızlı ulaşım, işleyebilmek için birçok biyoinformatik araçlar kullanılmaktadır (Baxevanis ve Bateman, 2015). Bu işlemlerin gerçekleştirilmesi için Phyton, Docker, Ubuntu, R gibi farklı veri bilimi tabanlı araçlar geliştirilmiştir (Pittard ve Li, 2020). Aynı zamanda, büyük boyutlu verilerin depolanması ve kolayca erişim sağlanması için DNA, RNA, protein, kanser, fenotip ve genom gibi birçok farklı alanlar için oluşturulan veri tabanları bulunmaktadır (Herbert, Spirollari, Wang, Piel, Westbrook ve Wu, 2007). Kanser için oluşturulan TCGA, CCGA, ICGC, CGP, COSMIC, cBioportal ve NCDB gibi veri tabanları, farklı kanser türlerinin klinik, patolojik, transkriptomik ve etnik köken bilgileri gibi geniş bilgileri sunmaktadır (Pavlopoulou, Spandidos ve Michalopoulos, 2015).

2.4.1. TCGA Veri Tabanı

Kanser Genom Atlası’nın kısaltması olan TCGA veri tabanı, halka açık erişim sağlayan ve birçok kanser türünün geniş yelpazede profillerini barındıran, temelde kanser atlasının oluşturulması için organize edilen bir veri tabanıdır. Araştırmanın çeşidine bağlı olarak bireysel ya da kohort olarak kanserin genom çapında bilgisini sunmakla beraber, vakanın klinik bilgilerini de içermektedir (Tomczak, Czerwińska ve Wiznerowicz, 2015). Ek olarak pan-cancer adı altındaki veriler, bireysel kanser türüne özgü bilgileri

sunmaktadır. Bu durumum bilim insanlarına kanser türleri arasındaki farklılıkların daha kolay karşılaştırılması avantajını sunar. Ayrıca, kanser türlerinde genomik düzey ile hücresel düzeyde meydana gelebilecek benzerlikler ve ayrımlar hakkında geniş ölçekli verileri barındırır (Weinstein, Collisson, Mills, Shaw ve Stuart, 2013).

2.4.2 cBioportal Veri Tabanı

TCGA ve ICGC gibi büyük ölçekli veri tabanları farklı kanser türleri ile ilgili sayısız ve büyük boyutlarda veri üretmekte ve depolamaktadır. Ancak bu verileri işleyebilmek, görselleştirebilmek ya da kümeleyebilmek için yeterli araçlara sahip değildir. Memorial Sloan Kettering Kanser Merkezi tarafından geliştirilen cBioportal veri tabanı, bilim insanları için veri hesaplamaları, görselleştirmeleri ve çeşitli analizleri analitik araçlar yardımı ile gerçekleştirebilen, halka açık erişim sağlayan bir web uygulama platformudur (Cerami, Gao, Dogrusoz, Gross, Sumer, Aksoy ve Schultz, 2012). 13.000'den fazla tümör örneğini içeren cBioportal veri tabanı günden güne zenginleşmekte ve farklı analizleri bünyesine eklemektedir. cBioportal veri tabanı, metilasyon profili, mRNA ekspresyon seviyesi, co-ekspresyon analizi, mutasyon frekansları ve tipleri gibi bir çok alanda bilgi barındırır, görselleştirir ve çeşitli karşılaştırmalı analizler sunar. Ek olarak, istenilen verilerin indirilmesine olanak tanır (Gao, Aksoy, Dogrusoz, Dresdner Gross, Sumer ve Schultz, 2013).

2.4.3. R ve RStudio

R, ücretsiz erişim sağlayan bir programlama dilidir. Kendine ait özel ortamı ve bu ortamda kullanılmaya uygun kodları içeren paketler bulunmaktadır. Bilimsel araştırmalarda, veri biliminde, hesaplamalı analizlerde, biyoinformatik ve istatistik alanlarda oldukça popüler olarak kullanılan bir programlama dilidir. Yüksek boyutlu verilerin işlenmesi, analiz edilmesi, filtrelenmesi gibi işlemleri hızlı bir şekilde ve düşük hata oranı ile gerçekleştirir. Buna ek olarak RStudio ise R'ın IDE'sidir ve desktopta görünür. RStudio veriler ile işlemlere ek olarak, verilen görselleştirilmesinde kolaylık sağlar (Gentleman, 2008, Peng, 2016; Kronthaler ve Zöllner, 2021).

2.5.Bioinformatik Çalışmaların Önemi

Biyoinformatik araçlar, biyolojik verileri organize eden, depolayan, işleyen ve paylaşabilen tüm platformları içermektedir. Bu platformlar kullanıcılarına, yüksek boyutlu verilerin kolay bir şekilde işlenmesine imkân tanır. Aynı zamanda manuel yapılacak olan işlemlere göre vakitten ve maddi açıdan kazanç sağlar (Attwood ve Miller, 2002; Singh, 2016; Ellsworth ve Manolio, 1999).

Hesaplamalı algoritmaların ve yazılım araçlarının geliştirilmesi, ardından uygulamaya geçilmesi, öncelikle tarım ve ilaç sektörlerine hizmet etmek amacıyla biyolojik süreçlerin anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, farmakoloji ve toksikoloji çalışmalarında, ilacın moleküler yapısı ile hücrenin davranışı arasındaki ilişkiyi tahminlere dayalı olarak hesaplayan biyoinformatik araçlar sayesinde, hayvanlar üzerinde yapılacak olan deneylerin azaltılmasına katkıda bulunmaktadır (Feasel, 2017).

Bilim insanları için, milyarlarca nükleotidlerden oluşan DNA'nın diziliminin belirlenmesi, mutasyonların seçilmesi ve çeşitli analizlerin gerçekleştirilip görselleştirilebilmesi vakit, kolaylık ve süreklilik açısından oldukça avantajlı olmaktadır. Son yıllarda in siliko çalışmaların artması ile birlikte, farklı bilim insanlarının deneylerinin sonucunda elde ettikleri veriler kullanılarak bilgisayar ortamında karşılaştırmalı analizler yardımıyla değerlendirip, çeşitli hastalıklar için ilaç tahminleri yapılabilmektedir (Wishart, 2005). Bu durum, dünya genelindeki farklı verilere kolayca ulaşım imkânı sağlamakla beraber boyut büyüklüğü olan verilerin yüksek hız ve düşük yanlış oranı ile analiz edilmesine olanak tanır (Manisekhar, Siddesh ve Manvi, 2020).

3. YÖNTEM

3.1. Araştırma Modeli

Bu çalışma, GBM'in agresif doğasının epitranskriptom perspektifinden aydınlatılması adına daha naif bir glioma türü olan LGG ile karşılaştırılması amaçlanarak, çeşitli biyoinformatik araçlar ve farklı analizlerden yararlanılarak in siliko araştırma modeli uygulandı.

3.2. Araştırma Materyali

Çalışmanın ilk basamağında, cBioportal veritabanında halka açık erişim sağlanan 5 farklı glioma çalışmalarının kullanılması ile 3234 hastadan alınan 3144 örnek seçilerek, m6A, m5C ve m1A yolak regülatör genlerinin glioma vakalarında meydana gelen mutasyon tipleri ve mutasyon frekans analizi cBioportal veri tabanından faydalanılarak gerçekleştirildi.

Deneyde seçilen 5 farklı glioma çalışması:

- Beyin Düşük Dereceli Glioma (TCGA, pan-cancer)
- Glioma (MSKCC, Clin Cancer Res 2019)
- GBM ve LGG'nin birleştirilmiş Kohort Çalışması (TCGA, cell,2016)
- Anaplastic Oligodendroglioma ve Anaplastic Oligoastrostoma (MSKCC, Neuro Oncol 2017)
- Glioblastoma multiforme (TCGA pan-cancer)

Çalışmanın ikinci basamağında araştırmaya GBM ve LGG TCGA, pan-cancer çalışmaları seçilerek devam edildi. GBM ve LGG pan-cancer çalışmalarının, m6A, m5C ve m1A genlerinin RNAseq ve klinik verileri RTCGA paketi kullanılarak R ortamına aktarılması sağlandı. GBM vakalarından 166 RNAseq ve LGG vakalarından 530 RNAseq verileri olarak totalde 696 RNAseq verisi ve her birinin klinik verisi ekstrakte edilerek çalışma gerçekleştirildi.

3.3. Veri Toplama Araçları

Araştırma kapsamında kullanılan glioma verilerinin mutasyon frekans analizi ve transkriptomik data eldesi cBioportal veri tabanından yararlanılarak gerçekleştirildi (Cerami, Gao, Dogrusoz, Gross, Sumer, Aksoy, Jacobsen ve Schultz, 2012). Klinik veriler ve RNAseq verileri RTCGA paketleri ile RStudio ortamından elde edilmiştir (Kosinski ve Biecek, 2021). Diferansiyel ekspresyon analizi ile GBM ve LGG vakaları arasında istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon seviyesine sahip m6A, m5C ve m1A yolak regülatörlerinin seçilmesi, hayatta kalma analizi ile m6A, m5C ve m1A yolak regülatörlerinin GBM ve LGG vakalarında daha uzun yaşam süresi ile ilişkisinin belirlenmesi, PCA analizi ile m6A, m5C ve m1A regülatörlerinin GBM ve LGG vakalarındaki dağılımının açıklanması, GO, KEGG ve GSEA zenginleştirme analizleri ile m6A, m5C ve m1A regülatörlerinin hücre içerisinde etkilediği yolların belirlenmesi, ROC analizi ile m6A, m5C ve m1A regülatörlerinin GBM ve LGG için biyobelirteç olarak kullanılma potansiyeli analiz edildi.

Mutasyon Frekans Analizi

5 farklı glioma çalışmasından 3234 hastadan alınan 3144 örneğin mutasyon tipleri ve değişen frekanslarının çubuk grafikleri cBioportal veri tabanından online olarak “Cancer Types Summary” sekmesi kullanılarak oluşturuldu. “OncoPrint” sekmesi kullanılarak m6a, m5c, m1a yollarındaki regülatör genlerinin mutasyon yüzdeleri ve mRNA seviyelerindeki değişimleri dahil olarak ek bilgilerle farkları özetlendi.

Transkriptom Verileri Eldesi

Transkriptomik veriler, cBioportal veri tabanından Glioblastoma Multiforme TCGA, pan-cancer ve Beyin düşük dereceli glioma TCGA, pan-cancer çalışmalarının tüm numuneleri log RNA Seq V2 RSEM göre mRNA ekspresyonu z-skorları ile toplanmıştır (Gao, Aksoy, Dogrusoz, Dresdner, Gross, Sumer, Sun, Jacobsen ve Schultz, 2013). GBM ve LGG verileri, m6A, m5C ve m1A yolları için değiştirilmiş ve

değiştirilmemiş olarak gruplandırıldı. Her transkriptomik yolak için bir veya daha fazla gende mutasyona sahip verileri içeren grup değiştirilmiş grubu temsil ederken, değiştirilmemiş grup, mutasyon olmayan veri örneklerinden olacak şekilde ayrıldı. Log Ratio ve p değerleri değerlerinin bulunduğu genlerin listesi değiştirilmiş ve değiştirilmemiş gruplar için cBioPortal'dan indirildi.

RNAseq ve Klinik Verilerin Eldesi

“RTCGA” paketleri kullanılarak GBM ve LGG pan-cancer verilerin R ortamına aktarılmıştır (Kosinski ve Biecek, 2021).

Ekspresyon Seviyelerinin İstatistiksel Olarak İncelenmesi

LGG ve GBM hastaları arasındaki genlerin RNA ekspresyon seviyelerini karşılaştırmak için TCGA'dan alınan 166 GBM ve 530 LGG verilerinin istatistiksel olarak anlamlılığını test etmek için “rstatix” paketi kullanılarak wilcox test R veri tabanında analiz edildi (Kassambara, 2020). Ardından “ggplot2” paketi ile görselleştirildi (H, Wickham, Chang ve M, Wickham, 2016).

Diferansiyel Ekspresyon Analizi

Diferansiyel farkın analiz edilmesi için birden farklı analiz geliştirilmiştir (Robinson, McCarthy ve Smyth, 2010, Soneson ve Delorenzi, 2013). Bu çalışmada, uygulaması daha kolay ve nispeten daha güvenilir sonuçlara dayanması açısından “LIMMA” analizi kullanıldı (Ritchie, Phipson, Wu, Hu, Law , Shi ve Smyth, 2015). M6A, m5C ve m1Aepitranskriptom yolağında(m6a, m5c,m1a) ilgilendiğimiz genlerin diferansiyel olarak farklı eksprese edilenleri saptamak için RTCGA'dan eksrakte edilen rna-seq verileri limma paketi kullanılarak R dilinde analiz edildi. Analiz sonucunda $\log_{2}FC \geq 0.6$ eşiği geçen genler differansiyel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

Genel Hayatta Kalma Analizi

R ortamında “Survival” ve “Survminer” R paketleri, Kaplan-Meier tahmin modeline dayalı olarak GBM ve LGG örneklerinin genel hayatta kalma analizi için kullanıldı (Kassambara, Kosinski, Biecek ve Fabian, 2017). M6A, m5C ve 1mA yolaklarında her bir gen için yüksek veya düşük ekspresyon gruplaması medyan ekspresyon değeri dikkate alınarak belirlendi. Her gen için, ifade değerlerinin hayatta kalma süresi ve durumu ile korelasyonuna dayalı olarak bir p değeri hesaplandı. p değeri <0.05 olan genler, hayatta kalma eğrileri şematize edildi.

PCA Analizi

Epitranskriptomik yolların gen ekspresyon seviyesinin GBM ve LGG arasındaki ayırma gücünü test etmek için R ortamında “stats” paketi kullanılarak Temel Bileşen Analizi (PCA) uygulandı (R, Team, M, Team, Suggests ve Matrix,, 2018). Epitranskriptomik yollar, GBM ve LGG veri kümelerinin örneklerinin uzamsal dağılımını göstermek için ayrı ayrı veya birlikte kullanıldı. Sonuçları görselleştirmek için R'deki “Ggfortify” paketinden yararlanıldı (Tang, Horikoshi ve Li, 2016).

Zenginleştirme Analizleri

Gen seti zenginleştirme analizi (GSEA), cBioportal'dan indirilen transkriptomik veri setini filtrelemek için bir p-değeri <0.05 olan veriler seçildikten sonra filtrelenmiş genlerle ClusterProfiler paketi kullanılarak R dilinde yapıldı (Wu, Hu, Xu, Chen, Guo, Dai, Feng, Zhou ve Yu, 2021). Analizler, nPerm 10000, minGSSize 20, maxGSSize 800, pvalueCutoff = 0.05, qvalueCutoff = 0.2 ve yanlış keşif oranı (FDR) olarak pAdjustmethod seçilerek tüm ontolojik terimleri bulmak için çalıştırıldı.

Daha sonra, gen ontolojisi (GO) ve genlerin ve genomların kyoto ansiklopedisi (KEGG) analizleri, GSEA da transkriptomik veri setine uygulanan ilk filtrelemeye ek olarak “Log Ratio” > 0.6 eşik değeri uygulanarak bir veri seti oluşturuldu. Ardından GO ve KEGG analizleri için R ortamında clusterProfiler paketi kullanıldı (Yu, Wang ve Han,

2012). Her iki analiz için ayarlanan parametreler; pvalueCutoff = 0.05, pAdjustMethod = "fdr", qvalueCutoff = 0.2, minGSSize = 10, maxGSSize = 500 olarak ayarlandı. Analiz sonucunda p değeri <0.05 olan yolaklar ve GO terimleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Elde edilen sonuçlar, R ortamında ggplot2 paketi kullanılarak nokta grafiği ve barplot şekillerinde sunuldu (H, Wickham, Chang ve M, Wickham, 2016).

