

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YUMUŞAK DOKU TÜMÖRLERİNDE TAM GENOM MİKROARRAY
ANALİZLERİ İLE HASTALIKLA İLİŞKİLİ GEN AĞI VE ALT
YOLLARININ TANIMLANMASI**

Tuğba DEMİRCİOĞLU

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2021

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YUMUŞAK DOKU TÜMÖRLERİNDE TAM GENOM MİKROARRAY
ANALİZLERİ İLE HASTALIKLA İLİŞKİLİ GEN AĞI VE ALT
YOLLARININ TANIMLANMASI**

Tuğba DEMİRCİOĞLU

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Naci ÇİNE

Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

Proje No: 2014/10

Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Protokol Kodu: KOU KAEK 2013/139 Karar No: 11/4

KOCAELİ

2021

ÖZET

Amaç: Hipofiz adenomları, gliomlar ve menenjiomlardan sonra en sık rastlanan beyin tümörleridir ve primer beyin tümörlerinin %10-15'ini oluşturur. Bu tümörler, hormonal, proliferatif ve gen ekspresyonu aktiviteleri açısından çok çeşitli biyolojik davranış gösterirler ve monoklonal orjinli, çoğu yavaş ilerleyen iyi huylu neoplazmlardır. Ancak şuan ki literatürde, hipofiz adenomlarının gen ekspresyonlarında rolü ile ilgili hala belirlenmemiş genler ve yolaklar mevcuttur. Bu çalışmada, adenom invazivliği ile ilgili mekanizmaları anlamak için invaziv ve non-invaziv adenomlarda farklı olarak ifade edilen genler belirlenmeye çalışılmıştır.

Yöntem: Hipofiz tümörleri boyut (makro ve mikro) ve invazyon özelliğine göre sınıflandırılarak normal hipofiz dokuları ile karşılaştırılıp DNA mikroarray yöntemi ile gen ifadelerindeki değişikliklerin analizi yapılmıştır.

Bulgular: Çalışmanın sonuçlarına göre, invaziv, makro ve mikro adenomlarda sırasıyla 59, 51 ve 42 genin ekspresyon düzeyinde artış saptanırken; 40, 40 ve 41 genin ekspresyon düzeyinde azalma saptanmıştır. İnvaziv hipofiz adenomlarında ifade edilen gen ağlarından BIRC3 ve BNIP2 sadece invaziv hipofiz adenomlarına spesifik olarak upregüle olmuştur. Hipofiz adenomlarında upregüle olan diğer önemli genler ise GATA3, SSX2IP, ABCA12, RACGAP1'dir.

Sonuç: Bu çalışma, literatürde hipofiz adenomlarının gelişiminde daha önce tanımlanmamış gen ağları ortaya koyması açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: İnvaziv adenom, Non invaziv Adenom, Makro adenom, Mikro Adenomas, BIRC3, BNIP, GATA3, SSX2IP, ABCA12, RACGAP1

ABSTRACT

Objective: Pituitary adenomas are the most common brain tumors after gliomas and meningiomas and constitute 10-15% of primary brain tumors. These tumors show a wide range of biological behavior in terms of hormonal, proliferative and gene expression activities and they are benign neoplasms of monoclonal origin, most of them are slowly progressing. However, there are still undetermined genes and pathways related to the role of pituitary adenomas in gene expression in the current literature. In this study, we tried to identify genes that are differently expressed in macro, micro and invasive adenomas in order to understand the mechanisms related to adenoma invasiveness.

Method: The pituitary tumors were classified according to size (macro and micro) and invasion characteristics, compared with normal pituitary tissues, and analysis of changes in gene expressions was conducted by DNA microarray method.

Results: According to the results of the study, while the expression level of 59, 51 and 42 genes increased in invasive, macro and micro adenomas, respectively; the expression level of 40, 40 and 41 genes decreased. Among the gene networks expressed in invasive pituitary adenomas, BIRC3 and BNIP2 were specifically upregulated only to invasive pituitary adenomas. Other important genes upregulated in pituitary adenomas are GATA3, SSX2IP, ABCA12 and RACGAP1

Conclusion: These results show distinct gene expression patterns between invasive, macro and micro adenomas, provide new insight into the pathogenesis and suggest that future prognostic and novel therapeutic strategies.

Keywords: Invasive adenomas, non invasive adenomas, macro adenomas, micro adenomas, BIRC3, BNIP, GATA3, SSX2IP, ABCA12, RACGAP1

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, anlayışı ve hoşgörüsü sayesinde bu tez çalışmasının oluşmasına öncülük eden değerli danışman hocam Doç. Dr. Naci Çine'ye,

Bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, çalışmada kullandığım yöntemleri geliştirmemi sağlayan ve laboratuvar çalışmalarına katkılarını sunan Dr. Öğretim Üyesi Deniz Akkoyunlu arkadaşşıma,

Doktora eğitimimim başından beri beraber yol aldığım ve sıkıntıları beraber göğüs gerdiğim sevgili arkadaşlarım Dr. Öğretim üyesi Seda Eren, Esen Ulak Gümüşlü, Ramis Ufuk Akkoyunlu ve Çiğdem Acioğlu'na

Doktora eğitimim süresindeki yardımlarından dolayı Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Hayatım boyunca aldığım her karara saygı gösteren, destek ve anlayışlarını esirgemeyen Annem Nilgün Pekacar, Babam Ahmet Erkan Tarhan ve Ablam Tuğçe Demirci'ye,

Akademik kariyerimin her aşamasında yanımda olan, desteğini esirgemeyen gösteren eşim Enis Demircioğlu'na ve bu süreçte hayatıma neşe ve enerji getiren oğlum Demir'e teşekkür ederim.

ORJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Yumuşak doku tümörlerinde tam genom mikroarray analizleri ile hastalıkla ilişkili gen ağı ve alt yollarının tanımlanması” başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

22/ 01 / 2021

Tuğba DEMİRCİOĞLU

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----------|
| ÖZET | v |
| ABSTRACT | vi |
| TEŞEKKÜR | vii |
| ORJİNALLİK BİLDİRİMİ | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | xii |
| ŞEKİLLER | xix |
| TABLolar | xxi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Epidemiyoloji | 1 |
| 1.2. Embriyoloji | 2 |
| 1.3. Anatomi | 2 |
| 1.3.1. Hipofizin Bezinin Damarları ve Portal Sistem | 3 |
| 1.4. Hipotalamus-Hipofiz Aksının Fizyolojisi | 5 |
| 1.5. Sitoloji | 9 |
| 1.6. Hipofiz Oluşumunda Rol Alan Sinyal Molekülleri | 10 |
| 1.6.1. Hücre Tiplerinin Tespitinde Transkripsiyon Faktörlerinin Rolü | 11 |
| 1.6.2. Özgün Hücre Tiplerinin Olgunlaşma Süreci | 12 |
| 1.7. Hipofiz Tümörögenezi | 13 |
| 1.7.1. Hormonal Faktörler | 14 |
| 1.7.2. Moleküler Patogenez | 14 |
| 1.7.2.1. Tümör Süpresör Gen İnaktivasyonu | 15 |
| 1.7.2.2. Onkogen Aktivasyonu | 15 |
| 1.7.2.3. Epigenetik Değişiklikler | 16 |
| 1.7.3. Sinyal Mekanizmaları | 17 |
| 1.7.3.1. Hücre Döngüsü Regülasyonu | 18 |
| 1.7.3.2. Sinyal İleti Yolakları ve Sinyal Molekülleri | 19 |
| 1.7.4. Hipofizer Adenom Sendromları | 20 |
| 1.8. Hipofiz Tümörlerinin Sınıflandırılması | 21 |
| 1.8.1. 2017 Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırması | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 1.8.2. 2004 Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırması | 23 |
| 1.8.3. Fonksiyonel Sınıflama | 24 |
| 1.8.4. Radyolojik/Anatomik Sınıflama | 25 |
| 1.8.5. Histolojik Sınıflama | 26 |
| 1.8.6. İmmünohistokimyasal/Elektron Mikroskopik Sınıflama | 26 |
| 1.9. Mikroarray Teknolojisi | 28 |
| 1.9.1. DNA Mikroarray Nedir? | 28 |
| 1.9.2. Mikroarray Tarihçesi | 28 |
| 1.9.3. Mikroarray Substratları | 29 |
| 1.9.4. Mikroarray Üretim Teknikleri | 29 |
| 1.9.4.1. Çip üzerinde oligonükleotid sentezi | 29 |
| 1.9.4.2. DNA'nın direkt olarak yüzeye bırakılması | 30 |
| 1.9.5. Mikroarray Teknolojisinin Prensipleri | 32 |
| 1.9.6. Mikroarray Tipleri | 32 |
| 1.9.6.1. Spotlu Mikroarray'ler | 32 |
| 1.9.6.2. Oligonükleotid Mikroarray'leri | 32 |
| 1.9.6.3. Genotip Mikroarray'leri | 33 |
| 1.9.7. Mikroarray Teknolojisinin Kullanım Alanları | 33 |
| 1.9.8. Ekspresyon Analizi ve Mikroarray Teknolojisi | 36 |
| 1.9.9. Mikroarray'in Avantajları ve Dezavantajları | 37 |
| 2. AMAÇ | 39 |
| 3. YÖNTEM | 40 |
| 3.1. Kullanılan Ekipmanlar/Kitler | 41 |
| 3.2. Kullanılan Kimyasallar | 42 |
| 3.3. Gerekli Yazılımlar | 42 |
| RNA İzolasyonunda Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması | 42 |
| 3.5. Dokulardan RNA İzolasyonu | 42 |
| 3.6. RNA'nın Yeniden Çözülmesi | 43 |
| 3.7. RNA'ların Kantite ve Kalite Tayini | 44 |
| 3.7.1. RNA'ların Agilent RNA 6000 Nano Kit ile Kalite Tayini | 44 |
| 3.8. Gen Havuzu Oluşturma | 46 |
| 3.9. Mikroarray Metodu | 46 |
| 3.9.1. Total RNA Kontrollerinin Spike-In İle Hazırlanması | 46 |
| 3.9.2. İşaretleme Reaksiyonunun Hazırlanması | 47 |

| | |
|--|------------|
| 3.9.3. İşaretlenen RNA'ların Pürifikasyonu | 48 |
| 3.9.4. cRNA'ların Kantitasyonu | 49 |
| 3.9.5. Hibridizasyon | 49 |
| 3.9.6. Array'lerin Yıkanması | 50 |
| 3.9.7. Tarama | 50 |
| 3.5.8. Verilerin Analizi | 51 |
| 4. BULGULAR | 53 |
| 4.1. Mikroarray Sonuçları | 53 |
| 4.2. Hasta Grupları Arasında Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişiklikler | 71 |
| 4.2.1. İnvaziv Adenom Grubu | 71 |
| 4.2.2. Makro adenom grubu | 73 |
| 4.2.3. Mikro Adenom Grubu | 74 |
| 4.3. Hipofiz Tümörlerinde İfade Edilen En Belirgin Genlerin Hastalık ve Moleküler Fonksiyonlarına Göre Sınıflandırılması | 77 |
| 4.4. Gen Ağları ve Alt Yollar | 82 |
| 4.7. Kanonik Sinyal Yolakları | 91 |
| 4.8. Kümeleme Analizi | 92 |
| 5. TARTIŞMA | 94 |
| SONUÇ VE ÖNERİLER | 101 |
| KAYNAKLAR | 103 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ABCA12: *ATP binding cassette*
- ACTH: Adrenokortikotropik hormon
- ADH: Antidiüetik hormon
- ADRB1: Adrenoreseptör beta
- AIP: Aril hidrokarbon reseptör aracılı protein
- AML: Akut myeloid lösemi
- AMOT: anjiomotin
- AMP: Adenozin monofosfat
- ANGPTL7: *Angiopoietin-like 7*
- ANKRD17: *Ankyrin repeat domain 17*
- ANOVA: *Analysis of Vairance*
- Apo J: Apolipoprotein J
- ARHGAP25: *Rho GTPase activating protein 25*
- ARTN: Artemin
- Atmin: *ATM interactor*
- BIRC3: *Baculoviral IAP repeat containing 3*
- BMP: Kemik morfojenik protein
- BMP2: Kemik morfojenik protein-2
- BMP4: Kemik morfojenik protein-4
- BNIP: *BCL2 Interacting Protei*
- BNIP2: *BCL2 Interacting Protein 2*
- BRG1: *ATP-dependent chromatin remodeler gene*
- C15orf38: *Chromosome 15 open reading frame 38*
- C2orf72: *Chromosome 2 open reading frame 72*
- C8orf4: *Choromosome 8 open reading frame 4*
- CALM1: Kalmodulin 1
- CALY: *Calcyon Neuron Specific Vesicular Protein*
- cAMP: Halkasal adenozin monofosfat
- CBTRUS: Amerika Birleşik Devletleri Merkez Beyin Tümörü Sicili
- CCNB2: Siklin B2

CCND1: Siklin D1
CDH2: Kadherin 2
CDK: siklin bağımlı kinaz
CDKN1B (p27): Siklin bağımlı kinaz inhibitör 1b
CDKN2A (p16): Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2a
cDNA: Komplementer DNA
CGH: Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
cGMP: Siklik guanozin monofosfat
CHURC1: *Churchill domain containing 1*
CLU: *Clusterin, apolipoprotein J*
CMPK1: Sistidin monofosfat kinaz 1
CNKSR3: *CNKSR family member 3*
CRABP1: *Cellular retinoic acid binding protein*
CREB: cAMP cevap elemanı bağlayıcı protein
CRH: Kortikotropin salgılatıcı hormon
cy3: siyanin 3
cy5: siyanin 5
DAPK: *Death-Associated Protein Kinaz*
DCDC2: *Doublecortin Domain Containing 2*
DCT: *Dopachrome Tautomerase*
DIAPH2: *Diaphanous related formin 2*
DMKN: Dermokin
DNA: Deoksiribo nükleik asit
DNMT: DNA metil transferaz
DNMT3b: : DNA metil transferaz 3 beta
DPF3: *Zinc and double PHD fingers, family 3*
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
dt: Deoksitimin
EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit
EGF: Epidermal büyüme faktörü
EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EM: Elektrom mikroskopik
Eps: Epidermal büyüme faktörü reseptör yolak substratı 8
ER: Östrojen reseptörü

ERK1: *Extracellular signal-regulated kinases 1*
ERK2: *Extracellular signal-regulated kinase 2*
EST: *Expressed Sequenced Tagged*
FAM110B: *Family with sequence similarity 110, member B*
FC: log kat değişimi
FE: *Feature Extraction*
FGF: Fibroblast büyüme faktörü
FGF13: *Fibroblast growth factor 13*
FGF4: Fibroblast büyüme faktörü 4
FGF-8: Fibroblast büyüme faktörü-8
FGFR: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
FGFR2: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2
FGFR4: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 4
FHOD3: *Formin homology 2 domain conatining 3*
FIPA: Ailevi Hipofiz Adenomu
FOXD1: *Forkhead box D1*
FSH: Folikl uyarıcı hormon
FSH β : Folikl uyarıcı hormon beta
GADD45 γ : *Growth Arrest And DNA Damage-Inducible Protein GADD45*
GATA2: Gata bağlayıcı protein 2
GATA-2: Gata bağlayıcı protein-2
GATA3: Gata bağlayıcı protein 3
GDE1: Gliserofosfodiester fosfodiesteraz 1
GDF10: *Growth differentiation factor 10*
GDO: Genetiği değiştirilmiş organizma
GH: büyüme hormonu
GHRH: Büyüme hormonu salgılatıcı hormon
GNAS: *guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating*
GNG8: Guanin bağlayıcı protein gamma 8
GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormon
GPCR: G proteini bağlı reseptörler
GTP: Guanozin-5'-tripfosfat
G α s: *Gs alfa subunit*
HEPACAM2: *HEPACAM family member 2*

Hesx1: Hesx homeobox-1
HIST1H4K: *Histone cluster 1*
HIST2H4B: *Histone cluster 2*
HMGA2: *High mobility group A*
H-ras: H-ras protonkogen
IDH1: İzositrat dehidrogenaz 1
IFN- α : İnterferon alfa
IGF-1: İnsulin benzeri büyüme faktörü-1
IL-4: İnterlökin 4
INTS4: *Integrator complex subunit 4*
IPA: *Ingeunity pathway analysis*
Isl-1: İnsulin gen arttırıcı protein-1
ISM1: Isthmin 1
İHK: İmmunohistokimyasal
LAMA4: Laminin alfa-4
LAYN: Layilin
LENG9: *Leukocyte reseptör cluster member 9*
LH: Luteinleştirici hormon
Lhx3: Lim homeobox-3
Lhx-4: Lim homeobox-4
LH β : Luteinleştirici hormon beta
LOH: Heterozigot kaybı
LRRC66: *Leucine rich repeat containing 66*
LRRN3: *Leucine rich repeat neuronal 3*
MAGE-A: Melanoma ilişkili antijen
MAPKK: *Mitojen aktive edici protein kinaz*
MCF2: *MCF2 cell line derived transforming sequence*
MDA-5: *melanoma differentiation-associated protein 5*
MEG3: *Maternally Expressed 3*
MEN-1: Multiple Endokrin Neoplazi Tip-1
MEN-4: Multiple Endokrin Neoplazi Tip-4
miRNA: mikro RNA
MR: Manyetik rezonans
mRNA: mesajcı RNA

MSH: Melanosit uyarıcı hormon
NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit
NDUFB6: NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex 6
NELL1: *Nel-like 1*
NFkB: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NLGN1: Nöroglin 1
nm23: nukleozid difosfat kinaz-1
P21: Sklin bağımlı kinaz inhibitör 1a
P53: Tümör protein 53
PARL: *Presenilin associated, rhomboid-like*
Pax6: Paired box-6
PCR: polimeraz zincir reaksiyonu
PI13K: Fosfotidilinositol kinaz
PIH: Prolaktin baskılayıcı hormon
PIK3CA: Fosfotidilinositol-4,5-Bifosfat 3-Kinaz katalitik altünite alfa
Pit-1: Hipofiz spesifik transkripsiyon faktör-1
Pitx1: Paired like homedomain-1
Pitx-2: Paired like homedomain-2
PKC: protein kinaz-c
POMC: Proopiomelanokortin
POU-h: POU homeodomain
POU-s: POU spesifik domain
PP1R17: Protein fosfotaz 1
pRB: Retinoblastoma proteini
PRH: Prolaktin salgılatıcı hormon
PRKAR1A: Protein Kinaz, cAMP-Bağımlı Tip I Düzenleyici Alt Birim Alfa
PRL: Prolaktin
Prop-1: homeobox protein prophet of Pit-1
PTAG: Hipofize tümör apoptotik gen
PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*
PTPRA: Protein tirozin fosfotaz, reseptör tip A
PTTG: Hipofizer tümör transforme edici gen
QC: Kalite kontrol
RACGAP1: Rac GTPaz-aktive edici protein 1

RAMP1: *Receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 1*

Rb: Retinoblastoma

Rb1: Retinoblastoma-1

Rho: *Ras homolog family member*

RIG-1: *Retinoic acid inducible gen 1*

RIN: *RNA integrity number*

RNA: Ribo nükleik asit

RNF130: *Ring finger protein 130*

RNF212: *Ring finger protein 212*

RTCB: *RNA 2',3'-cyclic phosphate and 5-OH ligase*

RUNX1: *Runt-related transcription factor 1*

S100A4: S100 kalsiyum bağlayıcı protein A4

SAA1: *Serum amyloid A1*

SDHB: *Succinatet dehydrogenase complex, subunit B*

SF-1: Steroidojenik faktör-1

SGP2: Sülfatlanmış glikoprotein 2

SHH: Sonic hedgehog

SKOR2: *SKI family transcriptional corepressor*

SLC16A12: *Solute carrier family 26*

SNP: Tek nükleotit poliformizmi

snRNA: küçük nükleer RNA

SP-40: serum proteini-40

SPAST: Spastin

SQSTM1: *Sequestosome 1*

Src: Sarkoma ile ilişkili

SS: Büyüme hormonu baskılayıcı hormon

SSX2IP: *Synovial sarcoma X breakpoint 2 interacting protein*

STAT-3: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü-3

TBC1D8B: *TBC1 domain family, member 8B*

TBx19: T-box transkripsiyon faktör

TCA: Krebs trikarboksilik asit

TE: Tris-EDTA

TEF: Triotrop embriyonik faktör

tFGF: Temel fibroblast büyüme faktörü

TGFβ: Transforme edici büyüme faktörü beta
TLN1: Talin 1
TMEM151B: Transmembran protein 151B
TNF: Tümör nekroz faktör
TNN1: Troponin 1, tip 1
TOR: *target of rapamycin proteins*
Tpit: T-box transkripsiyon faktör
TRH: Tirotropin salgılatıcı hormon
TRIM7: *Tripartite motif containing 7*
tRNA: Taşıyıcı RNA
TRPM-2: testosteron bastırılmış prostat mesajı- 2
TSH: tiroid uyarıcı hormon
UCMA: *Upper zone growth plate and cartilage matrix associated*
USP53: *Ubiquitin specific peptidase 53*
VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü
VEGFR: Vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü
VGLL4: *Vestigal like family member 4*
VGLL4: *Vestigal like family member 4*
XAGE1A: *Homo sapiens X antigen family, member 1A*
ZMAT4: *Zinc finger, matrin-type 4*
ZNF189: *Zinc finger protein 189*
ZNF541: *Zinc finger protein 541*
α-GSU: Alfa glikoprotein subunit
A-MSH: alfa-melanosit uyarıcı hormon

ŞEKİLLER

| | |
|---|----|
| Şekil 1.1. Hipofiz gelişimi..... | 2 |
| Şekil 1.2. Hipofiz bezi ve anatomisi..... | 3 |
| Şekil 1.3. Kavernoöz sinüsler ve komşulukları..... | 4 |
| Şekil 1.4. Hipofiz bezinde dolaşım | 5 |
| Şekil 1.5. Hipotalamusun salgılatıcı ve baskılayıcı hormonları..... | 7 |
| Şekil 1.6. Hipotalamus ile Ön hipofiz arasındaki ilişki..... | 8 |
| Şekil 1.7. Hipofiz gelişiminin erken evrelerinde hücrelerin tespiti..... | 11 |
| Şekil 1.8. Hipofizer tümöröenez kaskadı | 13 |
| Şekil 1.9 Hipofizer hücre proliferasyonu ve transformasyonu ile ilişkili hücre içi sinyalizasyon. | 18 |
| Şekil 1.10. Ink-jet baskılama yöntemi ile oligo sentezinin genel mekanizması..... | 30 |
| Şekil 1.11 Stanford çiplerinin teknolojisi..... | 31 |
| Şekil 1.12 Affymetrix GeneChip® firmasına ait insan ve fare genomu çipleri..... | 33 |
| Şekil 1.13 Agilent Technologies® firmasına ait bir çip örneği | 33 |
| Şekil 1.14 Gen ekspresyon array analizinin basamakları..... | 37 |
| Şekil 3.1. NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)..... | 44 |
| Şekil 3.2. Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, U.S.A.)..... | 44 |
| Şekil 3.3. Bioanalyzer mikroçiplerine örneklerin yüklenmesi | 45 |
| Şekil 3.4. RNA örneğinin biyoanalizer’da değerlendirilmesi | 46 |
| Şekil 3.5. Mikroarray taşıyan kasetlerin tarayıcıya yerleştirilmesi..... | 51 |
| Şekil 4.1. Hücre Hareket, Hücre Büyüme ve Proliferasyon, Sinir Sistemi Gelişimi ve Fonksiyonu ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları | 83 |
| Şekil 4.2. Hücre Ölümü ve Sağkalım, Kanser, Hematolojik Hastalıklar ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları | 84 |
| Şekil 4.3. Hücre Gelişim, Hücre Büyüme ve Proliferasyon, Hematolojik Sistem Gelişimi ve Fonksiyonu ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları | 85 |
| Şekil 4.4. Hücre Gelişim, Hematolojik Sistem Gelişimi ve Fonksiyonları, Hematopoez ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları | 86 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.5. Hücresel hareket, Kanser, organizmal yaralanma ve anormallikler ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları | 87 |
| Şekil 4.6. Hücresel gelişim, organizmal yaralanma ve anormallikler, hücre ölümü ve sağkalım ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları..... | 88 |
| Şekil 4.7. Hücre siklusu, hepatik sistem gelişimi ve fonksiyonları, hücresel hareket ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları..... | 89 |
| Şekil 4.8. Kanser, hücresel gelişim, hücresel büyüme ve proliferasyon ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları | 90 |
| Şekil 4.9. Hücresel gelişim, kanser, hücresel büyüme ve proliferasyon ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları | 91 |
| Şekil 4.10. Aktin hücre iskeleti sinyal ileti yolağı ve invaziv ve makro hipofiz adenom oluşumundaki hedef genler..... | 92 |
| Şekil 4.11. İnvaziv, makro, mikro hipofiz adenomları ve kontrol grubu arasındaki Kümeleme Analizi..... | 93 |

TABLolar

| | |
|--|----|
| Tablo 1.1. Ön hipofiz hücre tipleri, ürettikleri hormonlar ve fizyolojik etkileri | 6 |
| Tablo 1.2. Hipofiz adenomalarının moleküler patogenezi ile ilişkili seçilmiş genler (Melmed, 2009) | 14 |
| Tablo 1.3 2017 DSÖ Hipofiz Adenomlarının Patolojik Sınıflandırılması | 22 |
| Tablo 1.4. Hipofiz Tümörlerinin 2004 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Sınıflaması | 23 |
| Tablo 1.5. Hipofiz adenomlarının fonksiyonel sınıflandırılması | 25 |
| Tablo 1.6. Hipofiz adenomlarının immünohistokimyasal sınıflandırılması..... | 26 |
| Tablo 1.7. Mikroarray teknolojileri ve uygulamaları | 34 |
| Tablo 3.1. Spike mix dilüsyonlarının hazırlanması..... | 46 |
| Tablo 3.2. T7 primer mix hazırlanması (bir reaksiyon için) | 47 |
| Tablo 3.3. cDNA master mix hazırlanması (bir reaksiyon için) | 47 |
| Tablo 3.4. Transkripsiyon master mix hazırlanması (bir reaksiyon için)..... | 48 |
| Tablo 3.5. Hibridizasyon için önerilen yield ve spesifik aktivite değerleri..... | 49 |
| Tablo 3.6. Fragmentasyon mix hazırlanması (bir reaksiyon için)..... | 49 |
| Tablo 3.7. Yıkama koşulları | 50 |
| Tablo 4.1. İnvaziv adenom grubunda <i>down-regüle</i> olan genler | 53 |
| Tablo 4.2. İnvaziv adenom grubunda <i>up-regüle</i> olan genler..... | 56 |
| Tablo 4.3. Makro adenom grubunda <i>down-regüle</i> olan genler | 59 |
| Tablo 4.4. Makro adenom grubunda <i>up-regüle</i> olan genler | 62 |
| Tablo 4.5. Mikro adenom grubunda <i>down-regüle</i> olan genler | 65 |
| Tablo 4.6. Mikro adenom grubunda <i>up-regüle</i> olan genler..... | 69 |
| Tablo 4.7. İnvaziv adenom grubu ile makro adenom grubu karşılaştırıldığında <i>up-</i> | 71 |
| Tablo 4.8. İnvaziv adenom grubu ile mikro adenom grubu karşılaştırıldığında <i>up-</i> | 72 |
| Tablo 4.9. Makro adenom grubu ile mikro adenom grubu ile karşılaştırıldığında <i>up-</i> | 73 |
| Tablo 4.10. Makro adenom grubu ile invaziv adenom grubu karşılaştırıldığında <i>down-</i> ... | 74 |
| Tablo 4.11. Mikro adenom grubu ile invaziv adenom grubu karşılaştırıldığında <i>down-</i> | 74 |
| Tablo 4.12. Mikro adenom grubu ile makro adenom grubu karşılaştırıldığında <i>down-</i> | 76 |
| Tablo 4.13. Mikro adenom grubu ile makro adenom grubu karşılaştırıldığında <i>up-regüle</i> olan genler | 77 |

| | |
|--|----|
| Tablo 4.14. İnvaziv adenom grubunda öne çıkan genlerin ilişkili olduğu hastalık ve moleküler fonksiyonlar..... | 77 |
| Tablo 4.15. Makro Adenom grubunda öne çıkan genlerin ilişkili olduğu hastalık ve moleküler fonksiyonlar..... | 79 |
| Tablo 4.16. Mikro Adenom grubunda öne çıkan genlerin ilişkili olduğu hastalık ve moleküler fonksiyonları..... | 81 |
| Tablo 4.17. İnvaziv Hipofiz Adenomlarında Önemli Gen Ağları..... | 82 |
| Tablo 4.18. Makro Hipofiz Adenomlarında Önemli Gen Ağları | 85 |
| Tablo 4.19. Mikro Hipofiz Adenomlarında Önemli Gen Ağları..... | 88 |



1. GİRİŞ

1.1. Epidemiyoloji

Hipofiz adenomları, gliomlar ve menenjiomlardan sonra en sık rastlanan beyin tümörleridir ve primer beyin tümörlerinin %10-15'ini oluşturur. Otopsi sonuçlarına göre, normal populasyonun %14,4'ünde hipofiz adenomu saptanırken, rutin radyolojik incelemeler sırasında %22,5'inde hipofiz adenomu görülmüştür (Ezzat ve ark., 2004; Sivakumar ve ark., 2011). İleriki yıllarda yapılan çalışmada, manyetik rezonans (MR) görüntüleme ile normal populasyonda asemptomatik hipofiz tümörlerinin prevalansı %0,15-0,3 olarak hesaplanmıştır (Morris ve ark., 2009; Vernooij ve ark., 2007).

Amerika Birleşik Devletleri Merkez Beyin Tümörü (CBTRUS) Sicil'inin yayınlanan populasyon çalışmasında, 2004-2009 yılları arasında hipofiz tümörlerinin insidansı araştırılmış ve 2004 yılında 100.000 kişide 2,52 olarak hesaplanan yıllık insidansın 2009 yılında 3,13'e çıktığı görülmüştür (Gittleman ve ark., 2014). Bu artış diğer populasyon tabanlı çalışmaların sonuçlarını da destekler niteliktedir. Finlandiya'da hipofiz tümörlerinin 1992-2007 yılları arasındaki insidansın 100.000 kişide 3,8'den 4,2'e; (Raappana ve ark., 2010), İsveç'te 1958-1991 yılları arasında bir milyonda 6'dan 11'e (Nilsson ve ark., 2000), 1988-1998 yılları arasında İngiltere'nin Stoke-on Trent bölgesinde 1:3571'den 1:5263'e yükseldiği görülmüştür (Davis ve ark., 2001). Belçika'da yapılan kesitsel prevalans çalışmasında hipofiz tümörlerinin insidansı 1:1064 (Daly ve ark., 2006) iken İngiltere'de hipofizer adenomların prevalansı 100.000 de 77,6 olarak hesaplanmıştır (Fernandez ve ark., 2010).

Hipofiz adenomları tüm yaş gruplarında görülmesine karşın 3-5 dekadları arasında daha sık görülmektedir. Genel olarak fonksiyonel hipofiz adenomları daha genç yaşlarda görülür iken, ilerleyen yaşlarda nonfonksiyonel adenomların görülme sıklığı artmaktadır (Kovacs ve ark., 1986). Çocukluk çağında hipofiz adenomları oldukça nadirdir. Tüm primer pediyatrik beyin tümörlerinin sadece %2'sini oluşturur (Pollack, 1994).

Hipofiz adenomlarının kadınlarda ve erkeklerde görülme oranı eşittir (Mindermann ve ark., 1994). Kadınlarda prolaktin (PRL) ve adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgılayan adenomlar erken yaşlarda daha sık görülürken, erkeklerde ileriki yaşlarda fonksiyonel olmayan adenomların görülme eğilimi daha fazladır (Terada ve ark., 1995).

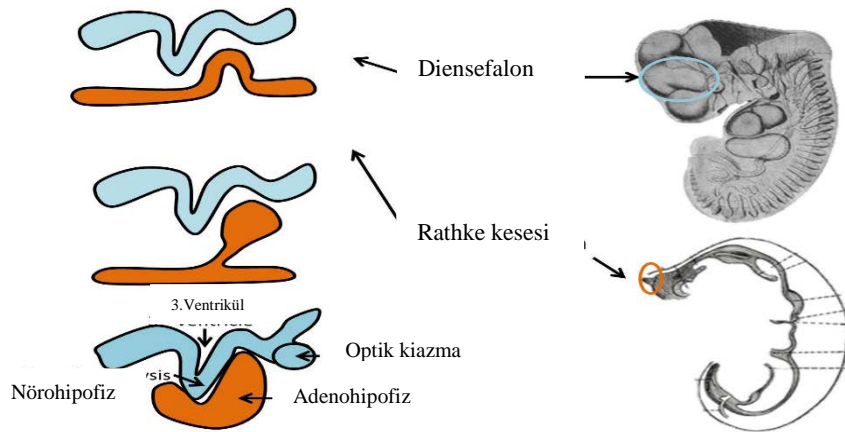
Prolaktinomalar, hipofiz tümörlerinin en yaygın görülen tipidir. Büyüme hormonu (GH) ve ACTH salgılayan hipofiz tümörleri, hipofiz tümörlerinin %10-15'ini oluşturur iken tiroid uyarıcı hormon (TSH) salgılayan tümörler oldukça az görülür (Asa, 1998).

Tüm hipofiz tümörlerinin sadece %3'ü otozomal dominant kalıtım gösteren Multiple Endokrin Neoplazi Tip-1 (MEN-1) sendromu ile bağlantılı olarak meydana gelir. MEN

sendromu olgularının %25'inde hipofiz tümörleri görülmekte ve bunlar genellikle GH ve PRL salgılayan hormonal aktif adenomlardır (Pamir, 2005; Scheithauer ve ark., 1987). MEN sendromu dışında kalan ailesel hipofiz adenomları Ailevi İzole Hipofiz Adenomu (FIPA) olarak adlandırılan hipofiz tümörlerinin aril hidrokarbon reseptör aracılı protein (AIP) geni ile ilişkili olduğu öne sürülmüş ve şimdiye kadar tüm dünyada yaklaşık 90 ailede tanımlanmıştır (Beckers ve ark., 2007; Leontiou ve ark., 2008).

1.2. Embriyoloji

Hipofiz bezi ektoderm orjinlidir ve gelişimin 4.haftasında iki ayrı bölümden gelişir. İki ayrı ektodermden oluştuğu için de iki farklı doku tipi içerir. Adenohipofiz (hipofiz ön lobu), glandüler yapıdadır ve oral ektodermden köken alır. Rathke kesesi ilkel ağız olan stomodeumun ektodermal tavanının yukarı doğru uzamasıyla oluşur ve adenohipofize farklılaşır. Nörohipofiz (hipofiz arka lobu) sinir dokusu yapısındadır ve nöroektodermden köken alır. İnfundibulum ise diensefalonun nöroektoderminden aşağı doğru olan bir uzantıdır ve nörohipofize farklılaşır (Şekil 1.1) (Carlson, 2001; Larsen, 2001).