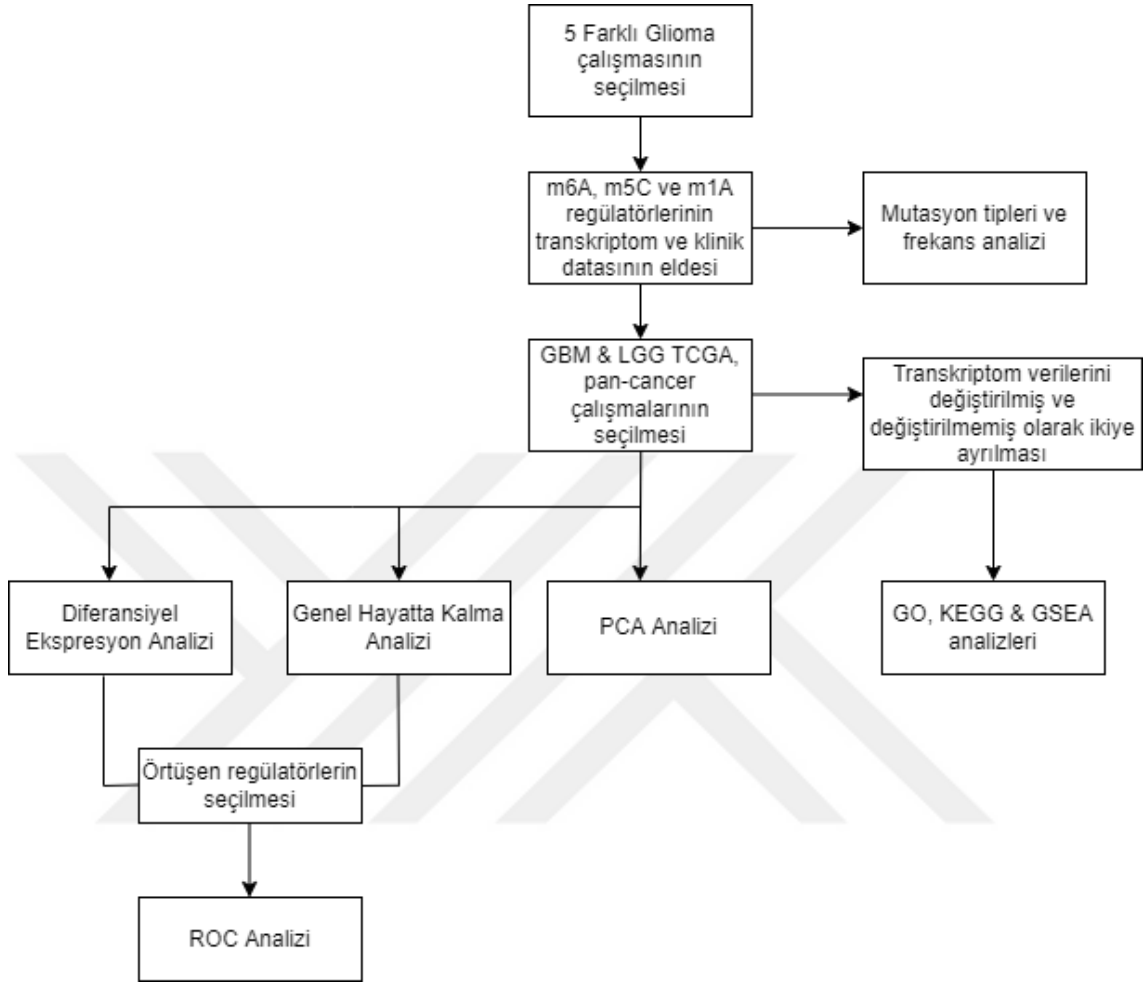
ROC Analizi

Aday biyobelirteç olarak vurgulanan genlerin GBM ve LGG için tanısal değere sahip olup olmadığını test etmek amacıyla, doğruluğunu saptamak için duyarlılık ve özgüllük ölçütleri kullanılarak her bir gen için Alıcı İşlem Karakteristiği (ROC) eğrisi oluşturulmuştur. ROC eğrisi analizi, R dilinin pROC paketi kullanılarak yapıldı (Robin, Turck, Hainard, Tiberti, Lisacek, Sanchez ve Müller, 2011). Sonuçların ROC eğrisi çizilerek AUC (ROC eğrisi altında kalan alan) değerleri belirlendi. AUC değeri 1 ile 0 arasında değişmekte, ilgili adayın duyarlılık ve özgüllük kabiliyetinin ölçüsünü belirtmektedir. AUC değeri 1'e ne kadar yakın ise adayın özgünlüğü ve duyarlılığı oldukça güvenilebilir anlamına gelmektedir (Hoo, Candlish ve Teare, 2017).

3.4. Veri Toplama Süreci

Çalışmada kullanılan bütün veriler dijital ortamdan elde edilmiştir. Çalışma in siliko olarak gerçekleştirilip, cBioportal, R, RStudio ve RTCGA gibi biyoinformatik tabanlı platformlardan yararlanılarak gerçekleştirildi.

3.5. Deneysel Kurgu



Şekil 3.1. Çalışmanın akış diyagramı

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmada, regülatör genlerin GBM ve LGG vakaları arasındaki farkın istatistiksel olarak tespiti için R ortamında “rstatix” paketinden faydalanılarak “Wilcoxon İşaretli Sıra testi” tabanlı istatistiksel analiz gerçekleştirildi. Wilcoxon işaretli sıra testi, iki örnek arasındaki farkı istatistiksel olarak ortaya koyan parametrik olmayan bir istatistiksel analiz yöntemidir. Hipotezleri test etmek için de sıklıkla kullanılır (Woolson, 2007). İstatistik sonucu p değeri 0.05’ten küçük olan genler anlamlı olarak kabul edildi.

3.7. Etik Onay

Yukarıda belirtilen sebeplerden ötürü, bu tez çalışmasında etik onaya ihtiyaç duyulmamıştır.

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları

Glioma bir beyin kanseri türü olduğundan ve glioma hastalarının tümünden beyin doku örneği alınamamasından kaynaklı olarak verilerin az olması araştırmanın sınırlılıkları içerindedir. Örnek sayılarının fazla olması sonuçların güvenilirliklerini artırarak standart sapmasını düşürür. Araştırmaya dahil edilen, 166 GBM, 530 LGG verileri diğer kanser vakalarına göre nispeten daha düşük sayıda veriyi kapsamaktadır.

BULGULAR

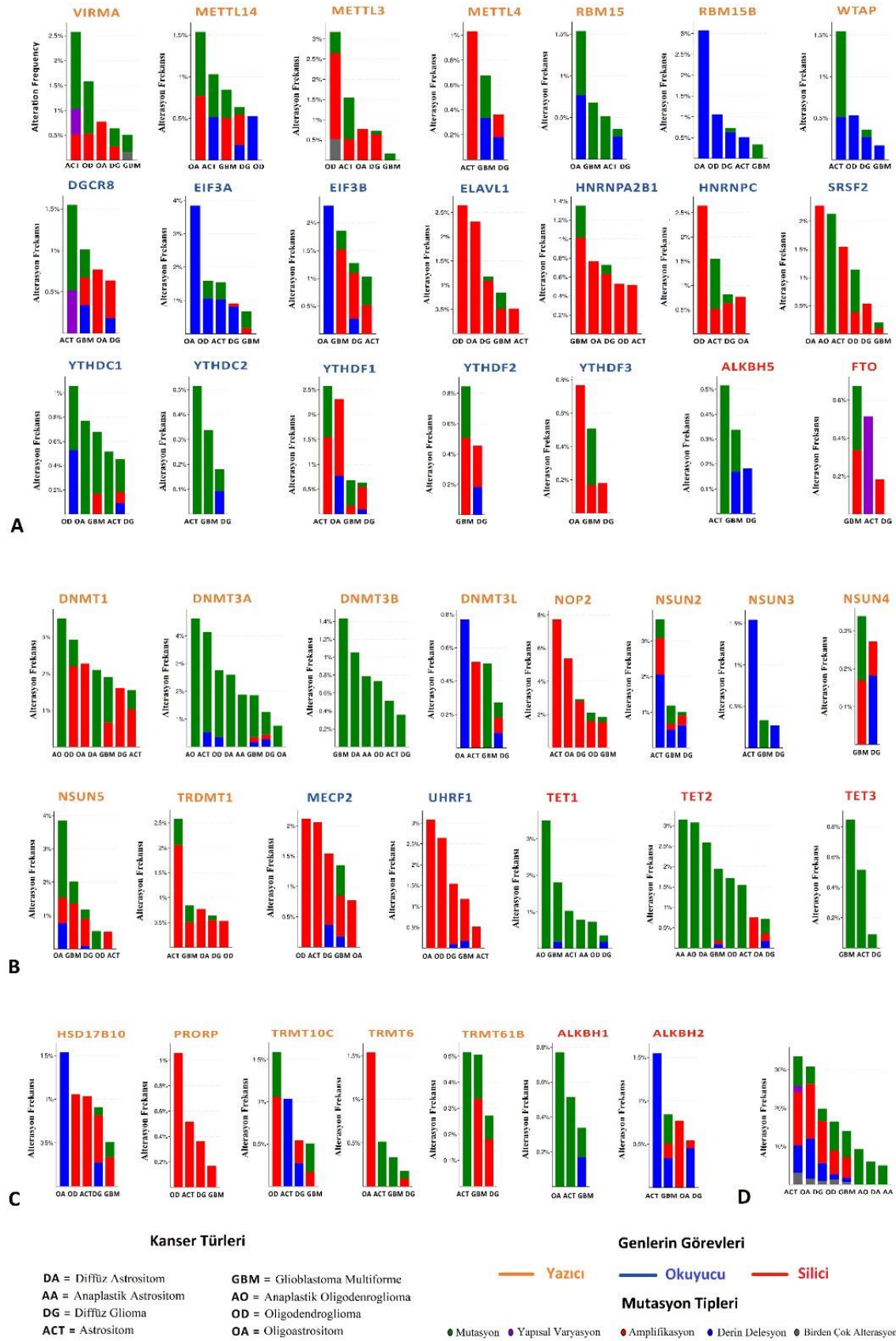
Biriken bulgular, hücresel süreçlerde ve kanser patolojisinde epitranskriptome yollarının, özellikle m6A'nın önemli işlevlerini vurgulamaktadır. Son çalışmalar, m5c ve m1a modifikasyonlarının homeostaz ve hastalık gelişiminde de kritik roller oynadığını ortaya koymuştur. Epitranscriptome yolaklarının kanser prognozu ile ilişkisini anlamlandırmak üzere, merkezi sinir sisteminin malignitesinin %81'ini oluşturan gliomlar, beyin tümörleri odaklanmak için uygun tümör tipleridir. GBM'nin epitranskriptom perspektifinden LGG ile karşılaştırılmasının GBM'nin bu karmaşık ve agresif doğasının altında yatan mekanizmaya ışık tutabileceğini varsaydık.

4.1. GBM ve LGG'de m6A m5C ve m1A Regülatörlerinin Mutasyon Profili

Epitranskriptom modifikasyonlarından m6A modifikasyonunun, RNA'da en sık görülen modifikasyon olduğu bilinmekle beraber kanserde m6a ile birlikte m5c ve m1a modifikasyonlarının da kritik ve önemli bir rol üstlendikleri yapılan çalışmalarla gün yüzüne çıkarılmaya başladığı, yukarıda daha önce bahsedilmişti. Bu yolaklardaki regülatörler yazıcı, silici ve okuyucu olarak 3 kategoriye ayrıldı. m6A yolundaki genler şu şekilde sınıflandırıldı: yazarlar: VIRMA, METTL14, METTL3, METTL4, RBM15, RBM15B, WTAP, okuyucular: DGCR8, EIF3A, EIF3B, ELAVL1, HNRNPA2B1, HNRNPC, SFRS2, YDFTHDC1, YTHDC2DC, YTHDF1, YTHDC2DC1, YTHDF , ve siliciler: FTO olarak ALKBH5. m5C yolağında; yazarlar: DNMT1A, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L, NOP2, NSUN2, NSUN3, NSUN4, NSUN5, TRDMT1, okuyucular: MECP2, UHRF1, siliciler: TET1, TET2 ve TET3, m1A yolu genlerinde, yazarlar: HSD17B10, PRORP, TRMT10C, TRMT6, TRMT61B, siliciler: ALKBH1 ve ALKBH2 şeklinde sınıflandırıldı. Bu doğrultuda ilk olarak, cBioPortal veri tabanının “oncoprint” sekmesi kullanılarak, 5 farklı glioma çalışmasının içerdiği toplamda 3144 örnek ile m6A, m5C ve m1A regülatörlerinin detaylı mutasyon tiplerini ve frekanslarının dağılımını gösteren oncoprintler oluşturuldu. Genel olarak karşılaştırıldığında, m5C (%11) ve m6A (%8) yolak regülatörlerinin, m1A (%2) yolak regülatörlerinden daha yüksek mutasyon sıklığına sahip olduğu gözlemlendi. m6A yolağında nispeten yüksek genetik değişim gösteren genler EIF3B, ELAVL1 ve EIF3A olarak karşımıza çıktı ve oranları sırasıyla %1,4, %1,2 ve %1.1 idi. M5C yolağında, görece yüksek oran sergileyen

Ardından, regülatör genlerin, evre II Diffüz Glioma (DG), Diffüz Astrositom (DA), Astrositom (ACT), Oligodendroglioma (OD) ve Oligoastrositom (OA), evre III Anaplastik Astrositom(AA), Anaplastik Oligodendroglioma (AO) ve evre IV Glioblastoma Multiforme(GBM) gibi farklı glioma vakalarında gerçekleşen genetik değişimler ve mutasyon frekans analizi, bar çubuk grafiği şeklinde cBioportal veri tabanında oluşturuldu (Şekil 4.1.2.). Şekil 4.1.2.'de görselleştirildiği üzere, m6A regülatörlerinden EIF3A ve RBM15B genlerinde sıklıkla deep delesyondan kaynaklanan değişim gözlemlendi bununla birlikte ELAVL1, HNRNPA2B1, HNRNPC, SRSF2 ve YTHDF3 genleri için ağırlıklı olarak amplifikasyondan kaynaklı mutasyonlar gözlemlendi. m6A regülatörlerinde en düşük değişim gözlenen genler ise YTHDC2 ve ALKBH5'ti. m6A regülatör genlerinde gözlemlenen değişimlerin tümü ele alındığında en sık, amplifikasyon, deep delesyon ve mutasyon değişimleri sırasıyla %26,19, %16,49 ve %16,29 oranlarında gözlemlendi (Şekil 4.1.2.A).

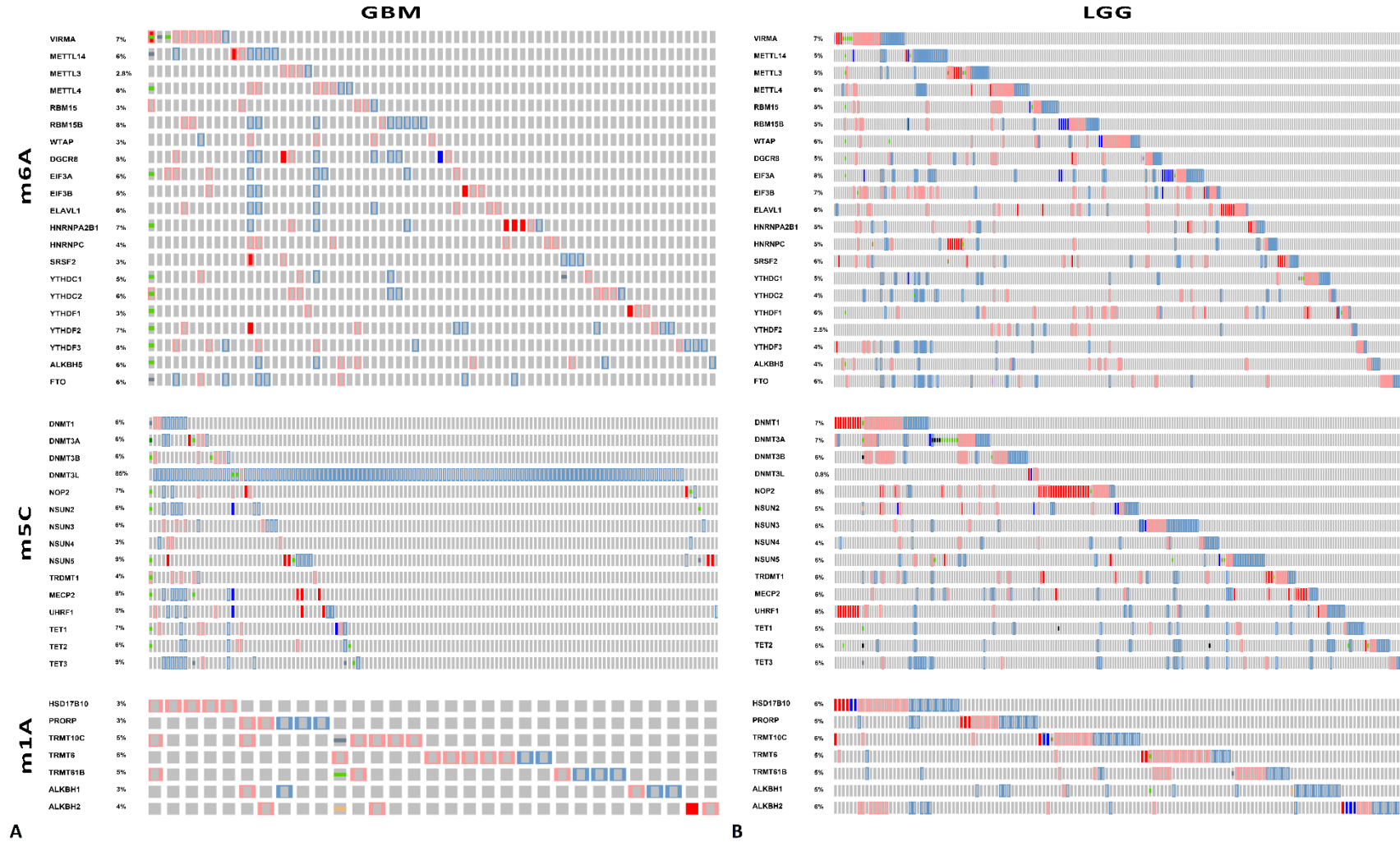
M5C regülatörlerinde en yüksek genetik değişim skorunu NOP2 geni %3 oranı ile gösterdi (Şekil 4.1.1.). Hemen arkasında, DNMT3A ve DNMT1 genleri, sırasıyla %1,9 ve %1,8'lik bir skorla yüksek değişim sergileyen m5C düzenleyicileri arasındaydı. Şekil 4.1.1. ve şekil 4.1.3. bir bütün olarak ele alındığında, m5C düzenleyicileri arasında DNA düzeyi varyasyonu en düşük olan genlerin NSUN4 ve TET3 genleri olduğu gözlemlendi. Ek olarak, NOP2, DNMT1, MECP2 ve UHRF1 genlerindeki değişikliklerin amplifikasyondan, DNMT3A/B, TET1/2/3 genlerindeki değişikliklerin ise mutasyondan kaynaklandığı gözlemlendi (Şekil 4.1.2.). m5C regülatör genlerinde görülen genetik değişimlerin dağılımına bakıldığında, biraz daha fazla mutasyon olmakla beraber mutasyon ve amplifikasyonun genel olarak görüldüğü not edildi (Şekil 4.1.2.B). M6A ve m5C yollarına göre nispeten daha az genetik değişim gösteren m1A yolak regülatörlerinde en yüksek oran %0,9 ile HSD17B10 geninde en düşük oran %0,2 oran ile ALKBH1 geninde görüldü. m1A regülatörlerinde görülen genetik değişimlerin nedeni sırasıyla önce amplifikasyondan daha sonra deep delesyondan ve mutasyondan kaynaklandığı gözlemlendi (Şekil 4.1.2.C). M6A, m5C ve m1A yolak regülatör genlerinin farklı gliomalarda gerçekleşen genetik değişimleri genel olarak değerlendirmek adına, yolakları regülatörlerini birbirinden ayırmadan mutasyon frekans analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.1.2.D).



Şekil 4.1.2. m6A, m5C ve m1A Modifikasyonlarının Alterasyon Frekans Analizi

M6A, m5C ve m1A yolaklarındaki regülatör genlerinde genel olarak DNA seviyesinde değişime neden olan mutasyon, ampifikasyon, deep delesyon, yapısal varyasyon ve birden çok değişim gibi farklı tip değişimler gözlemlendi. Mutasyon tiplerinin farklılığı kadar görülme frekansları da değişiklik gösterdi. Bir diğer önem nokta astrositom %33.51 oranla en çok anaplastik astrositomun ise %5.03 oranı ile, en az alterasyonun görüldüğü glioma türü olarak gözlemlendi. Evre IV GBM ise %13,97'lik bir oran ile beşinci sırada yer alan glioma türü olur iken ilk dört sıradaki glioma türleri evre II idi (Şekil 4.1.2.D).

Çalışmamıza, DNA seviyesinde meydana gelen değişimlere ek olarak mRNA'da da meydana gelen değişimleri incelemek hedeflendi. Bu hedef doğrultusunda çalışmaya sadece GBM ve LGG pan-cancer çalışmaları dahil edildi. 166 GBM vakasında ve 530 LGG vakasından alınan örnekler ile toplamda 696 örnek ile çalışmalara devam edildi. cBioportal veri tabanından faydalanarak önceki değişimlere ek olarak mRNA ekspresyon seviyeleri analize dahil edildi. Dikkat çekici bir şekilde, mRNA ekspresyon seviyelerinde değişim denkleme katıldığında, neredeyse üç yolaktaki tüm genlerin alterasyon frekansının arttığı görüldü. Bu genlerin arasında ilk ve en dikkat çeken gen GBM örneklerinde göstermiş olduğu değeri ile m5C yolak regülatör genlerinden DNMT3L oldu. Diğer mutasyonlara ek olarak mRNA seviyesinin oldukça azalmış olduğu görüldü ve bu değişimin DNMT3L geninin skorunu %85'e çıkardığı gözlemlendi (Şekil 4.1.3.).



Şekil.4.1.3. GBM ve LGG Vakalarının Karşılaştırmalı Alterasyon Analizi

4.2. m6A, m5C ve m1A Modifikasyon Regülatörlerinde Meydana Gelen Genetik Değişikliklerle İlişkilendirilen Yolaklar

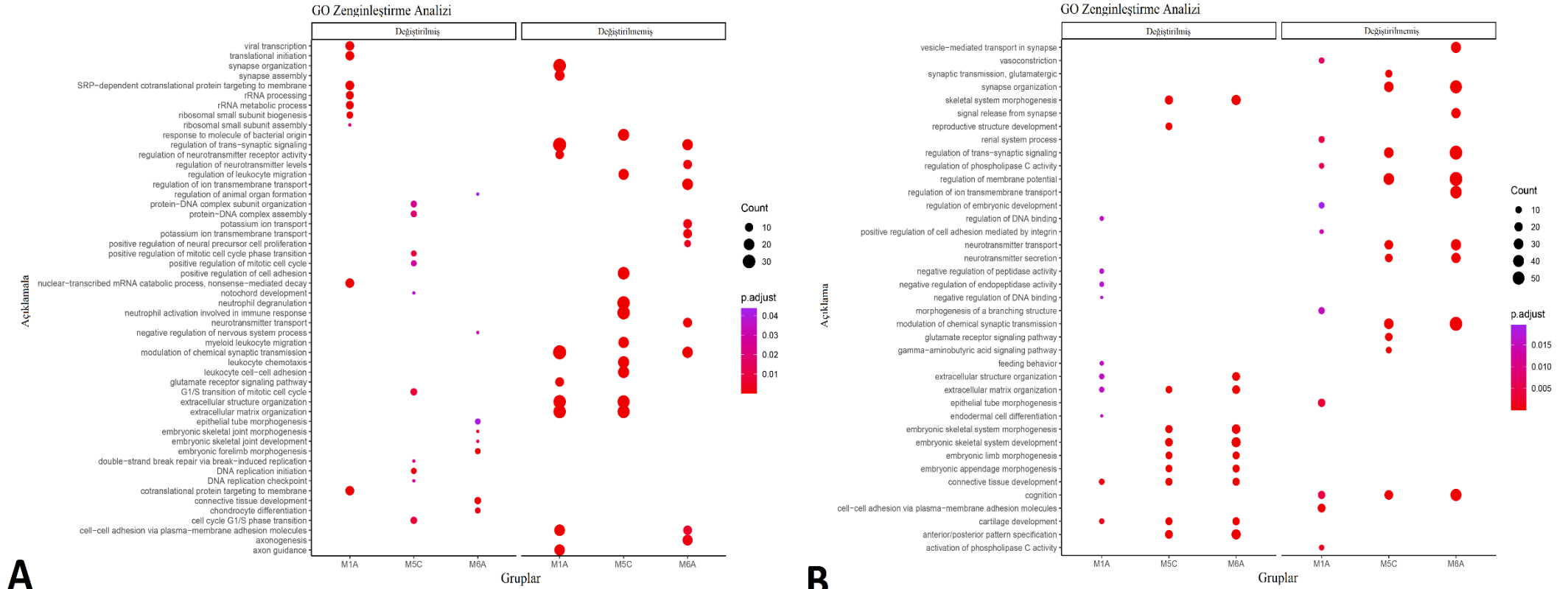
Genetik değişiklik analizine dayanarak, mRNA seviyesindeki dikkate değer değişikliklerin gliomaların saldırganlığı ile ilgili olabileceğini düşünüldü. Bu hipotezi test etmek için GBM ve LGG veri setlerini yöntem bölümünde açıklandığı gibi her bir epitranskriptom yolu için değiştirilmiş ve değiştirilmemiş olarak iki gruba ayırdık. Değiştirilmiş grupta incelenen yolun en az bir üyesinde genetik değişiklik olan hastaların transkriptom verilerini dahil ettik. Değiştirilmemiş grup, araştırılan yolda genetik bir değişiklik olmayan hastaların transkriptom verilerinden oluşturuldu. Değiştirilmiş ve değiştirilmemiş gruplar arasında farklı şekilde ifade edilen genler, cBioPortal veri tabanından alındı. m6A modifikasyonu için cBioportal'dan alınan verilerin p değeri ve kat değişim (FC) eşikleri olmadan, GBM veri setinde 19.615 gen (değiştirilmiş gruplarda 8.453 ve değiştirilmemiş gruplarda 11.162) ve LGG veri setinde 20.035 gen (değiştirilmişlerde 9.842 ve değiştirilmemiş gruplarda 10.193) içermekteydi. GBM veri setinde m5C yolu için değiştirilmiş 7.582 gen ve değiştirilmemiş gruplarda 11.684 gen, LGG veri setinde aynı yol için değiştirilmiş ve değiştirilmemiş gruplarda sırasıyla 10.121 ve 9.922 gen tanımlandı. M1A yolağında ise GBM veri setinde değiştirilmiş ve değiştirilmemiş gen sayıları 8.988 ve 10.499, LGG veri setinde, değiştirilmiş gruplarda 9.581 gen ve değiştirilmemiş gruplarda 10.432 gen idi. İndirilen transkriptom verilerinin p değeri <0.05 ve $|FC| > 1.5$ değerleri ile filtrelenmesi sonucunda, GBM veri setinde m6A yolu için değiştirilmiş 28 gen ve değiştirilmemiş grupta 207 gen ve LGG veri seti için 175 değiştirilmiş ve 550 değiştirilmemiş gruplarda yukarı regüle edilmiş genler olarak belirlendi. GBM ve LGG veri kümelerindeki m5C yolu için filtrelenmiş yukarı regüle edilmiş genlerin sayısı şu şekildeydi: sırasıyla 57 değiştirilmiş ve 374 değiştirilmemiş ve 84 değiştirilmiş ve 282 değiştirilmemiş. m1A yolu için GBM veri setinde değiştirilmiş olarak 65 ve değiştirilmemiş olarak 313 gen tespit edilirken, LGG veri kümelerinde değiştirilmiş 39 ve değiştirilmemiş 244 gen önemli yukarı regüle edilmiş olarak bulundu.

Daha sonra, her bir yol için değiştirilmiş ve değiştirilmemiş gruplardaki yukarı regüle edilmiş genler GO biyolojik proses (BP) teriminin ve KEGG yollarının zenginleştirilmesi gerçekleştirildi. M6A modifikasyonunun GBM vakalarında, morfogenez, gelişme, farklılaşma ve transsinaptik sinyalleşme ile ilgili BP'ler

değiştirilmiş grupta zenginleşirken, hücre-hücre yapışması, nörotransmitter taşınması, nöral öncü hücre proliferasyonu ve aksonogenez ile ilgili BP terimleri değişmemiş grupta zenginleştiği görüldü (Şekil 4.2.1.A). M6A yolağının LGG veri setinde ise, embriyonik iskelet gelişimi/morfogenezi, ön/arka patern spesifikasyonu ve embriyonik uzuv/apendaj morfogenezi ile ilgili BP'ler değiştirilmiş grupta zenginleştirilirken, değiştirilmemiş grup için membran potansiyeli regülasyonu, kimyasal sinaptik iletim/sinyalleme modülasyonu ve nörotransmitter taşıma/salgılama terimlerinin zenginleştiği tespit edildi (Şekil 4.2.1B).

LGG veri setinde değiştirilmiş ve değiştirilmemiş m5C modifikasyon grupları için benzer BP terimleri zenginleştiği gözlemlendi. Öte yandan, GBM veri setindeki değiştirilmiş m5C grubundaki zenginleştirilen terimler, DNA replikasyonu, mitotik hücre döngüsü, G1/S faz geçişi, çift sarmal kopma onarımı ve notokord gelişimi olarak ortaya çıktı (Şekil 4.2.1A). GBM vakalarında m5C modifikasyonunun değiştirilmemiş grubunun BP zenginleştirme sonuçları, hücre dışı matris organizasyonunu, nötrofil aktivasyonunu içeren bağışıklık tepkisini ve lökosit göçü terimlerini vurguladı (Şekil 4.2.1A).

Ayrıca GBM veri seti için, M1A yolunun değiştirilmiş grubunda, viral transkripsiyon, translasyon başlatma, rRNA işleme ve ribozomal alt birim biyogenez BP terimlerinin zenginleştiği görüldü. Değiştirilmemiş gruptakiler ise kimyasal sinaptik iletimi, sinaptik sinyalleşmeyi, ECM organizasyonu, sinaps organizasyonu, glutamat reseptörü sinyal yolunu ve akson rehberliğini BP'lerini içermekteydi (Şekil 4.2.1.A). M1A yolağının LGG veri setindeki değiştirilmiş grup için zenginleştirilmiş terimler, bağ dokusu/kıkırdak gelişimi, beslenme davranışı, hücre farklılaşması, ECM organizasyonu, DNA bağlanması negatif düzenlenmesi iken endopeptidaz aktivitesi ve hücre adezyon molekülleri, morfogenez, biliş, vazokonstriksiyon ve embriyonik regülasyonu BP'leri değiştirilmemiş grupta gözlemlendi (Şekil 4.2.1B).