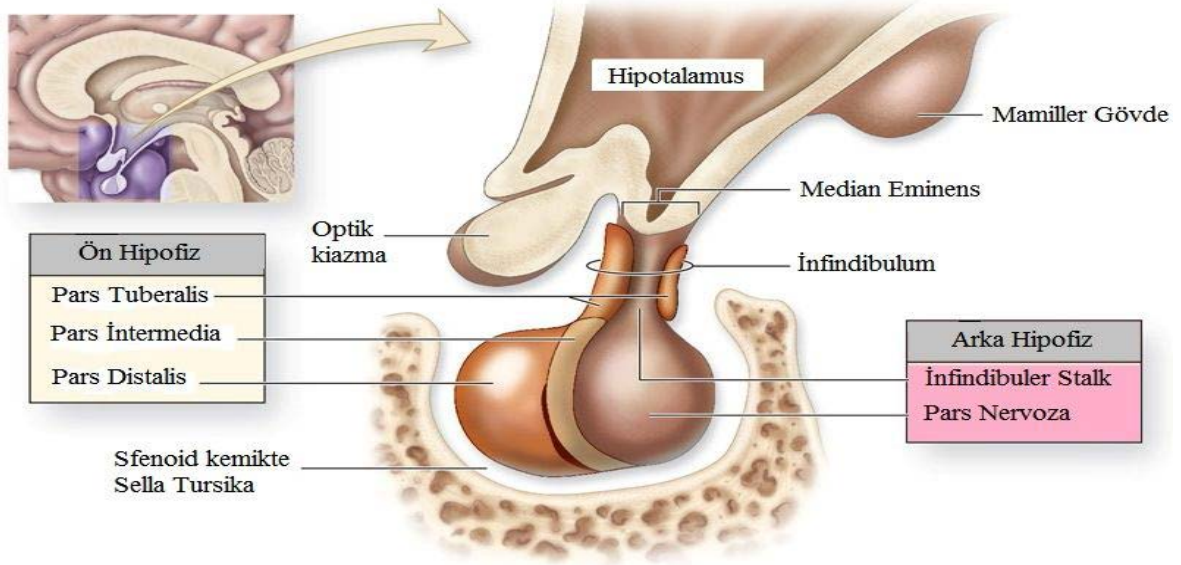


Şekil 1.1. Hipofiz gelişimi

1.3. Anatomi

Hipofiz bezi, transvers çapı 12-15 mm, ön-arka çapı 8-10 mm ve ağırlığı yaklaşık 500-600 mg olan oval şekilli bir bezdir. Sella tursikada yerleşmiş, beyin tabanında orta hatta yer alır ve üzerini dura uzantısı olan sellar diyafram örter. Diyaframın ortasındaki açıklıktan geçen hipofiz stalkı ile hipotalamusa bağlıdır. Hipofiz bezi 2 bölümden oluşmaktadır: ön bölümde adenohipofiz, arka bölümde ise nörohipofiz vardır. Bu iki bölüm arasındaki insanlarda yok sayılabilecek kadar küçük, ancak bazı aşağı grup hayvanlarda çok daha büyük ve işlevsel olan nispeten damarsız bir bölge olan pars intermedia vardır. Ara lob erişkinlerde rudimenter olmasına rağmen fetusta ve gebeliğin son dönemlerinde aktiftir. Pars distalis (anterior lob), ön hipofiz bezinin büyük bir kısmını oluşturur ve ön hipofiz hormonlarının

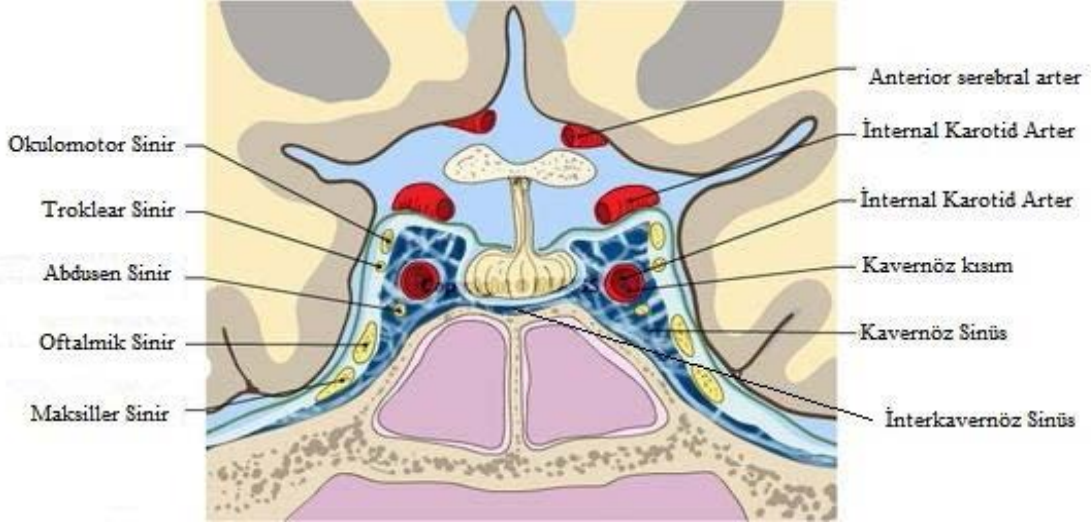
periferik dolaşıma salgılanmasından sorumludur. Pars intermedia (intermediate lob) pars distalis ile posterior hipofiz arasında uzanır ve hipofizial klef ile pars distalisten ayrılır. Pars tuberalis, ön lobun hipofiz sapı boyunca yukarıya doğru uzandığı kısımdır. Nörohipofiz ise infundibulum, hipofiz sapı ve arka lob olmak üzere üç bölüme ayrılır. Pars nervosa, arka hipofizin büyük bölümüdür. Median eminens, nörohipofizin pars tuberalis üstünde kalan kısmıdır. İfundibular stalk ise pars nervosayı beyine bağlayan kısımdır. Hipofiz dura ile kısmen çevrili bir organdır. Dura, sella tursika tabanını örterek hipofizi alttan çevreler. Bu bölgeden sonra kavernöz sinüslere atlayan ve sinüsün lateral yüzünü örten dura, yukarıya ve mediale doğru kıvrılarak hipofizin üst bölümünü örter. Hipofizi suprasellar yapılardan ayıran bu dura bölümü diafragma sella olarak adlandırılır. Diafragma sellanın merkezinde hipofiz sapının ve damar yapılarının geçtiği, çapı kişiden kişiye farklılık gösteren bir açıklık bulunur. Diafragma sella, hipofizden kaynaklanan tümörlerin suprasellar yayılımını engelleyen kısmi bir bariyer görevi görür (Şekil 1.2) (Netter, 1983; Standring, 2005).



Şekil 1.2. Hipofiz bezi ve anatomisi

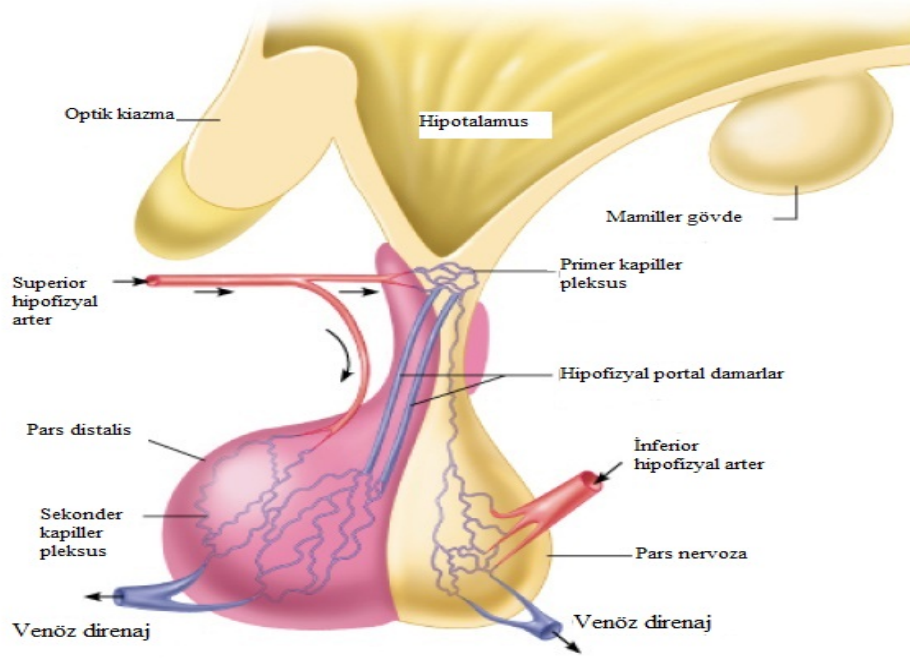
1.3.1. Hipofiz Bezinin Damarları ve Portal Sistem

Sellanın lateralinde kavernöz sinüsler ve içinde internal karotid arter, III., IV., V. ve VI. kranial sinirler, antero-inferiorunda sfenoid sinüs, antero-süperiorunda optik kiazma ve süperiorunda hipotalamus bulunur (Şekil 1.3) (Pernicone ve ark., 1997).



Şekil 1.3. Kavernöz sinüsler ve komşulukları

Hipofiz, arteriyal beslenmesini superior, orta ve inferior hipofizyal arterlerden alır; bunların tümü internal karotid arterden köken alır. İnterior hipofizeal arterler internal karotid arterden kavernöz sinüs içinden çıkar, sağ ve sol olmak üzere her bir tarafta tektir. Süperior hipofizeal arter ise her iki tarafta birkaç adetten oluşur; internal karotid arterin supraklinoid segmentinden çıkar ve hipofiz infundibulumu boyunca akar, hipofiz ön lobunu ve sapı besler; hipotalamustan hipofize düzenleyici hormonları taşır. Orta hipofizyal arter adenohipofizi direkt olarak besler. Hipofiz bezinde venöz dolaşım ana olarak internal juguler venlerle olur. Superior hipofizyal arterler infundibulum çevresinde, inferior hipofizyal arterler ise nörohipofiz çevresinde birer arter ağı oluştururlar. Superior hipofizyal arterden çıkan dallar genel olarak eminentia mediana ve infundibulumun üst kenarındaki sinüzoidlerde, inferior hipofizyal arterden çıkan dallar genel olarak infundibulumun alt kısmı ve nörohipofizdeki sinüzoidlerde sonlanır. İnfundibulumdaki sinüzoidler, vena portalis ve adenohipofizdeki sinüzoidlerin oluşturduğu sisteme hipofizin portal sistemi adı verilir. Adenohipofiz ve nörohipofizdeki sinüzoidler inferior hipofizyal venler aracılığı ile beyin venöz sinüslerine direne olurlar (Şekil 1.4) (Daniel ve ark., 1966; Gorczyca ve ark., 1987; Stanfield, 1960).



Şekil 1.4. Hipofiz bezinde dolaşım

1.4. Hipotalamus-Hipofiz Aksının Fizyolojisi

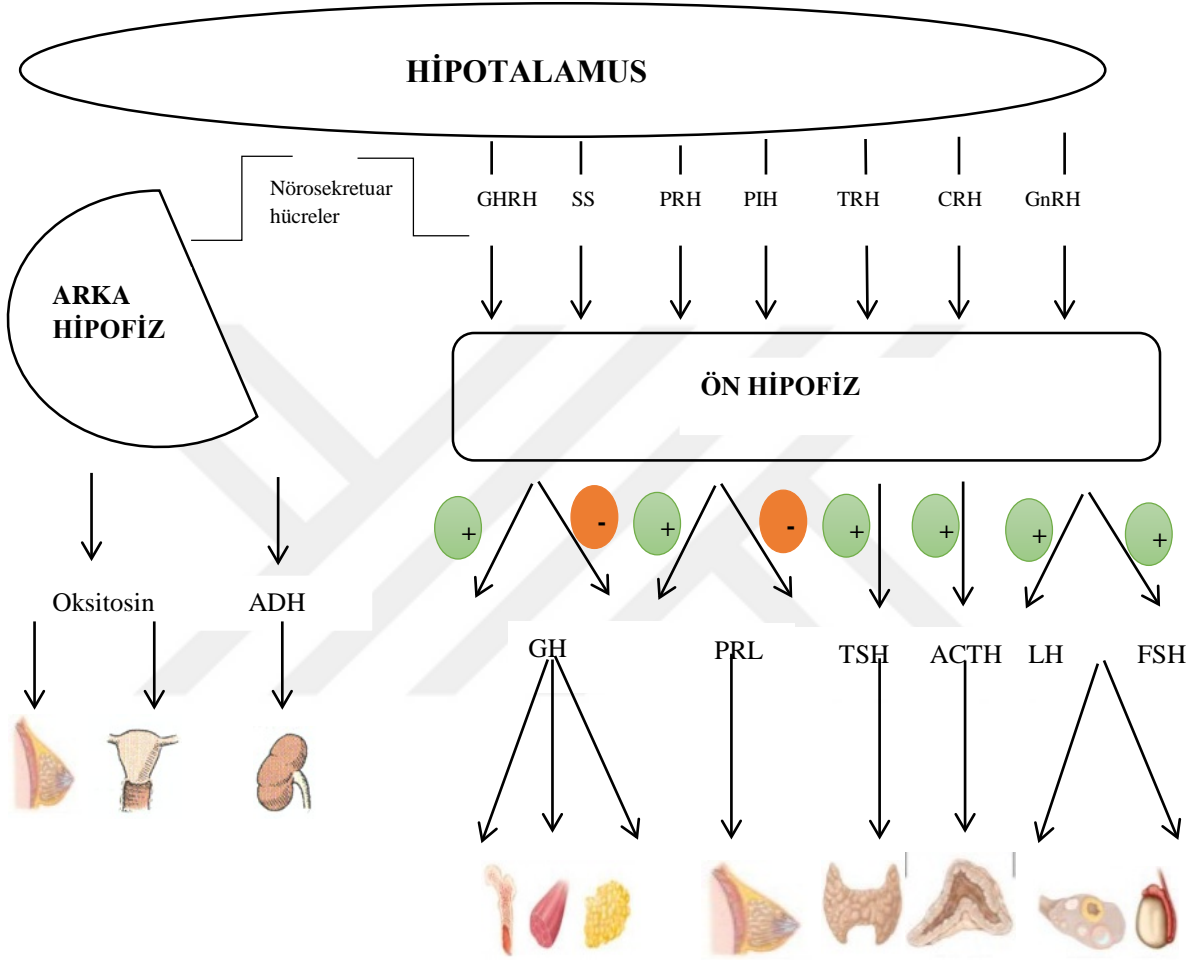
Santral sinir sistemi hipotalamus ve hipofiz aracılığıyla hormon yapımını düzenler. Hipofiz bezinin hemen hemen tüm sekresyonu, hipotalamusun hormonal ya da sinirsel sinyalleri ile kontrol edilir. Bu iki sistem arasındaki nöroendokrin uyum fizyolojik dengenin kurulmasında temel rol oynar. Bu iki organ birçok feedback sisteminin düzenlenmesinde merkezi rol üstlendiklerinden yönetici organlar olarak tanımlanırlar. Hipofizden salgılanan hormonların bir kısmı periferik yapılara direkt olarak etki ederken, bir kısmı ise tropik hormonlardır ve endokrin organlarda hormon yapımını kontrol eder. Hipofiz bezinde biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonun kontrolü 8 tane peptid hormonla sağlanır. Hipofiz ön lobundan altı adet ve arka lobundan iki adet hormon salgılanır. Ön lobda; somatotrop, laktotrop (mamatrop), kortikotrop, tirotrop ve gonadotrop hücre olmak üzere 5 tip hücre vardır. Bu hücrelerden salgılanan 6 farklı hormon, tüm vücudun metabolik fonksiyonlarının kontrolünde önemli rol oynar. Tablo 1.1’de bu hücre tipleri, ürettikleri hormonlar ve fizyolojik etkileri verilmiştir (Guyton ve Hall, 1996).

Tablo 1.1. Ön hipofiz hücre tipleri, ürettikleri hormonlar ve fizyolojik etkileri

| Hücre | Hormon | Kimyasal yapı | Fizyolojik Etki |
|--------------------------|--|--|---|
| Somatotropolar | Büyüme hormonu (GH) | 191 aminoasitlik tek zincir | Vücut büyümesini artırır, IGF-1 salgılanmasını ve lipolizi uyarır; insülinin karbonhidrat ve yağ metabolizması üzerindeki etkisini baskılar. |
| Kortikotropolar | Adrenokortikotropik Hormon (ACTH); kortikotropin | 39 aminoasitlik tek zincir | Adrenal kortekste glikokortikoid ve androjen yapımını uyarır, kortekse zona fasikulata ve zona retikularis bölümlerinin büyüklüğünü sabitler. |
| Tirotopolar | Tiroid stimülan hormon (TSH) | İki alt birimli glikoprotein α (89 aminoasit) β (112 aminoasit) | Tiroid folikül hücrelerinden tiroid hormonun yapımını uyarır, foliküler hücrelerin büyüklüğünü korur. |
| Gonadotropolar | Luteinleştirici hormon (LH) | İki alt birimli glikoprotein α (89 aminoasit) β (115 aminoasit) | Ovulasyona ve overlerde korpus luteum oluşmasını sağlar; overde östrojen ve progesteron yapımını, testiste testosteron yapımını uyarır. |
| | Folikül uyarıcı hormon (FSH) | İki alt birimli glikoprotein α (89 aminoasit) β (112 aminoasit) | Over foliküllerinin gelişimini uyarır; testislerde spermatogenezi düzenler. |
| Laktotropolar (Mamatrop) | Prolaktin (PRL) | 198 aminoasitlik tek zincir | Süt yapımını ve salgılanmasını uyarır. |

Arka lob ile ön lobu birbirine bağlayan orta kısımda sadece deri renginin ayarlanmasını sağlayan pigment hücrelerini (melanosit) uyaran melanosit uyarıcı hormon (MSH) salgılanır. Arka hipofizden salgılanan iki hormon farklı etkiler gösterirler. Antidiüretik hormon (vazopressin) (ADH) suyun idrarla atılmasını kontrol ederek, bu yolla vücuttaki su konsantrasyonunun düzenlenmesine yardım eder. Oksitosin, doğum sırasında uterusun kasılmasını ve doğum sonrasında meme bezlerinden süt salgılanmasını sağlar. Arka hipofiz

salgısı hipotalamustan kaynaklanan ve arka hipofizde sonlanan sinirsel uyarılarla kontrol edilir. Buna karşın ön hipofiz salgısı hipotalamusta salgılanan hipotalamus-hipofiz portal damarları denilen ince kan damarları ile hipofize iletilen hipotalamusun salgılatıcı ve baskılayıcı hormonları ile kontrol edilir (Şekil 1.5) (Guyton ve Hall, 1996).



Şekil 1.5. Hipotalamusun salgılatıcı ve baskılayıcı hormonları

TRH: Tiroid uyarıcı hormonun salgılanmasına neden olan tirotropin salgılatıcı hormon

CRH: Adrenokortikotropin salgılanmasına neden olan kortikotropin salgılatıcı hormon

GHRH: Büyüme hormonu salgılanmasına neden olan büyüme hormonu salgılatıcı hormon
 SS: Büyüme hormonu salgılanmasını baskılayan somatostatin olarak adlandırılan büyüme hormonu baskılayıcı hormon

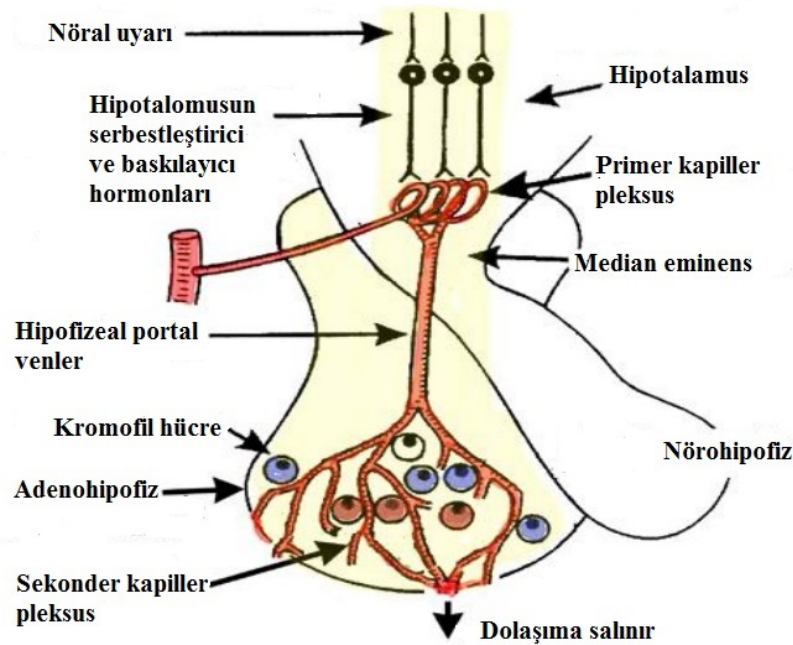
GnRH: Luteinleştirici hormon ve follikül stimüle edici hormonların salgılanmasına neden olan, gonadotropin salgılatıcı hormon

PRH: Prolaktin salgılanmasına neden olan prolaktin salgılatıcı hormon

PIH: Prolaktin salgılanmasını baskılayan prolaktin baskılayıcı faktör (dopamin)

Hipotalamustaki özel nöronlar, ön hipofiz salgısını kontrol eden hipotalamusun salgılatıcı ve baskılayıcı hormonlarını sentezler ve salgılar. Hipotalamusta yapılan ve median eminensde biriken bu hormonlar primer kapiller pleksusa girer buradan infundibulum boyunca hipofizyal portal venler tarafından anterior lobdaki sekonder kapiller pleksusa ulaştırılır. Burada kanı terk eden nörosekretuar hormonlar parankimal hücreleri stimüle veya inhibe eder. Böylece hipofizyal portal sistem pars distalisin hipotalamus tarafından hormonal düzenlenimi için kullanılan bir vasküler sistemdir (Şekil 1.6). Hipotalamusun farklı kısımlarından kaynaklanan nöron aksonları bu kapiller pleksuslar etrafında sonlanır. Bu aksonların uç kısımları vücudun diğer yerindeki aksonlardan farklıdır. Çünkü bunlar sinyali diğer hücreye aktarmak yerine salgılatıcı veya baskılayıcı hormonları direkt olarak primer kapiller yatağa salarlar. Bu hormonlar hipofizyal portal sistem tarafından alınır ve çeşitli anterior hipofizer hormonların salınımının düzenlendiği pars distalisin sekonder kapiller yatağına ulaştırılır (Guyton ve Hall, 1996).

Adenohipofizin salgı yapan hücrelerinde hormonlar endoplazmik retikulumda sentezlenir ve veziküllerde depolanır. Hipotalamustan salgılanan salgılatıcı hormonların stimülasyonu ile hücre membranına yaklaşan veziküller, perisinüzoidal alana ekzositoz ile atılırlar. Hormon granülleri interstisyel sıvıda çözünür ve hipofiz venöz sistemi ile sistemik dolaşıma katılır. Hipofizin arka lobunda ise hipotalamik olarak sentezlenerek nörohipofizdeki sinüzoidler aracılığıyla sistemik dolaşıma verilirler (Baxter ve ark., 1980) (Guyton ve Hall, 1996).



Şekil 1.6. Hipotalamus ile Ön hipofiz arasındaki ilişki

1.5. Sitoloji

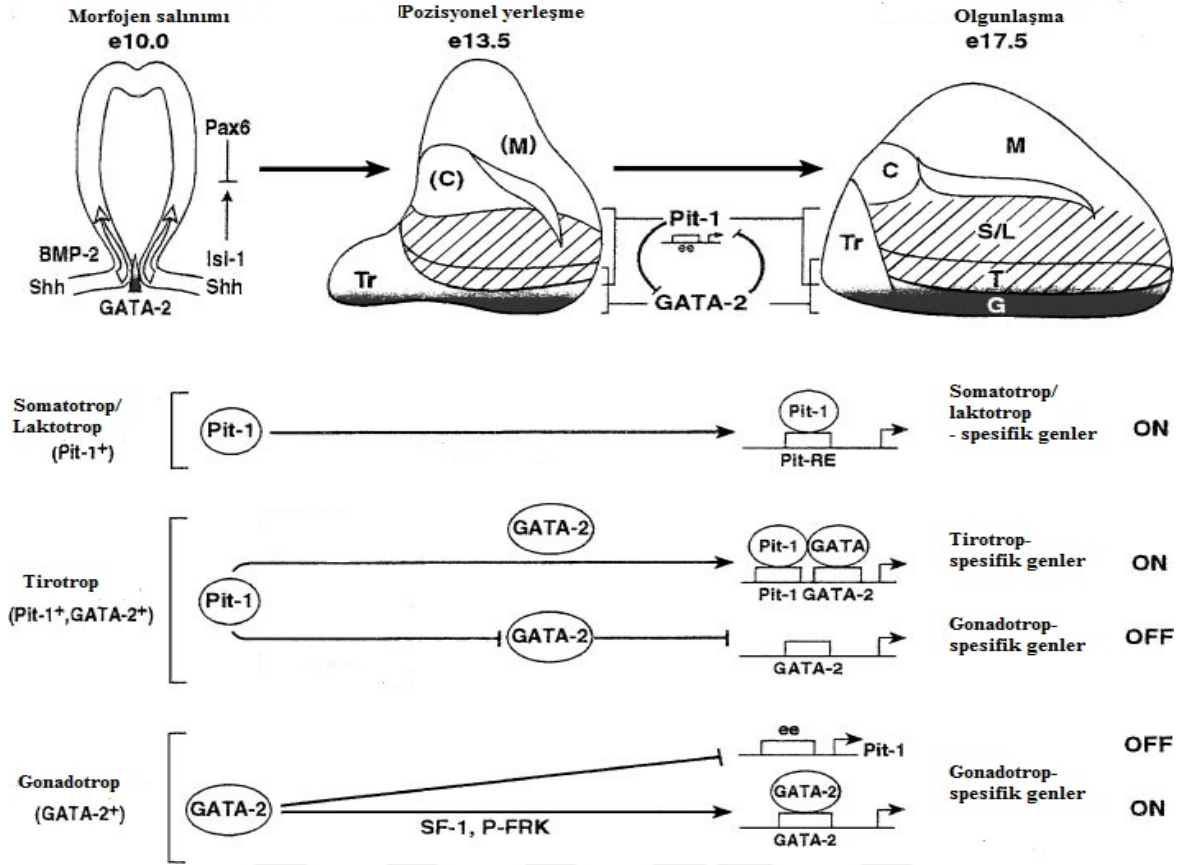
Ön lob, sinüsoidal kapiller tarafından ayrılmış kordonlar veya yığınlar şeklinde yerleşik büyük çaplı poligonal hücrelerden oluşmaktadır. Sinüzoidlerin endotel örtüsünün fenestratalı olması salgılatıcı faktörlerin tüm parankimal hücrelere difüzyonunu kolaylaştırır ve ayrıca parankima hücrelerin salgıları için geniş bir alan oluşturur. (Goodman, 1998). Bu hücrelerin stoplazmalarındaki salgı granüllerinin boya tiplerine afinitesi histolojik sınıflandırma yapılmasına imkan vermektedir. Pars distalisin boyalara afinitesi olan hücreleri kromofil (%50), boyalara afinite göstermeyen hücreleri ise, kromofob (%50) olarak isimlendirilir. Kromofiller ayrıca kendi aralarında asidofil (%10) (asit boya ile boyanan) ve bazofil (%40) (bazik boyalarla boyanan) olmak üzere ikiye ayrılır ve bunlar pars distalisin ana salgı hücre popülasyonunu oluştururlar (Guyton ve Hall 1996). GH salgılayan somatotroplar, ön hipofiz hücrelerinin yaklaşık %30-40'ını oluşturur. Genellikle ön lobun lateralinde yer alır ve asidofillerdir; granülleri eozin ile sarımtırak-kırmızı boyanır (Aron ve ark., 1997; Genuth 1998). Laktotroplar, küme veya gruptan ziyade tek tek hücreler şeklinde dağılım gösterir ve ön hipofiz hücrelerinin yaklaşık %20'sini oluşturur. Asidofillerdir ve granülleri azokarmin, eritrosin ve asit fuksin ile boyaları ile kırmızı renkte boyanır. Doğum sonrası laktotrop sayısı artar, sütle beslenme sona erdikten sonra, granüller ve laktotroplar sayıca azalır. Kortikotroplar, pars distalis boyunca seyrek dağılım gösteren, yuvarlak, ovoid hücreler olup parankimal hücrelerin yaklaşık %20'sini oluşturur. Granülleri bazik boyalar ile boyanır. Tirotroplar, sinüzoidlerin uzaktaki parankimal hücrelerin kordonları içinde derin bölgelerde bulunur ve parankimal hücrelerinin %5'ini teşkil eder. Salgı granülleri bazik boyalar ile boyanır. Gonadotroplar, parankimal hücrelerinin % 10'unu teşkil eder ve sinüzoidlere yakın yerleşmişlerdir. Salgı granülleri 200-400 nm arasında değişiklik gösterir ve bazik boyalar ile boyanır (Aron ve ark., 1997). Pars distalis ayrıca, esas hücre veya C hücreleri olarak adlandırılan sitoplazmaları çok az olduğu için tam olarak boyanamayan kromofob hücreler bulunur. Bu hücreler nonspesifik stem hücreler ve bazen de degranüle kromofil (rezerv) hücreler olarak da bilinmektedir. Salgılayıcı olmayan follükülostellat hücreler ise pars distalisin büyük bir hücre popülasyonunu oluştururlar. Fonksiyonları tam olarak bilinmiyorsa da, diğer follükülostellat hücrelerle gap junction oluşturan uzun uzantılara sahiptirler (Ganong, 2001).

Pars intermedia, kübik hücrelerle çevrelenmiş kolloid içeren kistler ile karakterizedir. Pars intermedia bazofilik ve kromofobik hücre grupları içerir. Bu hücre grupları sıklıkla pars nervosaya kadar uzanır. İnsanda pars intermedia hücrelerinin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Bu bazofillerin proopiomelanokortin (POMC) prohormonu salgıladığı ileri sürülmektedir. Bu prohormon posttransisyonel parçalanmalarla α -melanosit uyarıcı hormon (α -MSH), kortokotropin, β -lipotropin ve β -endorfini oluşturur. Buna karşın, ara lob insanda rudimenter olduğundan, POMC'nin aslında anterior lobun kortikotropin hücreleri tarafından salındığı ileri sürülmektedir. Pars tuberalis, kübikten prizmatığe kadar değişen bazofil

hücrelerden oluşur. Bu bazofilik hücrelerin sitoplazması, küçük yoğun granüller, lipid damlacıkları, kolloid damlacıkları ve glikojen içerir. Pars tuberalis tarafından salgılanan bir spesifik hormon tanımlanmamıştır. Pars nervosa, hipotalamik nörosekretuar nöronların çok sayıdaki akson ve akson terminallerine ilave olarak nörohipofiz, fibroblast, mast hücreleri ve pitüisitler içerir. Pitüisitler pars nervosa hacminin %25'ini doldurur. Pitüisitler; lipid damlacıkları, lipokrom pigmentleri ve ara filament içerirler. Komşu hücrelerle gap junction oluşturan çok sayıda sitoplazmik uzantı içerirler (Ganong, 2001; Lerner, 1981).

1.6. Hipofiz Oluşumunda Rol Alan Sinyal Molekülleri

Altı farklı hormon salgılayan hipofiz hücrelerinin ön şekillenmesi, çoğalması, hücre tipinin belirlenmesi ve hücrelerin belirli bir pozisyonda konumlanmaları çeşitli düzenleyici bölgelerden salgılanan bir dizi sinyal molekülü tarafından düzenlenir (Şekil 1.7). Hücre gelişimi, çeşitli sinyal faktörleri ile ya da direkt temas sonucu hücreler arası etkileşim ile ya da gen transkripsiyonunun düzenlenmesi ile hücrede birtakım olayların başlamasıyla gerçekleşmektedir. Morfojen olarak salgılanan veya direkt transmembran sinyal reseptörlerine dışarıdan gönderilen sinyaller, progenitor hücrelerin konumsal olarak belirlenmesi için lokal ortamların hazırlanması sağlar; proliferatif veya apoptotik olayları başlatarak hücrelerin özgün şeklini almasını düzenler. Bu sinyaller daha sonra azalarak yerlerini başka faktörlere bırakır ve bu alanlardaki hücrelerin en son özgün şekillerine dönüşmesini sağlarlar. Sinyallere göre hipofiz gelişimi 3 basamakta incelenebilir. İlk fazda transforming büyüme faktörü beta superailisi üyelerinden; kemik şekillendiren protein (BMP4), Wnt, fibroblast büyüme faktörü (FGF8) ve Sonic Hedgehog (Shh) gibi sinyallerin ortaklaşa etkisi organın ilk gelişimi için önemlidir. İkinci fazda Rathke kesesinin meydana geleceği alanda BMP2 ortaya çıkar. Bu fazda BMP2 ile FGF8 sinyallerinin ventral ve dorsal bölgedeki miktar farklılıkları özgün hipofiz hücrelerinin yerlerinin belirlenmesini sağlar. Üçüncü fazda ise BMP2 sinyalinin kaybı başka transkripsiyon moleküllerinin ortaya çıkmasına zemin hazırlayarak hücrelerin son şeklini almasını sağlar (Ökten ve ark., 2005; Burgess ve ark., 2002; Dasen ve ark., 2001).



Şekil 1.7. Hipofiz gelişiminin erken evrelerinde hücrelerin tespiti

1.6.1. Hücre Tiplerinin Tespitinde Transkripsiyon Faktörlerinin Rolü

Gelişmekte olan bezin çeşitli noktalarında bulunan hücreler farklı zamanlarda farklı sinyal moleküllerinin farklı miktarlarına maruz kalırlar. Böylece değişik yerlerde bulunan hücreler birbirinden farklı sinyaller algılar ve farklı transkripsiyon faktörleri ortaya çıkarır. Bunun sonucunda da özgün hücrelerin yerleri belirlenmiş olur (Ökten ve ark., 2009; Burgess ve ark., 2002; Dasen ve ark., 2001).

Hipofiz gelişiminin erken evrelerinde önemli rol oynayan LIM homeodomain sınıfı üyelerinden Lhx3, Lhx4 ve Isl-1 transkripsiyon faktörleri Rathke kesesinde eksprese olurlar. Lhx3, FGF sinyalleri etkisi ile ortaya çıkar ve rathke kesesinin gelişiminde özellikle embriyonik dönemin 10. haftasında belirgin olarak eksprese olur (Bach ve ark., 1995). Isl-1 ise BMP sinyalinin etkisi altındadır. BMP2 sinyalleri ventral bölge ile sınırlı olduğundan, daha sonraları Isl-1 miktarında da ventral-dorsal farklılık meydana gelir (Pfaff ve ark., 1996).

Organogenez basamaklarında önemli bir strateji de aynı DNA dizisine bağlanma kapasitesine sahip baskılayıcı ve aktive edici faktörlerin görev yapmasıdır. Hipofiz gelişiminde Hesx1 ve Prophet of Pit-1 (Prop-1) olarak adlandırılan iki paired-like homeodomain proteini görev yapar. Baskılayıcı görevi olan Rpx/Hesx1 hipofizin başlangıç gelişim ve çoğalmasında önemlidir. Prop-1 ise Pit-1 ekspresyonu ve gonadotropoların uygun

artışı için gereklidir. Yapılan çalışmalarda, Prop-1 mutasyonlarının çoklu hipofiz hormon eksikliğine sebebiyet verdiği gösterilmiştir (Wu ve ark., 1998; Fofanova ve ark., 1998).

Ventral ve dorsal bölgelerin farklılaşmasında ek transkripsiyon faktörleri rol oynar. Örneğin Pax6 dorsal-ventral alanlarda farklı miktarlarda bulunur ve Pax6 mutasyonunda ventralde tirotrop ve gonadotroplarda artış, dorsalde ise somatotrop ve laktotroplarda azalma meydana gelir. (Kioussi ve ark.,1999; Gallardo ve ark., 1999).

Bicoid-related Pitx homeodomain faktörlerinden Pitx1 ve Pitx2 hipofizin gelişiminde önemli rol oynarlar. Pitx1 gen hasarları, ventral gonadotrop ve tirotrop hücrelerinin terminal farklılaşması için gerekli olan markerlerin ekspresyonunda azalmaya neden olduğu gibi kraniyofasiyal ve arkabacak morfogenezinde defektlere de yol açmaktadır. Bu iki hücre tipindeki defektler, Pitx1'in öncelikli olarak ventralde yer alan hücre tiplerinde eksprese olduğu görüşünü destekler niteliktedir, bu da Pitx1'in dorsal sinyal molekülleri ile negatif veya ventral sinyal molekülleri ile pozitif yönde düzenlendiğini akla getirmektedir (Lanctot ve ark., 1999). Pitx2 ise, Pitx1'den yoksun dorsal bölgede bulunan hücre tiplerinde Pitx1 geninin yerini tutmaktadır. Pitx1 ayrıca POMC gen ekspresyonunu aktive edici etkiye sahiptir (Szeto ve ark., 1999). Pitx2 genindeki bozukluklarda ise 10,5 gün civarında hipofiz gelişimi durur. Yani erken değişim ve şekillenme fazında bozukluk olur. Pitx2 mutasyonları ayrıca dişlerde gelişim bozukluğu, vücut duvarında kapanma defektleri, sağ akciğer izomerizmi ile sonuçlanır (Szeto ve ark., 1996; Lin ve ark., 1999).

1.6.2. Özgün Hücre Tiplerinin Olgunlaşma Süreci

Organogenezin daha önceki basamaklarında bulunacakları yerleri tespit edilen ön hipofiz hücreleri, bundan sonra son olgunlaşma sürecine girerler. Somatotrop ve laktotrop hücreler arka-yan, kortikotroplar ön ve melanotroplar arka bölgelerde gelişirler. Her bir hücre tipi önceki basamakta geçici sinyal moleküllerinin miktarına göre şekillenirken, son basamakta ek spesifik transkripsiyon faktörleri de işe karışır. Bu faktörler; somatotrop, laktotrop ve tirotroplar için Pit-1, gonadotroplar için SF-1, POMC hücre serisi için ise Pit-1 ve STAT3'tür (Ökten ve ark., 2005; Scully ve ark., 2002).

Hipofize özgü bir transkripsiyon faktörü olan Pit-1, POU spesifik domain (POU-s) ve POU homeodomain (POU-h) denilen kısımlardan oluşmuş bir proteindir. Somatotrop, laktotrop, gonadotrop ve tirotrop serilerinin olgunlaşmasında önemlidir. Çoğu zaman diğer bazı moleküllerle sinerjistik etki yaparak hücrelerin farklılaşmasını sağlar. Örneğin prolaktin gen aktivasyonunu östrojen reseptörler ile gerçekleştirir (Tremblay ve ark., 1999; Ökten ve ark., 2005).

Somatotrop ve laktotroplarda hücreye özgü gen ekspresyonu, GH ve PRL genlerin promoter bölgesinde bulunan Pit-1 bağlayan bölgelerinin aktive olmasıyla gerçekleşir. Pit-1'in her iki hücrede birbirinden farklı etki yapma sebebi, her iki gen promotöründe bulunan

POU-s ile POU-h domainleri ile etkileşen DNA bölgeleri arasındaki uzaklığın birbirinden farklı olmasıdır (Andersen ve ark., 2001).

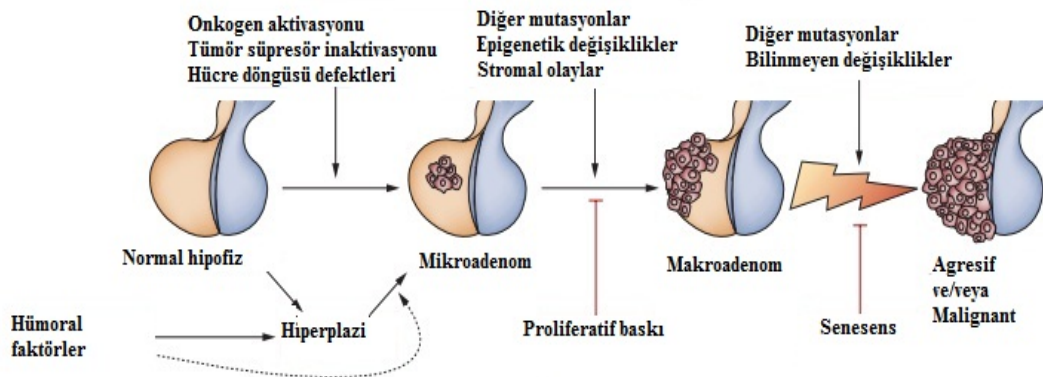
Tirotrop ile gonadotropun farklılaşmasında Pit-1 ile GATA2 karşılıklı görev yapar. Dorsal bölgelerde yüksek miktarda GATA2 bulunması, Pit-1 geninin başlangıçtaki aktivasyonunu baskılar, ancak otoregülasyon kazandıktan sonra baskılayamaz. GATA2 bu bölgede SF-1 ile epistatik etki yaparak hücrelerin gonadotrop yönünde gelişmesini sağlar. GATA2'nin düşük düzeyde bulunduğu yerlerde ise tirotroplar gelişir. Tirotroplarda bulunan yüksek miktardaki Pit-1, GATA2'nin fonksiyonlarını engeller (Ökten ve ark., 2005; Dasen ve ark., 1999; Gordon ve ark., 1997).

Hipofiz adenomlarındaki hücreye özgü Pit-1 gen ekspresyonu, bu transkripsiyon faktörünün sadece neoplazmaların fenotip ve hormonal aktivitesinin belirlenmesinde değil ayrıca adenomların büyümesinin kontrolünde de rol oynadığını akla getirmektedir (Asa ve ark., 1993; Friend ve ark., 1993; Pellegrini ve ark., 1994).

POMC geninin gelişmekte olan hipofiz bezinin ön periferinde ventral olarak aktive olması muhtemelen çevredeki mezenkim dokusundan bazı sitokinlerin ve benzer moleküllerin bu bölgeye ulaşması ile olur. T-box faktörlerden Tpit (insanda Tbx 19)'in POMC üreten hücrelerde meydana geldiği ve POMC genini aktive ettiği anlaşılmıştır. İnsanlarda hasarlı ACTH yapımının Tbx19/Tpit geni mutasyonları ile ilişkili olduğu kesin olarak gösterilmiştir (Lamolet ve ark., 2001; Ökten ve ark., 2005).

1.7. Hipofiz Tümörögenezi

Uzun yıllardır hipofiz adenomlarının gelişim mekanizmasında iki ana teori tartışılmaktadır. Bunlardan ilki hipofiz bezindeki hücrelerin primer defekti sonucunda, diğer teori ise aşırı hipotalamik stimülasyona bağlı olarak adenomun gelişmesidir. Her iki teori de hipofiz tümörögenезinin birden fazla basamakta gerçekleştiğinin göstergesidir (Şekil 1.8). Genetik faktörler hücrelerin transformasyonuna neden olarak geri döndürülemez tümör başlama fazını gerçekleştirir. Bunu çeşitli hormonal ve büyüme faktörlerinin etkisi ile promosyon fazı takip eder (Thapar ve ark., 1995).



Şekil 1.8. Hipofizer tümörögenез kaskadı (Melmed, 2011)

Hipofiz adenomlarının hemen hemen tamamına yakını monoklonalite gösterir (Jacoby ve ark., 1990). Bu bulgu patogeneizde tek bir adenohipofiz hücresinin neoplastik dönüşümünü destekler. Bu dönüşümü başlatan ve progresyonunu sağlayan genetik mutasyonlar, lokal parankimal büyüme faktörleri, hipotalamik salgılatıcı ve inhibe edici faktörlerin gelişmiş olan bir hipofiz adenomunun büyük boyutlara ulaşmasında veya invaziv özellik kazanmasında etkili olabileceği düşünülmektedir (Shimon ve ark., 1997; Thapar ve ark., 1997).

1.7.1. Hormonal Faktörler

- a) Stimülatör hormon salınımı; GHRH, CRH, TRH, GnRH
- b) İnhibitör hormon düzenlemesinde kayıp; dopamin, somatostatin, glukokortikoid hormonları, tiroid hormonları, gonadal hormonlar.

1.7.2. Moleküler Patogenez

Hipofiz tümörögenезinin altında yatan patogenetik mekanizmalar genetik veya epigenetik olabileceği gibi; hücre döngüsü düzenlenmesindeki bozukluklar, hücre içi sinyal ileti defektleri ve tümör süpresör faktörlerin fonksiyonel kaybı tümör progresyonunda etkili olan temel mekanizmalardır (Tablo 1.2)

Tablo 1.2. Hipofiz adenomalarının moleküler patogenezini ile ilişkili seçilmiş genler (Melmed, 2009)

| Gen | Fonksiyon | Aktivasyon/İnaktivasyon Şekli | Klinik |
|---------|------------------------|-------------------------------|--|
| GNAS | Onkogen | Aktive edici, imprinting | Ailesel olmayan, sendromik veya sporadik |
| CREB | Transkripsiyon faktörü | Fosforilasyon | Sporadik |
| AIP | Tümör süpresör | İnaktivasyon | Ailesel, sendromik |
| MEN1 | Tümör süpresör | İnaktivasyon | Ailesel, sendromik |
| PRKAR1A | Tümör süpresör | İnaktivasyon | Ailesel, sendromik |
| H-ras | Onkogen | Aktive edici | İnvaziv veya malignan |
| CCNB2 | Siklin | HMGA | Sporadik |

| Gen | Fonksiyon | Aktivasyon/İnaktivasyon Şekli | Klinik |
|---------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| CCND1 | Onkogen | Ekspresyon artışı | Sporadik |
| CDKN1B | CDK inhibitörü | İnaktivasyon | Sporadik, sendromik |
| HMGA2 | Onkogen | Ekspresyon artışı | Sporadik |
| FGFR4 | Onkogen | Alternatif transkripsiyon | Sporadik |
| PTTG | Sekürin | Ekspresyon artışı | Sporadik |
| Rb | Tümör süpresör | Epigenetik susturma | Sporadik |
| CDKN2A | Siklin bağımlı kinaz inhibitörü | Epigenetik susturma | Sporadik |
| BRG1 | Tümör süpresör | Glukokortikoid reseptör görevi | Sporadik |
| GADD45G | Proliferasyon inhibitörü | Epigenetik susturma | Sporadik |
| MEG3 | Proliferasyon inhibitörü | Epigenetik susturma | Sporadik |

1.7.2.1. Tümör Süpresör Gen İnaktivasyonu

Tümör süpresör genlerdeki sıkça rastlanan mutasyonlar hipofiz adenomlarında genellikle pek görülmez (Melmed, 2003). Retinoblastoma (Rb) (Prager ve Melmed, 1993), P53 (Thapar ve ark., 1996) ve nm23 (Clayton ve ark., 1997) tümör süpresör genlerindeki mutasyonlar ile inaktif olması agresif hipofiz tümörlerinde daha sık görülmektedir; bu durum bu faktörlerin hipofiz tümör progresyonunda etkili olduğunun göstergesidir.

1.7.2.2. Onkogen Aktivasyonu

Bazı onkogenlerin aktif mutasyonu sonucu hipofiz adenomlarının gelişmesinde ve ilerlemesinde rol aldığını destekleyen çalışmaların en önemlisi G- protein mutasyonlarıdır (Asa ve Ezzat, 1998). Gs alfa geni (GNAS), adenil siklaz aktive ederek siklik AMP (cAMP) ve protein kinaz A sinyal ileti yolağını indükler (Vallar ve ark., 1987) GNAS mutasyonları genellikle somatotrop adenomlarda (Lyons ve ark., 1990) izlenirken, ilerleyen çalışmalarda fonksiyonel olmayan hipofiz adenomlarında (Williamson ve ark., 1994) ve diğer fonksiyonel

neoplazilerde (Williamson ve ark., 1995) de izlenmiştir. McCune-Albright sendromu endokrin organlarının aşırı çalışması ile karakterize olan sporadik gsp mutasyonları sonucunda gelişen nadir bir sendromdur (Weinstein ve ark., 1991). Bu mutasyon aynı zamanda sporadik GH salgılayan tümörlerin yaklaşık %30-40'ında saptanmıştır ve agresif prolaktinomanın GH adenomuna değişimi ile alakalı olabileceği düşünülmektedir (Lania ve ark., 2010; Melmed, 2011; Jiang ve ark., 2013).

Ras onkogenindeki aktive edici mutasyonlar daha çok agresif hipofiz tümörlerinde daha görülmesi, bu mutasyonların tümörlerin az rastlanan malignant transformasyonunda etkili olabileceğini düşündürmektedir (Karga ve ark., 1992; Pei ve ark., 1994).

Protein kinaz-c (PKC), hücre çoğalması ve hormon salınımı gibi birçok hücre regülasyonu görevi olan kalsiyum ve fosfolipit bağımlı bir protein kinazdır. Hipofizer sinyal transdüksiyonda forbol ester tümör promotörü tarafından indüklenen PKC, pilot enzim görevini görmektedir (Alvaro ve ark., 1992). Kısıtlı sayıda yapılan çalışmalarda ise, PKC mutasyonları invaziv hipofiz adenomlarında saptanmıştır (Alvaro ve ark., 1993).

Hipofizer tümör transforme edici gen 1 (PTTG1) ilk olarak sıçanlarda hipofiz tümör hücrelerinden izole edilmiş ve E2F transkripsiyon faktörleri ile indüklendiği gösterilmiştir. Memelilerde, mitoz sırasında kardeş kromatidlerin ayrılmasından sorumlu pro-angiogenik hipofizer faktör olarak tanımlanmış olup, hipofizer adenomlara spesifik bir onkogendir (Pei ve Melmed, 1997). PTTG ekspresyonu, temel fibroblast büyüme faktörü (tFGF), TSH ve östrojen gibi çeşitli büyüme faktörleri ve hormonların etkisi altındadır. PTTG ekspresyonu azalmasının kromozomal instabilite ve anöpleudiye yol açtığı tahmin edilmektedir (Zou ve ark., 1999; Yu ve ark., 2000). PTTG1 gen ekspresyonu artışı tümör invazyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiş (Yu ve ark., 2004; Zhang ve ark., 1999), östrojen ile indüklenmiş hipofizer tümör gelişimini başlamasını uyardığı in vitro çalışmada gösterilmiştir (Heaney ve ark., 1992). Ayrıca, neoplazmlarda proliferasyon indeksin saptanmasında kullanılan, hücre bölünme markörü Ki-67 ve PTTG1 skorunun (PTTG1/Ki-67) %2-9'dan yüksek olması, hipofiz tümörlerinin agresif tutumlarıyla ilgili bilgi vermektedir (Wierinckx ve ark., 2007).

Yapılan çalışmalarda insan tümörogenesinde hücre proliferasyonu, motilitesi ve hayatta kalma gibi rollerde önemli bir sinyal ileti yolağı olan P13k/AKT'nın hipofiz adenomlarında artış olduğu gösterilmiştir (Musat ve ark., 2005). Ayrıca PIK3CA somatik gen mutasyonu ve amplifikasyonu hipofiz adenomlarında tanımlanmış olup, bu mutasyonun agresif ve nüks eden hipofiz tümörlerinde daha sık görüldüğü saptanmıştır (Lin ve ark., 2009).

1.7.2.3. Epigenetik Değişiklikler

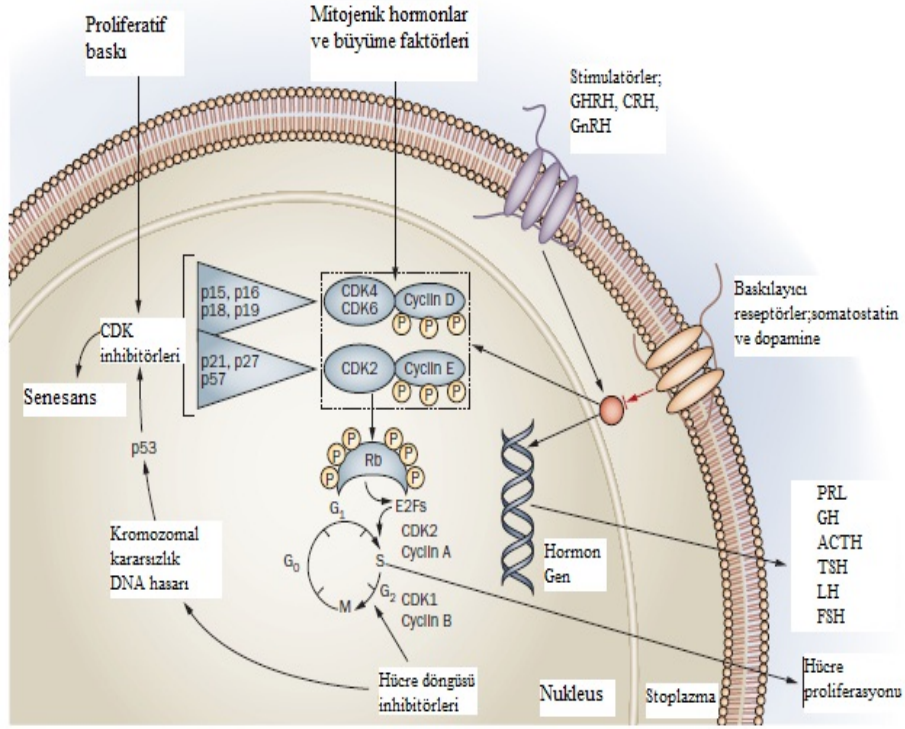
Rb1, p27 (Dahia ve ark., 1998), p16 (Woloschak ve ark., 1997), GADD45 γ (Bahar, Bicknell, Simpson, Clayton ve Farrell, 2004), MEG3 (Zhao ve ark., 2005) ve hipofizer tümör apoptotik gen (PTAG) (Bahar, Simpson, Cutty, Bicknell, Hoban, Holley, Mourtada-

Maarabouni, Williams, Clayton, R. N., & Farrell, 2004) gibi tümör süpresör genlerin epigenetik olarak olarak regülasyonun bozulması hipofiz tümörogenezinde giderek daha fazla önem kazanmaktadır (Asa ve Ezzat, 2009). GADD45- γ (Zhang ve ark., 2002) ve maternal imprint olan MEG3 (Zhang ve ark., 2010) hipofiz türevli süpresör genlerdir ve özellikle nonfonksiyonel hipofiz tümörlerinde metilasyon mekanizmalarıyla sessizleştirilmiştir. Epigenetik değişikliklerde DNA metiltransferaz (DNMT) enzim ailesi önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda DNMT3b'nin histon modifikasyonu yoluyla neoplastik hipofiz hücrelerinde yüksek oranda ifade edildiği gözlenmiş ve bu durum pRb, p21 ve p27 genlerinin susturulması yönünde etki ettiği gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2008). Diğer önemli bir faktör olan *Ikaros* hipofiz tümör hücrelerin kromatin yeniden modellendirilmesini düzenler (Ezzat, Mader, Yu, Ning, Poussier ve Asa, 2005). POMC promötörünü aktive ederek hipotalamik hipofiz sinyal yolağına entegre olmasını sağlar (Ezzat, Yu ve Asa, 2005).

Epigenetik değişikliklerde mikroRNA (miRNA)'lar giderek artan önem kazanmaktadır. ACTH salgılayan tümörlerde miR145, miR21, miR15 ve miR16 (Amaral ve ark., 2009) ekspresyonları azalırken, miR122 ve miR493 ekspresyonlarında artış gözlenmiştir (Stilling ve ark., 2010; Bottoni ve ark., 2007).

1.7.3. Sinyal Mekanizmaları

Hipofiz tümörogenezi; mitokondriyal fonksiyon, oksidatif stres, mitojenle-etkileşen protein kinaz sinyalizasyonu ve hücre döngüsü regülasyonu ile ilişkili ağları kapsamaktadır (Zhan ve Desiderio, 2010) (Şekil 1.9). İlerleyen zamanlarda bu tümörler ile ilişkili ağların aydınlatılması, hipofiz tümör patogenezi ve patofizyolojik işlevlerin birlikte anlaşılmasını sağlayacaktır.



Şekil 1.9 Hipofizer hücre proliferasyonu ve transformasyonu ile ilişkili hücre içi sinyalizasyon.

Farklılaşmış hücre ve hücre proliferasyonundaki hormonların gen transkripsiyonu çoğunlukla hipotalamik hormonlar ve transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere hipofizer mitojenik faktörler ve bunların yanı sıra endokrin hormonları tarafından indüklenir. Hipofizer proliferatif baskılayıcılar, somatotropin salgılatıcı-baskılayıcı faktörler ve tümör süpresör genleri içerir. Hücre döngüsünün G1 den S fazına doğru ilerleyişi CDK-siklin kompleksi aracılığıyla gerçekleşir. Bu kompleks, Rb fosforilasyonu sonucunda E2F faktörlerinin salınmasına ve hücre proliferasyonuna yönlendirir. CDK inhibitörleri kinaz fosforilasyonunu bloke ederek hücre döngüsünü baskı altında tutar. Kromozomal kararsızlık, DNA hasarı ve senesans hipofiz tümörlerinin malign dönüşümünü mecbur edebilir (Melmed, 2009).

1.7.3.1. Hücre Döngüsü Regülasyonu

pRB/E2F yolağının hipofiz tümörögenesinde önemli rol oynadığı deneysel fare modellerinde açıkça gösterilmiştir. Hücre döngüsünün çeşitli fazlarındaki kontrol noktaları, siklin ve siklin bağımlı kinazlar (CDK) tarafından düzenlenmektedir. Bu kinazlar aktive olduklarında hücre döngüsünün negatif regülatörü olan retinoblastoma proteinini (pRb) fosforilleyerek inaktive eder. Hipofosforilize olmuş aktif pRb, hücre döngüsünün G1 den S fazına ilerlemesini ve hatalı DNA'nın sürekli replikasyonuna neden olur (Melmed, 2011). Yapılan çalışmada Rb ekspresyonu en fazla nonfonksiyonel hipofiz adenomlarında

görüldürken, GH salgılayan adenomların yaklaşık %25'inde Rb gen promotörünün hipermetilasyonunu sonucunda ekspresyon kaybı gözlenmiştir (Simpson ve ark., 2000). CDK inhibitörleri (INK4 grubu: p16, p15, p18; CDKI grubu: p21, 27, p57), kinaz aktivitesini inhibe ederek fosforlanmasını engeller ve neticede pRb inaktivasyonuna neden olur. P16 normalde CDK4'ü inaktive ederek pRb fosforilasyonunu inhibe eder fakat incelenen birçok hipofiz tümör biyopsi örneklerinde, p16 kodlayan genin hipermetilasyon sonucunda sessiz hale geldiği gösterilmiştir (Simpson ve ark., 2004). P27 ekspresyon kaybı ile siklin E gen ekspresyonunun artması kortikotrop tümörögenezini kolaylaştırdığı öne sürülmüştür (Roussel-Gervais ve ark., 2010.). Siklin D1 kodlayan ve CDK4 ile hücre döngüsü kontrolünde önemli rol oynayan CCNDB1 geni, özellikle nonfonksiyonel hipofiz adenomlarında yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir (Melmed, 2011). Ayrıca bu gendeki mutasyonun tümör oluşumunun erken fazlarında etkili bir faktör olabileceği düşünülmektedir (Cander ve ark., 2012). Glukokortikoidlerin, POMC gen ekspresyonunu baskılayamaması sürekli sentezine ve aşırı salgılanmasına neden olur. Transkripsiyon aktivatörü olan Brg1'in fonksiyonu POMC'un baskılanmasını sağlamaktır. ACTH salgılayan adenomlarda, Brg1 kaybı kortikotroplarda glukokortikoid direncine neden olur. Çoğu kortikotrop ve hipofiz karsinomlarında hem p27 hem de Brg1 seviyeleri düşük ya da ölçülemeyecek düzeydedir (Bilodeau ve ark., 2006; Melmed 2011). p19/p53 hücre döngüsünü aktive eden bir kontrol noktası olarak iş gören ölüm ile ilişkili protein kinaz (DAPK) gen ekspresyon kaybı çoğunlukla hipofiz adenomlarında, özellikle invaziv hipofiz tümörlerinde saptanmıştır. İlerleyen çalışmalarda hem DAPK gen delesyonu hem de metilasyonu ekspresyon kaybından sorumlu olabileceği gösterilmiştir (Farrell, 2005).

High mobility group A (HMGA2) protein ailesi üyeleri, küçük nonhiston kromatin proteinleri olup, normal yetişkin dokularda eksprese olmayıp embriyogenez sırasında önemli ölçüde eksprese olurlar (Fedele ve ark., 2010). İnsanlarda, HMGA2 gen ekspresyonu ve yeniden düzenlenmesi ağırlıklı olarak prolaktinomalarda görülmekte olup HMGA2 mRNA artışı tümör büyüklüğü ve proliferasyon markörleri ile ilişkili bulunmuştur (Fedele ve ark., 2006). Ayrıca HMGA2 protein düzeyinin hipofiz tümörlerinin invazyon özelliği ve Ki-67 endeksi ile pozitif olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir (Fedele ve ark., 2010). Bunlara ilaveten; HMGA2, siklin-B2'yi up-regüle ederek E2F1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu artırır, daha sonra da hücre döngüsünü S fazına sürer (Fedele ve ark., 2006). HMGA1b ve HMGA2, siklin-B2 kodlayan CCNB2 gen regülasyonu ile hücre döngüsüne etki edebilme ve hipofiz hücre proliferasyonunu Pit1 ekspresyonunu direkt artırarak teşvik eder (Fedele ve ark., 2010; Palmieri ve ark., 2012)

1.7.3.2. Sinyal İleti Yolakları ve Sinyal Molekülleri

Hipofiz tümörögenezinde rol oynayan ve en çok çalışılan sinyal yolakları MAPK, AKT, RAS ve Wnt hücre içi kaskadlarıdır. Büyüme ve anjiyogenik faktörler hipofiz

tümörögenesinde çeşitli sinyal ileti yollarını aktive eden tetikleyici moleküllerdir. Fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), kemik morfojenik protein (BMP) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) aileleri ve Akt sinyal ileti yolağı hipofiz tümörögenez kaskadında yer alan üyelerdir. Ayrıca Wnt yolağı inhibitörlerinin normal hipofiz dokusuna göre hipofiz adenomlarında daha fazla ifade edildiğı görülmüştür (Elston ve ark., 2008). FGF2 ve fibroblast büyüme faktörü reseptörü 4 (FGFR4) tümör oluşumunda en fazla araştırılan büyüme faktörleridir. FGFR4 genindeki tek nükleotit polimorfizminin (SNP) büyüme hormonunu arttırdığı ve prolaktini azaltarak somatotroplardan hormonal dengesini değıştirdiğı gösterilmiştir. Ayrıca bu polimorfizm, mitokondrial STAT3 serin fosforilasyon ile ilişkilendirilmiş ve hipofizer büyüme hormon hücrelerinin tümörögenezini kolaylaştırdığı saptanmıştır (Tateno ve ark., 2011). İnsan hipofiz tümörlerinin yarısında FGFR2 gen düzenlenmesinin düşük olduğu saptanmış ve tümörlerin %45'inde FGFR2 geninin promotör bölgesinde metilasyon saptanmıştır (Ezzat, 2008). Ayrıca, FGFR2'nin varsayılan hedef genlerinden melanoma ilişkili antijen (MAGE-A)'in hipofiz tümörlerinde normal hipofiz dokuya göre önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Çelişkili bir biçimde, normal hipofizer dokuda MAGE-3 promotörünün hipermetilasyonu görülürken hipofiz tümörlerinde hipometile olduğu görülmüştür. Tüm bu çalışmalar birlikte ele alındığında, epigenetik değışimlerin FGFR2/ MAGE3 yolağının düzgün çalışması için önemli rol oynadığını düşündürmektedir (Ezzat, 2008). Transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β), epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) bağlanan ve hipofiz tümörlerinde yüksek oranda eksprese edilen bir büyüme faktörüdür (Heaney, 2005). Epidermal büyüme faktörü reseptör yolak substratı 8 (Eps) transkriptlerinin normal hipofiz dokuya göre tümör dokusunda daha fazla ifade edildiğı saptanmıştır. Yolak aktivasyonunu tetikleyici faktörlerin artışı, ERK yolağı üzerinden MAPK sinyal ileti yolağı ve AKT yolağı üzerinden PI3K yolağı aktivasyonu ile hipofiz hücrelerindeki proliferasyon ve anti-apoptatik faktörlerin aktivitesini arttırmaları. Tüm sinyal molekülleri hipofiz tümörlerinde yüksek oranda eksprese edilir, Eps8 protein düzeyi, aktive olmuş ERK ve AKT yolları gonadotropalarda saptanmıştır (Xu ve ark., 2009).

VEGF gibi anjiyogenik faktörlerin artışı, çoğu hipofiz tümör tiplerinde saptanmıştır. Hem FGF2 hemde VEGF ekspresyonları tümör büyüklüğü ve agresivitesi ile ilişkili bulunmuştur (Heaney, 2005). BMP4, kortikotrop tümör büyümesini baskılayıcı etki gösterirken, prolaktinomalarda aşırı miktarda ifade edildiğı saptanmıştır (Paez-Pereda ve ark., 2003).

1.7.4. Hipofizer Adenom Sendromları

Hipofiz adenomlarının yaklaşık %3'ünde otozomal dominant olarak kalıtılan ve değışken penetrans gösteren MEN-1 sendromu görülür (Scheithauer ve ark., 1987). Paratiroid hiperplazisi/adenomu, pankreatik endokrin hücre hiperplazisi/displazisi/tümörü

ve hipofiz adenomuyla karakterizedir. Penetrasyonu değişken oranda olduğundan, olguların ancak %25’inde hipofiz adenomu gelişir. Bunların çoğu PRL ve GH aşırı sekresyonu yapan makroadenomlardır (Ellison ve ark., 2008). Bu sendrom, 11q13’taki MEN-1 tümör süpresör geninde germline mutasyonla sonuçlanır. MEN1 gen ürünü olan menin proteini pek çok genin transkripsiyonunu düzenlemektedir. Sağlam alleldeki heterozigot kayıp (LOH) tümör formasyonu ile ilişkilidir (Ellison ve ark., 2008, Dong ve ark.,1997). MEN-1 benzeri özellikler gösteren fakat intakt MEN1 gen ile karakterize olan ve nadir görülen multipl endokrin neoplazisi tip 4 (MEN4)’de p27 germline mutasyonları tanımlanmıştır (Pellegata ve ark., 2006; Igreja ve ark., 2009).

MEN sendromu dışında kalan FIPA olgularının yaklaşık %15-25’inde, bir tümör süpresör gen olan AIP mutasyonu bildirilmektedir. AIP ilişkili adenomlar sıklıkla GH veya PRL üreten agresif adenomlardır. (Tichomirowa ve ark., 2011; Söylemezoğlu ve Aydın, 2014).

Carney sendromu otozomal dominant kalıtım gösteren bir diğer multipl endokrin neoplazisi formudur. Protein kinaz A’nın düzenleyici alt ünitesi 1 α ’yı kodlayan PRKAR1A genindeki germline mutasyon nedeni ile bu alt ünitenin inaktive olması sonucu kontrolsüz cAMP sinyalizasyonuna neden olur (Kirschner ve ark., 2000).

1.8. Hipofiz Tümörlerinin Sınıflandırılması

1.8.1. 2017 Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırması

2004 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’nün sınıflandırmasına göre, tümör hücrelerinin hormonal aktiviteleri, histolojik ve inceyapısal özelliklerinin kombinasyonu ile sınıflandırılma önerilmekte ve diğer sınıflamalardan farklı olarak atipik adenom kavramı yer almakta idi (DeLellis ve ark., 2004).

Tümör hücrelerinin hormonal aktivitelerine ek olarak, hücresel kökene göre tümör farklılaşmasındaki transkripsiyon faktörlerinin rolleri, tümör spesifik hormon üretimin düzenlenmesi ve olası adenom tümörogenezi tanımlanarak revize edilmiştir (ASA ve ark., 1993; Asa ve ark., 1996; Friend ve ark., 1993; Nihioka ve ark., 2015; Lloyd ve Osamura, 1997; Tani ve ark., 2011) (Tablo 1.3). Bu yeni yaklaşımda DSÖ sınıflandırması “hormon üreten adenom” kavramını terk ederek adenomların “adenohipofizyal hücre kökenine” göre tanımlanmasına bırakmıştır (Louis ve ark., 2016). Ayrıca atipik adenom terimi 2017 DSÖ sınıflandırmasında önerilmemekte, ancak tümör alt tipinin doğru tayin edilmesi, Ki-67 ve mitotik aktivite ile proliferasyon indeksi değerlendirilmesi, tümör invazyonu gibi klinik parametrelerin agresif adenomlarda göz önünde bulundurmasını önermektedir (Mete ve ark., 2012; Chatzellis ve ark., 2015; Raverot ve ark., 2015; Vasiljevic ve ark., 2016). Bu sınıflandırmada; seyrek granüllü somatotrop adenom, erkeklerde görülen laktotrop adenom, crooke hücreli adenom, sessiz kortikotrop adenom, Pit-1 pozitif plurihormonal adenomların

çeşitli alt tiplerin dahil olduğu ve tümör agresif tutumlarına göre “yüksek riskli hipofiz adenomları” olarak tanımlanmıştır (Xu ve ark., 2014; Alahmadi ve ark., 2012; Mete ve ark., 2016). 2017 DSÖ sınıflandırmasının diğer bir görüşü ise; aynı zamanda tiroid transkripsiyon faktör-1 (TFF-1) eksprese eden hipofiz tümörlerinin spektrumunu tanımlayan ve morfolojik spektrum açısından tek bir nozolojik varoluşu ifade eden, pituisitoma, adenohipofiz işçi hücreli onkositomu, sellar ependimom ve nörohipofiz granüler hücreli tümörlerin içerisinde bulunduğu sınıflandırmasıdır.

Tablo 1.3 2017 DSÖ Hipofiz Adenomlarının Patolojik Sınıflandırılması

| Adenom tipi | Morfolojik varyant | Hormonal aktivite | Transkripsiyon faktörü |
|--------------------|--------------------------------------|---|---------------------------|
| Somatotrop Adenom | Yoğun granüllü somatotrop adenom | GH, α -altbirim | Pit-1 |
| | Seyrek granüllü somatotrop adenom | GH | Pit-1 |
| | Mammomatotrop adenom | GH+PRL, α -altbirim | Pit-1, ER α |
| | Mikst somatotrop ve laktotrop adenom | GH+PRL, α -altbirim | Pit-1, ER α |
| Laktotrop adenom | Seyrek granüllü laktotrop adenom | PRL | Pit-1 |
| | Yoğun granüllü laktotrop adenom | PRL | Pit-1, ER α |
| | Asidofil kök hücre adenom | PRL, GH | Pit-1, ER α |
| Tirotrop adenom | | β -TSH, α -altbirim | Pit-1, GATA2 |
| Kortikotrop adenom | Yoğun granüllü kortikotrop adenom | ACTH | Tpit |
| | Seyrek granüllü kortikotrop adenom | ACTH | Tpit |
| | Crooke hücreli adenom | ACTH | Tpit |
| Gonadotrop adenom | | β -LH, β -FSH, α -altbirim | SF-1, ER α , GATA2 |

| Adenom tipi | Morfolojik varyant | Hormonal aktivite | Transkripsiyon faktörü |
|-------------------------|--|---|------------------------|
| Null hücreli adenom | | - | - |
| Plurihormonal adenomlar | Pit-1 pozitif plurihormonal adenom (önceki sınıflandırmada sessiz alt tip-3 adenom olarak adlandırılan) Sıradışı plurihormonal adenom | GH, PRL, β -TSH \pm α -altbirim Multipl kombinasyonlar | Pit-1 |

1.8.2. 2004 Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırması

Hipofiz adenomları büyüklüklerine, radyolojik görünümüne, endokrin fonksiyonlarına, morfoloji ve sitogeneze uygun olarak sınıflandırılabilirler.

Evrensel olarak kabul edilmiş Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün sınıflaması beşli adenohipofizyal sınıflamadır (DeLellis ve ark., 2004) (Tablo 1.4).

- Salgı aktivitesi ve klinik prezentasyon (akromegali gibi)
- Büyüklük ve yaygınlık (Hardy grade)
- Histolojik özellikler (tipik veya atipik histoloji)
- İmmünohistokimyasal profil
- Utrastrüktürel (EM'ik) alt tip

Tablo 1.4. Hipofiz Tümörlerinin 2004 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Sınıflaması

| Adenom Tipi | Sıklık % | E/K oranı | İmmünohistokimyasal Profil | Klinik Görünüm |
|--------------------------------|----------|-----------|---|---|
| Seyrek granüllü PRL Salgılayan | 27.0 | 1:2.5 | PRL | Amenore-galaktore sendromu (kadınlarda) Sellar kitle, hipogonadizm (erkeklerde) |
| Yoğun granüllü PRL salgılayan | 0.04 | - | PRL | |
| Yoğun granüllü GH salgılayan | 7.1 | 1:0.7 | GH, α -subunit (PRL, TSH, LH, FSH) | Akromegali |
| Seyrek granüllü GH salgılayan | 6.2 | 1:1.6 | GH (PRL α -subunit) | |
| Mikst GH+PRL salgılayan | 3.5 | 1:1.1 | GH, PRL (α -subunit, TSH) | Akromegali + Hiperprolaktinemi |
| Mammomatotrop adenom | 1.2 | 1:1.1 | GH, PRL (α -subunit, TSH) | |

| Adenom Tipi | Sıklık % | E/K oranı | İmmunohistomkimyasal Profil | Klinik Görünüm |
|------------------------------------|----------|-----------|--|--|
| Asidofil kök hücreli adenom | 1.6 | 1:1.5 | PRL, GH | Hiperprolaktinemi Nadiren Akromegali |
| Yoğun granüllü kortikotrop adenom | 9.4 | 1:5.4 | ACTH (LH, α -subunit) | Cushing hastalığı; Nelson sendromu |
| Seyrek granüllü kortikotrop adenom | Nadir | - | ACTH | |
| Tirotrop adenom | 1.1 | 1:1.3 | TSH (GH, PRL, α subunit) | Hipertiroidizm |
| Gonadotrop adenom | 9.8 | 1:0.8 | FSH, LH, α -subunit (ACTH) | Nonfonksiyonel sellar kitle |
| Sessiz kortikotrop adenom subtip 1 | 1.5 | 1:1.7 | ACTH | Nonfonksiyonel sellar kitle; pitüiter apopleksi |
| Sessiz kortikotrop adenom subtip 2 | 2.0 | 1:0.2 | β -endorfin, ACTH | Nonfonksiyonel sellar kitle |
| Sessiz subtip 3 | 1.4 | 1:1.1 | Anterior pitüiter adenomla herhangi bir kombinasyonu | Prolaktin salgılayan adenoma benzer (kadınlarda) Non-fonksiyonel sellar kitle |
| Null cell adenom | 12.4 | 1:0.7 | İmmün negatif (FSH, LH, TSH, α - subunit) | Non-fonksiyonel sellar kitle |
| Onkositom | 13.4 | 1:0.5 | İmmün negatif (FSH, LH, TSH, α - subunit) | Nonfonksiyonel sellar kitle |
| Sınıflandırılmayan | 18 | - | - | Değişken |

1.8.3. Fonksiyonel Sınıflama

Klinik özelliklere dayanan bu sınıflamada, tümörler hormonal aktivitelerine bağlı olarak fonksiyonel veya non-fonksiyonel olarak adlandırılırlar. Fonksiyonel adenomlar amenore-galaktore sendromu, akromegali veya gigantizm, sekonder hipertiroidizm ve Cushing hastalığı veya Nelson sendromu gibi klinik fenotipleri yapan, PRL, GH, TSH veya ACTH salgılayan adenomlardır. Hiperseksiyonla alakasız gonadotrop adenom, null cell adenomlar, onkositomalar ve çeşitli sessiz adenomlar gibi tümörlerin hepsi nonfonksiyonel adenomlardır (Tablo 1.5) (DeLellis ve ark., 2004; Thapar ve ark., 1980).

Tablo 1.5. Hipofiz adenomlarının fonksiyonel sınıflandırılması

| FONKSİYONEL ADENOMLAR | FONKSİYONEL OLMAYAN ADENOMLAR |
|--------------------------------------|--|
| GH FAZLALIĞI İLE SEYREDEN | |
| Somatotrop Adenom (Yoğun granüllü) | |
| Somatotrop Adenom (Seyrek granüllü) | |
| Mammosomatotrop adenom | Sessiz laktotrop adenom Sessiz |
| HİPERPROLAKTİNEMİ İLE SEYREDEN | |
| Laktotrop Adenom | Sessiz laktotrop adenom |
| Asidofil kök hücreli adenom | Sessiz laktotrop adenom |
| TSH FAZLALIĞI İLE SEYREDEN | |
| Tiroptop Adenom | Sessiz tiroptrop adenom |
| ACTH FAZLALIĞI İLE SEYREDEN | |
| Kortikotrop adenom (Yoğun granüllü) | Sessiz kortikotrop adenom |
| Kortikotrop adenom (Seyrek granüllü) | Sessiz kortikotrop adenom |
| GONADOTROPİN FAZLALIĞI İLE SEYREDEN | |
| Gonadotrop adenom | Sessiz gonadotrop adenom (null cell adenom, onkositom) |
| SINIFLANDIRILAMAYAN ADENOMLAR | |
| Plurihormonal adenomlar | İmmunnegatif adenomlar |

1.8.4. Radyolojik/Anatomik Sınıflama

Tümör büyüklüğü ve invaziv derecesine göre radyolojik açıdan sınıflandırılan en yaygın kullanılan sınıflandırma Hardy sınıflandırmasıdır (Hardy, 1973). Büyüklüklerine göre hipofiz adenomları mikroadenom ve makroadenom olarak ayrılırlar. Çapı 10 mm ve küçük olan adenomlar mikroadenom, 10 mm'den büyük adenomlar ise makroadenom olarak adlandırılır. Mikroadenomlar sellar görünüme göre Grade 0 ve 1; diffüz sellar genişleme, fokal destrüksiyon ya da kafatasında ekspansif erozyon yapan tümörler sırasıyla Grade 2, 3, 4 olarak sınıflandırılırlar.