GBM ve LGG için epitranskriptom yollarındaki genetik değişikliklerden etkilenen süreci daha detaylı incelemek adına her yol için KEGG analizi yapıldı (Şekil 4.2.2). Küçük akciğer kanseri, GBM veri setindeki değiştirilmiş m6A düzenleyici grubu için tek zenginleştirilmiş yol olduğu görüldü. Buna karşın, değiştirilmemiş grupta PD-L1 ekspresyonu ve nöroaktivite ligand-reseptör etkileşim yolları dikkat çekti. Sistemik lupus eritematöz, alkolizm ve nötrofil hücre dışı tuzak oluşumu gibi çeşitli zenginleştirilmiş yollar, GBM veri setindeki değiştirilmiş m5C ve m1A yolak grupları arasında benzer olarak tespit edildi (Şekil 4.2.2.A). Ek olarak, GBM veri setinde sitokin-sitokin reseptörü, hematopoietik hücre soyu, sıtma ve TNF/IL-17/JAK-STAT/AGERAGE sinyal yolları, değiştirilmemiş m5C modifikasyon grubu için zenginleştiği görüldü. m1A modifikasyonunun değiştirilmemiş grubu için ise, ECM reseptör etkileşimi, aldosteron sentezi/salgılaması, glutamaterjik/GABAerjik sinaps ve kalsiyum/oksitosin sinyali terimlerinin zenginleştiği not edildi (Şekil 4.2.2A).

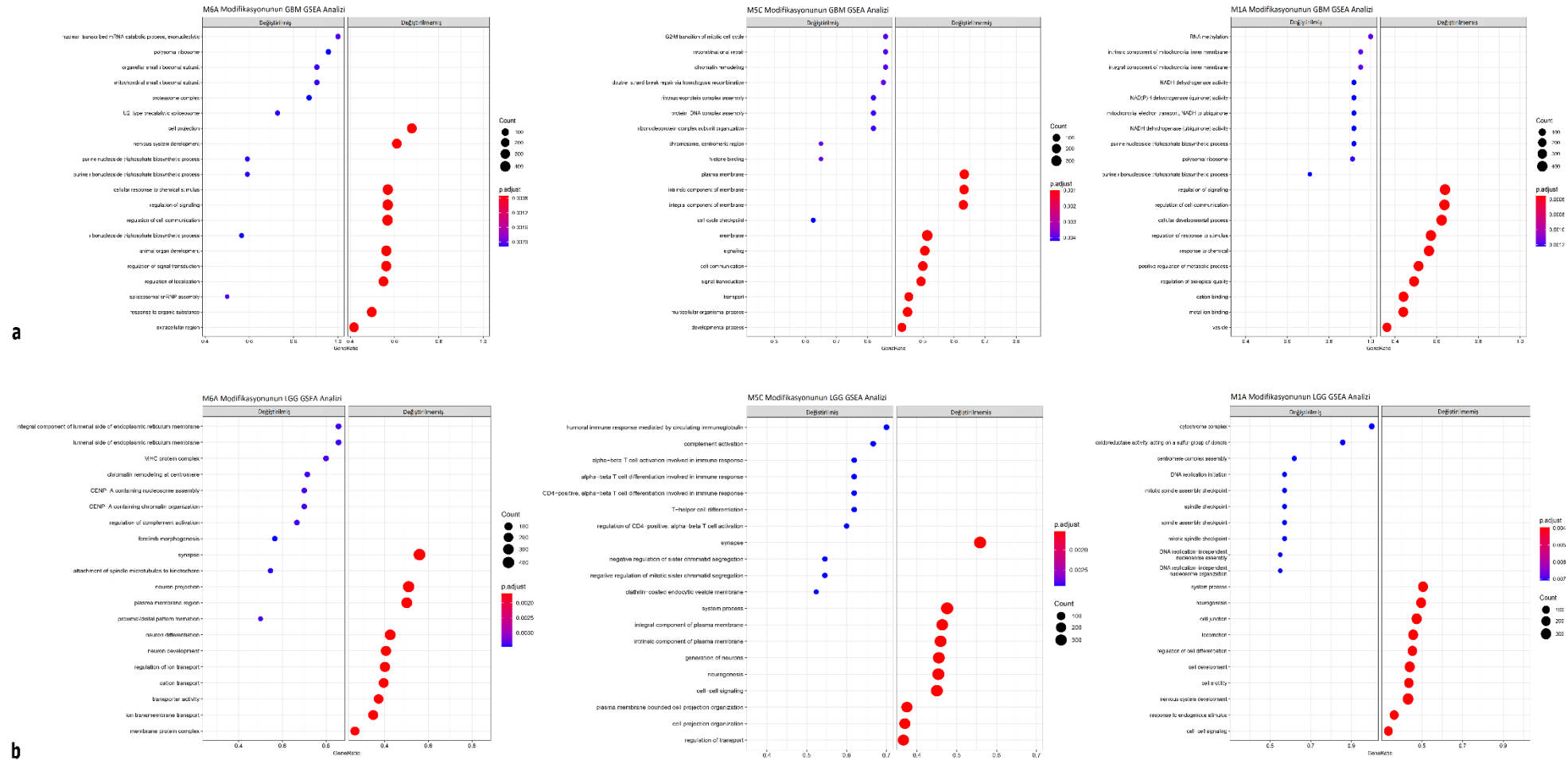
LGG örnekleri için, kanserde transkripsiyonel yanlış düzenleme, protein sindirimi ve absorpsiyonu, T-hücresi lösemi virüsü enfeksiyonu, astım, diyabetik komplikasyonlar, inflamatuvar kese hastalığı, greft-konak hastalığı ve leishmaniasis, değiştirilmiş m6A düzenleyicileri grubunda zenginleştirilmiş KEGG yollarıydı. Zenginleşen protein sindirimi ve emilimi, kanserde proteoglikanlar ve osteoklast farklılaşması KEGG yolları, değiştirilmiş m5C düzenleyicileri grubu için tanımlanandı. Ek olarak, protein sindirimi ve absorpsiyonu, değiştirilmiş m1A düzenleyicileri grubundaki tek zenginleştirilmiş KEGG yolu olarak belirlendi. LGG veri setinde m6A, m5C ve m1A modifikasyonlarının değiştirilmemiş grupları için, nöroaktivite ligand-reseptör etkileşimi, nikotin bağımlılığı, cAMP/kalsiyum sinyal yolu ve insülin salgılanması KEGG yolları benzer olarak elde edilen sonuçlardı (Şekil 4.2.2B).



Şekil 4.2.2. KEGG Analizi

Zenginleşen yolları ve terimleri keşfetmek için son olarak her grup için GSEA analizi yapıldı (Şekil 4.2.3.). GSEA sonuçlarında elde edilen yolların GO ve KEGG yolu zenginleştirme analizleri ile tutarlı olduğu görüldü. GO analizinde belirlenen kimyasal sinaptik iletim, nörotransmitter taşıma ve sinaptik sinyalleşme terimleri ile GSEA sonuçlarında görülen sinyalleşmenin düzenlenmesi, hücre iletişiminin düzenlenmesi terimleri, değiştirilmemiş GBM numune gruplarında dikkate değer örtüşmeler gösterdi. Benzer şekilde, hücre döngüsü ile ilgili zenginleştirilmiş KEGG yolları ile mitotik hücre döngüsünün G2/M geçişi, histon bağlanması terimleri değiştirilmiş GBM grupları için hücre kontrol noktası gibi GSEA terimleriyle paralel olduğu görüldü (Şekil 4.2.3A). Değişmiş LGG grupları için, gelişim, morfogenez ve ön/arka model spesifikasyonu, GO ve GSEA arasında benzer terimler arasında gözlemlendi. Sinaps organizasyonu, taşımanın düzenlenmesi ve hücre-hücre sinyalleşme terimleri, değiştirilmemiş LGG örnek grupları için GO ve GSEA analizinde ortak olarak zenginleştiği görüldü (Şekil 4.2.3.B).

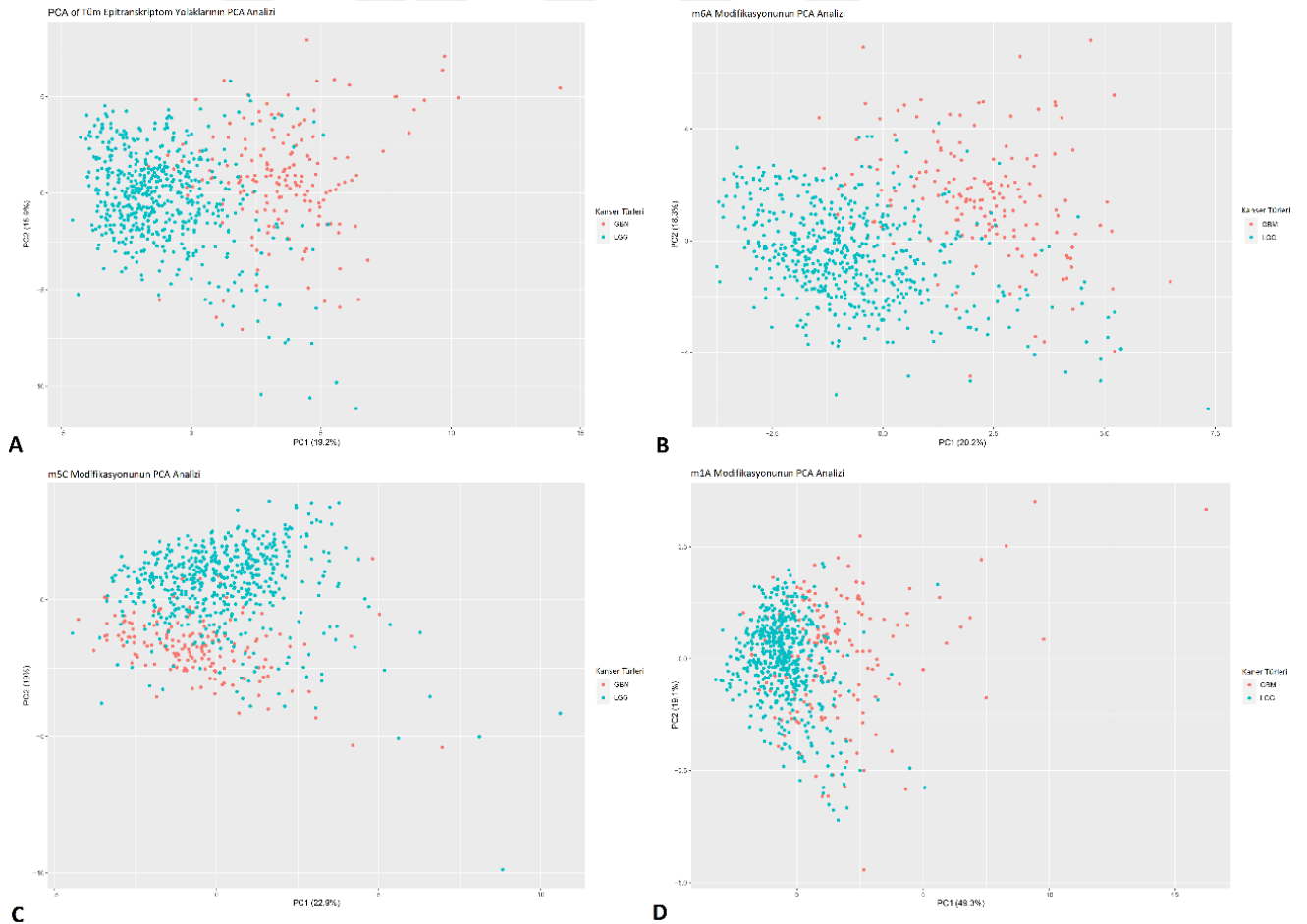
Genel olarak, zenginleştirmelerdeki birkaç ortak unsura rağmen, GBM ve LGG veri kümeleri için m6A, m5C ve m1A yollarındaki genetik değişikliklerin farklı etkileri dikkat çekiciydi.



Şekil 4.2.3. GSEA Analizi

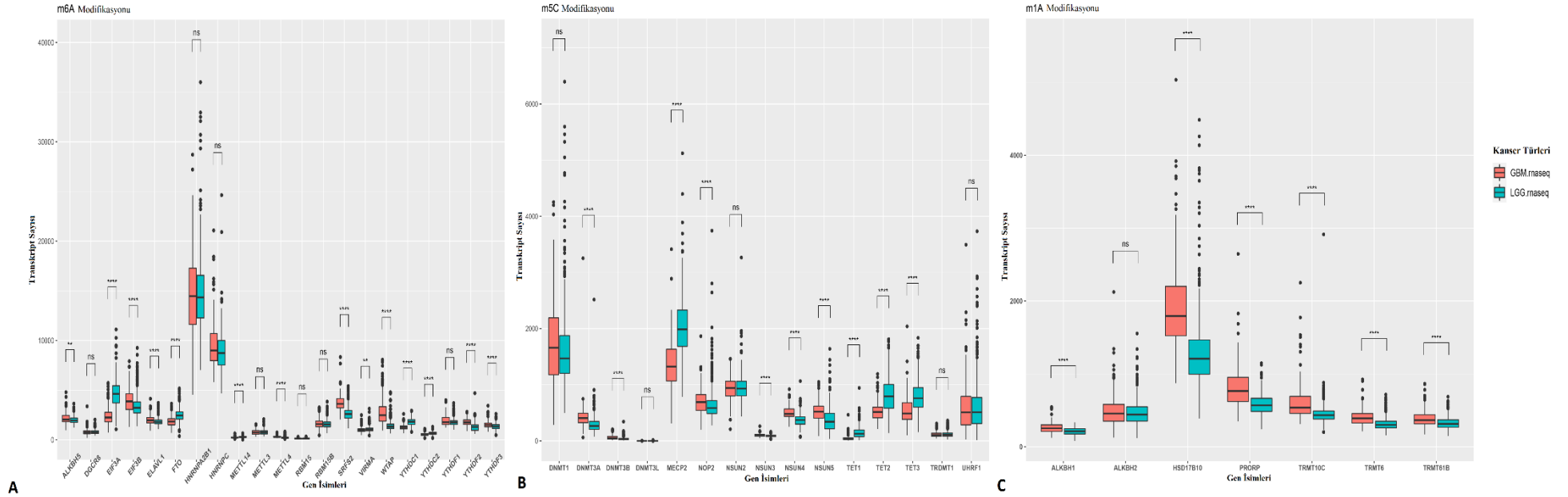
4.3. GBM ve LGG'de İncelenen Genlerin Potansiyel Diagnostik ve Prognostik Değerleri

GBM ve LGG örnekleri arasındaki epitranskriptom yolak düzenleyicilerinin ekspresyon seviyelerinin ayırım gücünü değerlendirmek için PCA analizi gerçekleştirildi. İlk olarak m6A, m5C ve m1A yolak regülatörlerinin birleştirilmesiyle elde edilen 43 genin PCA analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.3.1). LGG ve GBM örnekleri arasında kısmi bir ayırım, ana bileşenlerin yetersiz ayırım gücünün altını çizdi (PC1: %19,2, PC2: %15,9) (Şekil 4.3.1A). Ek olarak, m6A, m5C ve m1A yolaklarının ayırma gücü ayrı ayrı değerlendirildi (Şekil 4.3.1.B-D). GBM ve LGG örneklerinin dağınık dağılımı, m6a için %38,5 (Şekil 4.3.1.B), m5C için %41,9 (Şekil 4.3.1.C) ve m1A için %68,4 (Şekil 4.3.1.C) gibi nispeten düşük PC değerleri gösterdi. GBM ve LGG örnekleri, en ayrı şekilde m1A yolu regülatörleri tarafından kümelendiği not edildi.