Grade 0: İntrahipofizer adenom, çap <1 cm, normal sella

Grade I: İntrahipofizer adenom, çap <1 cm, fokal bir taşma veya sellada minör değişikliklerin görülmesi

Grade II: İntrasellar adenom, çap >1 cm, genişlemiş sella, fakat erozyon yok

Grade III: Diffüz adenom, çap >1 cm, genişlemiş sella, lokalize erozyon veya destrüksiyon

Grade IV: İnvaziv adenom, çap >1 cm, kemik yapılarda ekspansif destrüksiyon (Fantom sella)

1.8.5. Histolojik Sınıflama

Sitoplazmik boyanma özelliklerine göre asidofilik, bazofilik ve kromofobik olarak yapılmıştır. Asidofilik adenomlar GH salgılayan adenomlar, bazofilik adenomlar ise ACTH salgılayan adenomlardır. Boyanmayan tümörler topluca kromofobik tümörlerdir ve hormon olarak inaktiftirler. Yeni metodların kullanılmasıyla sitoplazmanın boyanma özelliklerinin hücre tipinin tanınması, sekretuar aktivitesi ve sitogenezis ile çok az alakalı olduğu anlaşılmıştır (Horvath ve ark., 1997).

1.8.6. İmmünohistokimyasal/Elektron Mikroskopik Sınıflama

İmmünohistokimyasal (İHK) yöntem ve elektron mikroskopik (EM) kullanımı hipofiz adenomlarının sınıflandırılmasında en yaygın kullanılan metotlardır. İHK'sal yöntem ile tümör hücrelerindeki salgı granüllerinin içinde depolanan hipofiz hormonlarının belirlenmesi söz konusudur. Ancak tek başına hormon içeriğine göre yapılan alt tiplendirme yetersiz kalmakta bu nedenle ek olarak keratinler (düşük molekül ağırlıklı keratin, CAM5.2, sitokeratin 7, sitokeratin 8) ve adenohipofiz hücre diferansiyasyon transkripsiyon faktörlerinin (Pit-1, Tpit, SF-1, ER, TEF, GATA-2 vb) immünreaksiyonlarının sağladığı bilgi baz alınır (Tablo 1.6). Tüm bunlara ek olarak, adenomların rekürrens ve agresif davranış özelliklerini açıklamaya yönelik proliferasyon belirteçleri (Ki-67, p27), fibroblast büyüme faktörü reseptörü-4 (FGFR-4) ve p53 immünohistokimyasal incelemelerinin de rutin adenom incelemeleri kapsamında yer alması gereklidir (Asa, 1998; Ellison ve ark., 2008; Ezzat ve Asa, 2006).

Tablo 1.6. Hipofiz adenomlarının immünohistokimyasal sınıflandırılması

| Adenom tipi | Transkripsiyon faktörü | Hormon | Keratin |
|--------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| GH içeren adenomlar | | | |
| Yoğun granüllü Somatotrop Adenom | Pit-1 | GH, α -SU | Perinükleer |
| Seyrek granüllü Somatotrop Adenom | Pit-1 | GH | Fibröz cisimcik |
| Mammosomatotrop adenom | Pit-1, ER | GH, PRL, α -SU | |
| Mikst somatotrop ve laktotrop adenom | Pit-1, ER | GH, PRL, α -SU | |
| Plurihormonal GH salgılayan adenom | Pit-1, ER | GH, PRL, α -SU, β -TSH | |

| Adenom tipi | Transkripsiyon faktörü | Hormon | Keratin |
|------------------------------------|-------------------------------|---|-----------------|
| PRL içeren adenomlar | | | |
| Seyrek granüllü laktotrop adenom | Pit-1, ER | PRL (Golgi tipi) | |
| Yoğun granüllü laktotrop adenom | Pit-1, ER | PRL (Diffüz tip) | |
| Asidofil kök hücre adenom | Pit-1, ER | PRL (Baskın), GH | Fibröz cisimcik |
| TSH içeren adenomlar | | | |
| Tirotrop adenom | Pit-1, TEF, GATA-2 | β -TSH, α -SU | |
| ACTH içeren adenomlar | | | |
| Yoğun granüllü kortikotrop adenom | Tpit | ACTH | |
| Seyrek granüllü kortikotrop adenom | Tpit | ACTH | |
| Crooke hücreli adenom | Tpit | ACTH | Bantlaşma |
| Gonadotropin içeren adenom | | | |
| Gonadotrop adenom | SF-1, ER, GATA-2 | β -LH, β -FSH, α -SU | |
| Plurihormonal adenomlar | | | |
| Sessiz Subtip III adenom | Pit-1, ER | Multipl | |
| Sıradışı plurihormonal adenom, NOS | Multipl | Multipl | |
| Hormon içermeyen adenomlar | | | |
| Null hücreli adenom | Yok | Yok | |

EM incelemesi ise salgı granüllerinin sitoplazmadaki yerleşim özellikleri, yoğunlukları, boyutları ve şekillerine göre yapılan bir sınıflandırma olup, vakaların klinik özellikleriyle yakın ilişki gösterir. Bu incelemeler ile özellikle plurihormonal adenom, asidofil kök hücre adenomu ve sessiz subtip III adenom gibi özel hipofiz adenomlarının tanısının doğrulanması, İHK'sal olarak negatif sonuç alınan null hücreli adenom tanısının doğrulanması, mikst somatotrop ve laktotrop adenom ile mammosomatotrop adenomların

ayırımı için ve sınıflandırılmayan adenomlarda immünohistokimyasal incelemelere ek olarak uygulanan bir methodur (Asa, 2008; Asa, 2009; Mete, 2011).

Adenohipofizyal hücre farklılaşmasında ve hormon üretiminde rol oynayan moleküler belirteçlerin tanımlanması ile önümüzdeki günlerde yeni sınıflandırılmaların taslağını oluşturabileceği düşünülmektedir.

1.9. Mikroarray Teknolojisi

DNA'nın moleküler yapısının anlaşılmasının ardından biyoteknolojik araştırmalar da hız kazanmıştır. Son yıllarda, yeni bir teknoloji olan DNA mikroarray teknolojisi moleküler biyoloji alanındaki araştırmaların hızını önemli derecede arttıran yeni ve güçlü bir teknolojidir. DNA mikroarray analizleri şu anda tek bir uygulama ile binlerce hatta milyonlarca farklı DNA dizisini analiz etme imkânı sağlamaktadır. Bilim adamları mikroarray teknolojisini büyüme ve gelişimi farklı açılardan anlamak ve birçok hastalığın altında yatan genetik sebeplerin keşfi için kullanmaktadırlar.

1.9.1. DNA Mikroarray Nedir?

Mikroarray genellikle cam, naylon membran veya silikon yapıdaki katı yüzeyler üzerinde minyatürize alanlara yerleştirilmiş milyonlarca birbirine denk tek iplikli DNA parçacıkları (prob), antikor veya epitopik belirteçler aracılığıyla bir genomda depolanmış olan bilgilerin hibridizasyon gibi özgün kimyasal bağlanma temeline dayanan bir prensiple incelenmesi tekniğidir. Yüzeye tutturulan bu DNA segmentlerinin (20 ile 100 ya da daha fazla nükleotid uzunluğunda olabilir) binlercesi tek bir DNA mikroarray'inde birlikte kullanılabilir. Standart mikroarray'lerde problar yüzey mühendisliği yolu ile katı bir yüzeye (kimyasal matriks= epoksi-silan, amino-silan, lizin, poliakrilamid veya diğerleri) kovalent bağ yardımıyla tutturulmaktadır. Katı yüzey cam ya da silikon çip olabileceği gibi mikroskobik boncuklardan da oluşabilmektedir (İpekdal, 2006).

Gen ekspresyonunun mikroarray'ler kullanılarak ölçülmesi biyoloji ve tıbbın pek çok alanında uygulanabilirlik arz etmektedir. Örneğin mikroarray'ler hastalıklı ve normal bir hücrede gen ekspresyonunun karşılaştırılması suretiyle hastalık ile alakalı genlerin belirlenmesinde kullanılabilir. Bunun yanı sıra SNP'lerin taranması, mutant genomların sekanslanması ve genotiplemede kullanılmaktadır.

1.9.2. Mikroarray Tarihçesi

Mikroarray teknolojisi DNA'nın bir substrata tutturulup bilinen bir gen ya da fragment ile prob hazırlanması şeklinde tanımlanabilecek "Southern blotting" tekniğinden türetilmiştir (İpekdal, 2006). Array'lerde ekspresyon profili için farklı DNA topluluklarının kullanılması ilk olarak 1987 yılında açıklanmış ve array'lenen bu DNA'lar interferon

tarafından ifadeleri değişen genlerin tanımlanması için kullanılmıştır (Kulesh ve ark., 1987) Bu ilk array'ler iğne spotlama aracının kullanılması ile filtre kağıdı üzerine komplementer DNA (cDNA)'ların spotlanması sonucu oluşturulmuştur. Minyatürize mikroarray'lerin gen ekspresyon profilinde kullanılması ilk olarak 1995 tarihinde bildirilmiş (Schena ve ark., 1995) ve mikroarray üzerinde tam ökaryotik genomu (*Saccharomyces cerevisiae*) 1997 yılında yayımlanmıştır (Lashkari ve ark., 1997).

1.9.3. Mikroarray Substratları

Geleneksel hibridizasyon yöntemlerinde nitroselüloz ve naylon gibi esnek membranlardan yararlanılmıştır. Bunun aksine mikroarray veya biyoçip yöntemlerinde katı yüzeyler kullanılmaktadır. Katı yüzeyin avantajı, gözeneksiz olması ve böylece belirlenen bölgede biyokimyasal materyalin küçük miktarlarının depolanabilir olmasıdır. Gözeneksiz substrat ise biyoçip üretimi ve kullanımı sırasında organik ve floresan bileşiklerin hızlı uzaklaştırılmasını sağlayarak substrat matriks içindeki çözeltilerin ve örneğin absorpsiyonunu önlemektedir. Gözeneksiz yüzey, yüksek örnek derişimleri ve hızlı hibridizasyon kinetiği sağlayarak küçük örnek hacimlerinin kullanılmasına olanak sağlar. Ayrıca katı bir substrat mikroarray elementlerinin kalitesini arttıran değişmez bir yapışma yüzeyi de sağlamaktadır (Schena ve Davis, 2001).

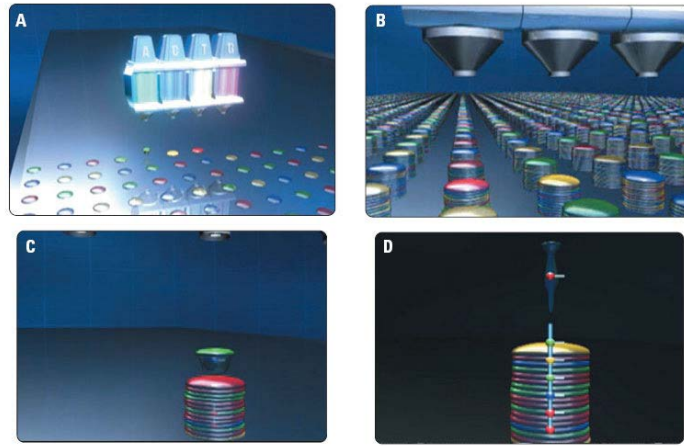
1.9.4. Mikroarray Üretim Teknikleri

Mikroarray'ler prob sayısına, maliyete, müşteri talebine ve sorulan bilimsel sorunun tipine göre farklı yollarla üretilebilmektedir. Temel olarak çiplerin hazırlanması iki şekilde yapılabilir;

1.9.4.1. Çip üzerinde oligonükleotid sentezi

Oligonükleotid mikroarray'lerinde proplar, bilinen ya da umulan açık okuma çerçeveleri sekanslarıyla eşleşmek için tasarlanmış kısa sekanslardır. Bu array'ler, kısa oligonükleotid sekansların yüzey üzerine baskılanmasıyla üretilmektedir. Bu sekanslar bir geni ya da gen ailesini temsil etmektedir ve intakt sekansın yüzeye yerleştirilmesi yerine direkt olarak yüzeye sentezlenmektedir. Sekanslar, arzu edilen amaca göre uzun (Agilent tasarımında 60-mer probları) ya da kısa (Affymetrix tarafından üretilen 25-er probları) olabilir: uzun proplar hedef gene spesifik olurken, kısa proplar array boyunca yüksek yoğunlukta noktalanırlar ve üretilmeleri daha ucuzdur. Oligonükleotid array'lerin üretiminde kullanılan bir diğer teknik de; ışık ve ışığa duyarlı maskeleme ajanlarının sekans oluşturmada kullanıldığı silika substrat üzerine fotolitografik sentezdir. Her bir uygulanabilir prob, array'i tek nükleotid içeren solüsyonda yıkamadan önce seçici olarak "maskesiz"dir. Daha sonra maskeleme reaksiyonları gerçekleşirken, diğer prob seti farklı nükleotid

maruziyetine kalmadan önce yine maskesizdir. Birçok tekrardan sonra bütün problemlerin sekansları oluşturulmuş olur (Şekil 1.10). Son zamanlarda NimbleGen Systems tarafından geliştirilen Maskesiz Array Sentezi, esnekliği ve çok sayıda prob kullanımını bir araya getirmiştir. cDNA arrayler, RNA ekspresyon analizlerinde tercih edilirken oligonükleotid arrayler ilaveten sekans analizinde kullanılırlar. Oligonükleotid mikroarray cDNA çiplere göre bazı avantajlara sahiptir. Örneğin kontaminasyon riski daha azdır ve örnek hazırlama aşaması daha kısa sürdüğünden daha az zamana ihtiyaç duyulur. Ayrıca ekstra stabilite ve spesifite sağlarlar ve genomun daha yüksek seviyede kapsanmasına izin verirler (Kumar ve ark., 2005).



Şekil 1.10. Ink-jet baskılama yöntemi ile oligo sentezinin genel mekanizması (www.chem.agilent.com/SiteCollectionImages/SurePrint_ABCD.jpg)

A: Aktif mikroarray yüzeyi üzerine nükleotidlerin birikerek ilk tabakayı oluşturmaları.

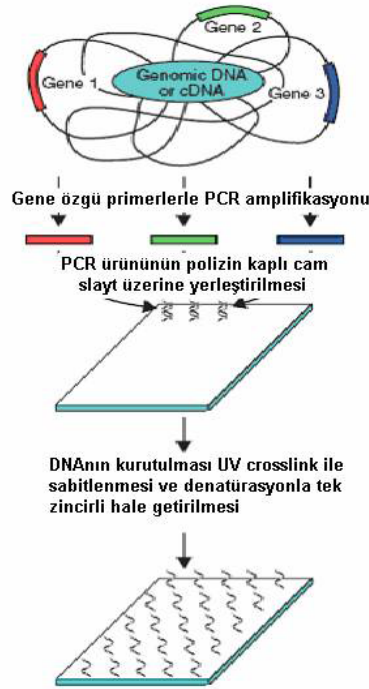
B: Nükleotidlerin slide üzerine basılması ile multiple tabakalar meydana gelmesi ve oligoların uzaması.

C, D: Zincire yeni bir bazın eklenmesi.

1.9.4.2. DNA'nın direkt olarak yüzeye bırakılması

Yöntem Stanford Üniversitesi'nden Pat Brown'un laboratuvarında tasarlanmıştır. Bu yöntemde DNA elemanlarının *in situ* sentezlenmesinden ziyade hazırlanan klonlar yüksek hızlı robot teknolojisi kullanılarak destek ortamına aktarılır (Şekil 1.11). Tipik olarak işlemin ilk basamağı bir cDNA klon kütüphanesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile 96 kuyucuklu plaklarda çoğaltılmasıdır (Rickett ve Dix, 2000). cDNA çipler istenilen cDNA deposunun saflaştırılmış PCR ürününün (genellikle 500 ve 2000 bp) ya da Expressed Sequenced Tagged (EST) klonların membran ve poli-L-lizin kaplı cam slaytlara immobilize edilmesi ile hazırlanır. EST'ler yaygın olarak bir genin tanımlanması ve haritalanması için kullanılan küçük cDNA sekanslarıdır. Hedef seçimi başlangıç materyalinin miktarına ve problemlerin array slaytlarındaki düzenlenişine göre yapılır (Kumar ve ark., 2005). 300 bp'den

uzun cDNA'ların kullanımı bazı avantaj ve dezavantajlara sahiptir. En büyük avantajı hibridizasyonun güçlü olmasıdır. Böylece bazı bireylerde oluşabilecek nokta mutasyonları ve küçük çaplı delesyonlar hibridizasyon sonucu üzerine etki edemezler. Bu özellik cDNA'ların kullanımını bazı genlerinde küçük farklılıklar olabilecek hasta kümelerini içeren çalışmalar için oldukça yararlı hale getirir. cDNA kullanımının diğer bir avantajı nispeten daha hesaplı olmalarıdır. Tek bir mini-prep ya da PCR reaksiyonu binlerce mikroarray için yetecek kadar saf DNA oluşturabilir. Uzun olmaları nedeniyle spotlanmış cDNA'lar alternatif RNA splicing yoluyla ya da alternatif promotor kullanımı yoluyla oluşturulabilen farklı versiyonlar gibi tüm transkriptleri algılama eğilimindedir. Başlıca dezavantajlardan biri saf cDNA depoları ya da PCR ürünlerini bir araya getirmek için gerekli masraf ve zamandır. Ayrıca cDNA'lar tekrarlı sekanslar içerebilir ve yakından bağlantılı transkriptler ile hibridize olabilirler ve bu nedenle pek çok uygulama için yeterli spesifikite sağlanamayabilir (Yoltas ve Karaboz, 2010).



Şekil 1.11 Stanford çiplerinin teknolojisi

DNA fragmentleri; genlerin PCR amplifikasyonu ile elde edilip, cam film üzerine robotik spotlama yöntemiyle kusursuz bir şekilde yerleştirilmesiyle elde edilir. PCR ürünleri cam film üzerine yaklaşık 2 cm^2 bir alana noktacıklar halinde yerleştirilir. Her bir PCR ürününün yerleştirildiği bölge ve içerdiği DNA dizisi kesin olarak bellidir. Daha sonra slayt üzerindeki DNA'lar kurutulur (100°C 'de 2 sn), sabitlenir (UV cross-linking), ve denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir (95°C 'de 2 dk). Hazırlanan çipler, işaretlenmiş cDNA fragmentleriyle bağlanmak üzere kullanılırlar (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/>).

1.9.5. Mikroarray Teknolojisinin Prensibi

Mikroarray teknolojisinin temel prensibi, iki DNA ipliği arasındaki hibridizasyon, birbirleri ile spesifik olarak baz çiftleri arasında hidrojen bağı oluşturarak eşleşen komplementer nükleik asit sekanslarının yapısıdır. Bir nükleotid sekansındaki yüksek sayıdaki komplementer baz çiftleri iki iplik arasında sıkı bir non-kovalent bağı olduğunu anlamına gelmektedir. Non-spesifik olarak bağlanan sekansların yıkanmasından sonra, sadece hibridize olmuş olan eşleşmiş kuvvetli iplikler kalmaktadır. Böylece, bir prob sekansına bağlanan floresans işaretli hedef sekanslar, eşleşen bazların sayısı, hibridizasyon koşulları (sıcaklık gibi) ve hibridizasyon sonrası yıkama tarafından belirlenen hibridizasyon gücüne bağlı olarak sinyal oluşturmaktadırlar. Bir noktacıktan gelen toplam sinyal gücü, bu noktacık üzerinde mevcut olan problemlere bağlanan hedef örneğin miktarına bağlı olmaktadır. Mikroarray'lerde, prob yoğunluklarının farklı koşullar altındaki yoğunlukları ile karşılaştırılmasında ve yeri bilinen probun özelliğinin belirlenmesinde göreceli kantitasyon kullanılmaktadır.

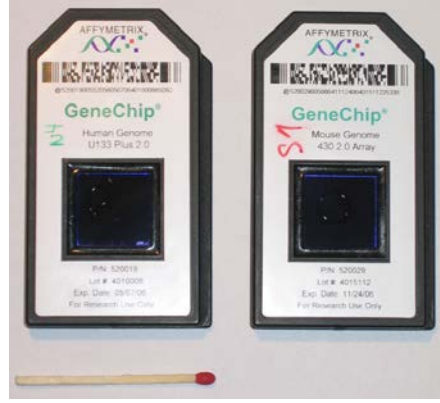
1.9.6. Mikroarray Tipleri

1.9.6.1. Spotlu Mikroarray'ler

Spotlu mikroarray'lerde problemler oligonükleotid cDNA veya mRNA'lara karşılık gelen PCR ürünlerinin küçük parçaları olabilir. Bu tip array'lerde genellikle iki farklı boya ile işaretlenmiş, karşılaştırılacak iki örnekten (örneğin hasta ve kontrol) gelen cDNA ile hibridize edilmiştir. Örnekler karıştırılıp tek bir mikroarray'e hibridize edilebilir; lazer ile taranması sonucunda up-regüle ve down-regüle genler bir seferde görülebilir. Dezavantajı gen ifadesi düzeyinin kesin olarak gözlenememesidir, ama bu yöntemle deneyin maliyeti azalır.

1.9.6.2. Oligonükleotid Mikroarray'leri

Oligonükleotid mikroarray'lerinde problemler sekansı bilinen ya da tahmin edilen mRNA'lara uygun olacak şekilde dizayn edilir. Bu tip tasarımların bazılarını ticari olarak erişmek mümkündür (Affymetrix, Agilent gibi firmalar aracılığıyla) (**Şekil 1.12**) (**Şekil 1.13**) Array'deki her bir geni temsil etmek üzere genellikle 25-70 nükleotid uzunluğunda oligonükleotidler kullanılır. Daha küçük boyutlarda prob bağlama etkinliği daha düşük olmaktadır. Bununla birlikte, küçük oligonükleotidlerin özgüllüğü daha fazladır. 70 nükleotidden daha uzun olanlarda ise sinyalde çok küçük bir artış olmaktadır. Oligonükleotidler her seferinde yeniden sentezlendiği için cDNA'larda olduğu gibi başka sekanslardan kontaminasyon söz konusu değildir.



Şekil 1.12 Affymetrix GeneChip® firmasına ait insan ve fare genomu çipleri



Şekil 1.13 Agilent Technologies® firmasına ait bir çip örneği

1.9.6.3. Genotip Microarray'leri

SNP mikroarray'ler bireylerde ve populasyonlarda genetik varyasyonu belirlemek için kullanılan özel bir çeşit DNA mikroarray tipidir. Genetik çeşitlilikten ve genetik hastalıklara yatkınlıktan sorumlu olduğu düşünülen SNP belirlemede kısa nükleotid array'leri kullanılabilir. Bu tip mikroarray tıp çalışmalarında, hastalıklara genetik yatkınlığın hızlı bir şekilde bulunması çalışmalarında ya da DNA temelli ilaç adaylarının tanımlanmasında kullanılabilir. Ayrıca kansere neden olan somatik mutasyonların, özellikle de heterozigosite kaybının ya da delesyon/duplikasyon profillerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır.

1.9.7. Mikroarray Teknolojisinin Kullanım Alanları


Mikroarray tekniği gen profillerini çıkarabilme imkanı sağlayan çok geniş kapsamlı bir teknoloji olup, aynı anda binlerce genin birbirleriyle olan ilişkisini, birbirlerini nasıl etkilediklerini öğrenebilme imkanı sağlamaktadır. Çeşitli koşullarda genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimler takip edilerek bu genlerin kodladığı proteinlerin fonksiyonları hakkında önemli ipuçları elde edilebilir. Ayrıca bir hücreye yapılan bir uygulamanın hücreyi nasıl etkilediği, hangi yolakların uyarıldığı hangilerinin sustuğu uygulama öncesine kıyasla ortaya konulması ve hangi genlerin ifadesinin artıp hangilerinin inhibe olduğu, yeni genlerin/yolakların keşfedilmesi açısından tercih edilme sebebidir. DNA mikroarray kanser hücrelerindeki gen ekspresyon farklılaşmasının karakterize edilmesinde oldukça kapsamlı

bir şekilde kullanılır. Böylece kanserleşme sürecinde genler; ekspresyon durumlarına göre sınıflandırılarak tedavi sürecinde rol oynayabilirler.

Gen ekspresyon analizlerine ek olarak, mutasyon taraması, polimorfizm analizleri, antimikrobiyal gen analizi, haritalama ve evrimsel çalışmalarda da kullanılabilir. Mikroarray'ler ayrıca proteinlerin nükleik asitlere, küçük moleküllere ve diğer proteinlere bağlanmasının izlenmesinde de kullanım alanı olmuşlardır (Tablo 1.7)

Tablo 1.7. Mikroarray teknolojileri ve uygulamaları

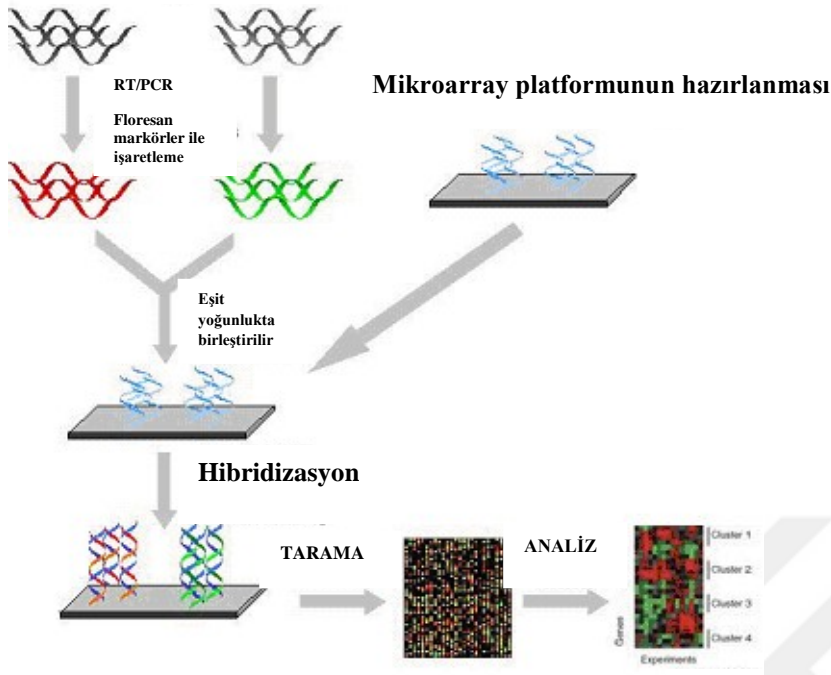
| Teknoloji/ Uygulama | Açıklama |
|---|---|
| Gen ekspresyon profili | Binlerce genin ekspresyon düzeyleri, belirli tedavilerin, hastalıkların ve gelişim basamaklarının gen ekspresyonu üzerine etkisi incelenmektedir. |
| Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) | Farklı hücre ve yakın ilgili organizmalarda genom içeriğinin (delesyon ve duplikasyon açısından) değerlendirilmesini sağlamaktadır. |
| GeneID | Çogu PCR ve mikroarray teknolojisini birleştirmektedir. Besin ve yemlerdeki GDO'ların, hastalık teşhisinde hücre kültürlerindeki mikoplazmaların ya da patojenlerin ID'lerinin saptanmasında kullanılan küçük çaplı array'lerdir. |
| Çip üzerinde kromatin immünopresipitasyonu (ChIP) | Belirli proteine bağlanan DNA sekansları bu proteinin immünopresipitasyonu ile izole edilebilmektedir. Bu fragmentler daha sonra mikroarray (tiling array) üzerine hibritlenmekte ve genom boyunca protein bağlanma bölgelerinin saptanması olanaklı hale gelmektedir. |
| DamID | ChIP'in analogudur. İlgilenilen proteinin bağlandığı genomik bölgelerin izolasyonu ve bağlanma bölgelerinin saptanması için mikroarray'i probamada kullanılmaktadır. ChIP'in aksine, DamIP'de antikor gerekliliği yoktur. Ancak protein bağlanma bölgelerinde adenin metilasyonu gerekmektedir. Bu sayede bu bölgeler seçici olarak amplifiye edilmektedir. |
| SNP taraması | Populasyon içerisinde ya da populasyonlar arasında allellerdeki tek |

| Teknoloji/ Uygulama | Açıklama |
|--|--|
| | <p>nükleotid polimorfizmlerinin saptanmasını sağlamaktadır. Genotipleme, adli tıp analizleri, hastalığa eğilimin ölçülmesi, ilaç aday tanımlanması, bireylerde germline mutasyonların oluşumu, kanserlerdeki somatik mutasyonlar, LOH, genetik bağlantı analizlerinde kullanılmaktadır.</p> |
| <p>Alternatif splicing taraması</p>  | <p>“Exon junction array” dizaynı, bir genin öngörülen ekzonlarının bilinen ya da potansiyel splice bölgelerine spesifik problar kullanılmaktadır. Tipik gen ekspresyon array’i (gen başına 1-3 prob) ve <i>tiling</i> array (gen başına yüzlerce binlerce prob) arasında bir yoğunluk ya da sahaya sahiptir. Bir genin alternatif splice formlarının ekspresyonunun incelenmesinde kullanılmaktadır. Ekzon array’leri farklı dizayna sahiptir, bilinen ya da öngörülen genler için herbir ekzonu saptamak adına düzenlenen problemleri kullanmakta ve farklı splicing izoformlarını tespit etmede kullanılabilir. </p> |
| <p>Füzyon gen mikroarray’leri</p> | <p>Kanser örneklerinde olduğu gibi füzyon transkriptlerinin taranmasında kullanılmaktadır. Bu durumun temelindeki prensip alternatif splicing mikroarray’lerine dayanmaktadır. Oligo dizayn stratejisi kimerik transkript bağlantılarının ölçümleri ile füzyon çiftlerinin ekzon yönünde ölçümlerinin bileşiminden oluşmaktadır.</p> |
| <p>Tiling array</p> | <p>Genom tiling array’leri ilgilenilen genomik bölgeyi (bezen tam bir kromozom kadar büyük bir bölge) yoğun bir şekilde temsil eden örtüşen problemlerden oluşmaktadır. Daha önce bilinmeyen ya da görülemeyen transkriptlerin ve alternatif splice formlarının ekspresyonlarının empirik olarak saptanmasında kullanılmaktadır.</p> |

1.9.8. Ekspresyon Analizi ve Mikroarray Teknolojisi

Gen ekspresyon array deneyinde, öncelikle araştırılan doku veya hücreden RNA izolasyonu yapılır. RNA örnekleri seyreltilerek her bir örneğin eşit yoğunlukta olması sağlanır. Kural olarak, asıl RNA populasyonundaki her mRNA molekülü için bu moleküle komplementer olan tek iplikli işaretlenmiş bir cDNA üretilir. Belli bir mRNA'nın yoğunluğu arttıkça cDNA miktarı da artar. Tek iplikli bir prob oluşturmak için RNA, mRNA'daki polyA ucu ile baz çifti kurabilen oligo dT (deoksitimin) primerleri, reverse transkriptaz (RNA'ya bağımlı DNA polimeraz) ve işaretlenmiş nükleotidler içeren bir reaksiyon karışımına konur ve radyoaktif ya da floresan markörler ile işaretlenir (İpekdal, 2006). En sık kullanılan floresan markörler aleksaflor, ficoeritrin ve siyanin boyalarıdır. Siyanin boyalarından olan siyanin 3 (cy3) ve siyanin 5 (cy5) eksitasyon ve emisyon spektrumlarındaki geniş ayırım ile yüksek fotostabiliteye sahiptirler ve bu nedenle en çok kullanılan floresan işaretçilerdir (Seidel ve Niessner, 2008). Bu fluoroforlar farklı dalga boylarında ışık yayarlar ve uygun lazerle eksitasyon sonrası kırmızı (cy5) ve yeşil (cy3) olarak görünürler. Problar iki boyutlu bir arrayde spotlanmış cDNA'ları içeren filtrelerle hibridize edilir. Eğer hedefte prob ile komplementer diziler bulunuyorsa hedef array ile hibridize olur. Hibridizasyonun sağlanması için hedef konsantrasyonu, sıcaklık, tampon ve tuz konsantrasyonu optimize edilmelidir. Hibridizasyon yapıldıktan sonra, yıkama solüsyonu kullanılarak hibridize olmayan prob dizileri mikroarray platformundan uzaklaştırılır. Farklı hücre populasyonlarından gelen mRNA ya da farklı şekilde işlem görmüş örnekler array iki farklı dalga boyunda tarandığından farklı renkler veren cy3 ve cy5 boylarının kullanımıyla saptanabilirler. Bu da array üzerinde sunulmuş olan her genin transkript seviyelerinin oranının ölçülmesini sağlar. Tarama sonrası, hibridizasyon varlığı, mikroarray'den alınan sinyallerle görüntülenir. Mikroarray verileri, ortak biyolojik fonksiyonları taşıdığı düşünülen, benzer ekspresyon paterni gösteren genlerin gruplandırılmasına olanak tanıyan spesifik yazılım programları ile analiz edilmektedir (Yoltaş ve Karaboz, 2010) (Şekil 1.14).

Hedef mRNA örneklerinin hazırlanması



Şekil 1.14 Gen ekspresyon array analizinin basamakları
(www.microarray.lu/images/overview_1.jpg)

1.9.9. Mikroarray'in Avantajları ve Dezavantajları

Mikroarray teknolojisinin büyük bir ilgi ile karşılanmasının sebebi, bütün genomun basit bir çip üzerinde görüntülenmesini vaat etmesi ve bu sayede bilim adamlarının aynı anda binlerce genin birbirleriyle olan etkileşimlerini görmesine olanak tanınmasıdır. Belli bir hücre türünün belirli bir ortam için gen ifadesi profili belirlenip, bu profil farklı hücre tipleri ve farklı çevre koşullarındaki gen ifadesi profilleriyle bu yöntemle karşılaştırılabilir. Bu teknikte membran yerine camın kullanılması, radyoaktivitenin yerini floresan işaretlerin alması ve bağlanmayı sağlayacak yöntemlerin hassaslaşmasıyla çalışmaların verimi ve elde edilen bilgilerin miktarı artmıştır. Kısa sürede ve oldukça pratik olarak on binlerce genin analizini yapmak mümkündür. Otomasyona dayalı bir sistem olduğu için insan kaynaklı hataların ortaya çıkma ihtimali düşüktür.

Mikroarray'lerin bilimin hizmetine sunulması büyük bir heyecan yaratmış olmasına rağmen bazı problemleri de beraberinde getirmiştir. Tüm deney düzeneği nükleik asit hibridizasyon yöntemine bağlıdır ve yüksek oranda benzerlik gösteren DNA dizileri problem yaratabilir. Bu nedenle mikroarray'den elde edilen veriler klasik gen ekspresyon analiz yöntemleriyle doğrulanmalıdır.

Ayrıca tüm mikroarray deneylerinin aynı hassasiyette olmayışı, ekspresyondaki küçük değişikliklerin analizde fark edilemeyecek boyutta olması, birbirinden farklı çipler kullanılarak yapılan deneylerin birbiriyle karşılaştırılmasında yaşanan zorluklar,

optimizasyon ve standardizasyon sorunları ve herhangi bir deneyden elde edilen sonuçları her yönüyle değerlendirebilecek biyoinformatik programların henüz geliştirilememiş olması karşılaşılan sorunlardan birkaçıdır. Bu tür sorunları çözebilmek için Microarray Gene Expression Data Society gibi bazı yeni kuruluşlar oluşturulmaktadır. Bunun yanı sıra mikroarray çalışmalarıyla elde edilen sonuçların geçerliliği, tekrarlanabilirliği ve günlük hayatta uygulanabilirliği konusunda çalışmalar hızla devam etmektedir.



2. AMAÇ

Bu tez çalışmasında hipofiz tümörögenezinde rol oynayan genler ve bu genlerin ilişkili olduğu bağlantı yollarının tanımlanması amaçlanmıştır. Hipofiz tümörögenezinde, onkogen ve tümör süpressör genlerin fonksiyonlarının tanımlanması, tek başına hipofiz tümörlerinin genetik patogenezi ve prognozunu anlamak için yeterli olmamaktadır. Sporadik hipofiz tümörlerinde; hormonlar, büyüme faktörleri, reseptörler, bağlantılı sinyal transdüksiyon yolları ve hücre döngüsü düzenleyicilerinin yer aldığı potansiyel patojenik değişiklikleri gösteren yeterli sayıda literatür bulunmaktadır (Asa ve Ezzat, 2002, 2005; Melmed, 2003; Heaney ve Melmed, 2004). Hipofiz tümörögenezinin hangi safhasında hangi moleküler olayların primer sorumlu olduğunun belirlenmesi prognoza da katkı sağlayacaktır. Dolayısıyla farklı genlerin ifade edilme düzeyleri ve bu genlerin ilişkili olduğu bağlantı ağlarının saptanması, hipofizer tümörögenezin moleküler biyolojisine dair önemli veriler içermenin yanısıra yeni diagnostik, prognostik ve terapötik aday moleküller ortaya koyabilecektir. Bu amaçla hipofiz tümörlü dokular ile sağlıklı hipofiz dokularından alınan örnekler, tam genom mikroarray analizi yöntemi ile gen ekspresyon profilleri ve genlerin hastalıkla ilişkili bağlantı ağları belirlenmiştir.

Tüm genom mikroarray analizi ile gen ekspresyon profillendirme birçok insan (Evans ve ark., 2001; Evans ve ark., 2008; Galland ve ark., 2010; Gong ve ark., 2013; Moreno ve ark., 2005; Morris ve ark., 2005; Wierinckx ve ark., 2007; Zhao ve ark., 2014) ve hayvan (Goidin ve ark., 2000; Mohammed ve ark., 2004; Wood ve ark., 2002) çalışmasında gösterilmiştir. Yapılan insan çalışmalarında daha çok fonksiyonel sınıflama yapılmış ve normal hipofiz dokuları ile karşılaştırılarak proliferasyon, hücre büyümesi ve hücre döngüsünde rol oynayan genlerin ifade edilme düzeyleri belirlenmiştir. Bunların dışında nonfonksiyonel hipofiz tümörleri ve normal hipofiz dokularının karşılaştırılması ile yapılan gen ekspresyon profillendirme ve proteomik çalışma (Moreno ve ark., 2005); nonfonksiyonel invaziv ve nonfonksiyonel noninvaziv hasta gruplarıyla yapılan tüm genom mikroarray gen ekspresyon analizi ile terapötik aday moleküller ve sinyal ağları gösterilmiştir (Galland ve ark., 2010). Bu çalışmada ise tümör boyutu ve invazyon özelliğine göre hastalar sınıflandırılmış ve sağlıklı hipofiz dokuları ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Tez çalışmasından elde edilen bulgular, tümör boyutu ve invazyon özelliğinin altında yatan moleküler faktörlerin belirlenmesine ışık tutacak ve yeni tanısal-genetik belirteçlerin belirlenmesi açısından temel bilimlere katkı sağlayacaktır.

3. YÖNTEM

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Ana bilim Dalı tarafından hipofiz tümörü tanısı almış 100 hasta ve daha önceden herhangi bir malign hastalık tanısı almamış 3 sağlıklı kadavradan cerrahi girişim ile alınan hipofiz doku örnekleri tez çalışmasına dâhil edilmiştir. Tümör boyutları ve invazyon dereceleri MR görüntüleme ile belirlendi. Hardy sınıflanmasına göre (Hardy, 1973) tümör büyüklüğü ve invaziv derecesine göre radyolojik açıdan sınıflandırıldı. Bu sınıflandırmaya göre; çapı 10 mm ve küçük olan adenomlar mikroadenom, 10 mm'den büyük adenomlar ise makroadenom olarak; çapı 1 cm'den büyük kafatasında ekspansif erozyon yapan tümörler invaziv adenom olarak sınıflandırıldı. Sıvı nitrojende -80°C 'de muhafaza edilen dokuların histopatolojik değerlendirmesi yapıldıktan sonra Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı Laboratuvarında moleküler analizleri yapılmak üzere -80°C 'de muhafaza edildi. Hipofiz dokularından bistüri yardımıyla alınan 30 mg örnek, GeneJET RNA Purifikasyon Kit (Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, ABD) protokolüne uygun olarak homojenize edildi ve total RNA izolasyonu yapıldı. RNA'ların kantitesi spektrofotometre (NanoDrop ND-1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), kalitesi ise Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, U.S.A.) çipleri ile değerlendirildi. Yeterli kantite ve kaliteye sahip RNA'lar toplamda 4 ayrı gen havuzu (mikroadenom, makroadenom, invaziv adenom ve kontrol grubu) oluşturmak üzere eşit yoğunlukta gruplandırıldı. Gen havuzları Low Input Quick Amp Labeling kit (Agilent, Palo Alto, U.S.A.) protokolüne göre işaretlendi ve purifiye edildi. Purifiye edilen cRNA'ların kantitesi NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) ile kontrol edildikten sonra Human Gene Expression v2 4x44K (Agilent, Palo Alto, U.S.A.) mikroçiplerine yüklendi ve hibridizasyon fırınında (Agilent Microarray Oven; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 65°C 'de 10 rpm'de 17 saat boyunca hibridizasyona bırakıldı. Hibridizasyon süresi sonunda Agilent protokolüne uygun olarak yıkanan mikroçipler, Agilent Mikroarray tarayıcı (Agilent Microarray Scanner; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) ile tarandı. Görüntü yoğunluğu verileri kaydedildi ve metin dosyaları içine transfer edildi (Feature Extraction (FE) software versiyon 9.5.3; Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Veriler, Agilent Feature Extraction yazılım programından toplandı ve GeneSpring GX 13.1 (GeneSpring, Silicon Genetics, Redwood City, CA.) yazılım programında aktarıldı. ANOVA istatistiksel analiz programında, p-değerleri <0.05 ve sinyal/arka plan kirliliği oranı >2 kullanılarak veri setleri filtrelendi ve tümör örneğinin normale göre kaç kat değiştiği analiz edildi. Gen artış sayıları, Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software (Ingeniuty Systems, Redwood City, CA) yorum programına girildi. Bu program kullanılarak gen ürünleri, lokasyon ve moleküler

fonksiyonlarına göre kategorize edildi. Her gen sembolü, IPA'daki uygun gen yerine haritalandırılarak, bu genlerin ağırları, algoritmik olarak bağlantılarına göre oluşturuldu.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, Kocaeli Üniversitesi Etik Kurulu tarafından değerlendirildi ve onaylandı (KOU KA EK 2013/139). Çalışmada yer alan hastalardan şahsen aydınlatılmış onam formları imzalanmıştır. Sağlıklı gruba ait hipofiz örnekleri ise Adli Tıp Kurumu Başkanlığı (İstanbul, Türkiye) Morg Departmanından 24 saat ve öncesinde +4 °C sıcaklıkta buzdolabında bekletilen otopsi örneklerinden elde edilmiştir.

3.1. Kullanılan Ekipmanlar/Kitler

- Manyetik bilyeler (Roche Applied Sciences, Mannheim, Almanya)
- Agilent 2100 Biyoanalyzer chip priming station (Agilent, Palo Alto, U.S.A.)
- IKA vorteks karıştırıcı (Agilent, Palo Alto, U.S.A.)
- Human GE 4x44K v2 (iki slayt) (Agilent, Palo Alto, U.S.A.)
- Agilent Mikroarray Tarayıcısı (Agilent, Palo Alto, U.S.A.)
- Hibridizasyon Chamber (Agilent, Palo Alto, U.S.A.)
- Hibridizasyon gasket slyatları (Agilent, Palo Alto, U.S.A.)
- Hibridizasyon fırını (Agilent, Palo Alto, U.S.A.)
- Hibridizasyon fırını rotatorü (Agilent, Palo Alto, U.S.A.)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)
- Agilent 2100 Biyoanalyzer
- Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, ABD)
- Isıtıcı blok
- GeneJET RNA Purifikasyon Kit (Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, ABD)
İçeriği: Proteinaz K, Lysis Buffer, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Nuclease-free su, GeneJET RNA Purification columns, Collection tubes
- Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent, Palo Alto, U.S.A.)
İçeriği: RNA 6000 Nano jel matrix, RNA 6000 Nano Ladder, RNA 6000 Nano dye concentrate, RNA 6000 Nano Marker, spin filtre tüpler, Nano çipler, RNase-Zap, Rnase-free su
- Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color Agilent (Agilent, Palo Alto, U.S.A.) İçeriği: T7 Primer, 5X First Strand Buffer, 0.1 M DTT, 10 mM dNTP Mix, Affinity Script RNase Block Mix, 5X Transcription Buffer, NTP Mix, T7 RNA Polymerase Blend, Nuclease-free Su, Cyanine 3-CTP
- RNeasy Mini Kit Cat no: 74104 (Qiagen, Hilden, Almanya)
İçeriği: RNeasy Mini Spin Column Collection Tube (1.5 ml), Collection Tube (2 ml), Buffer RLT, Buffer RW1, Buffer RPE, RNase-free su

- RNA Spike-In Kit, One-Color (Agilent, Palo Alto, U.S.A.) i
İçeriği: Spike Mix, Dilution Buffer
- Gene Expression Hybridization Kit (Agilent, Palo Alto, U.S.A.)
İçeriği: 10× Gene Expression Blocking Agent, 25X Fragmentation Buffer, 2X Hi-RPM Hybridization Buffer
- Gene Expression Wash Buffer Kit (Agilent, Palo Alto, U.S.A.)
İçeriği: Gene Expression Wash Buffer 1, Gene Expression Wash Buffer 2, Triton X-102 (%10)
- 0.2 mL'lik PCR tüpü
- 1.5 mL'lik Eppendorf tüpleri
- 0.5 mL'lik Safe Lock Tüpler

3.2. Kullanılan Kimyasallar

- 14.3 M β -merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, Missouri, ABD)
- Tris-EDTA (TE) Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) (Sigma-Aldrich, Missouri, ABD)
- Etanol (%100) (Sigma-Aldrich, Missouri, ABD)
- DNase 1 (RNase free) (Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, ABD)
- DNase/RNase-free su Cat no: 10977-015 (Invitrogen, Kaliforniya, U.S.A)

3.3. Gerekli Yazılımlar

- Feature Extraction Software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)
- Gene Spring GX Software (GeneSpring, Silicon Genetics, Redwood City, CA)
- Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA)

RNA İzolasyonunda Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması

- Her 10 μ l Proteinaz K (PK) için 590 μ l TE Buffer ile dilüsyon yapıldı, vortekslendi ve 15-25 C° sıcaklıkta 10 dakika boyunca inkübe edildi.
- Her 1 mL Lizis Buffer üzerine 20 μ l 14,3M β -merkaptoetanol eklendi.
- 200 mL Wash Buffer 1 üzerine 50 mL %100 etanol eklendi.
- 100 mL Wash Buffer 2 üzerine 170 mL %100 etanol eklendi.
- Her 10 μ l Dnase 1 (RNase free) üzerine 70 μ l reaksiyon buffer eklendi.

3.5. Dokulardan RNA İzolasyonu

1. Manyetik bilyelerin olduğu tüplere 30 mg doku örnekleri konularak, üzerlerine hazırlanan 300 μ l Lizis buffer karışımından pipetlendi. 10 saniye vorteks ile

- homojen bir karışım elde edildikten sonra homojenizatörde (MagNA Lyser System, Roche, Mannheim, Almanya) 40 saniye santrifüj edildi.
- Her tüpe hazırlanmış olan PK'dan 600 µl pipetlendi ve 10 saniye vortekslendi. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra 12000g'de +4°C sıcaklıkta 10 dk santrifüj edildi.
 - Tüm süpernetant 900 µl ependorfa alındı ve üzerine 450 µl %100 etanol eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.
 - Tüm lizat GeneJet Rna pürifikasyon kolonlarına aktarıldı ve 12000g'de 1 dakika santrifüj edildi. (Kolon karışımının tamamını almadığı takdirde işlem 2 kez tekrarlandı.)
 - Kolonun dibinde toplanan sıvı atıldı. Filtreler yeni bir 2 mL'lik collection tüplere konuldu.
 - Filtrelere 350 µl wash buffer1 pipetlenip 12000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
 - Kolonun dibinde toplanan sıvı atıldı. Filtreler yeni bir 2 mL'lik collection tüplere konuldu.
 - Filtre tüplerin tam ortalarına gelecek şekilde 80 µl Dnase pipetlendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
 - Filtrelere 350 µl wash buffer 1 pipetlenip 12000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
 - Kolonun dibinde toplanan sıvı atıldı. Filtreler yeni bir 2 mL'lik collection tüplere konuldu.
 - Filtrelere 600 µl wash buffer 2 pipetlenip 12000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
 - Kolonun dibinde toplanan sıvı atıldı. Filtreler yeni bir 2 mL'lik collection tüplere konuldu.
 - Filtrelere 250 µl wash buffer 2 pipetlenip 12000g'de 2 dakika santrifüj edildi.
 - Toplanan sıvı atıldı. Tüp boş haliyle 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
 - Filtreler 1,5 mL'lik ependorf tüpler içine yerleştirildi ve üzerlerine 50 µl nuclease-free su eklendi ve 12000g'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 2 kere tekrar edildi.
 - Filtreler atıldı, ependorf tüp içerisinde toplanan RNA -80°C sıcaklıkta muhafaza edildi.

3.6. RNA'nin Yeniden Çözülmesi

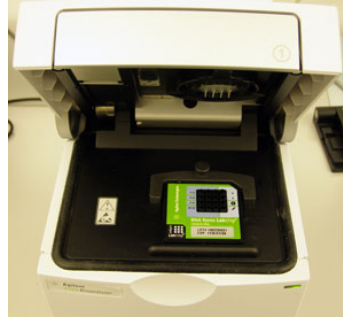
- 1,5 mL'lik ependorf tüplere 20 µl RNA, 10 µl nuclease-free su, 70 µl fizyolojik su ve 250 µl %100 etanol eklendi. Tüpler nazikçe alt üst edilerek karıştırıldı.
- 30 dakika boyunca -20°C'de bekletildi.
- 13.400g'de +4 °C sıcaklıkta 20 dakika santrifüj edildi.
- Sıvı kısım yeni 1,5 mL'lik ependorf tüplere aktarıldı ve oda sıcaklığında ters çevirilip kurutuldu.
- Tüplere 20 µl steril su eklenip nazikçe karıştırıldı.

3.7. RNA'ların Kantite ve Kalite Tayini

RNA'ların kantitesi NanoDrop ND-1000 (Şekil 3.1) (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) cihazında RNA-40 opsiyonu kullanılarak yapıldı. RNA'ların 260/280 oranlarının 1,8-2,0 arası; 260/230 oranlarının ise 2,0 ve üzeri olmasına dikkat edildi. RNA'ların kalite tayini ise Agilent 2100 Bioanalyzer (Şekil 3.2) (Agilent, Palo Alto, U.S.A.) çipleri ile protokole uygun olarak değerlendirildi (Şekil 3.3) (Şekil 3.4)



Şekil 3.1. NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)



Şekil 3.2. Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, U.S.A.)

3.7.1. RNA'ların Agilent RNA 6000 Nano Kit ile Kalite Tayini

Nano Jel hazırlama

- Filtre tüpe 550 µl nano jel matrix eklendi ve 1500g'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 0,5 mL' lik safe lock tüplere 65'şer µl jel dağıtıldıktan sonra +4°C sıcaklıkta saklandı.

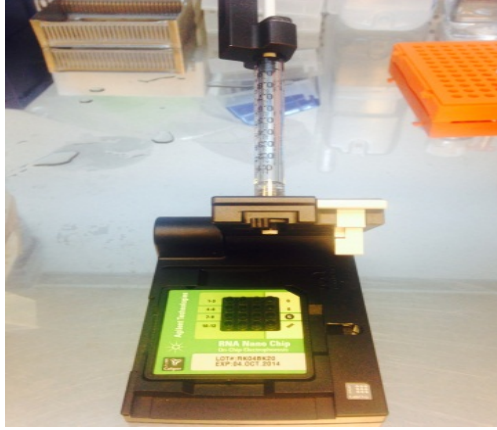
Agilent RNA6000 Nano Ladder hazırlama

- 5'er µl RNase-free su PCR tüplerine dağıtıldı.

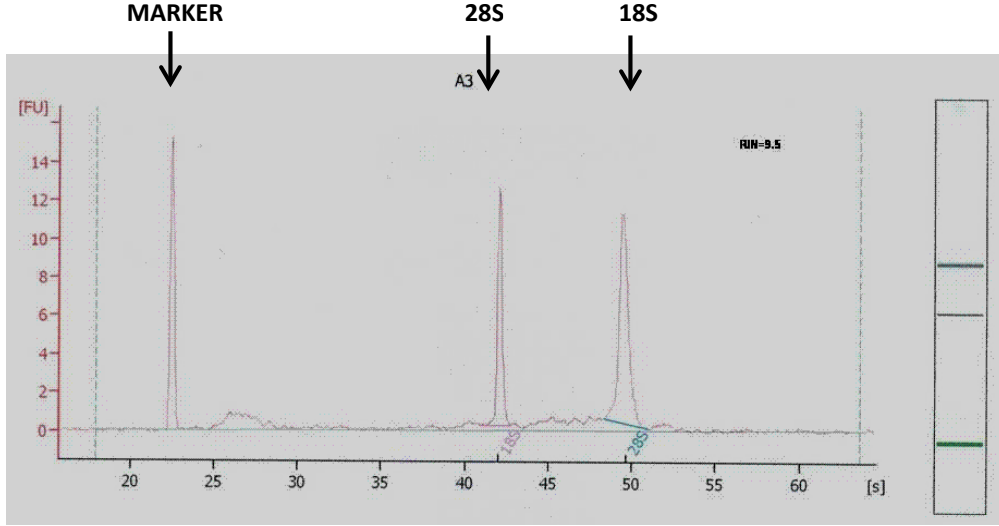
- 70°C sıcaklıkta 2 dakika denatüre edildikten sonra hemen buza konuldu.
- Falcon tüpte -80°C sıcaklıkta saklandı.

Boya ve Jel karışımını hazırlama

- Nano dye concentrate vortekslendi
 - 65µl jele 1µl boya eklenerek vortekslendi ve 13000g'de 10 dakika santrifüj edildi.
1. RNA konsantrasyonları 25-500 ng/µl olacak şekilde dilüe edildikten sonra PCR tüplerine 2'şer µl pipetlendi ve 70°C sıcaklıkta 2 dakika denatüre edildi.
 2. Özel kasetlere pipetlenen sırasıyla 350 µl Rnase-free su 10 saniye, daha sonra 350 µl RNase Zap 1 dakika boyunca mikro çipin yerleşeceği bölümde bekletilerek cihazın sterilizasyonu sağlandı.
 3. Şırınga en üst seviyeye, kademe de C de olacak şekilde ayarlandıktan sonra, nanoçipte önce G kuyucuğuna 9µl jel-boya karışımı pipetlendi.
 4. Şırınga 1 mL'ye çekildi ve istasyon kapatıldı. Şırınga mandal kısmına gelene kadar itilip ve 30 saniye bekletildi. Yavaşça en üst seviyeye kadar çekildi.
 5. Diğer G kuyucuklarına 9'ar µl jel-boya karışımı pipetlendi. Geriye kalan 13 kuyucuğa 5'er µl markör pipetlendi.
 6. # kuyucuğuna ise 1 µl ladder, kalan 12 kuyucuğa 1 µl RNA örnekleri pipetlendi.
 7. Nanoçip 2400 rpm'de 1 dakika vortekslendikten sonra değerlendirmesi yapıldı.
 8. Analiz sonucunda RNA Integrity Number (RIN) değerleri 4'ün üzerinde olan örnekler hibritleme işlemine alındı.



Şekil 3.3. Bioanalizer mikroçiplerine örneklerin yüklenmesi



Şekil 3.4. RNA örneğinin biyoanalizer’da değerlendirilmesi

3.8. Gen Havuzu Oluşturma

Gen havuzu oluşturmadan önce yeterli kalite ve kantiteye sahip RNA örnekleri 100 ng/ml olacak şekilde dilüe edildi. Makro adenom (n:30) mikro adenom (n:24) ve invaziv adenom (n:46) olmak üzere sınıflandırılan hasta grubuna ait RNA’lar 3 ayrı hasta havuzu, sağlıklı kontrollere ait RNA’lar (n:3) ise sağlıklı havuzu oluşturmak üzere birleştirildi. Gen havuzlarının kantitesi spektrofotometre (NanoDrop ND-1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) ile ölçüldü.

3.9. Mikroarray Metodu

3.9.1.Total RNA Kontrollerinin Spike-In İle Hazırlanması

Tablo 3.1. Spike mix dilüsyonlarının hazırlanması

| Total RNA miktarı | 1.Dilüsyon | 2.Dilüsyon | 3.Dilüsyon | 4.Dilüsyon | 4.Dilüsyondan Total RNA’ya eklenecek miktar |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|------------|---|
| 10 | 1:20 | 1:25 | 1:20 | 1:10 | 2µl |
| 25 | 1:20 | 1:25 | 1:20 | 1:4 | 2µl |
| 50 | 1:20 | 1:25 | 1:20 | 1:2 | 2µl |
| 100 | 1:20 | 1:25 | 1:20 | | 2µl |
| 200 | 1:20 | 1:25 | 1:20 | | 2µl |

1.Dilüsyon: Spike mix hafifçe vortekslenip, 37°C sıcaklıkta 5 dakika ısıtıldı. Ardından mikrosantrifüjde kısa bir süre döndürülüp tekrar hafifçe vortekslendi. İlk seyreltme için (1:20); 38µl dilüsyon solüsyonuna 2 µl spike mix eklendi. Hafifçe vortekslenip mikrosantrifüjde kısa bir süre döndürüldü.

2.Dilüsyon: İkinci seyreltiyi hazırlamak için (1:25); 48µl dilüsyon solüsyonuna ilk seyreltiden 2 µl eklendi. Hafifçe vortekslenip mikrosantrifüjde kısa bir süre döndürüldü.

3.Dilüsyon: Üçüncü seyreltiyi hazırlamak için (1:20); ikinci seyreltiden 2µl, 38µl dilüsyon solüsyonuna eklendi. Hafifçe vortekslenip mikrosantrifüjde kısa bir süre döndürüldü.

4.Dilüsyon: Dördüncüyü seyreltiyi hazırlamak için (1:2); 15µl dilüsyon solüsyonuna üçüncü seyreltiden 15µl eklendi. Hafifçe vortekslenip mikrosantrifüjde kısa bir süre döndürüldü.

3.9.2. İşaretleme Reaksiyonun Hazırlanması

- PCR tüplerine son volüm 1,5 µl olacak şekilde 50 ng RNA pipetlendi. Konsantrasyonları yüksek olanlar nuclease-free su ile seyreltildi.
- 4.Dilüsyondan PCR tüplerine 2'şer µl dağıtıldı. Böylelikle tüplerdeki son volüm 3,5 µl olmuş oldu
- T7 primer mix hazırlanarak PCR tüplerine 1,8'er µl dağıtıldı. (Tablo 3.2)

Tablo 3.2. T7 primer mix hazırlanması (bir reaksiyon için)

| | |
|------------------|--------|
| T7 primer | 0,8 µl |
| Nuclease-free su | 1 µl |
| Total Volüm | 1,8 µl |

- 65 °C sıcaklıkta 10 dakika inkübasyona bırakıldı
- İnkübasyondan alınan örnekler buzda 5 dakika bekletildi.
- 5X first strand buffer kullanılmadan önce 80°C sıcaklıkta 3-4 dakika ılınması sağlandı, hafifçe vortekslendi ve kısa bir süre santrifüjde döndürüldü. Kullanılana kadar oda ısısına gelmesi beklendi. cDNA master mix Tablo 3.3'e göre hazırlandı.

Tablo 3.3. cDNA master mix hazırlanması (bir reaksiyon için)

| | |
|---------------------------------|--------|
| 5X first strand buffer | 2 µl |
| 0,1 M DTT | 1 µl |
| 10 mM dNTP mix | 0,5 µl |
| Affinity Script Rnase block mix | 1,2 µl |
| Total volüm | 4,7 µl |

- Karışım tüplere dağıtılmadan önce kısa bir süre santrifüjde döndürüldü.
- Karışım iyice pipetaj yapıldıktan sonra her tüpe 4,7 µl dağıtıldı ve hafifçe pipetaj yapılarak karıştırıldı. Tüplerdeki son volüm 10 µl'ye ulaşmış oldu.

- Tüpler önce 40 °C sıcaklıkta 2 saat, daha sonra 70 °C sıcaklıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan alınan örnekler buzda 5 dakika bekletildikten sonra kısa bir süre santrifüjde döndürüldü.
- Bir sonraki basamağa hemen geçilmeyecek ise -80 °C sıcaklıkta muhafaza edildi.
- Transkripsiyon master mix Tablo 3.4'e göre hazırlandı.

Tablo 3.4. Transkripsiyon master mix hazırlanması (bir reaksiyon için)

| | |
|--------------------------|---------|
| Nuclease-free su | 0,75 µl |
| 5X transkripsiyon buffer | 3,2 µl |
| 0,1 M DTT | 0,6 µl |
| NTP mix | 1 µl |
| T7 RNA polymerase blend | 0,21µl |
| Cyanine 3-CTP | 0,24 µl |
| Total volüm | 6 µl |

- Karışım iyice hafifçe karıştırıldıktan sonra tüplere 6'şar µl dağıtıldı. Böylece son hacim 16 µl olmuş oldu.
- 40 °C sıcaklıkta 2 saat inkübasyona bırakıldı
- Pürifikasyon basamağına hemen geçilmeyecek ise -80 °C sıcaklıkta saklanabilir.

3.9.3. İşaretlenen RNA'ların Pürifikasyonu

- cRNA'lara 84'er µl nuclease-free su eklendi.
- 350 µl Buffer RLT eklendi ve pipetaj yapılarak iyice karışması sağlandı.
- 250 µl etanol (%96-100) eklendi ve pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı.
- Toplam hacmi 700 µl olan cRNA'lar 2mL'lik RNeasy mini spin kolonlara aktarıldı.
- 4 °C sıcaklıkta 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
- RNeasy spin kolonlar, yeni collection tüplere aktarıldı ve üzerlerine 500 µl Buffer RPE (%96-100 etanol içeren) eklendi.
- 4 °C sıcaklıkta 13000 rpm'de de 30 saniye santrifüj edildi.
- RNeasy spin kolonlar, yeni collection tüplere aktarıldı ve üzerlerine 500 µl Buffer RPE (%96-100 etanol içeren) eklendi.
- 4 °C sıcaklıkta 13000 rpm'de 60 saniye santrifüj edildi.
- RNeasy spin kolonlar, yeni collection tüplere aktarıldı.
- Boş bir şekilde, 4 °C sıcaklıkta 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
- RNeasy spin kolonlar, 1,5 mL'lik ependorf tüplere alındı.
- Tüplere 30'ar µl Rnease-free su pipetlendi ve 60 saniye beklendi.
- 4 °C sıcaklıkta 13000 rpm'de de 30 saniye santrifüj edildi.

- Pürifiye edilmiş cRNA'lar buza alındı.

3.9.4. cRNA'ların Kantitasyonu

Pürifiye edilen c-RNA'ların kantitesi NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) cihazında mikroarray ölçümü seçilerek RNA-40 opsiyonunda yapıldı. Siyanin 3 konsantrasyonları (pmol/μL), RNA 260/280 nm oranları ve cRNA konsantrasyonları (ng/μL) kaydedildi. Yield ve spesifik aktivite değerleri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\frac{\text{cRNA konsantrasyonu} \times 30 \mu\text{l (elüsyon hacmi)}}{100} = \text{yield değeri } (\mu\text{g cRNA})$$

$$\frac{\text{Cy3 konsantrasyonu}}{\text{cRNA konsantrasyonu}} \times 1000 = \text{spesifik aktivite (cRNA } (\mu\text{g) başına Cy3 (pmol))$$

Tablo 3.5. Hibridizasyon için önerilen yield ve spesifik aktivite değerleri

| Mikoarray format | Yield (μg) | Spesifik aktivite cRNA (μg) başına Cy3 (pmol) |
|------------------|------------|---|
| 1 paket | 5 | ≥6 |
| 2 paket | 3.75 | ≥6 |
| 4 paket | 1.65 | ≥6 |
| 8 paket | 0.825 | ≥6 |

3.9.5. Hibridizasyon

- Tablo 3.6'ya göre hazırlanan mix hafifçe karıştırıldıktan sonra 60°C sıcaklıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.6. Fragmantasyon mix hazırlanması (bir reaksiyon için)

| | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| Cy3 ile işaretlenmiş cRNA | 1,65 μg |
| 10X Gene Expression Blocking Agent | 11 μl |
| 25X Fregmantation Buffer | 2,2 μl |
| Nuclease-free su | 52,8 μl olacak şekilde ayarlanır |
| Total Volüm | 55 μl |

- İnkübasyondan alınan örnekler 1 dakika buzda bekletildi.
- Üzerlerine 55'er μl 2Xhi-RPM Hybridization Buffer eklendi ve köpürmesine izin verilmeden pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- 13000 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi.

- Hibridizasyon chamber içine gasket slayt yerleştirildi ve array alanlarına tüplerden 100 µl pipetlendi.
- Hangi gen havuzu hangi alana pipetlendi ise slide düzenine göre kaydedildi.
- Human GE 4x44K (v2) 4X44K slayt Agilent tarafı alta, barkod kısmı üste bakacak şekilde gasket slayt üzerine yerleştirildi.
- Önceden ısıtılmış hibridizasyon fırınında 65°C sıcaklıkta 10 rpm'de 17 saat inkübasyona bırakıldı.

3.9.6. Array'lerin Yıkama

- Wash buffer 1 ve Wash buffer 2'ye, 2'şer mL Triton X-102 (10%) eklendi.
- Wash buffer 2, 37°C sıcaklıkta su banyosunda gece boyunca inkübasyona bırakıldı.
- Stabilizasyon drying solution 37°C sıcaklıkta etüvde gece boyunca inkübe edildi.
- Yıkama aşaması aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Yıkama koşulları

| Cam Kap No | Buffer | Koşul | İşlem |
|------------|---------------|---------------------------|--|
| 1 | Wash Buffer 1 | Oda sıcaklığı | Gasket slayt ile Human GE 4x44K (v2) 4X44K slaytı pens yardımıyla birbirinden ayrıldı. |
| 2 | Wash Buffer 1 | Oda sıcaklığı 1 dakika | Human GE 4x44K (v2) 4X44K slaytı yıkandı. |
| 3 | Wash Buffer 2 | 37°C 1 dakika | Human GE 4x44K (v2) 4X44K slaytı yıkandı. |

- Slaytların ozonla temas etmesini engellemek amacıyla sırasıyla asetonitril ile oda sıcaklığında 10 saniye, ardından drying solution ile oda sıcaklığında 30 saniye bekletildi.

3.9.7. Tarama

- Mikroarray'ler barkod kısımları üste gelecek şekilde tarayıcı kasetlerine yerleştirildi.
- Kasetler içerisindeki mikroarray'ler tarayıcı karuseline yerleştirildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Mikroarray taşıyan kasetlerin tarayıcıya yerleştirilmesi

- Agilent Scan Control programı açılarak aşağıdaki ayarlar yapıldı ve tarama işlemi başlatıldı (Tablo 3.8).

Tablo 3.8. Agilent B tarayıcı ayarları

| | |
|-----------------------------------|------------------------|
| Tarama Alanı (Scan region) | 61 × 21.6 mm |
| Rezolüsyon (µm) (Scan resolution) | 5 |
| 5 µm tarama modu (scanning mode) | Single pass |
| XDR | Selected |
| Kanal (Dye channel) | Green |
| PMT | XDR Hi 100% XDR Lo 10% |

3.5.8. Verilerin Analizi

Elde edilen tarama görüntüsü “Feature Extraction versiyon 9.5.3” programı kullanılarak işlenmemiş ham data ve tarama kalitesini gösteren kalite kontrol (QC) raporu elde edildi. Bu raporlar, hibridizasyonun kalitesi hakkında çeşitli parametreler sunmaktadır. En doğru sonuçların elde edilmesi açısından QC dosyalarındaki parametreler kontrol edildi.

Kalite kontrol açısından değerlendirilen dosyalar Genespring versiyon 13.0 yazılım programına (GeneSpring, Silicon Genetics, Redwood City, CA) girildi ve veriler normalize edildi. ANOVA (Analysis of Variance) istatistiksel analiz programı kullanılarak gruplar arasında gen ekspresyon değişimindeki anlamlı farklılıklar belirlendi. p değerleri <0.05 ve log kat değişim değeri (FC) >2 kullanılarak veri setleri filtrelendi ve tümör gruplarının sağlıklı gruba göre kaç kat değiştiği analiz edildi.

Gen artış sayıları, IPA yazılım (Ingeunity Systems, Redwood City, CA) yorum programına girildi. Bu program kullanılarak gen ürünleri, lokasyon ve moleküler fonksiyonlarına göre kategorize edildi. Her gen sembolü, IPA'daki uygun gen yerine

haritalandırıldı ve bu genlerin ağları, algoritmik olarak bağlantılarına göre oluşturuldu. Sonuç, sayısal bir değer olup, ağlarla var olan veri setindeki genler arasındaki yakınlığı derecelendirmektedir. Bu değer, ağın önemi ya da kalitesi ile ilgili bir belirteç değildir. Ağ, merkez genlerinin orijinal listesine yakın bir hale getirmek için ağdaki merkez genlerin sayısı ve ağın boyutu hesaplandı. Tanımlanan ağ, gen/gen ürünleri arasındaki ilişkiyi belirten bir grafik olarak ortaya çıkarıldı. Genler, düğümler ile iki gen arasındaki biyolojik ilişki de çizgi ile belirtildi. Düğüm renginin yoğunluğu, anlatım artış/azalışının derecesini göstermektedir. Standart altyol analizleri, veri seti girişinde önemli olan yolları IPA standart altyol kütüphanesinden tespit edildi. Veri seti ve standart altyol arasındaki ilişkinin önemi iki parametreye dayanarak bulgulandırıldı.

- Veri setinde yer alan genlerin sayısının standart altyoldaki toplam gen sayısına oranı
- Fischer'in kesin olasılık testi kullanılarak hesaplanan p değeri

Bu p değeri, veri setindeki genlerin birlikteliğinin ve standart altyolun tek başına varolma şansının olasılığını göstermektedir.

4. BULGULAR

4.1. Mikroarray Sonuçları

Mikroadenom, makroadenom ve invaziv hipofiz adenomları ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırılarak Genespring versiyon 13.0 (GeneSpring, Silicon Genetics, Redwood City, CA) yazılım programında analiz edildi. Hasta grupları ve kontrol grubu arasında gen ekspresyon değişimlerinde farklılıklar ANOVA istatistiksel analiz programı kullanılarak belirlendi. *p* değerleri <0.05 ve FC >2 olacak şekilde filtrelendi ve analiz sonuçlarına göre, toplamda 272 gen ekspresyon düzeyinde artış ve azalış (*up/down* regülasyon) gözlemlendi. Hasta grupları ve kontrol grubu arasındaki ekspresyon düzeyi değişen genler Tablo 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6' da listelenmiştir.