Şekil 4.3.1. PCA Analizi

TCGA'dan alınan verilerin 166 GBM ve 530 LGG örneği içerdiği yukarıda belirtilmişti. Bu regülatörlerin RNA ekspresyon seviyelerini her yolak için GBM ve LGG vakalarındaki seviyelerini karşılaştırmak için wilcoxon işaretli sıra testi istatistiksel analiz gerçekleştirildi (Şekil 4.3.2). m6A yolu için, 21 genden 14 genin ekspresyon seviyeleri, LGG ve GBM vakaları arasında istatistiksel olarak önemli ölçüde anlamlı sonuç verdi. ALKBH5, EIF3B, ELAVL1, METTL4, SRFS2, WTAP, YTHDF2 ve YTHDF3 genleri GBM hastalarında yukarı regüle edilirken, EIF3A, FTO, METTL14, VIRMA, YTHDC1 ve YTHDC2 genleri LGG veri setinde yukarı regüle edilmiştir (Şekil 4.3.2.A). m5C modifikasyonunda görevli DNMT3A, DNMT3B, NOP2, NSUN3, NSUN4 ve NSUN5 genleri GBM vakalarında yukarı regüle edilirken ve MECP2, TET1, TET2 ve TET3 genlerinin LGG vakalarında istatistiksel olarak yukarı regüle edildiği tespit edildi (Şekil 4.3.2.B). m1A yolunda, ALKBH1, HSD17B10, PRORP, TRMT10C, TRMT6 ve TRMT61B, GBM hastalarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yukarı regüle edilmiş olarak tanımlandı.



Şekil 4.3.2. GBM ve LGG Vakalarında m6A, m5C ve m1A Regülatörlerinin mRNA Seviyelerinin İstatistiksel Olarak Belirlenmesi

Ardından, regülatörlerin RNA seviyelerinin GBM ve LGG vakalarında diferansiyel olarak farklarını tespit etmek için limma analizi gerçekleştirildi. Limma analizi sonucunda, $|FC| > 1.5$ olan genler diferansiyel olarak farklı eksprese edilen genler olarak seçildi. Sonuç olarak, LGG ve GBM numuneleri arasında m6A yolunda (EIF3a ve WTAP) 2 farklı şekilde eksprese edilmiş gen ve m5C yolunda (DNMT3A, DNMT3B, NSUN5 ve TET1) 4 gen ile sonuçlandı (Tablo 4.3.1).

Tablo 4.3.1. Limma Analiz sonuçları

Genes	LogFC	p Değeri	Modifikasyon
EIF3A	-1.0209E+14	4.0043E-78	m6A
WTAP	0.91213978689173	1.2409E-52	m6A
YTHDC1	-0.5629194278382	7.0639E-66	m6A
METTL4	0.51165364202825	2.2591E-15	m6A
FTO	-0.4998752362495	9.1253E-21	m6A
SRFS2	0.48000622009415	1.0921E-38	m6A
YTHDF2	0.47731064713406	8.5116E-31	m6A
METTL14	-0.2992523089408	5.9197E-01	m6A
YTHDC2	-0.2871776756113	1.3190E+00	m6A
EIF3B	0.16898056054660	1.1442E+08	m6A
YTHDF3	0.15658775649821	1.2214E+07	m6A
VIRMA	-0.1396326375290	1.2853E+08	m6A
METTL3	-0.0958541364026	0.006679619664	m6A
DGCR8	-0.0890538497689	0.005354056264	m6A
HNRNPA2B1	-0.0773019489474	0.000620909897	m6A
ELAVL1	0.07320562155620	0.000466913505	m6A
HNRNPC	0.06603536443369	0.004055891682	m6A
ALKBH5	0.06123882498655	0.045659790139	m6A
RBM15B	-0.0533088149364	0.076944346225	m6A
YTHDF1	0.04943918826647	0.048731236237	m6A
RBM15	0.03885098956347	0.336996916472	m6A
TET1	-1.4965E+13	4.4393E-37	m5C

Tablo 4.3.1. Limma Analiz sonuçları (Devam)

NSUN5	0.777066958522971	2.6770E-07	m5C
DNMT3B	0.7191070039121	3.6356E-18	m5C
DNMT3A	0.668790741672309	7.0833E-35	m5C
NSUN4	0.562280966459744	5.6683E-28	m5C
TET3	-0.499973008916138	7.3823E-19	m5C
TET2	-0.48260006062648	7.4838E-11	m5C
MECP2	-0.481063877278803	1.4810E-26	m5C
NSUN3	0.319472010135492	9.0534E-03	m5C
NOP2	0.275254254331735	1.3901E+02	m5C
DNMT1	0.194687828381806	3.2005E+05	m5C
DNMT3L	0.17605518504205	0.0001863715448931	m5C
UHRF1	0.088879556647636	0.287880322527667	m5C
NSUN2	0.082726583008408	0.0024967184527808	m5C
TRDMT1	0.077350903159578	0.125219897436571	m5C
ALKBH2	-0.310946032740603	2.9509E-03	m1A
TRMT61B	-0.186677244049918	1.0793E+06	m1A
HSD17B10	0.155208988127189	3.2604E+03	m1A
ALKBH1	-0.131548822689105	0.0002846526370283	m1A
TRMT6	-0.052658925485871	0.128642978200648	m1A
PRORP	0.0231116875077859	0.501915320727511	m1A
TRMT10C	0.0181564782498214	0.534763909718379	m1A

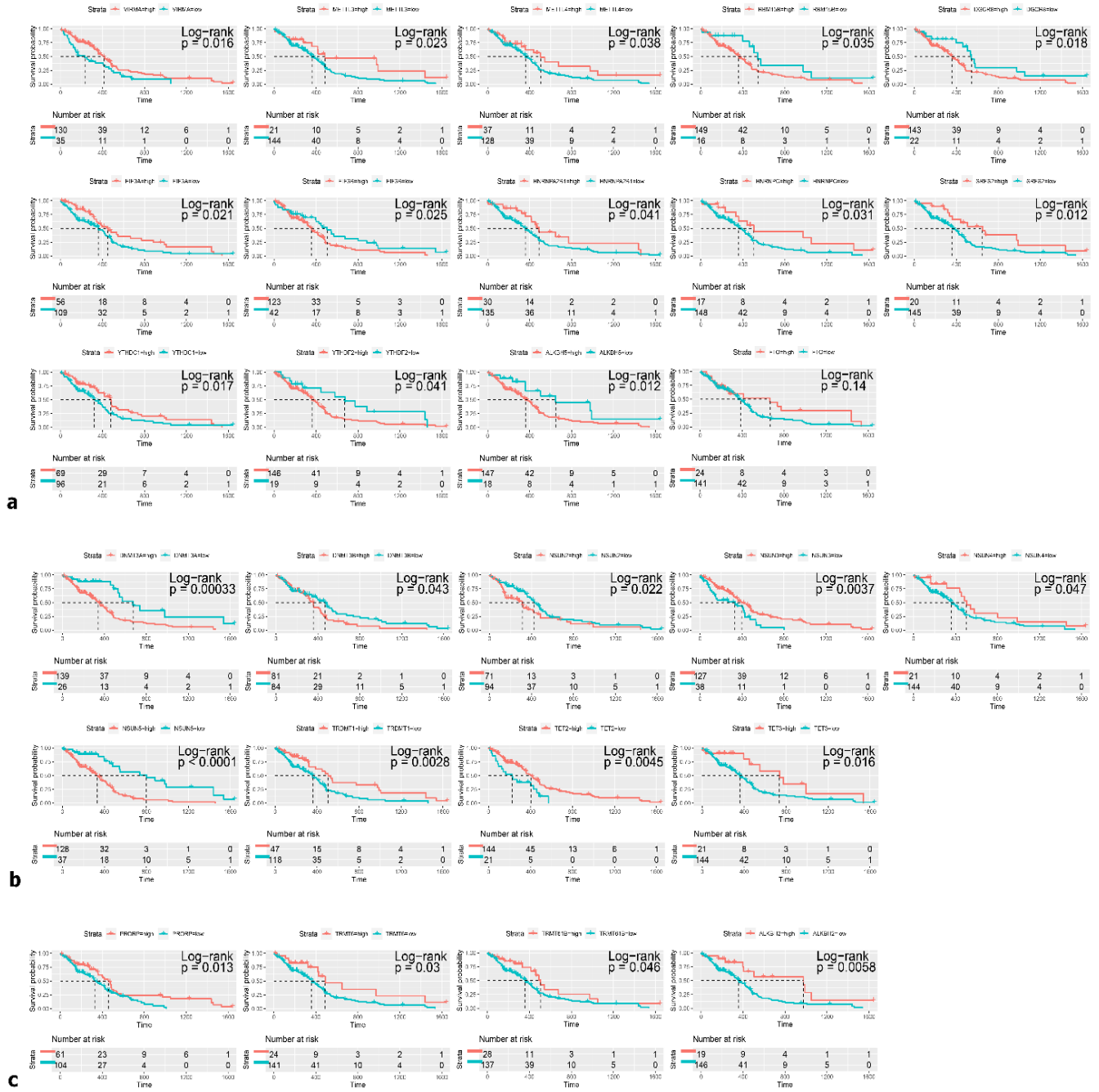
Bir sonraki adım olarak, genel sağ kalım analizi gerçekleştirerek ve Kaplan-Meier tahmin yöntemini kullanarak LGG ve GBM'deki analiz edilen genlerin prognostik değerleri sorgulandı. LGG ve GBM hastalarının mevcut klinik verilerine dayanarak, yüksek veya düşük ekspresyon seviyelerindeki hayatta kalma oranı hesaplandı ve istatistiksel olarak anlamlı genler (p -değeri <0.05) GBM ve LGG vakaları için ayrı ayrı görselleştirildi (Sırasıyla; Şekil 4.3.3 ve Şekil 4.3.4). GBM veri seti için 14 m6A regülatörü, 9 m5C regülatörü ve 4 m1A regülatörünün istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar

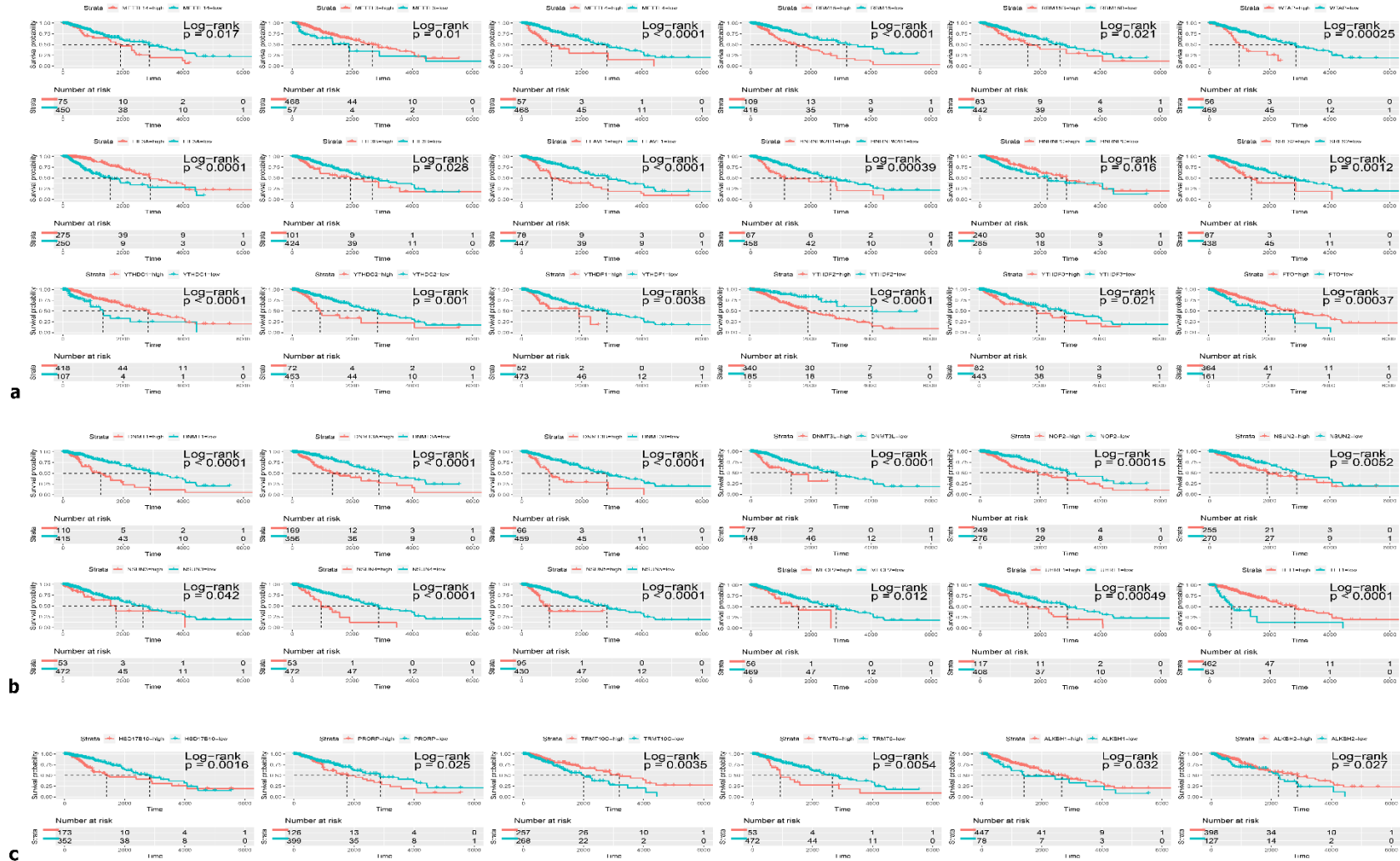
gösterdiği not edildi (Şekil 4.3.3.). Buna karşılık, LGG veri seti için m6A yolunda 18, m5C yolunda 12 ve m1A yolunda 6 gen potansiyel prognostik biyobelirteçler olarak tespit edildi (Şekil 4.3.4.).

VIRMA, METTL3, METTL4, EIF3A, HNRNPA2B1, HNRNPC, SRSF2, YTHDC1, FTO, NSUN3, NSUN4, TRDMT1, TET2, TET3, PRORP, TRMT6, TRMT61B ve ALKBH2 genlerinin yüksek ekspresyonu, GBM hastalarında yaşam süresinin uzamasıyla ilişkili olduğu görüldü. Buna karşılık, düşük RBM15B, DGCR8, EIF3B, YTHDF2, ALKBH5, DNMT3A, DNMT3B, NSUN2 ve NSUN5 ekspresyon seviyelerine sahip hastalarda daha iyi bir genel sağ kalım oranı gözlemlendi (Şekil 4.3.3.). LGG hastaları için METTL3, EIF3A, HNRNPC, YTHDC1, FTO, TET1, TRMT10C, ALKBH1, ALKBH2'nin yüksek ekspresyonu daha uzun sağ kalım ile ilişkilendirildi. Öte yandan METTL14, METTL4, RBM15, RBM15B, WTAP, EIF3B, ELAVL1, HNRNPA2B1, SRSF2, YTHDC2, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMTL3, NOP2, SUN3, SUNMTL3, NOP2, NSUN3, NSUN5, MECP2, UHRF1, HSD17B10, PRORP ve TRMT6 genleri daha iyi prognoz ile korele olduğu görüldü (Şekil 4.3.4.).

METTL3, EIF3A, HNRNPC, YTHDC1 ve ALKBH2 genlerinin yüksek ekspresyon seviyeleri ve RBM15B, EIF3B, YTHDF2, DNMT3A, DNMT3B, NSUN2 ve NSUN5 genlerinin düşük ekspresyon seviyeleri hem GBM hem de LGG hastalarında daha uzun sağ kalım ile ilişkilendirildi. Ters bir eğilim olarak, GBM hastalarında METTL4, HNRNPA2B1, SRSF2, NSUN3, NSUN4, PRORP ve TRMT6 genlerinin yüksek ekspresyonu ve bu genlerin LGG örneklerinde düşük ekspresyonu, hastalıkların daha iyi prognozu ile ilişki olduğu tespit edildi. Ayrıca VIRMA, TRDMT1, TET2, TET3, TRMT61B, DGCR8 ve ALKBH5 genleri GBM'de potansiyel prognostik biyobelirteçler olarak bulunurken LGG'de bulunmadı. Buna karşılık, FTO, TET1, TRMT10C, ALKBH1, METTL14, RBM15, ELAVL1, YTHDC2, YTHDF1, YTHDF3, DNMT1, DNMT3L, NOP2, MECP2, UHRF1, HSD17B10 genleri, LGG prognozunun varsayılan biyobelirteçleri olarak öne çıktı.

Elde edilen sonuçlar, GBM ve LGG'de prognostik biyobelirteçler olarak m6A, m5C ve m1A yolu genlerinin kullanımını güçlü bir şekilde destekledi.

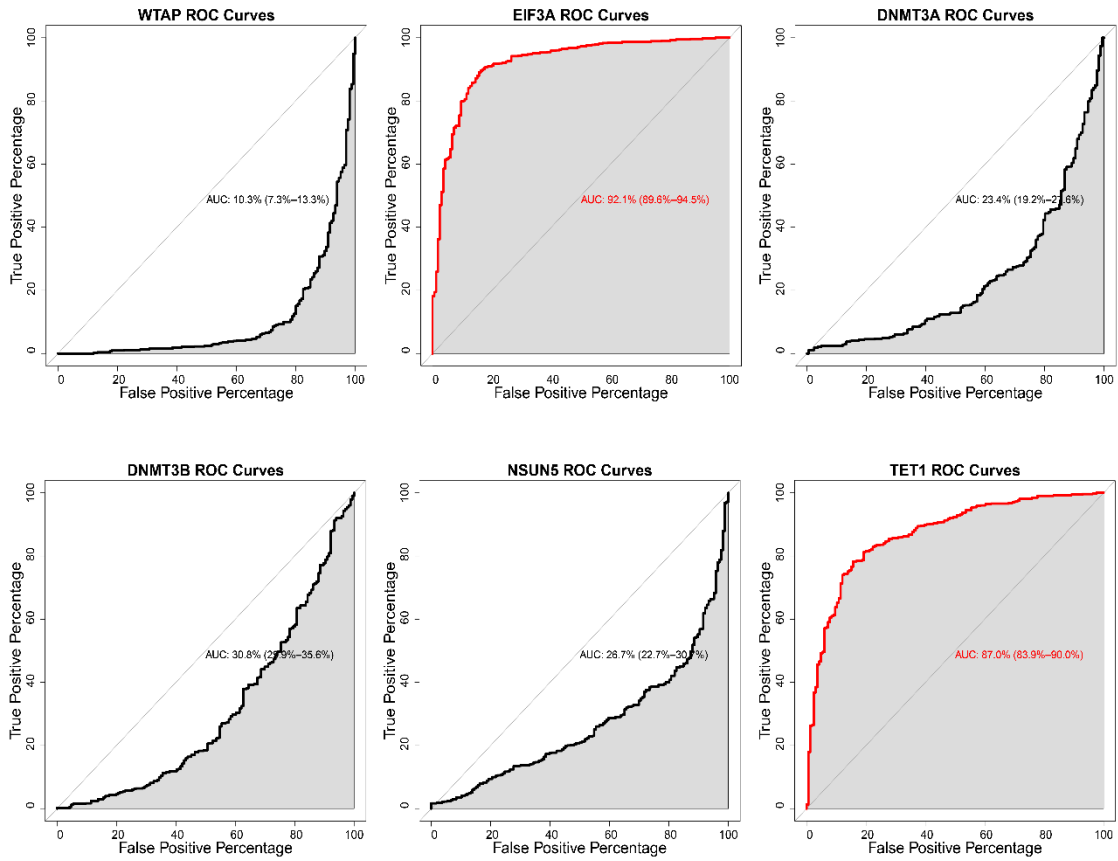




Şekil 4.3.2. LGG vakalarında Regulatorlerin Genel Hayatta Kalma Analiz

4.4. Aday Biyobelirteç Genleri Değerlendirmek için ROC Analizi

Tanımlanan genlerin diagnostik değeri hakkında daha fazla kanıt sağlamak için, istatistiksel olarak anlamlı diferansiyel olarak farklı eksprese olan genler ve genel hayatta kalma analizinde ortak olarak bulunan altı gen (WTAP, EIF3A, DNMT3A, DNMT3B, NSUN5 ve TET1) için ROC analizi yapıldı. 6 genin tanısal değerinin tahmin doğruluğu, ROC eğrisi altında kalan alan %95 güven aralığı (CI) ile hesaplanarak değerlendirildi (Şekil 4.4.1). EIF3A ve TET1 genleri, sırasıyla 0.9208 ve 0.8695 AUC değerleri ile tanısal bir biyobelirteç olarak kullanılmak üzere yüksek potansiyel sergiledi (Şekil 4.4.1).



Şekil 4.4.1. ROC Analizi

TARTIŞMA

GBM, kötü prognoz ve yüksek agresiflik ile karakterize bir derece IV gliomadır (Iacob ve Dinca 2009). Diğer bir merkezi sinir sistemi kanseri olan LGG, daha iyi bir prognoz sergileyen derece I, II ve III gliomlar grubudur (Wijnenga, French, Dubbink, Dinjens ve van den Bent, 2018). Bununla birlikte, çalışmalar, LGG'li hastalarda tanıdan sonraki 5-10 yıl içinde GBM geliştirme riski olduğunu bildirmiştir (Pouratian ve Schiff, 2010). Bu nedenle, kapsamlı bir hesaplama analizi yaparak GBM ve LGG'nin ilerlemesinin altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmak, mevcut merkezi sinir sistemi kanserleri anlayışımızı genişletmek için çok önemlidir. Bu doğrultuda kanser patogeneğinde epitranskriptom yolaklarındaki değişiklikleri açıklamaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır (Han ve Choe, 2021; Lian, Wang, Zhu, Ma ve Jin, 2018). Bu çalışma, GBM ve LGG veri kümelerinde m6A, m5C ve m1A epitranscriptome yolaklarının ayrıntılı bir araştırmasını sunar.

Bu çalışmada ilk olarak sırasıyla amplifikasyon, mutasyon ve deep delesyon olarak saptanan m6A, m5C ve m1A yolağı regülatörleri için farklı agresiflik düzeylerinde bulunan gliomaların mutasyon tipleri ve frekansları incelenmiştir. m5C modifikasyonunun regülatörlerinde en yüksek değişim sıklığının görülmesi, bir başka kayda değer bulguydu. Ek olarak, ilgili tüm epitranskriptom yolak genlerinde meydana gelen mutasyonlar ele alındığında, evre II gliomaların (ACT, OA, DG ve OD) diğer seviyelerdeki gliomalardan daha çok mutasyona uğradığı saptandı (Şekil 4.1.5). Sonuçlarımız, GBM ve LGG örnekleri için m6A, m5C ve m1A düzenleyicilerinde yüksek oranda genetik değişiklik olduğunu vurgulayarak önceki çalışmaları doğruladı (Anita, Paramasivam, Priyadharsini ve Chitra, 2020). Artan epitranskriptom çalışmaları, m6A, m5C ve m1A epitranskriptom yolak regülatör genlerin anormal ekspresyon seviyelerinin kanser hücrelerinin prognoz, metastaz ve proliferasyon gibi kritik proseslerle yakından ilişkili olduğu vurgulamıştır (Liu, Ouyang, Zhan, Yin, Liu, Tan ve Yin, 2022; Wu, Chen, Liu, Tang ve Zhou, 2021). Bu bağlamda çalışmamızda, m6A, m5C ve m1A yolakların regülatörler genlerinde saptanan değişik mutasyon frekansları, farklı evrelerdeki gliomalar ile ilişkilendirilebileceği düşünüldü.

GBM ve LGG veri setlerinde mutasyon tiplerinin yanı sıra mRNA ekspresyon seviyelerini de dahil ettik. Analizde mRNA ekspresyon seviyeleri dikkate alındığında tüm genlerin genetik değişiklik frekansları arttığı not edildi (Şekil 4.1.6.). Bu nedenle, genetik değişikliklerin önemli katkılarından biri olarak m6A, m5C ve m1A modifikasyon regülatörlerinin mRNA seviyelerine odaklandık. Bu analizde sadece pan-cancer veri setlerini içerdi ve sonucunda, m5C regülatörlerinin diğer iki yolağa göre daha yüksek alterasyon frekansına sahip olduğu görüldü. Asıl ilginç olan, analize mRNA ekspresyon seviyeleri dahil edildiğinde tüm genlerin frekanslarının hem GBM hem LGG örneklerinde artmasının yanı sıra, tüm regülatör genlerin arasında DNMT3L geninde görülen yükselmenin GBM vakalarında 0.4%'den 85%'e fırlaması oldu (Şekil 4.1.6.). DNMT3L (DNA metil transferaz 3 benzeri) geni m5C yolağının bir üyesidir ve yazıcı proteinler arasında yer alır. Metil transferazlar DNA, RNA ve protein gibi moleküllere metil grubunu katalizleme özelliğine sahip proteinlerdir. Bunlardan DNMT3 ailesi ek olarak de novo metil gruplarını da ekleyebilmektedir, fakat DNMT3L katalitik olarak aktive olmadığı için tek başına de novo metilasyon gerçekleştirememektedir (Tzelepi, Logotheti, Efstathiou, Troncoso, Aparicio, Sakellakis ve Zolota, 2020). Daha önceki kanser çalışmalarında, DNMT3L geninin ekspresyon seviyesinin, tümör evresine ve agresifliğiyle doğru orantılı olarak arttığı rapor etmişti (Subramaniam, Thombre, Dhar ve Anant, 2014; Tzelepi, Logotheti, Efstathiou, Troncoso, Aparicio, Sakellakis ve Zolota, 2020; Yang, Wu, Zhang, Sun, Li ve Huang, 2019). Literatürde bulunan bulgular ışığında, Şekil 4.3.4.'te görselleştirilen hayatta kalma analizlerimiz ile örtüştüğü, fakat Şekil 4.1.6.'da şematize edildiği üzere GBM vakalarında DNMT3L geninin düşük seviye ekspresyonun görülmesi ile çakıştığı söylenebilir. Ek olarak, Şekil 4.3.2'de DNMT3L geninin GBM ve LGG örneklerinde karşılaştırılmasının sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir çıkmadığının altı çizmekte fayda var. DNMT3L geninin GBM'de görülen düşük ekspresyon seviyesi, analizde kullanılan pan-cancer data setinden kaynaklı olabileceği ya da DNMT3L geninin ilişkili olduğu farklı gen grupları olabileceğini düşündürdü. Sonuçlar doğrultusunda, DNMT3L geninin gliomalarda farklı bir yol izliyor olma ihtimalinin olabileceği düşünüldü.

Bir adım daha atarak, m6A, m5C ve m1A regülatörlerinin hücredeki hangi prosesleri etkilediğini detaylı araştırmak adına, GO, KEGG ve GSEA analizleri gerçekleştirildi. Üzerinde çalıştığımız GBM ve LGG veri setlerinin transkriptomik

verileri cBioportaldan ekstrakte edildi ve detaylı inceleme için değiştirilmiş ve değiştirilmemiş olarak 2 gruba ayrıldı. İlginç bir şekilde, sonuçlarımız, GBM örneklerinde bu 3 yolağın değiştirilmiş ve değiştirilmemiş grupları dahil olmak üzere, birbirlerinden farklı biyolojik prosesleri etkilediği gösterdi (Şekil4.2.1). Bu sonuçlar, GO, KEGG ve GSEA analizlerinde de benzerdi (Şekil4.2.2., Şekil4.2.3.). Kısa bir örnek olarak, GBM veri setinde embriyonik morfogenez ve embriyonik gelişim GO terimleri m6A değiştirilmiş gruplarında zenginleşti. Buna karşın, m6A'nın değiştirilmemiş grubunda, nörotransmitter ve iyon transport terimleri, m5C'nin değiştirilmemiş grubu ECM organizasyonu ve immün yanıt terimleri, m1A'nın değiştirilmemiş grubunda rRNA prosesi ve ribozomal altbirim biyogenezi terimleri zenginleşti (Şekil4.2.1.). m6A, m5C ve m1A yolaklarının gliomalarda farklı prosesleri etkiledikleri bulgumuz, yapılan önceki çalışmalarla tutarlı olduğu görüldü (Guan, He, Su ve Zhou, 2021; Sun, Gong, Shang, Chen ve Hu, 2021; Wang, Wu, Tu, Tao, Hu, Li ve Huang, 2020). Dahası, LGG veri setinde, m6A ve m5C yolaklarının GO zenginleştirme analizinde benzerliği şaşırtıcıydı. Literatürde yer alan önceki çalışmalar LGG örneklerinde, m6A yolağı için, ECM organizasyonu, hücre adezyonu, iyon kanalları aktivitesi ve nörotransmitter aktivite terimlerinin GO analizlerinde zenginleştiğini rapor etmiş (Ma, Liu, Zhang, Ning ve Qu, 2021, Zheng, Wang, Qiu, Wang, Yu, Zhou ve Jiang, 2021). Bununla birlikte TCGA ve CGGA veri tabanlarından toplanan LGG örnekleriyle gerçekleştirilen bir çalışma, GO analizi sonucunda T hücre aktivasyonu, lökosit migrasyonu ve hücre-hücre adezyon terimlerinin m5C yolağında zenginleştiğini rapor etti (Li ve Meng, 2021). Çalışmamızda, LGG verilerinin GO zenginleştirme analiz sonuçlarının önceki çalışmalar ile, m6A ve m5C yolaklarında ortak olan nörotransmitter aktivite, ECM organizasyonu ve kimyasal sinaptik aktarımı terimleri ile örtüştüğü, aksine kavrama, embriyonik gelişim ve embriyonik morfogenez terimleri ile uyumlu olmadığı görüldü. Bunlara ek olarak zenginleştirme analizlerimiz, m1A yolağının genel olarak rRNA bağlanması, ribosom, cAMP sinyali ve glutamatergic sinyali gibi hücrenin temel biyolojik prosesleriyle ilişkilendiğini gösterdi. Sun ve arkadaşlarının, m1A RNA metilasyonunun gliomaların malignitesine katkıda bulunduğunu gösteren bir çalışmasının sonuçları, çalışmamızda m1A yolağı için gerçekleştirdiğimiz GO, KEGG ve GSEA zenginleştirme sonuçlarımızla örtüştü (Sun, Gong, Shang, Chen ve Hu, 2021). Genel olarak, m6A, m5C ve m1A yolaklarının zenginleştirme analizleri için, çeşitli sinyal yolakları (glutamatergic, GABAergic, cAMP, Kalsiyum, IL-17, Jak-stat, TNF sinyali), sitokin-sitokin etkileşimleri ve sekresyon ile ilişkili mekanizmaları değiştirilmemiş gruplarda, hücre adezyonu,

morfogenez, büyüme ve hücre döngüsü ile ilişkili prosesleri değiştirilmiş gruplarda zenginleştiği görüldü. İlginç olarak, m6A yolak KEGG analizlerinde Astım, Leishmaniasis, graft-host hastalığı ve inflamatuvar bağırsak rahatsızlığı gibi hastalıkların zenginleşmesi dikkat çekti (Şekil4.2.2.). m6A modifikasyonu ile yumurtalık kanseri arasında ki ilişkinin araştırıldığı yakın tarihli bir çalışma, bulgularımızı destekler nitelikte olarak, m6A yolağında graft-host hastalığı, allogreft uyumsuzluğu ve astım hastalıklarının zenginleştiğini rapor etti (Zhang, Liu, Guo, Hong, Ji ve Ren, 2021).