Tablo 4.1. İnvaziv adenom grubunda *down-regüle* olan genler

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|------------------|--|--|------------|
| A_33_P3213103 | SKOR2 | <i>SKI family transcriptional corepressor</i> | Transkripsiyon ko-represör aktivitesi; SMAD proteinleri bağlama; TGF- β sinyal yolağının negatif regülasyonu; BMP sinyal yolağının negatif regülasyonu | -3,4314644 |
| A_24_P196384 | C15orf38 (ARPIN) | <i>Chromosome 15 open reading frame 38</i> | Aktin nükleasyonun negatif regülasyonu; hücre göçünün negatif regülasyonu | -3,4070618 |
| A_24_P18270 | UCMA | <i>Upper zone growth plate and cartilage matrix associated</i> | Osteoblast diferansiyasyonunun negatif regülasyonu; GPCR sinyal ileti yolağı | -3,6867692 |
| A_32_P34920 | FOXD1 | <i>Forkhead box D1</i> | Transkripsiyon; hücre farklılaşması; BMP sinyal yolağının pozitif regülasyonu | -3,374585 |

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|---------|--|--|------------|
| A_32_P186731 | ISM1 | <i>Isthmin 1, angiogenesis inhibitor</i> | Anjiyogenez inhibitörü | -3,3677056 |
| A_33_P3347397 | AMOT | <i>Angiomotin</i> | Aktin sitoskeleton organizasyonu; hücre göçü regülasyonu; anjiyogenezin negatif regülasyonu; GPCR sinyal ileti yolağı; HIPPO sinyal ileti yolağı | -2,9160488 |
| A_33_P3308744 | LAMA4 | <i>Laminin alpha 4</i> | Hücre adhezyonu; Ekstrasellüler matriks organizasyonu; hücre göçü regülasyonu; PI3K-Akt sinyal ileti yolağı | -2,7973695 |
| A_33_P3414883 | ATMIN | <i>ATM interactor</i> | Transkripsiyon; DNA hasarına hücre sel yanıt | -2,649819 |
| A_24_P230540 | RNF212 | <i>Ring finger protein 212</i> | Ligaz aktivitesi; Mayotik gen konversiyonu; resiprokal rekombinasyon | -2,6357298 |
| A_24_P220771 | ANKRD17 | <i>Ankyrin repeat domain 17</i> | Hücre siklusunun pozitif regülasyonu; NFkB yolağı; MDA-5 yolağı; RIG-I yolağı | -2,3769088 |
| A_23_P85004 | DIAPH2 | <i>Diaphanous-related formin 2</i> | Aktin sitoskeleton regülasyonu; sitokinez; Rho GTPase bağlama | -2,2735848 |
| A_23_P94800 | S100A4 | <i>S100 calcium binding protein A4</i> | Kalsiyum bağlama; NFkB yolağı | -2.102109 |
| A_33_P3310189 | ADRB1 | <i>Adrenoceptor beta 1</i> | Apoptoz; Adenilat siklaz aktivasyonu; AMPK yolağı; | -2.089321 |

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|----------|--|--|------------|
| | | | cAMP yolağı; GPCR yolağı; G α s yolağı; Rho sinyal transdüksiyonu | |
| A_23_P142974 | ARHGAP25 | <i>Rho GTPase activating protein 25</i> | GTPase aktivasyonu | -2,0034163 |
| A_24_P410582 | VGLL4 | <i>Vestigial like family member 4</i> | Transkripsiyonun düzenlenmesi | -1,9071672 |
| A_23_P253350 | C8orf4 | <i>Chromosome 8 open reading frame 4</i> | Hücre siklusu; apoptoz, Notch sinyal yolağı; NF κ B sinyal yolağı | -1,8764334 |
| A_32_P120638 | INTS4 | <i>Integrator complex subunit 4</i> | snRNA işlenmesi | -1.8352406 |
| A_33_P3269824 | LRRC66 | <i>Leucine rich repeat containing 66</i> | Protein kinaz aktivitesinin inhibisyonu; JAK-STAT sinyal yolağı negatif regülasyonu; sitokin aracılı sinyal ileti yolağı | -1.8024099 |
| A_33_P3282898 | TLN1 | <i>Talin 1</i> | Hücreler arası bağlantı; hücre-substrat bağlama; hücre iskeletinin plasma membrana bağlanması | -1.6631873 |
| A_33_P3317988 | CMPK1 | <i>Cytidine monophosphate kinase 1</i> | Üridin ve üridilat kinaz aktivitesi; sitidilat kinaz aktivitesi; nükleotid difosfat fosforilasyonu | -1.5185802 |

Tablo 4.2. İnvaziv adenom grubunda *up-regüle* olan genler

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|----------|--|---|-----------|
| A_32_P186474 | RACGAP1 | <i>racGTPase activating protein 1</i> | Hücre siklusu; hücre farklılaşması; sitokinez; hücre içi sinyal transdüksiyonu; iyon transportu; nöroblastom proliferasyonu | 4,714402 |
| A_23_P201376 | SSX2IP | <i>Synovial sarcoma X breakpoint 2 interacting protein</i> | Aktin sitoskeleton organizasyonu; hücre adhezyonu; sentrozom organizasyonu; | 4,255736 |
| A_32_P45009 | IDH1 | <i>Isocitrate dehydrogenase 1</i> | Oksidatif stres cevabı; trikarboksilik asit siklusu | 4,225706 |
| A_33_P3360341 | GATA3 | <i>GATA binding protein 3</i> | Transkripsiyon; Sinyal transdüksiyon; T-hücre reseptör sinyalizasyon yolağı; TOR sinyalizasyonu; IFN- α hücresel yanıtı; IL-4 hücresel yanıtı; TNF hücresel yanıtı; trombin sinyalizasyonu; hücre döngüsü, motilitesi ve proliferasyonunun negatif düzenlenmesi; Notch sinyal yolağı | 4,184745 |
| A_24_P13024 | SLC16A12 | <i>Solute carrier family 26</i> | Simport aktivitesi; Kreatin transmembran transportu; Laktat transmembran transportu | 3,8304753 |
| A_23_P215913 | CLU | <i>Clusterin, apolipoprotein J</i> | Apoptoz; hücre ölümü; hücre proliferasyonu ve differansiyasyonu düzenlenmesi; NFkB | 3,6556585 |

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|---------|--|--|-----------|
| | | | pozitif regülasyonu; protein import; protein stabilizasyonu; nöronal sinyal transdüksiyonun düzenlenmesi | |
| A_23_P134085 | CNKSR3 | <i>CNKSR family member 3</i> | PTEN yolağı; Sıkı bağlantı sinyalizasyon; ERK1 ve ERK2 kaskadının negatif regülasyonu; Peptidil serin fosforilasyonunun negatif regülasyonu | 3,1997254 |
| A_23_P28869 | PTPRA | <i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type A</i> | Defosforilasyon; protein fosforilasyonu; Protein kinaz A sinyalizasyonu; Ras protein sinyal transdüksiyonu; FGFR sinyal yolağı, EGFR sinyal yolağı; VEGFR sinyal yolağı; MAPKK aktivasyonu | 3,3050585 |
| A_23_P145724 | PPP1R17 | <i>Protein phosphatase 1</i> | Merkezi sinir sistemi gelişimi; hücre içi sinyal transdüksiyon | 3,1164742 |
| A_33_P3367984 | ABCA12 | <i>ATP binding cassette</i> | Transmembran transport; hücrel homeostaz | 2,897386 |
| A_23_P50517 | ZNF541 | <i>Zinc finger protein 541</i> | Hücre farklılaşması, transkripsiyon | 2,8881476 |
| A_33_P3335451 | PARL | <i>Presenilin associated, rhomboid-like</i> | Proteoliz; intrinsik apoptoz sinyal yolağının negatif regülasyonu | 2,7274396 |
| A_23_P98350 | BIRC3 | <i>Baculoviral IAP repeat containing 3</i> | Apoptoz; NFkB sinyal ileti yolağı; toll | 2,3726854 |

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|----------|--|---|-----------|
| | | | benzeri reseptör sinyal ileti yolağı | |
| A_23_P436281 | HIST2H4B | <i>Histone cluster 2, H4b</i> | Hücre döngüsü; DNA onarımı; kromatin organizasyonu; DNA metilasyonu | 2,28676 |
| A_33_P3274129 | TMEM151B | <i>Transmembrane protein 151B</i> | Hücre membranının integral bileşeni; transkripsiyon | 2,281429 |
| A_24_P89872 | ZNF189 | <i>Zinc finger protein 189</i> | Transkripsiyon | 2,219828 |
| A_23_P251151 | NELL1 | <i>NEL-like 1</i> | Hücre farklılaşması; sinir sistemi gelişimi | 2,2054493 |
| A_23_P149649 | SDHB | <i>Succinate dehydrogenase complex, subunit B</i> | Triboksilik asit döngüsü; oksidatif fosforilasyon | 2,181036 |
| A_23_P68892 | RTCB | <i>RNA 2',3'-cyclic phosphate and 5'-OH ligase</i> | tRNA işlenmesi | 2,077906 |

Tablo 4.3. Makro adenom grubunda *down-regüle* olan genler

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|------------------|--|--|------------|
| A_32_P34920 | FOXD1 | <i>Forkhead box D1</i> | Transkripsiyon; hücre farklılaşması; BMP sinyal yolağının pozitif regülasyonu | -3,208434 |
| A_33_P3347397 | AMOT | <i>Angiomotin</i> | Aktin sitoskeleton organizasyonu; hücre göçü regülasyonu; anjiyogenezin negatif regülasyonu; GPCR sinyal ileti yolağı; HIPPO sinyal ileti yolağı | -3,1552334 |
| A_33_P3213103 | SKOR2 | <i>SKI family transcriptional corepressor</i> | Transkripsiyon ko-represör aktivitesi; SMAD proteinleri bağlama; TGF- β sinyal yolağının negatif regülasyonu; BMP sinyal yolağının negatif regülasyonu | -3,106711 |
| A_24_P18270 | UCMA | <i>Upper zone growth plate and cartilage matrix associated</i> | Osteoblast diferansiasyonunun negatif regülasyonu; GPCR sinyal ileti yolağı | -3,063035 |
| A_33_P3310189 | ADRB1 | <i>Adrenoceptor beta 1</i> | Apoptoz; Adenilat siklaz aktivasyonu; AMPK yolağı; cAMP yolağı; GPCR yolağı; Gas yolağı; Rho sinyal transdüksiyonu | -3,0155318 |
| A_24_P196384 | C15orf38 (ARPIN) | <i>Chromosome 15 open</i> | Aktin nükleasyonun | -2,9255419 |

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|---------|--|---|------------|
| | | <i>reading frame 38</i> | negatif regülasyonu; hücre göçünün negatif regülasyonu | |
| A_32_P186731 | ISM1 | <i>Isthmin 1, angiogenesis inhibitor</i> | Anjiyogenez inhibitörü | -2,6668687 |
| A_33_P3308744 | LAMA4 | <i>Laminin alpha 4</i> | Hücre adhezyonu; Ekstrasellüler matriks organizasyonu; hücre göçü regülasyonu; PI3K-Akt sinyal ileti yolağı | -2,5163882 |
| A_23_P253350 | C8orf4 | <i>Chromosome 8 open reading frame 4</i> | Hücre siklusu; apoptoz, Notch sinyal yolağı; NFkB sinyal yolağı | -2,292028 |
| A_24_P230540 | RNF212 | <i>Ring finger protein 212</i> | Ligaz aktivitesi; Mayotik gen konversiyonu; resiprokal rekombinasyon | -2,1800133 |
| A_23_P94800 | S100A4 | <i>S100 calcium binding protein A4</i> | Kalsiyum bağlama; NFkB yolağı | -2,0805924 |
| A_24_P220771 | ANKRD17 | <i>Ankyrin repeat domain 17</i> | Hücre siklusunun pozitif regülasyonu; NFkB yolağı; MDA-5 yolağı; RIG-I yolağı | -2,019634 |
| A_33_P3414883 | ATMIN | <i>ATM interactor</i> | Transkripsiyon; DNA hasarına hücrel yanıt | -1,9913738 |
| A_33_P3269824 | LRRC66 | <i>Leucine rich repeat containing 66</i> | Protein kinaz aktivitesinin inhibisyonu; JAK-STAT sinyal yolağı negatif | -1,9912059 |

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|----------|--|---|------------|
| | | | regülasyonu; sitookin aracılı sinyal ileti yolağı | |
| A_33_P3227676 | C2orf72 | <i>Chromosome 2 open reading frame 72</i> | Fonksiyonu bilinmiyor | -1,8383548 |
| A_24_P410582 | VGLL4 | <i>Vestigial like family member 4</i> | Transkripsiyonun düzenlenmesi | -1,8169153 |
| A_23_P142974 | ARHGAP25 | <i>Rho GTPase activating protein 25</i> | GTPase aktivasyonu | -1,7741344 |
| A_23_P127565 | LAYN | <i>layilin</i> | Karbonhidrat ve hiyaluronik asit bağlama | -1,7529409 |
| A_33_P3282898 | TLN1 | <i>Talin 1</i> | Hücreler arası bağlantı; hücre- substrat bağlama; hücre iskeletinin plasma membrana bağlanması | -1.7227356 |
| A_33_P3338724 | LENG9 | <i>Leukocyte receptor cluster (LRC) member 9</i> | Metal iyon bağlama; mitofaji | -1.5654867 |

Tablo 4.4. Makro adenom grubunda up-regüle olan genler

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|--------|--|---|-----------|
| A_32_P45009 | IDH1 | <i>Isocitrate dehydrogenase 1</i> | Oksidatif stres cevabı; trikarboksilik asit siklusu | 4,3904705 |
| A_33_P3360341 | GATA3 | <i>GATA binding protein 3</i> | Transkripyon; Sinyal transdüksiyon; T-hücre reseptör sinyalizasyon yolağı; TOR sinyalizasyonu; IFN- α hücresel yanıtı; IL-4 hücresel yanıtı; TNF hücresel yanıtı; trombin sinyalizasyonu; hücre döngüsü, motilitesi ve proliferasyonunun negatif düzenlenmesi; Notch sinyal yolağı | 4,125924 |
| A_23_P215913 | CLU | <i>Clusterin</i> | Apoptoz; hücre ölümü; hücre proliferasyonu ve differansiyasyonu düzenlenmesi; NFkB pozitif regülasyonu; protein import; protein stabilizasyonu; nöronal sinyal transdüksiyonun düzenlenmesi | 3,849984 |
| A_23_P201376 | SSX2IP | <i>Synovial sarcoma X breakpoint 2 interacting protein</i> | Aktin sitoskeleton organizasyonu; hücre adhezyonu; sentrozom organizasyonu | 3,709939 |
| A_23_P28869 | PTPRA | <i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type A</i> | Defosforilasyon; protein fosforilasyonu; Protein kinaz A | 3,3246126 |

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|----------|---|---|-----------|
| | | | sinyalizasyonu; Ras protein sinyal transdüksiyonu; FGFR sinyal yolağı, EGFR sinyal yolağı; VEGFR sinyal yolağı; MAPKK aktivasyonu | |
| A_32_P186474 | RACGAP1 | <i>racGTPase activating protein 1</i> | Hücre siklusu; hücre farklılaşması; sitokinez; hücre içi sinyal transdüksiyonu; iyon transportu; nöroblastom proliferasyonu | 3,0854635 |
| A_33_P3367984 | ABCA12 | <i>ATP binding cassette</i> | Transmembran transport; hücrel homeostaz | 3,0233502 |
| A_24_P13024 | SLC16A12 | <i>Solute carrier family 26</i> | Simport aktivitesi; Kreatin transmembran transportu; Laktat transmembran transportu | 2,768867 |
| A_33_P3335451 | PARL | <i>Presenilin associated, rhomboid-like</i> | Proteoliz; intrinsik apoptoz sinyal yolağının negatif regülasyonu | 2,573837 |
| A_23_P41734 | RNF130 | <i>Ring finger protein 130</i> | Programlı hücre ölümü; protein ubiquitinasyonu | 2,5728736 |
| A_32_P34444 | FHOD3 | <i>Formin homology domain containing 3</i> | Aktin filaman organizasyonu; aktin filaman polimerizasyonun negatif regülasyonu | 2,446847 |
| A_23_P251151 | NELL1 | <i>NEL-like 1</i> | Hücre farklılaşması; sinir sistemi gelişimi | 2,302705 |

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|----------|---|--|-----------|
| A_24_P137522 | USP53 | <i>Ubiquitin specific peptidase 53</i> | Protein de-ubiquitasyonu Ubiquitin hidrolaz 1 aktivitesi | 2,2295814 |
| A_23_P436281 | HIST2H4B | <i>Histone cluster 2, H4b</i> | Hücre döngüsü; DNA onarımı; kromatin organizasyonu; DNA metilasyonu | 2,2021778 |
| A_23_P149649 | SDHB | <i>Succinate dehydrogenase complex, subunit B</i> | Triboksilik asit döngüsü; oksidatif fosforilasyon | 2,1965375 |
| A_23_P68892 | RTCB | <i>RNA 2',3'-cyclic phosphate and 5'-OH ligase</i> | tRNA işlenmesi | 2,0588534 |
| A_23_P50517 | ZNF541 | <i>Zinc finger protein 541</i> | Hücre farklılaşması, transkripsiyon | 1,9886281 |
| A_23_P30813 | HIST1H4K | <i>Histone cluster 1</i> | Hücre siklusu; DNA onarımı; kromatin organizasyonu; telomer organizasyonu; histon H4-K20 demetilasyonu | 1,9661906 |
| A_23_P43613 | NDUFB6 | <i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6</i> | NADH dehidrogenaz aktivitesi; hücre metabolik süreç; mitokondrial elektron transport sistem | 1,1962669 |
| A_33_P3274129 | TMEM151B | <i>Transmembrane protein 151B</i> | Hücre membranının integral bileşeni; transkripsiyon | 1,884279 |

Tablo 4.5. Mikro adenom grubunda down-regüle olan genler

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|------------------|---|--|------------|
| A_33_P3213103 | SKOR2 | <i>SKI family transcriptional corepressor</i> | Transkripsiyon ko-represör aktivitesi; SMAD proteinleri bağlama; TGF- β sinyal yolağının negatif regülasyonu; BMP sinyal yolağının negatif regülasyonu | -3,499728 |
| A_32_P186731 | ISM1 | <i>Isthmin 1, angiogenesis inhibitor</i> | Anjiyogenez inhibitörü | -3,2567213 |
| A_24_P196384 | C15orf38 (ARPIN) | <i>Chromosome 15 open reading frame 38</i> | Aktin nükleasyonun negatif regülasyonu; hücre göçünün negatif regülasyonu | -3,2542627 |
| A_32_P34920 | FOXD1 | <i>Forkhead box D1</i> | Transkripsiyon; hücre farklılaşması; BMP sinyal yolağının pozitif regülasyonu | -3,243028 |
| A_33_P3240946 | DPF3 | <i>Zinc and double PHD fingers, family 3</i> | Kromatin modifikasyonu; transkripsiyon; çinko bağlama; sinir sistemi gelişimi; | -2,9137757 |

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|--------|------------------------------------|--|------------|
| A_33_P3310189 | ADRB1 | <i>Adrenoceptor beta 1</i> | Apoptoz; Adenilat siklaz aktivasyonu; AMPK yolağı; cAMP yolağı; GPCR yolağı; Gas yolağı; Rho sinyal transdüksiyonu | -2,7359493 |
| A_33_P3347397 | AMOT | <i>Angiomotin</i> | Aktin sitoskeleton organizasyonu; hücre göçü regülasyonu; anjiyogenezin negatif regülasyonu; GPCR sinyal ileti yolağı; HIPPO sinyal ileti yolağı | -2,7162685 |
| A_33_P3308744 | LAMA4 | <i>Laminin alpha 4</i> | Hücre adhezyonu; Ekstrasellüler matriks organizasyonu; hücre göçü regülasyonu; PI3K-Akt sinyal ileti yolağı | -2,5403187 |
| A_23_P85004 | DIAPH2 | <i>Diaphanous-related formin 2</i> | Aktin sitoskeleton regülasyonu; sitokinez; Rho GTPase bağlama | -2,3748438 |
| A_24_P18270 | UCMA | <i>Upper zone growth plate</i> | Osteoblast diferansiyasyonunun | -2,2087212 |

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|----------|--|--|------------|
| | | <i>and cartilage matrix associated</i> | negatif regülasyonu; GPCR sinyal ileti yolağı | |
| A_33_P3330443 | FAM110B | <i>Family with sequence similarity 110, member B</i> | Miktotübül organizasyonu | -2,079075 |
| A_32_P120638 | INTS4 | <i>Integrator complex subunit 4</i> | snRNA işlenmesi | -2,0673275 |
| A_33_P3414883 | ATMIN | <i>ATM interactor</i> | Transkripsiyon; DNA hasarına hücre sel yanıt | -2,0238714 |
| A_23_P38732 | CDH2 | <i>Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)</i> | Hücre bağılantısı; hücre adhezyonu; hücre göçü; beyin morfogenezi; serebral korteks gelişimi; Wnt sinyal ileti yolağı; MAPK sinyal ileti yolağı; FGF sinyal yolağı | -1,9556057 |
| A_23_P94800 | S100A4 | <i>S100 calcium binding protein A4</i> | Kalsiyum bağlama; NFkB yolağı | -1,9075477 |
| A_23_P142974 | ARHGAP25 | <i>Rho GTPase activating protein 25</i> | GTPase aktivasyonu | -1,876293 |

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|---------|--|---|------------|
| A_23_P253350 | C8orf4 | <i>Chromosome 8 open reading frame 4</i> | Hücre siklusu; apoptoz, Notch sinyal yolağı; NFkB sinyal yolağı | -1,8238623 |
| A_33_P3269824 | LRRC66 | <i>Leucine rich repeat containing 66</i> | Protein kinaz aktivitesinin inhibisyonu; JAK-STAT sinyal yolağı negatif regülasyonu; sitookin aracılı sinyal ileti yolağı | -1,680054 |
| A_24_P230540 | RNF212 | <i>Ring finger protein 212</i> | Ligaz aktivitesi; Mayotik gen konversiyonu; resiprokal rekombinasyon | -1,6767592 |
| A_24_P220771 | ANKRD17 | <i>Ankyrin repeat domain 17</i> | Hücre siklusunun pozitif regülasyonu; NFkB yolağı; MDA-5 yolağı; RIG-I yolağı | -1,6602457 |

Tablo 4.6. Mikro adenom grubunda up-regüle olan genler

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|---------|--|--|-----------|
| A_23_P28869 | PTPRA | <i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type A</i> | Defosforilasyon; protein fosforilasyonu; protein kinaz A sinyalizasyonu; Ras protein sinyal transdüksiyonu; FGFR sinyal yolağı, EGFR sinyal yolağı; VEGFR sinyal yolağı; MAPKK aktivasyonu | 3,394507 |
| A_23_P41734 | RNF130 | <i>Ring finger protein 130</i> | Programlı hücre ölümü; protein ubiquitinasyonu | 3,2079253 |
| A_32_P186474 | RACGAP1 | <i>racGTPase activating protein 1</i> | Hücre siklusu; hücre farklılaşması; sitokinez; hücre içi sinyal transdüksiyonu; iyon transportu; nöroblastom proliferasyonu | 3,118586 |
| A_33_P3367984 | ABCA12 | <i>ATP binding cassette</i> | Transmembran transport; hücre homeostaz | 2,9996943 |
| A_24_P137522 | USP53 | <i>Ubiquitin specific peptidase 53</i> | Protein de-ubiquitinasyonu Ubiquitin hidrolaz 1 aktivitesi | 2,815166 |
| A_33_P3335451 | PARL | <i>Presenilin associated, rhomboid-like</i> | Proteoliz; intrinsik apoptoz sinyal yolağının negatif regülasyonu | 2,5394275 |
| A_32_P164593 | ZMAT4 | <i>Zinc finger, matrin-type 4</i> | Nükleik asit bağlama; çinko iyonu bağlama; p53 bağlama; p53 aracılı intrinsik apoptotik sinyal yolu | 2,5128405 |
| A_23_P30315 | TRIM7 | <i>Tripartite motif containing 7</i> | Protein ve çinko iyonu bağlama | 2,5064247 |

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|----------|--|---|-----------|
| A_32_P118397 | HEPACAM2 | <i>HEPACAM family member 2</i> | Hücre bölünmesi; sentrozom organizasyonu; mitotik nuklear bölünme; protein bağlama | 2,410491 |
| A_23_P251151 | NELL1 | <i>NEL-like 1</i> | Hücre farklılaşması; sinir sistemi gelişimi | 2,2878363 |
| A_23_P201376 | SSX2IP | <i>Synovial sarcoma X breakpoint 2 interacting protein</i> | Aktin sitoskeleton organizasyonu; hücre adhezyonu; sentrozom organizasyonu; | 2,268527 |
| A_23_P68892 | RTCB | <i>RNA 2',3'-cyclic phosphate and 5'-OH ligase</i> | tRNA işlenmesi | 2,255789 |
| A_24_P79070 | GNG8 | <i>Guanine nucleotide binding protein gamma 8</i> | GTPase aktivitesi; sinyal dönüştürme aktivitesi; sinaptik transmisyon; GPCR sinyal yolağı | 2,2275887 |
| A_23_P149649 | SDHB | <i>Succinate dehydrogenase complex, subunit B</i> | Triboksilik asit döngüsü; oksidatif fosforilasyon | 1,9184403 |
| A_24_P49190 | C17orf58 | <i>Chromosome 17 open reading frame 58</i> | Fonksiyonu bilinmiyor | 1,9301033 |
| A_33_P3318852 | TBC1D8B | <i>TBC1 domain family, member 8B (with GRAM domain)</i> | GTPase aktivitesinin pozitif regülasyonu; kalsiyum iyonu bağlama | 1,8963118 |
| A_23_P54758 | GDE1 | <i>Glycerophosphodiester phosphodiesterase 1</i> | Lipit metabolizma süreci | 1,8458223 |
| A_24_P941988 | SPAST | <i>Spastin</i> | Mirotübül sarmal oluşumu; sitokinez; protein homooligomerizasyonu; aksonogenez; endoplazmik | 1,790894 |

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|--------|--------------------------------------|---|-----------|
| | | | retikulumdan golgi aygıtına transport | |
| A_23_P215913 | CLU | <i>Clusterin</i> | Apoptoz; hücre ölümü; hücre proliferasyonu ve differansiyasyonu düzenlenmesi; NFkB pozitif regülasyonu; protein import; protein stabilizasyonu; nöronal sinyal transdüksiyonun düzenlenmesi | 1,7786138 |
| A_33_P3354539 | CHURC1 | <i>Churchill domain containing 1</i> | Transkripsiyonun pozitif regülasyonu; çinko iyon bağlama | 1,7186651 |

4.2. Hasta Grupları Arasında Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişiklikler

Mikroadenom, makroadenom ve invaziv adenom grupları kendi aralarında ANOVA istatistiksel analiz programı kullanılarak. *p* değerleri <0.05 ve log kat değişim değeri (FC) >2 olacak şekilde filtrelenerek karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki ekspresyon düzeyi değişen genler Tablo 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13’de listelenmiştir.

4.2.1. İnvaziv Adenom Grubu

Tablo 4.7. İnvaziv adenom grubu ile makro adenom grubu karşılaştırıldığında up-regüle olan genler

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|--------|------------------------------|---|-----------|
| A_23_P134085 | CNKSR3 | <i>CNKSR family member 3</i> | PTEN yolağı; Sıkı bağlantı sinyalizasyon; ERK1 ve ERK2 kaskadının negatif regülasyonu; Peptidil serin fosforilasyonunun negatif regülasyonu | 3,8237615 |
| A_24_P335092 | SAA1 | <i>Serum amyloid A1</i> | Hücre adhezyonu; MAPK sinyal ileti yolağı aktivasyonu; GPCR sinyal yolağı | 2,4796576 |

Tablo 4.8. İnvaziv adenom grubu ile mikro adenom grubu karşılaştırıldığında up-regüle olan genler

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|--------|---|--|-----------|
| A_23_P134085 | CNKS3 | <i>CNKS3 family member 3</i> | PTEN yolağı; Sıkı bağlantı sinyalizasyon; ERK1 ve ERK2 kaskadının negatif regülasyonu; Peptidil serin fosforilasyonunun negatif regülasyonu | 4,319542 |
| A_24_P271696 | XAGE1A | <i>Homo sapiens X antigen family, member 1A</i> | Protein bağlama | 4,0079865 |
| A_33_P3326483 | CRABP1 | <i>Cellular retinoic acid binding protein 1</i> | Sinyal transdüksiyon; transport; retinokoik asit biyosentezi | 3,5708518 |
| A_23_P45536 | MCF2 | <i>MCF2 cell line derived transforming sequence</i> | Apoptotik sinyal yolağı; Rho protein sinyal transdüksiyonu; GTPase aktivitesinin pozitif regülasyonu | 2,8409452 |
| A_23_P52227 | GDF10 | <i>Growth differentiation factor 10</i> | BMP sinyal yolağı; SMAD protein sinyal transdüksiyonu; hücre gelişimi; MAPK sinyal yolağının regülasyonu; apoptotik sürecin regülasyonu; TGF β sinyal yolağı | 2,6852973 |

4.2.2.Makro adenom grubu

Tablo 4.9. Makro adenom grubu ile mikro adenom grubu ile karşılaştırıldığında up-regüle olan genler

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|--------|--|---|-----------|
| A_24_P271696 | XAGE1A | <i>Homo sapiens X antigen family, member 1A</i> | Protein bağlama | 5,225795 |
| A_33_P3326483 | CRABP1 | <i>Cellular retinoic acid binding protein 1</i> | Sinyal transdüksiyon; transport; retinoik asit biyosentezi | 3,4473982 |
| A_33_P3233906 | RAMP1 | <i>Receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 1</i> | Anjiyogenez; hücre içi protein tranportu; kalsiyum tranportu; cAMP biyosentezinin pozitif regülasyonu; GPCR sinyal yolağı | 3,2582211 |
| A_23_P320261 | DMKN | <i>Dermokine</i> | Protein bağlama | 3,079049 |
| A_23_P45536 | MCF2 | <i>MCF2 cell line derived transforming sequence</i> | Apoptotik sinyal yolağı; Rho protein sinyal transdüksiyonu; GTPase aktivitesinin pozitif regülasyonu | 2,7170393 |

Tablo 4.10. Makro adenom grubu ile invaziv adenom grubu karşılaştırıldığında down-regüle olan genler

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|---------|------------------------------|---|------------|
| A_23_P145724 | PPP1R17 | <i>Protein phosphatase 1</i> | Merkezi sinir sistemi gelişimi; hücre içi sinyal transdüksiyon | -4,6145897 |
| A_23_P134085 | CNKSR3 | <i>CNKSR family member 3</i> | PTEN yolağı; Sıkı bağlantı sinyalizasyon; ERK1 ve ERK2 kaskadının negatif regülasyonu; Peptidil serin fosforilasyonunun negatif regülasyonu | -3,8237615 |

4.2.3. Mikro Adenom Grubu

Tablo 4.11. Mikro adenom grubu ile invaziv adenom grubu karşılaştırıldığında down-regüle olan genler

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|--------|-------------------------------|---|-----------|
| A_23_P134085 | CNKSR3 | <i>CNKSR family member 3</i> | PTEN yolağı; Sıkı bağlantı sinyalizasyon; ERK1 ve ERK2 kaskadının negatif regülasyonu; Peptidil serin fosforilasyonunun negatif regülasyonu | -4,319542 |
| A_33_P3360341 | GATA3 | <i>GATA binding protein 3</i> | Transkripyon; Sinyal transdüksiyon; T-hücre reseptör sinyalizasyon yolağı; TOR sinyalizasyonu; IFN- α hücresel yanıtı; IL-4 | -4,123869 |

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|----------|--|--|------------|
| | | | hücresel yanıtı; TNF hücresel yanıtı; trombin sinyalizasyonu; hücre döngüsü, motilitesi ve proliferasyonunun negatif düzenlenmesi; Notch sinyal yolağı | |
| A_24_P13024 | SLC16A12 | <i>Solute carrier family 26</i> | Simport aktivitesi; Kreatin transmembran transportu; Laktat transmembran transportu | -3,3873699 |
| A_23_P50517 | ZNF541 | <i>Zinc finger protein 541</i> | Hücre farklılaşması, transkripsiyon | -3,269771 |
| A_32_P45009 | IDH1 | <i>Isocitrate dehydrogenase 1</i> | Oksidatif stres cevabı; trikarboksilik asit siklusu | -3,053084 |
| A_23_P217319 | FGF13 | <i>Fibroblast growth factor 13</i> | MAPK sinyal yolağı; PI3K-Akt sinyal yolağı; RAS sinyal yolağı | -2,8066108 |
| A_33_P3240946 | DPF3 | <i>Zinc and double PHD fingers, family 3</i> | Kromatin modifikasyonu; transkripsiyon; çinko bağlama; sinir sistemi gelişimi; | -2,5257602 |
| A_33_P3227676 | C2orf72 | <i>Chromosome 2 open reading frame 72</i> | Fonksiyonu bilinmiyor | -2,4947639 |

Tablo 4.12. Mikro adenom grubu ile makro adenom grubu karşılaştırıldığında down-regüle olan genler

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|---------|--|---|------------|
| A_33_P3360341 | GATA3 | <i>GATA binding protein 3</i> | Transkripyon; Sinyal transdüksiyon; T-hücre reseptör sinyalizasyon yolağı; TOR sinyalizasyonu; IFN- α hücresel yanıtı; IL-4 hücresel yanıtı; TNF hücresel yanıtı; trombin sinyalizasyonu; hücre döngüsü, motilitesi ve proliferasyonunun negatif düzenlenmesi; Notch sinyal yolağı | -4,065048 |
| A_32_P45009 | IDH1 | <i>Isocitrate dehydrogenase 1</i> | Oksidatif stres cevabı; trikarboksilik asit siklusu | -3,2178483 |
| A_33_P3240946 | DPF3 | <i>Zinc and double PHD fingers, family 3</i> | Kromatin modifikasyonu; transkripsiyon; çinko bağlama; sinir sistemi gelişimi; | -2,8723872 |
| A_23_P217319 | FGF13 | <i>Fibroblast growth factor 13</i> | MAPK sinyal yolağı; PI3K-Akt sinyal yolağı; RAS sinyal yolağı | -2,7763665 |
| A_23_P114862 | ANGPTL7 | <i>Angiopoietin-like 7</i> | Oksidatif stres cevabı | -2.674698 |

Tablo 4.13. Mikro adenom grubu ile makro adenom grubu karşılaştırıldığında up-regüle olan genler

| Agilent Probe ID | Sembol | Gen | Fonksiyon/Yolak | FC |
|------------------|---------|---|---|-----------|
| A_24_P79070 | GNG8 | <i>Guanine nucleotide binding protein gamma 8</i> | GTPase aktivitesi; sinyal dönüştürme aktivitesi; sinaptik transmisyon; GPCR sinyal yolağı | 2,9630647 |
| A_23_P145724 | PPP1R17 | <i>Protein phosphatase 1</i> | Merkezi sinir sistemi gelişimi; hücre içi sinyal transdüksiyon | 2,4615877 |
| A_24_P96403 | RUNX1 | <i>Runt-related transcription factor 1</i> | Transkripsiyon aktivasyonu; anjiyogenezin pozitif regülasyonu | 2,0119584 |

4.3. Hipofiz Tümörlerinde İfade Edilen En Belirgin Genlerin Hastalık ve Moleküler Fonksiyonlarına Göre Sınıflandırılması

IPA yazılım (Ingeunity Systems, Redwood City, CA) yorum programı kullanılarak gen ürünleri moleküler fonksiyonlarına göre kategorize edildi (Tablo 4.14, 4.15, 4.16).

Tablo 4.14. İnvaziv adenom grubunda öne çıkan genlerin ilişkili olduğu hastalık ve moleküler fonksiyonlar

| Gen Sembol | Hastalık&Biyofonksiyon | P değeri | FC |
|------------|------------------------|----------|-------|
| CLU | Benign glioma | 5,70E-05 | 3,656 |
| IDH1 | | | 4,226 |
| IDH1 | Ganglioglioma | 8,77E-03 | 4,226 |
| | Benign beyin tümörü | 1,31E-02 | |
| | Grade 1 glioma | 8,77E-03 | |
| | Gliomaya yatkınlık | 1,75E-02 | |
| | Glioskoma | 1,75E-02 | |
| | Oligoastrozitoma | 4,32E-02 | |
| | Gliomatozis Serebri | 8,77E-03 | |

| Gen Sembol | Hastalık&Biyofonksiyon | P değeri | FC |
|---|---|--|---|
| CLU | Nöroblastoma hücre invazyonu Grade 3 astrositoma Anaplastik astrositoma Şiddetli Alzheimer Hastalığı | 4,40E-03 2,61E-02 3,04E-02 3,04E-02 | 3,656 |
| CLU FGF13 PARL NDUFB6 SDHB SSX2IP TNN1 ADRB1 | Bazal Ganglion Bozuklukları | 2,97E-02 | 3,656 1,817 2,728 1,482 2,181 4,256 1,034 -2,089 |
| CLU FGF13 NDUFB6 SDHB SSX2IP TNNT1 ADRB1 | Huntington hastalığı | 1,57E-02 | 3,656 1,817 1,482 2,181 4,256 1,034 -2,089 |
| RACGAP1 CLU SDHB | Primer neoplazm | 3,61E-02 | 4,714 3,656 2,181 |
| NLGN1 | Nöron hücre adhezyonu | 3,89E-02 | 1,251 |
| ARTN | Dopaminerjik nöronların sağkalımı Duyusal nöronların sağkalımı | 4,40E-02 1,75E-02 | -1,101 |
| PPP1R17 SQSTM1 | Nöroblastoma hücre dizilerinin hücre yaşama yeteneği | 1,33E-02 | 3,116 1,360 |

| Gen Sembol | Hastalık&Biyofonksiyon | P değeri | FC |
|---|--|----------------------|---|
| BNIP2 CLU DCDC2 PPP1R17 SQSTM1 ARTN DCT S100A4 | Tümör hücre dizilerinin hücreysel yaşama yeteneği | 2,67E-02 | 1,307 3,656 1,228 3,116 1,360 -1,101 -1,228 -2,102 |
| CALM1 | Nöroblastoma hücre dizilerinin sitotoksitesisi | 2,18E-02 | 1,081 |
| ABCA12 | Salgı yollarının regülasyonu | 1,31E-02 | 2,897 |
| SPAST | Mikrotübüllerin bağlanması Mikrotübül morfolojisi | 4,32E-02 8,77E-02 | 1,656 |
| AMOT TLN1 | İntrasellüler bağlantıların birleşmesi | 1,81E-02 | -2,916 -1,663 |
| CALM1 RACGAP1 DIAPH2 | Sitokinez | 1,66E-02 | 1,081 4,714 -2,274 |
| CLU SQSTM1 | Hücre replikasyonu | 7,17E-03 | 3,656 1,360 |

Tablo 4.15. Makro Adenom grubunda öne çıkan genlerin ilişkili olduğu hastalık ve moleküler fonksiyonlar

| Gen Sembol | Hastalık&Biyofonksiyon | P değeri | FC |
|-------------|--|--|----------------|
| CLU IDH1 | Benign glioma | 5,55E-05 | 3,850 4,390 |
| IDH1 | Ganglioglioma Benign beyin tümörü Grade 1 glioma Gliomaya yatkınlık Gliosarkoma Oligoastrozitoma Gliomatozis Serebri | 8,66E-03 1,30E-02 8,66E-03 1,72E-02 1,72E-02 4,25E-02 8,66E-03 | 4,390 |
| CLU | Nöroblastoma hücre invazyonu Grade 3 astrozitoma | 4,34E-03 2,57E-02 | 3,850 |

| Gen Sembol | Hastalık&Biyofonksiyon | P değeri | FC |
|---|--|----------------------|---|
| | Anaplastik astrositoma Şiddetli Alzheimer Hastalığı | 3,00E-02 3,00E-02 | |
| NLGN1 | Nöron hücre adhezyonu | 3,84E-02 | 1,298 |
| CLU FGF13 NDUFB6 SDHB SSX2IP TNNT1 ADRB1 | Huntington hastalığı | 1,47E-02 | 3,850 1,786 1,196 2,197 3,710 1,075 -3,015 |
| CLU FGF13 PARL NDUFB6 SDHB SSX2IP TNN1 ADRB1 | Bazal Ganglion Bozuklukları | 2,77E-02 | 3,850 1,786 2,573 1,196 2,197 3,710 1,075 -3,015 |
| SPAST | Mikrotübüllerin bağlanması Mikrotübül morfolojisi | 4,25E-02 8,66E-02 | 1,635 |
| AMOT TLN1 | İntrasellüler bağlantıların birleşmesi | 1,77E-02 | -3,155 -1,722 |
| ABCA12 | Salgı yolaklarının regülasyonu | 1,30E-02 | 3,023 |
| CLU SQSTM1 RUNX1 | DNA hasarı | 9,38E-03 | 3,850 1,243 -1,301 |
| PTPRA | Tümör hücrelerinin metastazı | 3,42E-02 | 3,324 |
| RACGAP1 CLU SDHB | Primer neoplazm | 3,50E-02 | 3,085 3,850 2,197 |
| CLU SQSTM1 | Hücre replikasyonu | 6,99E-03 | 3,850 1,243 |
| PPP1R17 SQSTM1 | Nöroblastoma hücre dizilerinin hücre yaşama yeteneği | 1,30E-02 | -1,498 1,243 |

Tablo 4.16. Mikro Adenom grubunda öne çıkan genlerin ilişkili olduğu hastalık ve moleküler fonksiyonları

| Gen Sembol | Hastalık&Biyofonksiyon | P değeri | FC |
|---|--|--|--|
| CLU IDH1 | Benign glioma | 4,83E-05 | 1,779 1,173 |
| IDH1 | Ganglioglioma Benign beyin tümörü Grade 1 glioma Gliomaya yatkınlık Gliosarkoma Oligoastrositoma Gliomatozis Serebri | 8,03E-03 1,21E-02 8,03E-03 1,61E-02 1,61E-02 3,98E-02 8,03E-03 | 1,173 |
| CLU | Nöroblastoma hücre invazyonu Grade 3 astrositoma Anaplastik astrositoma Şiddetli Alzheimer Hastalığı | 4,05E-03 2,40E-02 2,80E-02 2,80E-02 | 1,779 |
| CLU RACGAP1 SDHB | Primer neoplazm | 2,93E-02 | 1,779 3,118 1,918 |
| PTPRA | Tümör hücrelerinin metastazı | 3,19E-02 | 3,395 |
| CALM1 RACGAP1 DIAPH2 | Sitokinez | 1,33E-02 | 1,267 3,118 -2,375 |
| CLU SQSTM1 | Hücre replikasyonu | 6,11E-03 | 1,779 1,334 |
| ARTN | Dopaminerjik nöronların sağkalımı Duyusal nöronların sağkalımı Nöron jenerasyonu | 4,05E-03 1,61E-02 3,98E-02 | -1,224 |
| CALM1 | Nöroblastoma hücre dizilerinin sitotoksitesi | 2,01E-02 | 1,267 |
| ABCA12 | Salgı yollarının regülasyonu | 1,21E-02 | 3,000 |
| CLU NDUFB6 SDHB SSX2IP TNNT1 ADRB1 | Huntington hastalığı | 3,34E-02 | 1,779 1,181 1,918 2,259 -1,403 -2,736 |

4.4. Gen Ağları ve Alt Yollar

Her gen sembolü, IPA'daki gen yerine haritalandırıldı ve bu genlerin ağları, algoritmik olarak bağlantılarına göre oluşturuldu. Sonuç, sayısal bir değer olup, ağlarla var olan veri setindeki genler arasındaki yakınlığı derecelendirmektedir. Bu değer, ağın önemi ya da kalitesi ile ilgili bir belirteç değildir. Tanımlanan ağ, gen/gen ürünleri arasındaki ilişkiyi belirten bir grafik olarak ortaya çıkarıldı. Standart altyol analizleri, veri seti girişinde önemli olan yolları IPA standart altyol kütüphanesinden tespit edildi. Veri seti ve standart altyol arasındaki ilişkinin önemi iki parametreye dayanarak bulgulandırıldı.

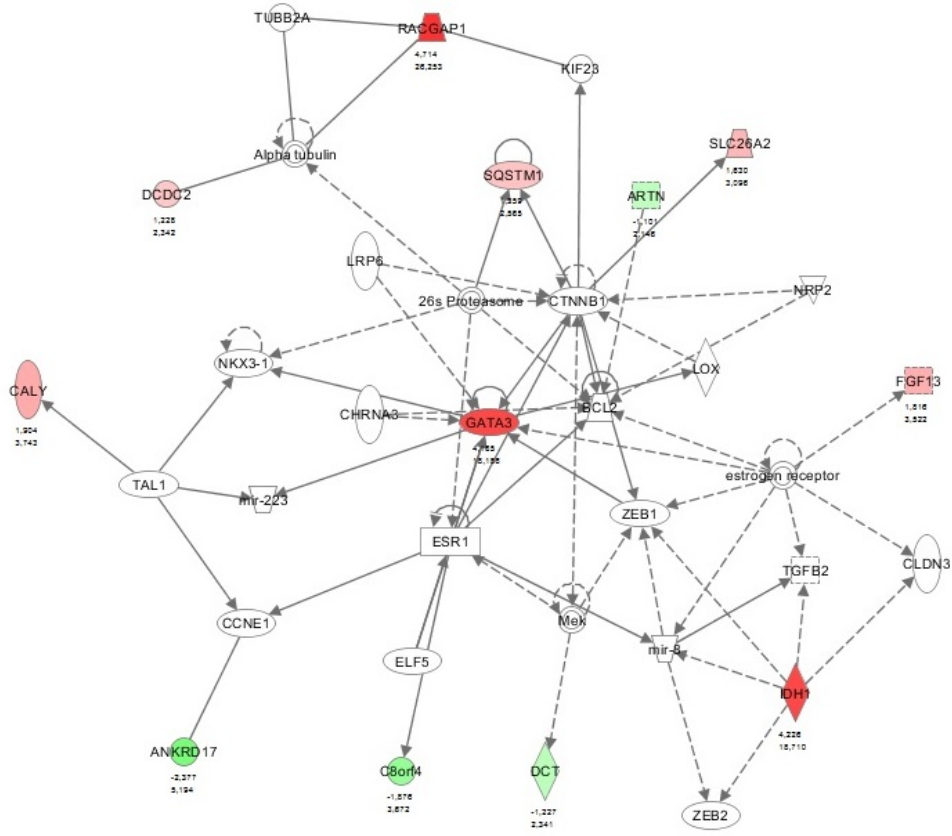
- Veri setinde yer alan genlerin sayısının standart altyoldaki toplam gen sayısına oranı
- Fischer'in kesin olasılık testi kullanılarak hesaplanan p değeri

Bu p değeri, veri setindeki genlerin birlikteliğinin ve standart altyolun tek başına varolma şansının olasılığını göstermektedir.

İnvaziv, makro ve mikro hipofiz adenomların öne çıkan gen ağları Tablo 4.17, 4.18 ve 4.19'da listelenmiştir. Bu gen ağlarında yer alan moleküller ve birbirleri ile bağlantıları Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9'da gösterilmiştir.

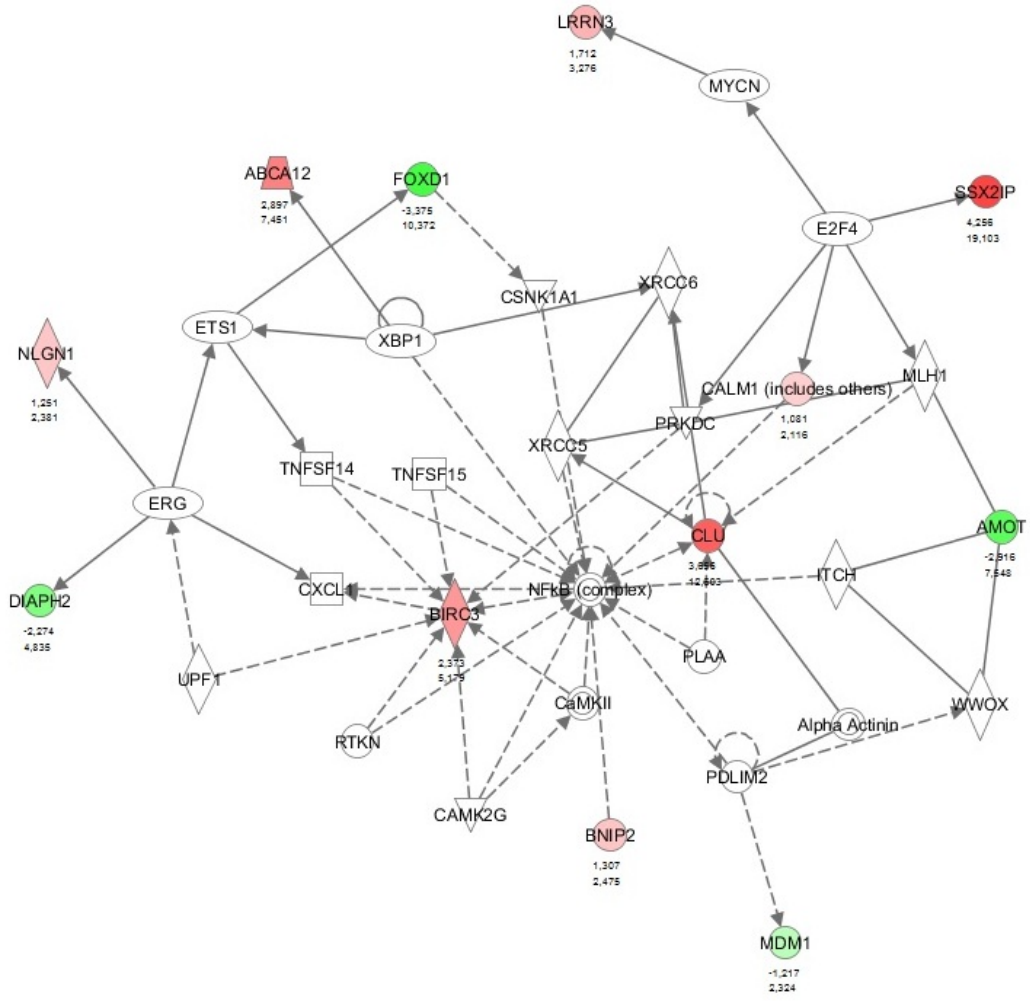
Tablo 4.17. İnvaziv Hipofiz Adenomlarında Önemli Gen Ağları

| Gen Ağı | Moleküller |
|---|---|
| Hüresel Hareket, Hüresel Büyüme ve Proliferasyon, Sinir Sistemi Gelişimi ve Fonksiyonu | 26s Proteazom Alfatubulin, ANKRD17, ARTN, BCL2, C8orf4, CALY, CCNE1, CHRNA3, CLDN3, CTNNB1, DCDC2, DCT, ELF5, ESR1, Östrojen reseptör, FGF13, GATA3, IDH1, KIF23, LOX, LRP6, Mek, mir8, mir223, NKX31, NRP2, RACGAP1, SLC26A2, SQSTM1, TAL1, TGFB2, TUBB2A, ZEB1, ZEB2 |
| Hücre Ölümü ve Sağkalım, Kanser, Hematolojik Hastalıklar | ABCA12, Alfa Aktinin, AMOT, BIRC3, BNIP2, CALM1 (diğerleri de dahil), CAMK2G, CaMKII, CLU, CSNK1A1, CXCL1, DIAPH2E2F4, ERG, ETS1, FOXD1, ITCH, LRRN3, MDM1, MLH1, MYCN, NFkB (kompleks), NLGN1, PDLIM2, PLAA, PRKDC, RTKN, SSX2IP, TNFSF14, TNFSF15, UPF1, WWOX, XBP1, XRCC5, XRCC6 |
| Hüresel Gelişim, Hüresel Büyüme ve Proliferasyon, Hematolojik Sistem Gelişimi ve Fonksiyonu | ADRB1, ADRB2, BCL6B, BNIP3, CCL18, CERS6, CSNK1A1, CXCL1, DAB2IP, DLG1, EZH2, FHOD3, HEXA, HEXB, HSPD1, Igm, ITGB2, LAMA4, MAPK1, NFKB2, PPP1R17, PSMC6, PSMD6, RELB, S100A4, STAT6, TIMP1, TJP1, TLN1, TNF, TNFRSF14, TP53, TRAF1, TRAF5, UGCG |



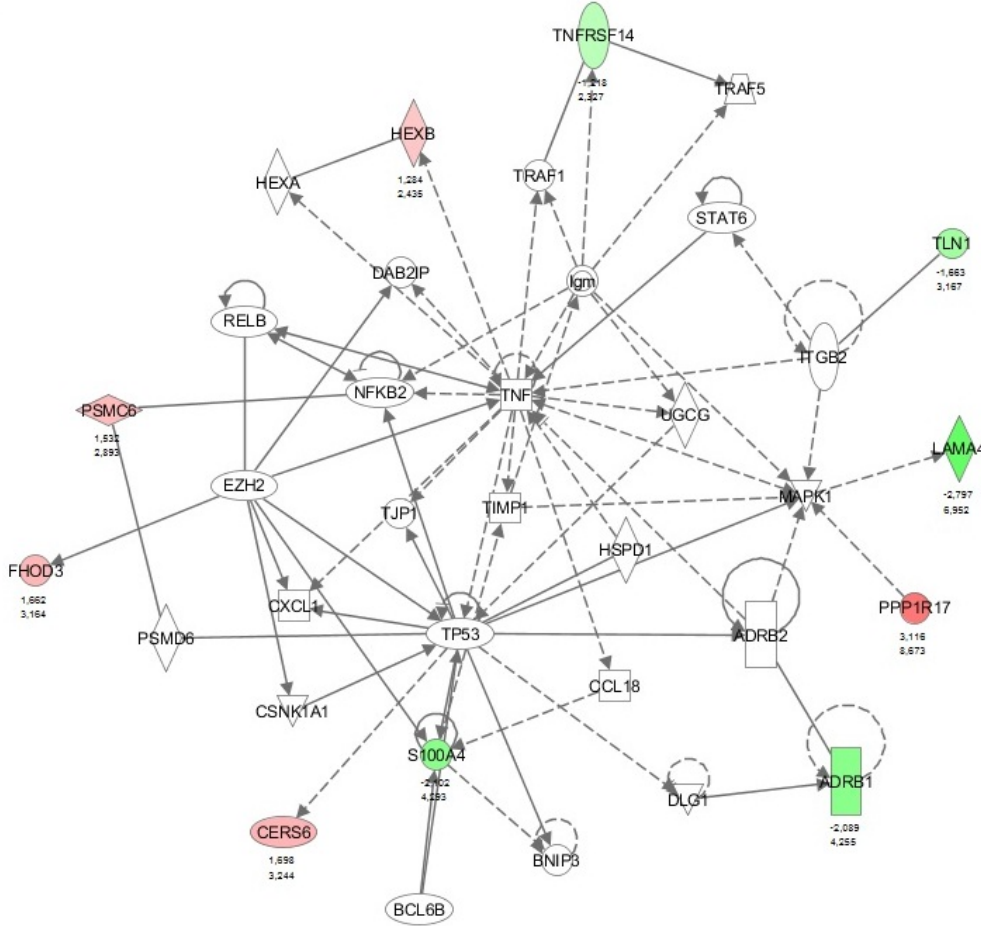
Şekil 4.1. Hücresel Hareket, Hücresel Büyüme ve Proliferasyon, Sinir Sistemi Gelişimi ve Fonksiyonu ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları

RACGAP1, GATA3, IDH1 (kırmızı) gen ifadeleri en yüksek olan genler; CALY, FGF13, SQSTM1, DCDC2, SLC26A2 (Pembe) gen ifadeleri yüksek; ANKRD17, C8orf4, DCT ve ARTN (yeşil) gen ifadeleri ise en düşük olan genlerdir.



Şekil 4.2. Hücre Ölümü ve Sağkalım, Kanser, Hematolojik Hastalıklar ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları

CLU, SSX2IP ve ABCA12 (kırmızı) gen ifadeleri en yüksek; BIRC3, CALM1(diğerleri de dahil), BNIP2, NLGN1 ve LRRN3 (pembe) gen ifadeleri yüksek; AMOT, DIPAH2, FOXD1 ve MDM1(yeşil) gen ifadeleri ise en düşük olan genlerdir..



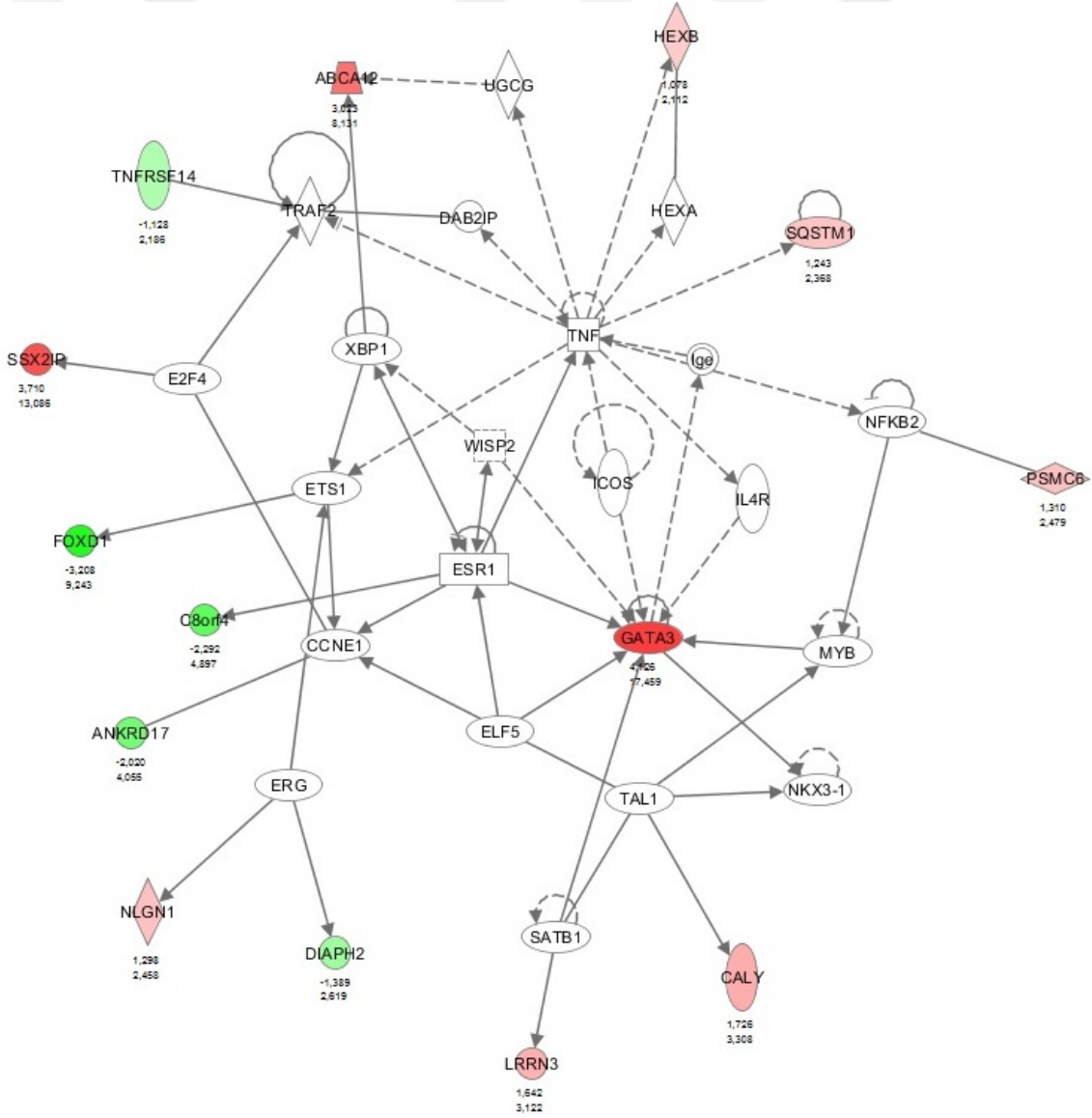
Şekil 4.3. Hüresel Gelişim, Hüresel Büyüme ve Proliferasyon, Hematolojik Sistem Gelişimi ve Fonksiyonu ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları

PPP1R17 (kırımızı) gen ifadesi en yüksek; HEXB, PSMC6, FHOD3 ve CERS6 (pembe) gen ifadesi yüksek; S100A4, ADRB1, LAMA4, TNFRSF14 ve TLN1 (yeşil) gen ifadesi en düşük olan genlerdir.

Tablo 4.18. Makro Hipofiz Adenomlarında Önemli Gen Ağları

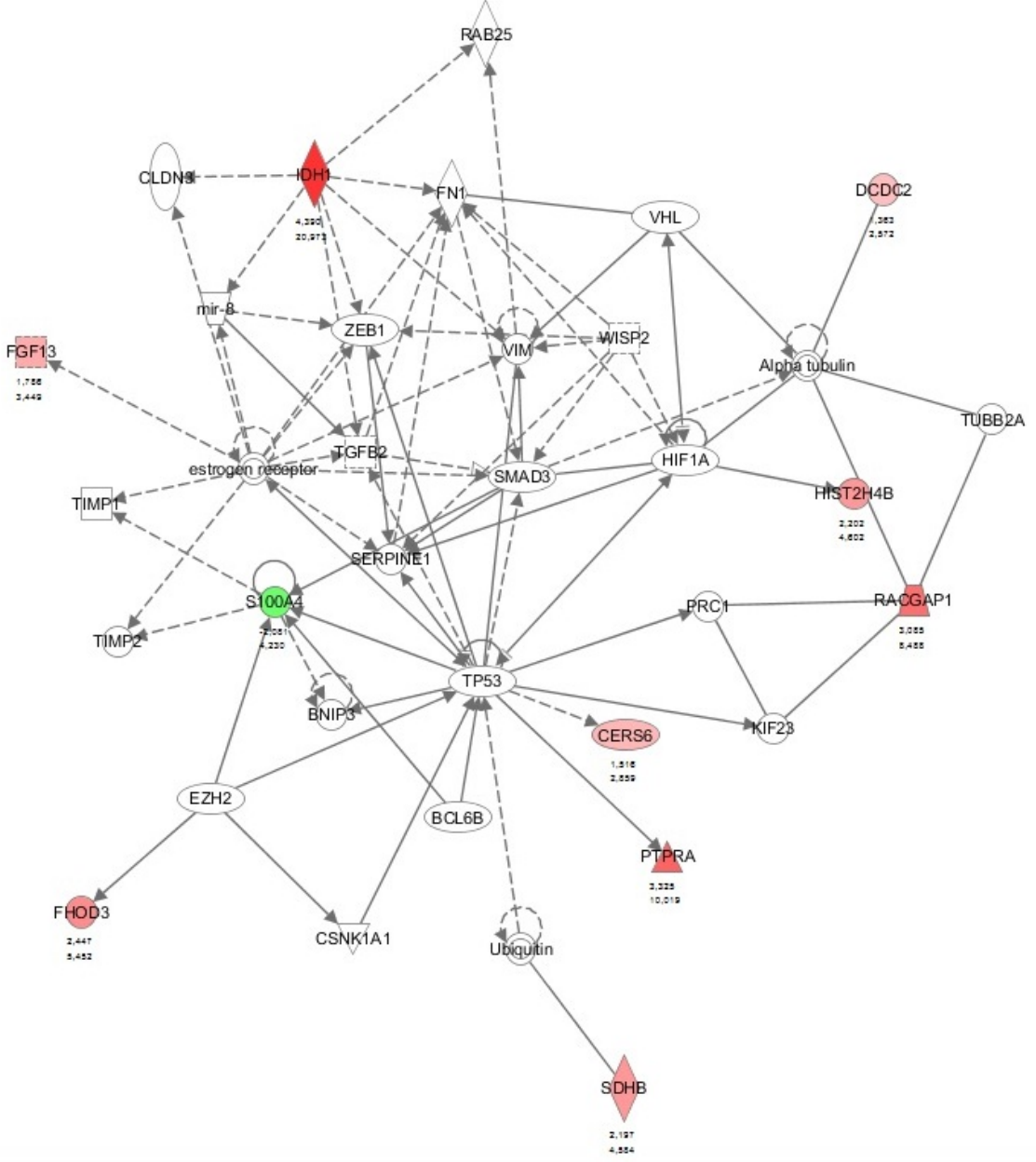
| Gen Ağı | Moleküller |
|---|---|
| Hüresel gelişim, Hematolojik sistem gelişimi ve fonksiyonları, Hematopoez | ABCA12, ANKRD17, c8orf4, CALY, CCNE1, DABP2IP, DIAPH2, E2F4, ELF5, ERG, ESR1, ETS1, FOXD1, GATA3, HEXA, HEXB, ICOS, Ige, IL4R, LRRN3, MYB, NFKB2, NKX3-1, NLGN1, PSMC6, SATB1, SQSTM1, SSSX2IP, TAL1, TNF, TNFRSF14, TRAF2, UGCG, WISP2, XBP1 |
| Hüresel hareket, Kanser, Organizmal yaralanma ve anormallikler | Alfa tubulin, BCL6B, BNIP3, CERS6, CLDN3, CSNK1A1, DCDC2, östrojen reseptörü, EZH2, FGF13, FHOD3, FN1, HIF1A, HIST2H4B, |

| Gen Ağı | Moleküller |
|---|---|
| | IDH1, KIF23, mir8, PRC1, PTPRA, RAB25, RACGAP1, S100A4, SDHB, SERPINE1, SMAD3, TGFB2, TIMP1, TIMP2, TP53, TUBB2A, Ubuquitin, VHL, VIM, WISP2, ZEB1 |
| Hüresel gelişim, Organizmal yaralanma ve anormallikler, Hücre ölümü ve sağkalım | ADRB1, ADRB2, AKAP5, ALB, Alfa aktinin, AMOT, BNIP2, CD209, CLU, ELF5, fokal adhezyon kinaz, HIST2H3C, HSPD1, IL13, ITCH, L3MBTL1, LAMA4, MAPK1, MDM1, MECOM, MYL9, NFE2, NFKB (Kompleks), NR4A3, PDLIM2, Pkc(s), PLAA, PLG, PPP1R17, RUNX1, SLC8A1, TLN1, VTN, WWOX, XRCC5 |



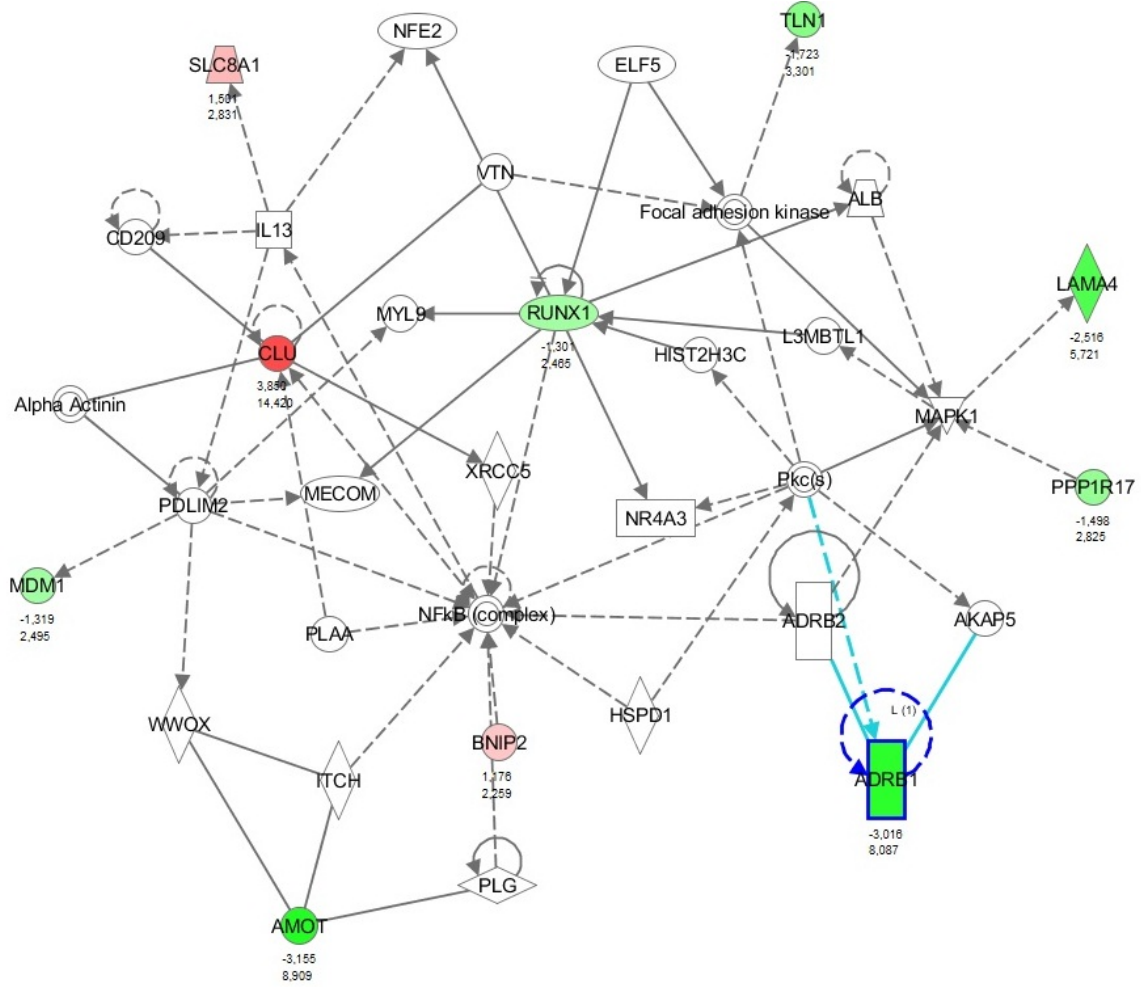
Şekil 4.4. Hüresel Gelişim, Hematolojik Sistem Gelişimi ve Fonksiyonları, Hematopoez ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları

GATA3, SSX2IP, ABCA12 (KIRMIZI) gen ifadesi en yüksek; NLGN1, CALY, LRRN3, PSMC6, SQSTM1 ve HEXB (pembe) gen ifadesi yüksek; DIAPH2, ANKRD17, C8orf4, FOXD1 ve TNFRSF14 (yeşil) gen ifadeleri en düşük olan genlerdir.



Şekil 4.5. Hücresel hareket, Kansere, organizmal yaralanma ve anormallikler ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları

IDH1, RACGAP1 ve PTPRA (kırmızı) gen ifadesi en yüksek; SDHB, FHOD3, FGF13, CERS6, HIST2H4B ve DCDC2 (pembe) gen ifadeleri yüksek; S100A4 (yeşil) gen ifadesi en düşük olan genlerdir.



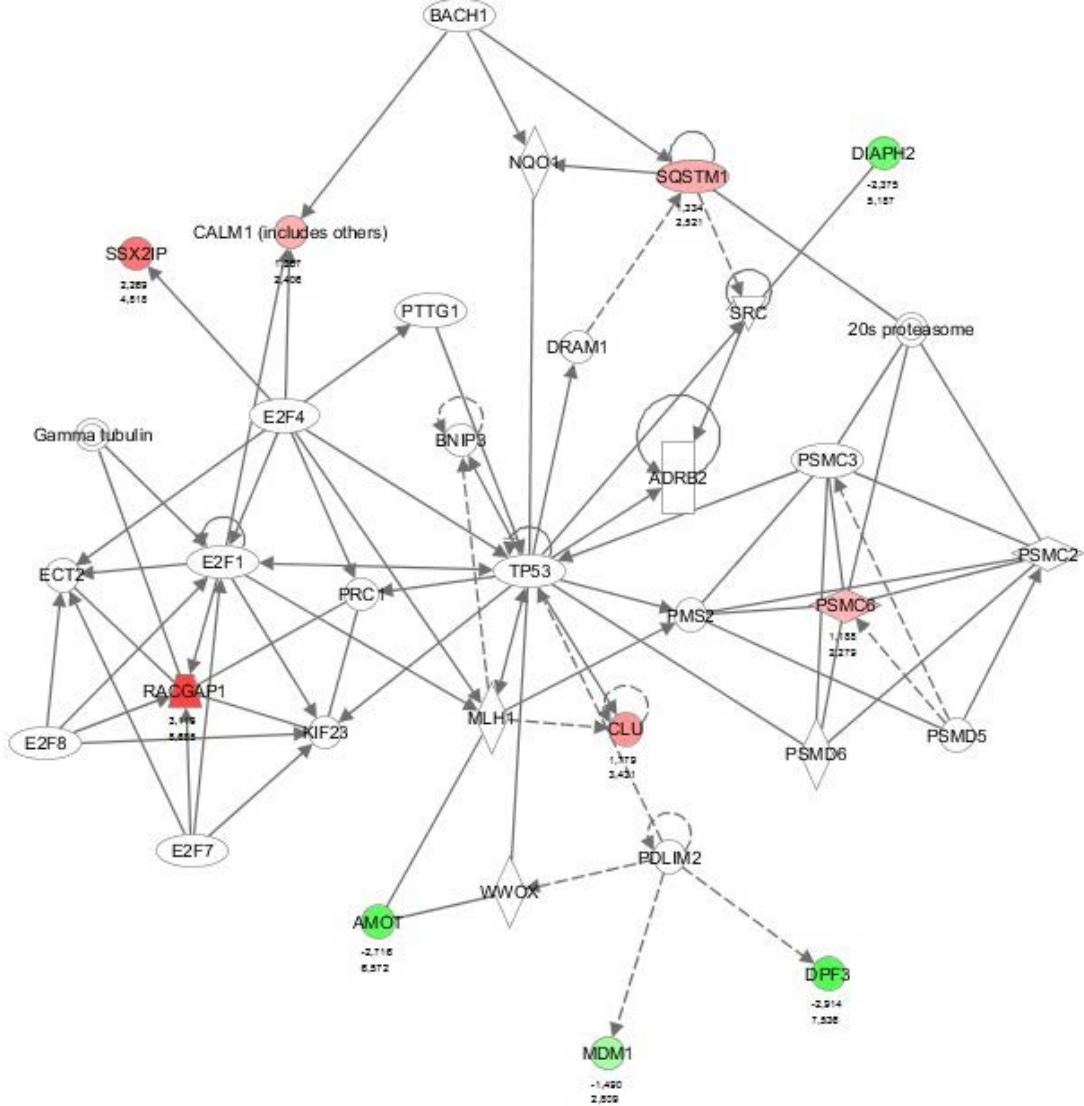
Şekil 4.6. Hücresel gelişim, organizmal yaralanma ve anormallikler, hücre ölümü ve sağkalım ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları

CLU (kırmızı) gen ifadesi en yüksek; SLC6A1 (pembe) gen ifadesi yüksek; ADRB1, RUNX1, AMOT, LAMA4, PP1R17, TLN1 ve MDM1(yeşil) gen ifadesi en düşük olan genlerdir