Çalışmanın bir sonraki basamağında, GBM ve LGG örneklerinde m6A, m5C ve m1A yolak regülatör genlerinin diagnostik değerlerini belirlemek için gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. Uygulanan karşılaştırmalı analiz sonucunda, m6A, m5C ve m1A yolaklarında görev alan genlerin çoğu, (ilgili 3 yolakta bulunan toplam 43 genden 30'u) ekspresyon seviyesi GBM ve LGG örneklerinde kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı değerlere sahip olduğu görüldü (Şekil 4.3.2.). Daha önce farklı glioma veri setlerinde gerçekleştirilen analizler genel olarak bu regülatör genlerin ekspresyon seviyelerinin yukarı regüle olduğunu bildirmişti (Chai, Wu, Wang, Zhang, Liu ve Kang, 2019, Li ve Meng, 2021, Sun, Gong, Shang, Chen ve Hu, 2021). Literatürdeki sonuçlar ile birlikte, bulgularımız GBM ve LGG'de m6A, m5C ve m1A regülatör genlerinin çoğu için diagnostik değer taşıdığını iddia etmektedir.

M6A, m5C ve m1A modifikasyon regülatör genlerin, prognostik değerlerini açığa kavuşturmak için genel hayatta kalma analizi yapıldı. Sonuçlarımız hem LGG vakalarında hem de GBM vakalarında, ilgili regülatör genlerin büyük çoğunluğu için istatistiksel olarak anlamlı değerler göstererek, prognostik değerlerinin de güçlü olabileceğini öne sürdü (Şekil 4.3.3. ve Şekil 4.3.4.). Genel hayatta kalma analizi sonucunda, LGG vakalarında GBM örneklerine göre daha çok m6A, m5C ve m1A regülatörlerinin anlamlı çıktığının altını çizmek gerekte fayda var. Sonuçlarımız, m6A, m5C ve m1A yolaklarının LGG de daha çok mutasyona uğraması ve daha fazla genin genel hayatta kalma analizinin istatistiksel olarak anlamlı değere sahip olmasını, bu yolakların glioma vakalarında agresiflik ve prognoz seyrinde kritik rol üstlenebileceğinin önemini vurguladı. Buna birlikte araştırmamız detaylandırıldığında, sadece 6 genin (EIF3A, WTAP, DNMT3A, DNMT3B, NSUN5, TEET1) diferansiyel olarak eksprese olduğu belirlendi (Tablo 4.3.1.). Bu 6 genin hayatta kalma analizleri göz önüne alındığında, GBM vakalarında TET1 ve WTAP genleri hariç diğer 4 genin istatistiksel

olarak anlamlı sonuçları olduğu görüldü. İlginç olarak, GBM vakalarında sadece EIF3A geni low ekspresyon seviyelerinin uzun yaşam süresi ile ilişkilendirildi. LGG vakalarında, diferansiyel olarak eksprese olan 6 genin istatistiksel olarak anlamlı değerlere sahip oldu başka bir ilgi çekici buldu oldu. Dahası, sadece EIF3A ve TET1 genleri LGG’de yüksek ekspresyon seviyeleri uzun yaşam süresi ile ilişkilendirildi (Şekil 4.3.2.).

Ökaryotik başlama faktörü 3A (EIF3A) geni, küçük ve büyük ribozom altbirimlerinin birleşmesinde rol oynayan, translasyonun başlamasında görevli ökaryotik bir gendir (Yin, Shen, Dong, Huang, Zhong, Feng ve Liu, 2011). Daha önce akciğer kanseri ve yumurtalık kanseri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar, EIF3A geninin yüksek ekspresyonunun, kanserin tedavisinde kullanılan ajanlara gösterdiği direnci azalttığını bildirdi (Zhang, Yu, Tian, Li ve Liu, 2015). Dahası EIF3A ve diğer EIF3 alt birimlerinin aşırı ekspresyonu kanser hücrelerinin malignitesi ile pozitif korelasyon gösterdiğini bildiren çalışmalar da literatürde yer almaktadır (Qi, Dong, Liu ve Zhang, 2014, Hershey, 2015). İlginç bir şekilde, Chai ve arkadaşlarının, gliomlar üzerinde gerçekleştirdiği bir çalışmada, EIF3A geninin ekspresyon seviyesinin WHO glioma seviyeleri ile negatif korelasyon gösterdiğini bildirmiştir (Chai, Wang, Chang, Zhang, Li, Niu ve Wang, 2019). Literatürde EIF3A geni ile ilgi gerçekleştirilen çalışmalar, EIF3A regülatörü ile bulgularımızı ve hipotezimizi destekler nitelikte olduğu görüldü.

TET Metilsitozin Dioksijenaz 1 (TET) ailesi, metilsitozin deoksijenaz aktiviteye sahip m5C yolağının silici proteinleridir. Nükleik asitlere eklenmiş 5mc (5-methylcytosine) gruplarını hm5c (5-hydroxymethylcytosine)’ye dönüştürerek demetilasyonu sağlar. Bu sayede gen regülasyonunda önemli bir rol üstlenir. Ek olarak Hsu ve arkadaşları fareler üzerinde gerçekleştirdikleri bir deneyde TET1 geninin susturulmasının, kanserin invazyonunu ve proliferasyonunu arttırdığını bildirmişti (Hsu, Peng, Kang, Chen, Yang, Tsai ve Juan, 2012). Dahası, Neri ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada TET1 geninin yüksek ekspresyonunun tümör supresör görevi gördüğünü bildirdi (Neri, Dettori, Incarnato, Krepelova, Rapelli, Maldotti ve Oliviero, 2015).

Literatürde bulunan çalışmaların epitranskriptom regülatörlerinin farklı kanserde önemli rol oynadığının desteklemesi ile, çalışmamızda diferansiyel olarak eksprese olan 6 genin biyobelirteç potansiyellerini yüksek olduğunu hipotezimizi test ettik. Bu amaç

doğrultusunda, 6 genin ROC eğrisi analizini gerçekleştirdik. Literatür ile uyumlu olarak EIF3A ve TET1 geninin AUC değerleri (sırasıyla %92 ve %87) oldukça yüksek değerler gösterdi (Şekil 4.4.1.). Çalışmamız, GBM ve LGG örnekleri arasında biyobelirteç olarak kullanılabilecek genleri, güçlü sonuçlar ve literatür ile uyumlu olarak ortaya koymaktadır. Fu ve arkadaşları, gliomada TET1 geninin otofajiyi regüle ederek tümör supresor olarak rol aldığını bildirmişti (Fu, Ding, Luo, Yu, Li, D, Li ve Guo, 2017). Aynı zamanda, gliomalarda TET1 genin ekspresyon seviyesinin WHO'nun yayınladığı kanser evreli ile negatif kolerasyon gösterdiğini söylemektedir ve hipotezimizi destekler niteliktedir.

Özetle çalışmamız, GBM ve LGG vakalarında m6A, m5C ve m1A epitranskriptom yollarının oldukça önemli bir ol üstlendiklerini belirlemiştir. Dahası, TET1 ve EIF3a genlerinin, gliomada yeni bir terapötik yaklaşımı temsil edebileceğinin altınız çizmiştir.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Epitranskriptom perspektifinin gliomalarda incelenmesi ve GBM'in karmaşık mekanizmasının aydınlatılması önem arz eden bir konudur. Çalışmamızda, m6A, m5C ve m1A modifikasyonlarının gliomadaki rolüne değinerek GBM'in epitranskriptom yolakları ile ilişkisi açıklamayı hedefledik. Sonuç olarak çalışmamızda, m6A, m5C ve m1A modifikasyon regülatörlerinin gliomalarda önemli roller üstlendiği ve hücre içerisinde farklı yolları etkilediğini belirttik. M6A, m5C ve m1A epitranskriptom regülatörlerinin GBM ve LGG vakalarında farklı seviyelerde eksprese edildiğini ve hastaların hayatta kalma süreleri ile güçlü bir ilişkisinin olduğunu vurguladık. Dahası, EIF3A ve TET1 Genlerinin güçlü prognostik ve diagnostik değerler gösterdiğini belirledik. Literatürdeki bilgilerin hipotezimizi desteklemesi ile birlikte, çalışmamız EIF3A ve TET1 genlerinin gliomalarda kullanılabilecek yeni aday biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.

6.2. Öneriler

Epitranskriptom ve kanser çalışmaları günden güne artmakta ve epitranskriptom mekanizmalarının etkili bir terapötik yöntem olabileceği gündemdedir. Literatürde gliomalar üzerinde gerçekleştirilen epitranskrpitom çalışmaları bulunmasına rağmen m6A, m5C ve m1A modifikasyonlarının tümünün genel olarak GBM ve LGG vakalarında karşılaştırmalı değerlendirildiği çalışma sayısı azdır. Bu tür karşılaştırmalı çalışmaların GBM'min karmaşık mekanizmasını açıklamada oldukça faydalı olacağının altı çizilmelidir. Aynı zamanda gliomlar, merkezi sinir sisteminde yer alan beyin tümörü olmasından ötürü, çalışmalar için örnek elde etme kısıtlamaları bulunmaktadır. Bu nedenle gliomalar üzerine gerçekleştirilecek çalışmaların güvenilirliğini arttırmak açısından örnek sayılarının arttırılması önem arz etmektedir.

Çalışmamız m6A, m5C ve m1A modifikasyon regülatörleri için güçlü roller önermektedir. Ayrıca, in siliko ortamda bulduğumuz sonuçların, in vitro ya da in vivo ortamlarda test edilmesi bulgularımızın güvenilirliğini arttırabilir ve GBM mekanizmasını epitranskriptom perspektifinden daha açık bir şekilde açıklamaya katkıda

bulunabilir. Ek olarak, DNMT3L geninin mRNA seviyesinin GBM örneklerinde %85 orana çıkmasını çalışmamız net bir şekilde açıklayamamaktadır, bu doğrultuda DNMT3L geninin GBM örneklerinde üstlendiği rolün daha iyi gün yüzüne çıkarabilmek için ilişki içerisinde olduğu gen ve yollarını aydınlatma ya da farklı glioma çalışmalarını analize dahil etmeleri önerilebilir. Ek olarak çalışmamız, EIF3A ve TET1 genleri için aday biyobelirteç olduğunu vurgulamaktadır. Bu bağlamda, gelecek çalışmalara, gliomalarda EIF3A ve TET1 genini, in vivo ve in vitro araştırmalarda yer verilmesi ve GBM vakaları için geliştirilecek yeni terapötik yaklaşımlarda kullanılmaları şiddetle önerilebilir.



KAYNAKLAR

- Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK ve Bigner DD (2009). Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert opinion on investigational drugs*, 18(8), 1061-1083.
- Anita R, Paramasivam A, Priyadharsini JV ve Chitra S (2020). The m6A readers YTHDF1 and YTHDF3 aberrations associated with metastasis and predict poor prognosis in breast cancer patients. *American journal of cancer research*, 10(8), 2546.
- Attwood TK ve Miller CJ (2002). Progress in bioinformatics and the importance of being earnest.
- Baxevanis AD ve Bateman A (2015). The importance of biological databases in biological discovery. *Current protocols in bioinformatics*, 50(1), 1-1.
- Bishop KS ve Ferguson LR (2015). The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. *Nutrients*, 7(2), 922-947. doi: 10.3390/nu7020922
- Biswas S ve Rao CM (2017). Epigenetics in cancer: fundamentals and beyond. *Pharmacology & Therapeutics*, 173, 118-134 DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.011
- Cerami, E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, ... ve Schultz N (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery*, 2(5), 401-404.
- Chai RC, Wang N, Chang YZ, Zhang KN, Li JJ, Niu JJ, ... ve Wang YZ (2019). Systematically profiling the expression of eIF3 subunits in glioma reveals the expression of eIF3i has prognostic value in IDH-mutant lower grade glioma. *Cancer Cell International*, 19(1), 1-13.
- Chai RC, Wu F, Wang QX, Zhang S, Zhang KN, Liu YQ, ... ve Kang CS (2019). m6A RNA methylation regulators contribute to malignant progression and have clinical prognostic impact in gliomas. *Aging (Albany NY)*, 11(4), 1204.

- Cheng Y, He C, Wang M, Ma X, Mo F, Yang S, ... ve Wei X (2019). Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal transduction and targeted therapy*, 4(1), 1-39.
- Chiang JH, Cheng WS, Hood L, ve Tian, Q. (2014). An epigenetic biomarker panel for glioblastoma multiforme personalized medicine through DNA methylation analysis of human embryonic stem cell-like signature. *Omics : a journal of integrative biology*, 18(5), 310–323. <https://doi.org/10.1089/omi.2013.0084>
- Claus EB, Walsh, KM, Wiencke JK, Molinaro AM, Wiemels JL, Schildkraut JM, Bondy ML, Berger M, Jenkins R, ve Wrensch M (2015). Survival and low-grade glioma: the emergence of genetic information. *Neurosurgical focus*, 38(1), E6. <https://doi.org/10.3171/2014.10.FOCUS12367>
- Cui QI, Shi H, Ye P, Li L, Qu Q, Sun G, ... ve Shi Y (2017). m6A RNA methylation regulates the self-renewal and tumorigenesis of glioblastoma stem cells. *Cell reports*, 18(11), 2622-2634.
- Dong Z ve Cui H (2020). The emerging roles of RNA modifications in glioblastoma. *Cancers*, 12(3), 736.
- Duruiseaux M ve Esteller M (2018, August). Lung cancer epigenetics: from knowledge to applications. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 51, pp. 116-128). Academic Press.
- Ellsworth DL ve Manolio TA (1999). The emerging importance of genetics in epidemiologic research III. Bioinformatics and statistical genetic methods. *Annals of epidemiology*, 9(4), 207-224.
- Feasel MG (2017). *The use of in vitro and in silico technologies for predicting human pharmacology and toxicology of carfentanil* (Doctoral dissertation, University of Maryland, Baltimore).
- Fu R, Ding Y, Luo J, Yu L, Li CL, Li DS, ve Guo SW (2017). TET1 exerts its tumour suppressor function by regulating autophagy in glioma cells. *Bioscience reports*, 37(6).

- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, ... ve Schultz N (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling*, 6(269), pl1-pl1.
- Gentleman R (2008). *R programming for bioinformatics*. Chapman and Hall/CRC.
- Gillette TG ve Hill JA (2015). Readers, writers, and erasers: chromatin as the whiteboard of heart disease. *Circulation research*, 116(7), 1245–1253. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303630>
- Guan S, He Y, Su Y ve Zhou L (2021). A Risk Signature Consisting of Eight m6A Methylation Regulators Predicts the Prognosis of Glioma. *Cellular and molecular neurobiology*, 1-11.
- Han SH, ve Choe J (2021). Deciphering the molecular mechanisms of epitranscriptome regulation in cancer. *BMB reports*, 54(2), 89.
- Heard E ve Martienssen RA (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell*, 157(1), 95–109.
- He Y, Yu X, Zhang M ve Guo W (2021). Pan-cancer analysis of m5C regulator genes reveals consistent epigenetic landscape changes in multiple cancers. *World Journal of Surgical Oncology*, 19(1), 1-12.
- Herbert KG, Spirollari J, Wang JT, Wang JT, Piel WH, Westbrook J, ... ve Wu CH (2007). Bioinformatic databases. *Wiley Encyclopedia of Computer Science and Engineering*.
- Hershey JW (2015). The role of eIF3 and its individual subunits in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7), 792-800.
- Hsu CH, Peng KL, Kang ML, Chen YR, Yang YC, Tsai CH, ... ve Juan LJ (2012). TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Cell reports*, 2(3), 568-579.
- Huerta M, Downing G, Haseltine F, Seto B ve Liu Y (2000). NIH working definition of bioinformatics and computational biology. *US National Institute of Health*, 1-1.

- Huang B, Zhang H, Gu L, Ye B, Jian Z, Stary C ve Xiong X (2017). Advances in Immunotherapy for Glioblastoma Multiforme. *Journal of immunology research*, 2017, 3597613. <https://doi.org/10.1155/2017/3597613>
- Indraccolo S, Lombardi G, Fassan M, Pasqualini L, Giunco S, Marcato R, Gasparini A, Candiott C, Nalio S, Fiduccia P, Fanelli, GN, Pambuku A, Della Puppa A, D'Avella D, Bonaldi L, Gardiman MP, Bertorelle R, De Rossi A, ve Zagonel V (2019). Genetic, Epigenetic, and Immunologic Profiling of MMR-Deficient Relapsed Glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 25(6), 1828–1837. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1892>
- Iacob G, ve Dinca EB (2009). Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *Journal of medicine and life*, 2(4), 386–393.
- Jiang T, Mao Y, Ma W, Mao Q, You Y, Yang X, ... ve Chinese Glioma Cooperative Group (CGCG) (2016). CGCG clinical practice guidelines for the management of adult diffuse gliomas. *Cancer letters*, 375(2), 263-273.
- Jung G, Hernández-Illán E, Moreir L vd. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17, 111–130 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0230-y>
- Kassambara A, Kosinski M, Biecek P ve Fabian S (2017). Package ‘survminer’. *Drawing Survival Curves using ‘ggplot2’(R package version 03 1)*.
- Kitange GJ, Templeton KL, ve Jenkins RB (2003). Recent advances in the molecular genetics of primary gliomas. *Current opinion in oncology*, 15(3), 197–203. <https://doi.org/10.1097/00001622-200305000-00003>
- Lapointe, S., Perry, A., & Butowski, N. A. (2018). Primary brain tumours in adults. *The Lancet*, 392(10145), 432-446.
- Kennecke H, Yu J, Gill S, Cheung WY, Blanke CD, Speers C ve Woods R (2014). Effect of M1a and M1b category in metastatic colorectal cancer. *The oncologist*, 19(7), 720-726.
- Konno M, Taniguchi M ve Ishii H (2019). Significant epitranscriptomes in heterogeneous cancer. *Cancer Science*, 110(8), 2318-2327.

- Kronthaler F ve Zöllner S (2021). R and RStudio. In *Data Analysis with RStudio* (pp. 1-12). Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Lapointe S, Perry A ve Butowski NA (2018). Primary brain tumours in adults. *The Lancet*, 392(10145), 432-446.
- Li S ve Mason CE (2014). The pivotal regulatory landscape of RNA modifications. *Annual review of genomics and human genetics*, 15, 127-150.
- Lian H, Wang QH, Zhu CB, Ma J, ve Jin WL. (2018). Deciphering the epitranscriptome in cancer. *Trends in cancer*, 4(3), 207-221.
- Liu K, Ouyang QY, Zhan Y, Yin H, Liu BX, Tan LM, ... ve Yin JY (2022). Pharmacoepitranscriptomic landscape revealing m6A modification could be a drug-effect biomarker for cancer treatment. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 28, 464-476.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, ve Kleihues P (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114(2), 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>
- Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, ... ve Wesseling P (2014). International Society of Neuropathology-Haarlem Consensus Guidelines for Nervous System Tumor Classification and Grading. *Brain pathology*, 24(5), 429-435.
- Lyons SM, Fay MM ve Ivanov P (2018). The role of RNA modifications in the regulation of tRNA cleavage. *FEBS letters*, 592(17), 2828-2844.
- Ma L, Liu Z, Zhang H, Ning W ve Qu Y (2021). Chunjiang Yu. The Landscape and Prognostic Value of m6A Methylation-related Genes in Low Grade Glioma. *Archives of Microbiology & Immunology*, 5, 214-231.

- Maran SR, de Lemos Padilha Pitta JL, dos Santos Vasconcelos CR, McDermott SM, Rezende AM ve Silvio Moretti N (2021). Epitranscriptome machinery in Trypanosomatids: New players on the table?. *Molecular Microbiology*, 115(5), 942-958.
- Malvi P, Wang B, Shah S ve Gupta R (2019). Dissecting the role of RNA modification regulatory proteins in melanoma. *Oncotarget*, 10(38), 3745.
- Manisekhar SR, Siddesh GM, ve Manvi SS (2020). Introduction to bioinformatics. In *Statistical Modelling and Machine Learning Principles for Bioinformatics Techniques, Tools, and Applications* (pp. 3-9). Springer, Singapore.
- Matsui Y, Maruyama T, Nitta M vd. Prediction of lower-grade glioma molecular subtypes using deep learning. *J Neurooncol* 146, 321–327 (2020).
- Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, Richman AR, Silverbush D, Shaw ML, Hebert CM, Dewitt J, Gritsch, S, Perez, E. M., Gonzalez Castro LN, Lan X, Druck N, Rodman C, Dionne D, Kaplan A, Bertalan MS ve Suvà, M. L. (2019). An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*, 178(4), 835–849.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024>
- Neri F, Dettori D, Incarnato D, Krepelova A, Rapelli S, Maldotti M ... ve Oliviero S (2015). TET1 is a tumour suppressor that inhibits colon cancer growth by derepressing inhibitors of the WNT pathway. *Oncogene*, 34(32), 4168-4176.
- Nombela P, Miguel-López B, ve Blanco S (2021). The role of m6A, m5C and Ψ RNA modifications in cancer: Novel therapeutic opportunities. *Molecular Cancer*, 20(1), 1-30.
- Pan J, Huang Z, ve Xu Y (2021). m5C RNA Methylation Regulators Predict Prognosis and Regulate the Immune Microenvironment in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in oncology*, 11, 657466. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.657466>
- Paramasivam A, Vijayashree Priyadharsini J, ve Raghunandhakumar S (2020). N6-adenosine methylation (m6A): a promising new molecular target in hypertension and cardiovascular diseases. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 43(2), 153–154.

- Pavlopoulou A, Spandidos DA ve Michalopoulos I (2015). Human cancer databases. *Oncology reports*, 33(1), 3-18.
- Peng RD (2016). *R programming for data science* (pp. 86-181). Victoria, BC, Canada: Leanpub.
- Pittard WS ve Li S (2020). The essential toolbox of data science: Python, R, Git, and Docker. In *Computational Methods and Data Analysis for Metabolomics* (pp. 265-311). Humana, New York, NY.
- Pouratian N, Schiff D, Management of Low-Grade Glioma. *Curr Neurol Neurosci Rep* 10, 224–231 (2010). <https://doi.org/10.1007/s11910-010-0105-7>
- Ramaiah MJ, Naushad SM, Manyam RR ve Kutala VK (2021). Role of long noncoding RNAs in temozolomide-resistant glioblastoma. In *Glioblastoma Resistance to Chemotherapy: Molecular Mechanisms and Innovative Reversal Strategies* (pp. 401-428). Academic Press.
- Robinson MD, McCarthy DJ ve Smyth GK (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
- Rosselló-Tortella M, Ferrer G ve Esteller M (2020). Epitranscriptomics in hematopoiesis and hematologic malignancies. *Blood cancer discovery*, 1(1), 26.
- Singh H (2016). Bioinformatics: Benefits to Mankind. *International Journal of PharmTech Research*, 9(4), 242-248.
- Shi Q, Xue C, Yuan X, He Y, ve Yu Z (2020). Gene signatures and prognostic values of m1A-related regulatory genes in hepatocellular carcinoma. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.
- Siegal T (2015). Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas. *Journal of Clinical Neuroscience*, 22(3), 437-444.
- Soneson C ve Delorenzi M (2013). A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC bioinformatics*, 14(1), 1-18.

- Subramaniam D, Thombre R, Dhar A ve Anant S (2014). DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Frontiers in oncology*, 4, 80.
- Sullenger BA ve Nair S (2016). From the RNA world to the clinic. *Science* (New York, N.Y.), 352(6292), 1417-1420. <https://doi.org/10.1126/science.aad8709>
- Sun H, Gong J, Shang M, Chen Y, Chen J, Chen H, ... ve Hu B (2021). m1A RNA Methylation Regulators Contribute To Malignant Progression And Have Clinical Prognostic Impact In Gliomas.
- Tang Y, Chen K, Song B, Ma J, Wu X, Xu Q, ve Meng J (2021). m6A-Atlas: a comprehensive knowledgebase for unraveling the N 6-methyladenosine (m6A) epitranscriptome. *Nucleic acids research*, 49(D1), D134-D143.
- Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, ve Villano JL (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 23(10), 1985–1996. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275>
- Tomczak K, Czerwińska P ve Wiznerowicz M (2015). The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemporary oncology*, 19(1A), A68.
- Trixl L ve Lusser A (2019). The dynamic RNA modification 5-methylcytosine and its emerging role as an epitranscriptomic mark. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 10(1), e1510.
- Tso CL, Freije WA, Day A, Chen Z, Merriman B, Perlina A, Lee Y, Dia E., Yoshimoto K, Mischel PS, Liao LM, Cloughesy TF, ve Nelson SF (2006). Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer research*, 66(1), 159–167. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0077>
- Tysnes BB ve Mahesparan R (2001). Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. *Journal of neuro-oncology*, 53(2), 129–147.

- Tzelepi V, Logotheti S, Efstathiou E, Troncso P, Aparicio A, Sakellakis M, ... ve Zolota V (2020). Epigenetics and prostate cancer: defining the timing of DNA methyltransferase deregulation during prostate cancer progression. *Pathology*, 52(2), 218-227.
- Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M ve Sysa P (2014). Glioblastoma multiforme- an overview. *Contemporary oncology* (Poznan, Poland), 18(5), 307–312. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>
- Yang Y, Wu F, Zhang J, Sun R, Li F, Li Y, ... ve Huang C (2019). EGR1 interacts with DNMT3L to inhibit the transcription of miR-195 and plays an anti-apoptotic role in the development of gastric cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(11), 7372-7381.
- Yin JY, Shen J, Dong ZZ, Huang Q, Zhong MZ, Feng DY, ... ve Liu ZQ (2011). Effect of eIF3a on response of lung cancer patients to platinum-based chemotherapy by regulating DNA repair. *Clinical cancer research*, 17(13), 4600-4609.
- Qi J, Dong Z, Liu J ve Zhang JT (2014). EIF3i promotes colon oncogenesis by regulating COX-2 protein synthesis and β -catenin activation. *Oncogene*, 33(32), 4156-4163.
- Wang B, Niu L, Wang Z ve Zhao Z (2021). RNA m1A Methyltransferase TRMT6 Predicts Poorer Prognosis and Promotes Malignant Behavior in Glioma. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 692130.
- Wang LC, Chen SH, Shen XL, Li DC, Liu HY, Ji YL, ... ve Lv QL (2020). M6A RNA methylation regulator HNRNPC contributes to tumorigenesis and predicts prognosis in glioblastoma multiforme. *Frontiers in oncology*, 10, 2021.
- Wang P, Wu M, Tu Z, Tao C, Hu Q, Li K, ... ve Huang K (2020). Identification of RNA: 5-methylcytosine methyltransferases-related signature for predicting prognosis in glioma. *Frontiers in oncology*, 1119.
- Wei J, Liu F, Lu Z, Fei Q, Ai Y, He PC, ... ve He C (2018). Differential m6A, m6Am, and m1A demethylation mediated by FTO in the cell nucleus and cytoplasm. *Molecular cell*, 71(6), 973-985

- Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KR, Ozenberger BA, Ellrott K, ... ve Stuart JM (2013). The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nature genetics*, 45(10), 1113-1120.
- Wijnenga M, French PJ, Dubbink HJ, Dinjens W, Atmodimedjo PN, Kros JM, Smits M, Gahrmann R, Rutten GJ, Verheul JB, Fleischeuer R, Dirven C, Vincent A, ve van den Bent MJ (2018). The impact of surgery in molecularly defined low-grade glioma: an integrated clinical, radiological, and molecular analysis. *Neuro-oncology*, 20(1), 103–112. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox176>
- Wishart DS (2005). Bioinformatics in drug development and assessment. *Drug metabolism reviews*, 37(2), 279-310.
- Witkin KL, Hanlon SE, Strasburger JA, Coffin JM, Jaffrey SR, Howcroft TK ve Read-Connole E (2015). RNA editing, epitranscriptomics, and processing in cancer progression. *Cancer biology & therapy*, 16(1), 21- 27.
- Woolson RF (2007). Wilcoxon signed-rank test. *Wiley encyclopedia of clinical trials*, 1-3.
- Wu F, Wang ZL, Wang KY, Li GZ, Chai RC, Liu YQ, ... ve Zhang W (2020). Classification of diffuse lower-grade glioma based on immunological profiling. *Molecular oncology*, 14(9), 2081-2095.
- Wu XR, Chen Z, Liu Y, Chen ZZ, Tang F, Chen ZZ ve Zhou, J. (2021). Prognostic signature and immune efficacy of m1A-, m5C-and m6A-related regulators in cutaneous melanoma. *Journal of cellular and molecular medicine*.
- Xiang S, Ma Y, Shen J, Zhao Y, Wu X, Li M, ... ve Xiao Z (2020). m5C RNA methylation primarily affects the ErbB and PI3K–Akt signaling pathways in gastrointestinal cancer. *Frontiers in molecular biosciences*, 360.
- Xie S, Chen W, Chen K, Chang Y, Yang F, Lin A, ... ve Yan X (2020). Emerging roles of RNA methylation in gastrointestinal cancers. *Cancer cell international*, 20(1), 1-11.
- Zhang C, Liu J, Guo H, Hong D, Ji J, Zhang Q, ... ve Ren Q (2021). m6A RNA methylation regulators were associated with the malignancy and prognosis of ovarian cancer. *Bioengineered*, 12(1), 3159-3176.

- Zhang Y, Yu JJ, Tian Y, Li ZZ, Zhang CY, Zhang SF, ... ve Liu ZQ (2015). eIF3a improve cisplatin sensitivity in ovarian cancer by regulating XPC and p27Kip1 translation. *Oncotarget*, 6(28), 25441.
- Zhang Q, Liu F, Chen W, Miao H, Liang H, Liao Z, ... ve Zhang B (2021). The role of RNA m5C modification in cancer metastasis. *International Journal of Biological Sciences*, 17(13), 3369.
- Zhao Y, Zhao Q, Kaboli PJ, Shen J, Li M, Wu X, ... ve Xiao Z (2019). m1A regulated genes modulate PI3K/AKT/mTOR and ErbB pathways in gastrointestinal cancer. *Translational oncology*, 12(10), 1323-1333.
- Zheng J, Wang X, Qiu Y, Wang M, Yu H, Zhou Z, ... ve Jiang X (2021). Identification of Critical m6A RNA Methylation Regulators with Prognostic Value in Lower-Grade Glioma. *BioMed Research International*, 2021.
- Zheng Q, Yu X, Zhang Q, He Y ve Guo W (2021). Genetic characteristics and prognostic implications of m1A regulators in pancreatic cancer. *Bioscience Reports*, 41(4).
- Zhu P, Du XL, Lu G ve Zhu JJ (2017). Survival benefit of glioblastoma patients after FDA approval of temozolomide concomitant with radiation and bevacizumab: A population-based study. *Oncotarget*, 8(27), 44015–44031.
- Zhou Y, Kong Y, Fan W, Tao T, Xiao Q, Li N ve Zhu X (2020). Principles of RNA methylation and their implications for biology and medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110731.

EKLER**Ek 1: ÖZ GEÇMİŞ**

Adı Soyadı : Gaye AÇCAN
Yabancı Dili : İngilizce, Arapça
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl) : Yüksek Lisans (Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi 2020- Günümüz)
Lise : Narlıca Anadolu Lisesi (2012-2016)
Lisans : Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik (2016-2020)
Yüksek Lisans : Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıbbi Biyoloji (2020- Günümüz)
Çalıştığı Kurum / Kurumlar ve Yıl :
Yayınları (SCI ve diğer) :
Diğer Konular :