Tablo 4.19. Mikro Hipofiz Adenomlarında Önemli Gen Ağları

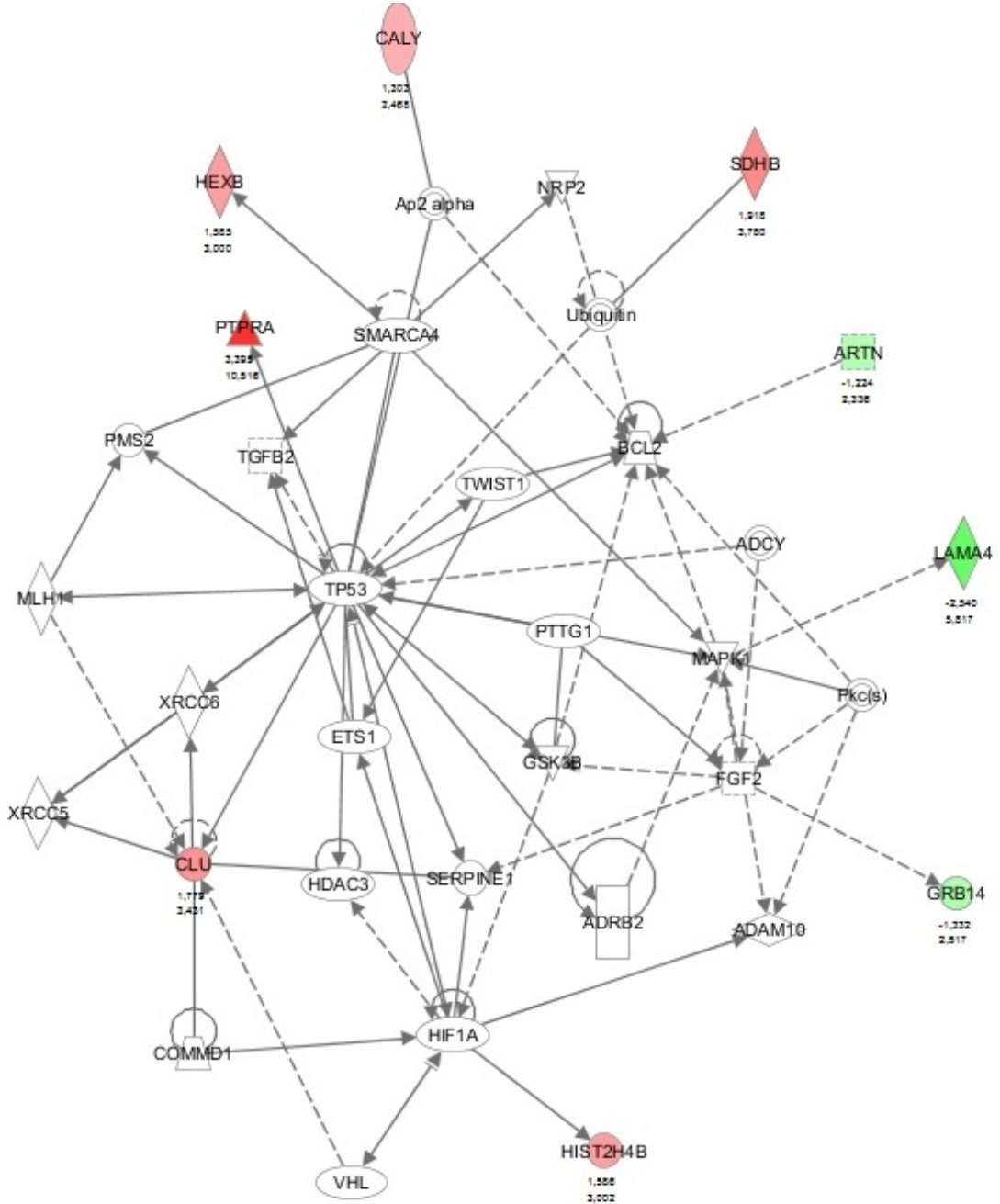
| Gen Ağı | Moleküller |
|---|---|
| Hücre siklusu, Hepatik sistem gelişimi ve fonksiyonları, Hücresel hareket | 20s proteozom, ADRB2, AMOT, BACH1, BNIP3, CALM1 (Diğerleri de dahil), CLU, DIAPH2, DPF3, DRAM1, E2F1, E2F4, E2F7, E2F8, ECT2, gamma tubulin, KIF23, MDM1, NMLH1, NQO1, PDLIM2, PMS2, PRC1, PSMC2, PSMC3, PSMC6, PSMD5, PSMD6, PTTG1, RACGAP1, SQSTM1, SRC, SSX2IP, TP53, WWOX |
| Kanser, Hücresel gelişim, Hücresel büyüme ve proliferasyon | ADAM10, ADCV, ADRB2, Ap2 Alfa, ARTN, BCL2, CALY, CLU, COMMD1, |

| Gen Ağı | Moleküller |
|--|--|
| | ETS1, FGF2, GRB14, GSK3B, HDAC3, HEXB, HIF1A, HIST2H4B, LAMA4, MAPK1, MLH1, NRP2, Pkc(s), PMS2, PTPRA, PTTG1, SDHB, SERPINE1, SMARCA4, TGFB2, TP53, TWIST1, Ubiquitin, VHL, XRCC5, XRCC6 |
| Hücresel gelişim, Kanser, Hücresel büyüme ve proliferasyon | ABCA12, ADAM10, ADRB1, AKAP5, AKT3, ANKRD17, BNIP3, C8orf4, CCNE1, CDH2, CSNK1A1, DAB2IP, ESR1, ESRRA, ETS1, EZH2, FHOD3, FOXD1, Histone H3, IDH2, mir-8, MMP13, MUC4, NOS3, NQO1, PARP1, Pkc(s), S100A4, SIRT1, SP3, TGFB2, TWIST1, XBP1, XRCC6, ZEB1 |



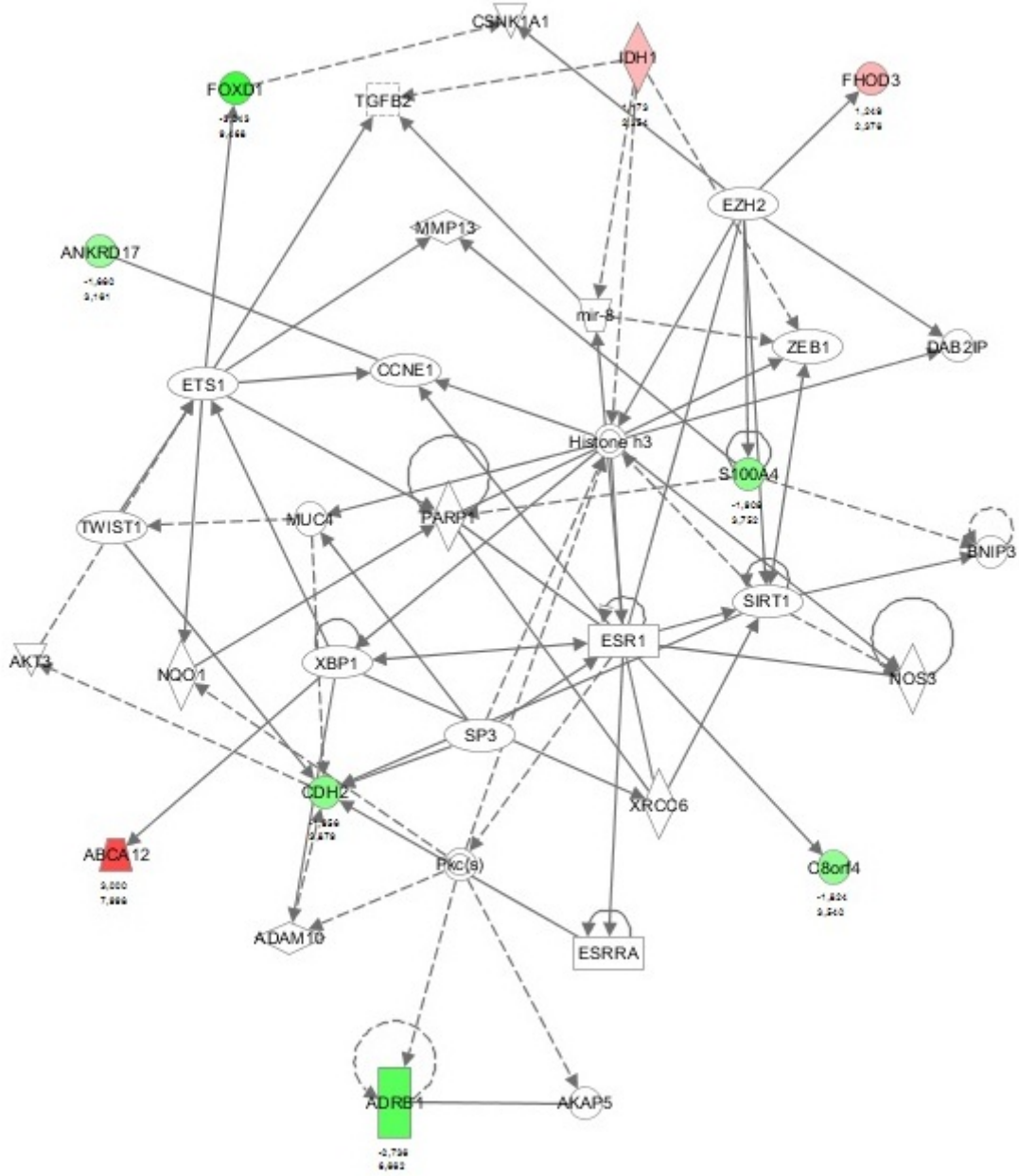
Şekil 4.7. Hücre siklusu, hepatik sistem gelişimi ve fonksiyonları, hücresel hareket ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları

RACGAP1 ve SSX2IP (kırmızı) gen ifadesi en yüksek; CLU, CALM1 (diğerleri de dahil), SQSTM1 ve PSMC6 (pembe) gen ifadesi yüksek; DPF3, AMOT, DIAPH2 ve MDM1 (yeşil) gen ifadesi en düşük olan genlerdir



Şekil 4.8. Kanser, hüresel gelişim, hüresel büyüme ve proliferasyon ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları

PTPRA (kırmızı) gen ifadeleri en yüksek; HIST2H4B, CLU, HEXB, CALY ve SDHB (pembe) gen ifadeleri yüksek; LAMA4, ARTN ve GRB14 (yeşil) gen ifadeleri en düşük olan genlerdir.

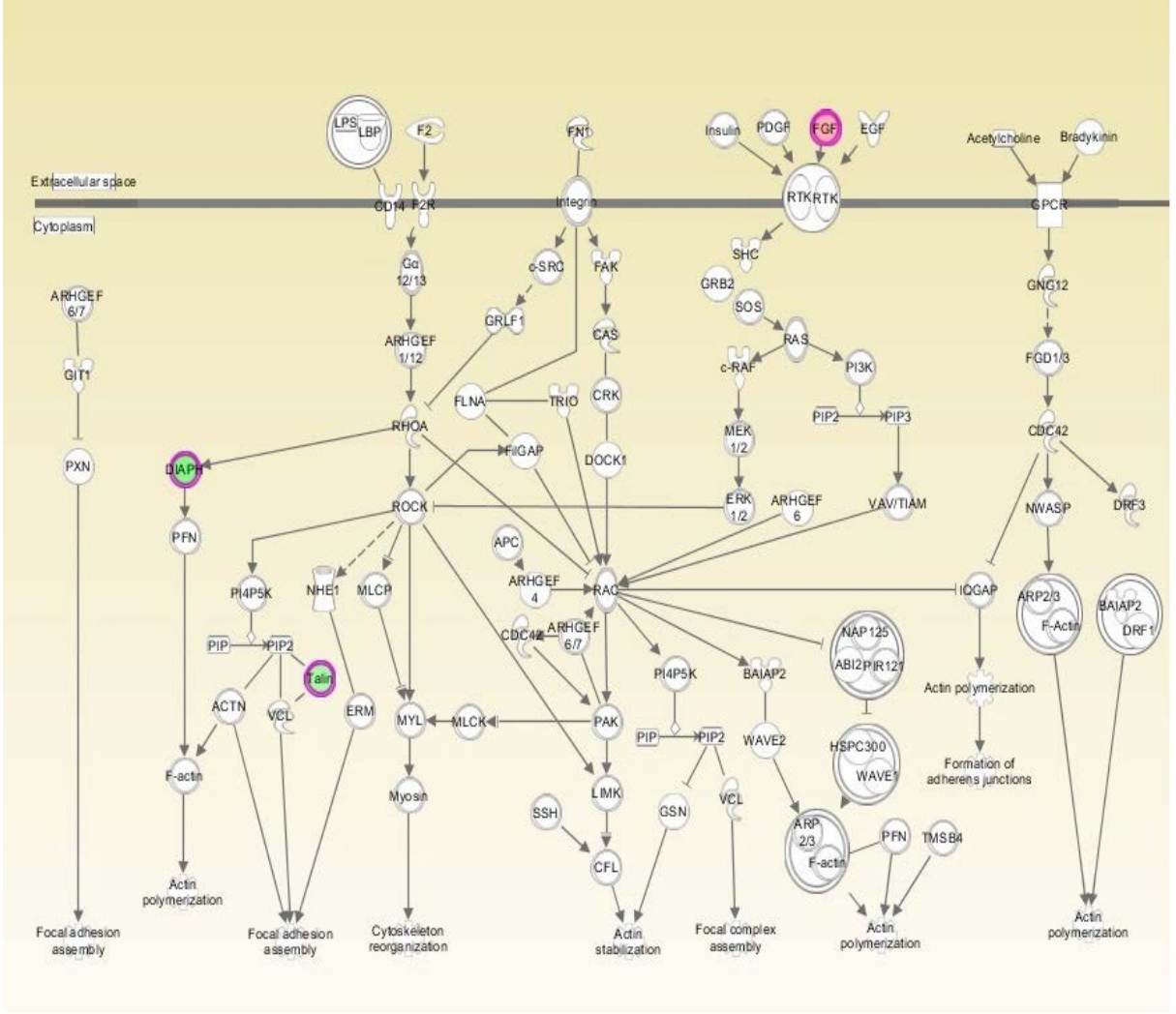


Şekil 4.9. Hüresel gelişim, kanser, hüresel büyüme ve proliferasyon ile ilgili Gen Ağında Yer Alan Moleküller ve Birbirleri ile Bağlantıları

ABCA12 (kırmızı) gen ifadesi en yüksek; IDH1 ve FHOD3(pembe) gen ifadesi yüksek; S100A4, CDH2, ADRB1, C8orf4, FOXD1 Ve ANKRD17 (yeşil) gen ifadeleri en düşük olan genlerdir.

4.7.Kanonik Sinyal Yolakları

İnvaziv ve makro hipofiz adenomlarında anlamlı olarak öne çıkan kanonik yolak aktin hücre iskeleti sinyal ileti yolağı olarak saptanmıştır ($p<0,05$).



Şekil 4.10. Aktin hücre iskeleti sinyal ileti yolağı ve invaziv ve makro hipofiz adenom oluşumundaki hedef genler.

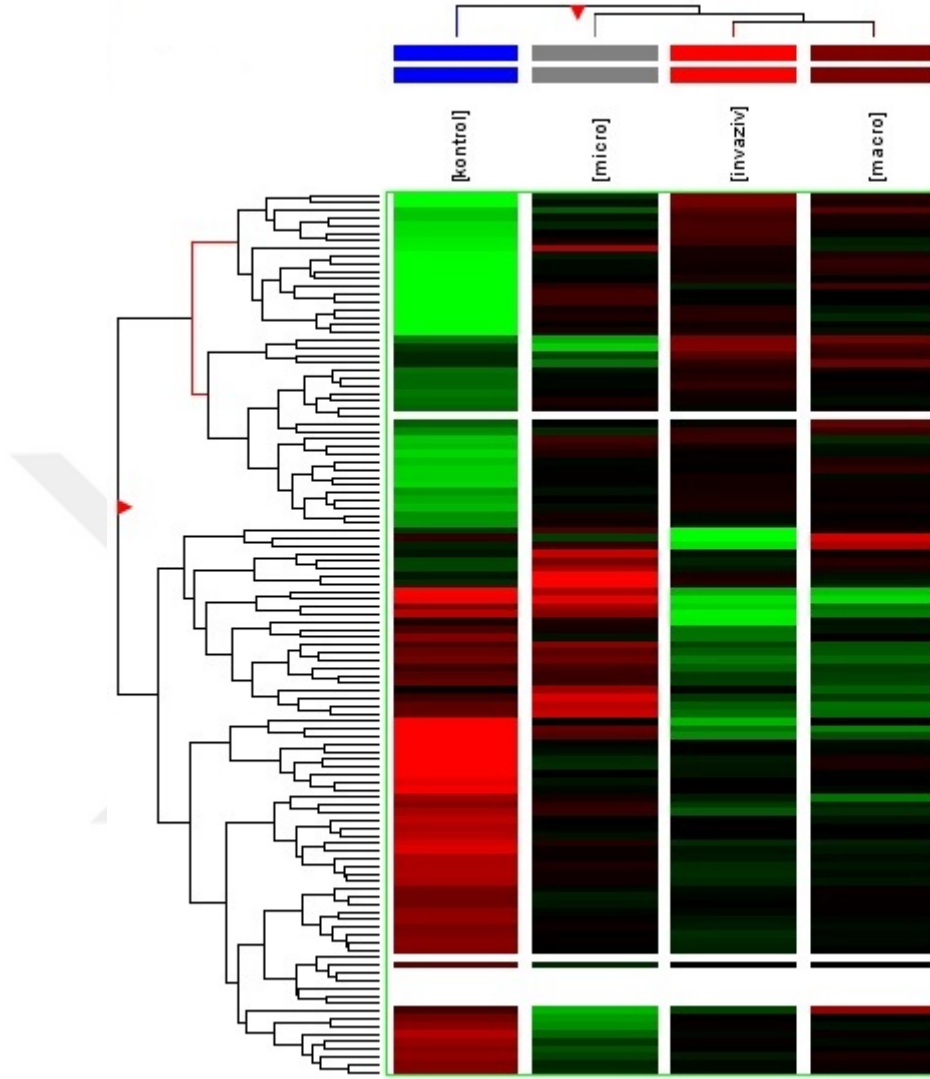
FGF13 (Pembe) gen ekspresyonu invaziv adenomlarda 3,5 kat, makro adenomlarda 3,4 kat artarken; DIAPH2 gen ekspresyonu (yeşil) invaziv adenomlarda 4,8 kat, makro adenomlarda 2,6 kat ve TLN1 genn ekspresyonu (yeşil) 3,1 kat, makro adenomlarda 3,3 kat azaldığı görülmüştür (Şekil 4.10).

4.8. Kümeleme Analizi

Kümeleme Analizi (Cluster Analysis), benzer ifadenenme kalıbına sahip genlerin tek bir grupta toplanmasını sağlamaktadır. Gruplar arasındaki gen ifadenenme örüntüsünü izleyebilmek amacıyla hiyerarşik kümeleme analizi gerçekleştirilmiştir. Kümeleme analizinde uzaklık ölçüsü olarak Pearson Korelasyonu ve yöntem olarak da average linkage clustering kullanılmıştır.

İnvaziv hipofiz adenom grubu, makro hipofiz adenom grubu, mikro hipofiz adenom grubu ve kontrol grubu olmak üzere 3 grup arasında Kümeleme Analizi yapılarak, farklı

ifadelenen gen paternleri Şekil 4.11’de gösterildiği üzere karşılaştırılmıştır. Sonuçlar anlamlı bir patern vermiş olup yüksek ve düşük ifadelenen genler ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 4.11. İnvaziv, makro, mikro hipofiz adenomları ve kontrol grubu arasındaki Kümeleme Analizi

5. TARTIŞMA

Hipofiz adenomları monoklonal orjinli olup ve çoğu yavaş ilerleyen iyi huylu neoplazmlardır. İnsanlarda kansere yol açan birçok onkogen veya tümör supresör genler hipofiz adenomlarında henüz keşfedilmemiştir. Ancak moleküler biyolojideki gelişmeler, hipofiz adenomlarında aday tümörojenik genlerin araştırılmasını hızlandırabilir. Bazı araştırmacılar, karşılaştırmalı gen ekspresyon profilendirme ve mikroarray tekniklerini kullanarak hipofiz adenomlarında farklı şekilde eksprese edilen genler tanımlamışlardır. Farklı şekilde eksprese olan genler hipofiz bezinin disfonksiyonuna ve parasekresyonuna neden olduğu, özellikle bazı transkripsiyon faktörlerinin down regülasyonu önemli ölçüde hipofiz adenomu oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Daha önce hipofiz adenomlarında yapılan mikroarray çalışmalarında PTTG (Pei ve Melmed, 1997), GADD45 (Bahar ve ark., 2004), MEG3 (Zhang ve ark.,2003) ve BMP4 (Páez-Pereda ve ark., 2003) genlerinin dahil olduğu birçok aday gen saptanmıştır.

Bu çalışmada, hipofiz tümörleri boyut ve invazyon özelliğine göre sınıflandırıldı ve normal hipofiz dokuları ile karşılaştırılarak analizi yapıldı. Analiz sonuçlarına göre invaziv, makro ve mikro adenomlarda sırasıyla 59, 51 ve 42 genin ekspresyon düzeyinde artış saptanırken; 40, 40 ve 41 genin ekspresyon düzeyinde azalma saptanmıştır. Pitüiter adenom invazivliği ile ilgili mekanizmaları anlamak için invaziv ve non-invaziv adenomlarda farklı olarak ifade edilen genleri belirlemeye çalıştık.

İnvaziv hipofiz tümörlerinde saptanan önemli gen ekspresyon değişiklikleri ve bu genlerin ağları IPA yöntemi ile standart alt yol kütüphanesinden tespit edilerek ilişkilendirildi. Sonuçlara göre invaziv hipofiz tümörlerinde önemli 3 ağ modülünün tümör agresifliği ile ilgili olabileceği düşünüldü. İlk gen ağı modülünde; hücre hareket, hücre büyüme ve proliferasyon, sinir sistemi gelişimi ve fonksiyonunda rol alan moleküllerden RACGAP1, GATA3 ve IDH1 genlerinin gen ifadeleri en yüksek; CALY, FGF13, SQSTM1, DCDC2 ve SLC26A2 gen ifadeleri yüksek; ANKRD17, C8orf4, DCT ve ARTN gen ifadeleri ise düşük olarak saptandı.

Bu bağlantı yolağındaki GATA3 hem tirotrop hem de gonadotrop hücrelerde embriyonik dönemde geçici olarak eksprese edilir. GATA3 ve GATA2 ortak bir α -glikoprotein subunit (α -GSU) ve spesifik β -subunit (FSH β , LH β , and thyrotropin β) bulunduran heterodimerlerdir ve ilginç olarak α -GSU ve tirotropin kodlayan genler GATA2'nin hedef genleridir. Mete ve ark. (2019), insan hipofiz nöroendokrin tümörlerinde GATA3 ifadesini göstermişlerdir. Çalışmada, GATA3'e karşı ticari olarak temin edilebilen antikoru, adeno-hipofizyal tümörlerde, özellikle gonadotrop tümörlerde ve zayıf şekilde farklılaşmış Pit-1 soy tümörleri de dahil olmak üzere, TSH ifade eden tümörlerde pozitifliği

tanımladığını gösterilmektedir. Hipofiz gonadotrop tümörlerinde ve β -TSH ifade eden tümörlerde nükleer GATA3 immünoaktivitesinin tanımlanması, embriyolojik gelişimi belirleyen transkripsiyon faktörlerine dayanarak adenohipofiziyal neoplazmaların sınıflandırılmasına katkı sağlayabilmektedir.

Merkezi spindlin bileşeni olan ve sitokinezin indüksiyonu için gerekli olan Rac GTPaz-aktive edici protein (RacGAP1), Rho GTPaz-aktive edici proteinlerin ailesine aittir (Touré ve ark., 1998). GTP'ye bağlı Rac1'in eşlik ettiği RacGAP1, hem sinyal dönüştürücüsünün bir tirozin fosforilasyonu aracı hem de transkripsiyon (STAT) protein ailesinin bir tirozin fosforilasyonu aracı olarak ve fosforile edilmiş STAT'ların de dahil olduğu çeşitli fonksiyonlara sahip nükleer bir lokalizasyon sinyali içeren nükleer şaperonu olarak çalışır. Aynı zamanda anti-apoptoz, çoğalma, farklılaşma ve enflamasyon gibi süreçlerde rol oynar (Kawashima ve ark., 2009). RacGAP1 ayrıca, hücre morfolojisini, hareketliliğini ve kutupluluğun oluşumunu etkilemek için Rac ve cdc42 gibi Rho proteinlerinin işlevini de düzenler (Sahai, 2005). Kötü huylu tümörlerde, RacGAP1, tümör hücrelerinin psödopod uzaması ve yayılmasıyla metastatik yayılımını etkiler (Yamazaki ve ark., 2009). Galland ve ark. (2010) invaziv ve invaziv olmayan hipofiz tümörlerinde mikroarray kullanarak farklı gen ifadesi profillerine bakmışlardır. Çalışmalarının sonuçlarına göre, invaziv olmayan hipofiz adenomlarında Rac-1 downregüle olmuştur. Bu çalışmada RACGAP1'in invaziv hipofiz adenomlarında en yüksek ölçüde ifadesinin olduğunu göstermiştik. Bu veri göz önüne alındığında, invaziv ve invaziv olmayan hipofiz adenomlarında RACGAP1'in hücre motilitesindeki rolü önem taşımaktadır ve dolayısıyla RACGAP1'in upregüle olması hipofiz adenomların invaziv davranış sergilemesi ve tümör hücrelerinin yayılımı adına önemlidir.

İzositrat dehidrojenazlar, Krebs trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde aktif olan nükleer DNA kodlu, NADP'ye bağımlı enzimlerdir ve sitozol (IDH1) veya mitokondri (IDH2) içindeki izositrat dekarboksilasyonunu katalize eder. TCA döngüsü sırasında, NADPH birikir, glikoliz ve antioksidan tepki için önemli bir yardımcı faktördür (Casar-Borota ve ark., 2016; Desideri ve ark., 2015) yaptığı çalışmada hipofiz adenomuna sahip hastalarda IDH1 mutasyonunun analiz edilen 246 hastadan sadece birinde gözlemlendiğini ve bu hastanın tekrar eden gonadotrop adenomuna sahip olduğunu, dolayısıyla IDH1 inhibitörleri kullanımının hipofiz adenomlarında işlevsiz olabileceğini öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda invaziv hipofiz adenomlarında IDH1'in en yüksek düzeyde ifade edildiğini göstermiştik. Casar-Borota ve ark. (2016) çalışmasıyla karşılaştırıldığında, IDH1'in invaziv, tekrar eden veya agresif hipofiz adenomlarına spesifik olabileceği ve yapılacak diğer çalışmalarla bulgular kesinleşirse potansiyel biyomarker adayı olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Yine çalışmamıza paralel olarak, Moreno ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada IDH1'in nonfonksiyonel hipofiz adenomlarında 41 kat daha fazla upregüle olduğunu kanıtlamışlardır.

İnvaziv hipofiz adenomlarında, hücre ölümü ve sağkalım, kanser, hematolojik hastalıklar ile ilgili gen ağlarında yer alan moleküllerden, CLU, SSX2IP ve ABCA12 gen ifadelerinin en yüksek, BIRC3, CALM1, BNIP2, NLGN1 ve LRRN3 gen ifadeleri yüksek, AMOT, DIPAH2, FOXDI ve MDM1 gen ifadeleri ise en düşük olarak saptanmıştır.

Yüksek oranda korunmuş hücrenel ve dolaşımdaki bir protein olan Clusterin (CLU) ayrıca apolipoprotein J (ApoJ), sülfatlanmış glikoprotein 2 (SGP-2), testosteron-bastırılmış prostat mesajı 2 (TRPM-2) veya serum proteini-40 (SP-40) olarak da bilinir (Jenne ve Tschopp, 1989). Hücre içi clusterinin prostat kanseri hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve clusterinin farede knock-out edilmesi sonucu, yüksek derecede agresif transgenik fare prostat tümörlerini indüklediği gösterilmiştir (Bettuzi ve ark., 2009). Daha önce yapılan bir çalışmada Clusterinin baskın olarak gonadotrop hücre adenomlarında eksprese edildiği gösterilmiştir (Chesnokova ve ark., 2011). Ancak araştırmacılar gonadotrop kökenli benign hipofiz tümör hücrelerinde, clusterinin rolünün proliferasyonu sınırlamak olduğunu gösterebilir de çalışmamız CLU gen ifadesinin invaziv tümörlerde yüksek düzeyde ifade edildiği için, clusterinin invaziv tümörlerde de tümör supresif etkisinin olabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

SSX2IP ilk olarak bir transkripsiyonel baskılayıcı olan SSX2 ile etkileşimi ile tanımlanmıştır. Önceki çalışmalar SSX2IP'in akut myeloid lösemi ile ilişkili bir antijen olduğunu göstermiştir, çünkü klinik vakaların analizi SSX2IP ekspresyonunun akut myeloid lösemili (AML) hastaların %33'ünde serumda tanımlandığını ancak sağlıklı gönüllülerde olmadığını göstermiştir (Guinn ve ark., 2005). Literatüre baktığımızda, şu an için SSX2IP'nin hipofiz adenomlarında ifadesi tam olarak bilinmemektedir. Dolayısıyla SSX2IP invaziv hipofiz adenomlarında araştırılması gereken aday gen olabilir.

İnsan ABCA12 geni, kromozom 2q34 üzerinde bulunur ve 2,595 ve 2,516 amino asidin iki ekleme varyantını kodlamaktadır (Annino ve ark., 2002). ABCA12, cilt lipit homeostazisinde rol oynar, sağlıklı keratinositlerde yüksek ABCA12 ekspresyonu gözlemlenmektedir. ABCA12 genindeki mutasyonlar, tüm vücutta cilt deskuamasyonu ile karakterize nadir görülen kalıtsal bir hastalık olan lamelar iktiyosiz tip 2 olan hastalarda tespit edilmiştir (Lefevre ve ark., 2003). ABCA12'nin şu anki literatür bilgisine göre hipofiz adenomlarında rolü bilinmemektedir. Ancak; yapılan bir çalışmada uzun kodlanmayan ABCA-12-3 RNA'nın hücre göçü, invazyon ve proliferasyonu özafogal skuamöz hücre karsinomunda fibronektin 1 regülasyonu ile artırdığı bilinmektedir (Ma ve ark., 2019). Dolayısıyla, ABCA12'nin invaziv hipofiz adenomlarında da önemli rol oynaması olasıdır ve araştırılması gerekmektedir.

İnvaziv hipofiz adenomlarında, hücrenel gelişim, hücrenel büyüme ve proliferasyon, hematolojik sistem gelişimi ve fonksiyonu ile ilgili gen ağında yer alan moleküllerden PPP1R17 gen ifadesi en yüksek; HEXB, PSMC6, FHOD3 ve CERS6 gen ifadesi yüksek; S100A4, ADRB1, LAMA4, TNFRS14 ve TLN1 gen ifadeleri düşük olarak saptanmıştır.

PPP1R17 olarak da bilinen G-substratı, siklik guanozin monofosfat (cGMP)'a bağlı protein kinazın spesifik bir substratı olarak adlandırılan ve ağırlıklı olarak serebellar Purkinje hücrelerinde bulunan 23 kDa'lık bir proteindir. NO / cGMP / PKG yolunun bir bileşeni olarak, G-substratı potansiyel olarak birkaç önemli hücresel sürece dahil olur ve şu ana kadar bir dizi hastalık durumu ile ilişkilendirilmiştir: G-substratındaki tek bir nokta mutasyonu hiperkolesterolemi ile bağlantılıdır (Vigbedor, 2013). PPP1R17 geninin hipofiz adenomlarında rolü bilinmemesine rağmen, PPP1R17 L12V varyantının progresif kolorektal kanserde rolü bulunmuştur (Townsend ve ark., 2017). İnvaziv hipofiz adenomlarında bu genin ilerleyen aşamalarda çalışılması, genin hipofiz tümörlerinde olası önemini ortaya çıkarabilir.

İnvaziv hipofiz adenomlarında tüm gen ağlarında yüksek düzeyde ifade edilen genlerden sadece BIRC3 ve BNIP2 invaziv hipofiz adenomlarına spesifik olarak upregüle olurken, bu gen ağlarındaki diğer genlerin, mikro ve makro hipofiz adenomlarında da yüksek düzeyde ifade olduğu bulunmuştur. BIRC3 bir apoptoz protein inhibitör proteini olup E3 ligaz aktivitesiyle kaspaz aktivasyonunu indirek olarak regüle etmektedir (Vucic ve ark., 2011). Son yıllarda yapılan bir çalışmada BIRC3 upregülasyonunun glioblastom hastalarında apoptozu önleyerek glioblastoma tedavisinde radyoterapi ve temozolomide terapetik direnç oluşturduğu bulunmuştur (Wang ve ark., 2016). Araştırmacılar, BIRC3'ün tümör agresifliğinde rolü olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu yaklaşımla, hipofiz adenomlarında da BIRC3'ün invazyonda rolü olması olasıdır. BNIP2, ilk olarak adenovirüs E1B 19-kDa proteini ile etkileşen bir molekül olarak tanımlanmıştır. E1B proteini hücreleri viral enfeksiyon veya diğer proapoptotik uyarıların neden olduğu apoptozdan korur (Hashimoto ve ark., 1991). Bcl-2 ve bununla ilgili antiapoptotik proteinler fonksiyonel olarak E1B 19-kDa proteininin yerine kullanılabilir ve BNIP2'ye bağlanabilir. Bu nedenle, BNIP2'nin potansiyel bir pro-apoptotik protein olduğu öne sürülmüştür (Subramanian ve ark., 1995). Yapılan bir çalışmada BNIP2 ve Cdc42GAP homologisi domainine sahip yeni bir gen olan proapoptotik BMCC1'in artan ekspresyonu, insan nöroblastomlarında prognoz ile ilişkili olarak bulunmuştur (Machida ve ark., 2006). Dolayısıyla, BNIP2'nin hipofiz adenomlarının invazyonunda rol oynaması olasıdır. CNKSR3 geni ise analiz sonucu bağlantı yolağında yer almamasına rağmen invaziv hipofiz adenomlarında upregüle olurken, mikro ve makro adenomlarda downregüle olmuştur (Tablo 1.20 ve 1.21). İlk olarak Drosophila'da tanımlanan CNK proteinlerinin, RAS / ERK yolunu RAS protein kinaz seviyesinde düzenlediği ortaya konulmuştur (Claperon ve Therrien, 2007). CNKSR3'ün hipofiz adenomlarında rolü henüz bilinmemesine rağmen, Lake ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, CNKSR3'ün amplifikasyonunun üveal melanomda metastaz gelişimini etkileyebileceğini göstermiştir. Cox regresyonu ve Kaplan Meier sağkalım analizi ile, CNKSR3 geninin amplifikasyonunun, protein ekspresyonunda ilişkili bir artışla daha uzun hasta sağkalımı ile ilişkili olduğunu tespit edilmiştir. CNKSR3 hakkında çok az şey bilinmesine rağmen, protein

ekspresyonunun artmış sağkalım ile ilişkisi, muhtemelen üveal melanom hücrelerinin metastatik ilerlemesini sınırlamak ile ilgili biyolojik bir fonksiyonu olduğunu düşündürmektedir. Bu durumda, invaziv hipofiz adenomlarında CNKSR3 gen ifadesi artışı, evrimsel olarak invaziv hipofiz adenomlarında metastazı önlemeye yönelik bir adaptasyon olabilir.

Makro hipofiz adenomlarında, hücre gelişim, hematolojik sistem gelişimi ve fonksiyonları ve hematopoez ile ilgili gen ağında yer alan moleküllerden GATA3, SSX2IP, ABCA12 gen ifadesi en yüksek; NLGN1, CALY, LRRN3, PSMC6, SQSTM1 ve HEXB gen ifadesi yüksek; DIAPH2, ANKRD17, C8orf4, FOXD1 ve TNFRSF14 gen ifadeleri en düşük olarak saptanmıştır.

Mikro hipofiz adenomlarında, hücre siklusu, hepatik sistem gelişimi ve fonksiyonları, hücre hareket ile ilgili gen ağında yer alan moleküllerden, RACGAP1 ve SSX2IP gen ifadesi en yüksek; CLU, CALM1 (diğerleri de dahil), SQSTM1 ve PSMC6 gen ifadesi yüksek; DPF3, AMOT, DIAPH2 ve MDM1 gen ifadesi en düşük olarak saptanmıştır. Bunlara ek olarak; hücre gelişim, kanser, hücre büyüme ve proliferasyon ile ilgili gen ağında yer alan moleküllerden, ABCA12 gen ifadesi en yüksek; IDH1 ve FHOD3 gen ifadesi yüksek; S100A4, CDH2, ADRB1, C8orf4, FOXD1 ve ANKRD17 gen ifadeleri en düşük olan genlerdir.

GATA3 gen ifadesi invaziv ve makro hipofiz tümörlerinde en yüksek bulunmuştur. Mete ve ark. (2019) çalışmalarında GATA3 immünoaktivitesinin hipofiz gonadotrop ve TSH üreten tümörlerin karakteristiği olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgu, Mete ve arkadaşlarına göre adenohipofizyal tümörleri sınıflandırmak için kullanılan transkripsiyon faktörlerinin modelini genişletmekle beraber aynı zamanda sellar bölgesine metastaz yapabilen karsinomların yanı sıra, primer sellar paragangliomaların bir özelliği olduğu için sellar tümörlerinin ayırıcı tanısında da önemlidir. Bu açıdan bakıldığında GATA3 gen ifadesinin artması tümörün invazivitesi ve agresifliği açısından önemli olabilmektedir. Çalışmamızda GATA3 gen ekspresyonunu invaziv ve makro hipofiz tümörlerinde en yüksek olarak saptanması da tümör agresifliği ile bağlantılı olduğunu göstermektedir.

SSX2IP gen ifadesi invaziv, mikro ve makro adenomlarda en yüksek düzeyde bulunmuştur. SSX2IP lösemi ile ilişkili bir antijen olmasına rağmen (Guinn ve ark., 2005), invaziv, mikro ve makro adenomlarda ifade edilmesi hipofiz tümörlerinin metastatik ve agresif bir yapı oluşturmasında etkili olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla, daha fazla araştırmanın SSX2IP gen ekspresyonuna yoğunlaşması gerekmektedir.

ABCA12 gen ifadesi invaziv, mikro ve makro adenomlarda en yüksek düzeyde bulunmuştur. Literatürde henüz ABCA12'nin hipofiz tümörlerinde etkisi bilinmemektedir. Ancak, uzun kodlanmayan ABCA12 RNA'nın hücre göçü, invazyon ve proliferasyonu skuamöz hücreli özafagus karsinomunda (Ma ve ark., 2019) rolü daha önce bulunmuştur.

ABCA12, hipofiz tümörü invazivitesi ve agresyonunda rol oynayan tanımlanmamış bir gen olabilir.

Makro hipofiz adenomlarında, hücrel hareket, kanser, organizmal yaralanma ve anormallikler ile ilgili gen ağında yer alan moleküllerden, IDH1, RACGAP1 ve PTPRA gen ifadesi en yüksek; SDHB, FHOD3, FGF13, CERS6, HIST2H4B ve DCDC2 gen ifadeleri yüksek; S100A4 gen ifadesi en düşük olarak saptanmıştır.

Mikro hipofiz adenomlarında ise, kanser, hücrel gelişim, hücrel büyüme ve proliferasyon ile ilgili gen ağında yer alan moleküllerden, PTPRA gen ifadeleri en yüksek; HIST2H4B, CLU, HEXB, CALY ve SDHB gen ifadeleri yüksek; LAMA4, ARTN ve GRB14 gen ifadeleri en düşük olarak saptanmıştır.

IDH1 gen ifadesi invaziv ve makro adenomlarda en yüksek düzeyde bulunmuştur. Moreno ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada IDH1'in nonfonksiyonel hipofiz adenomlarında 41 kat daha fazla upregüle olduğunu kanıtlamışlardır. Dolayısıyla, IDH1 tümörün invazivitesi ve agresifliğinde rol alan genlerden biri olabilir.

RACGAP1 gen ifadesi invaziv, mikro ve makro adenomlarda en yüksek düzeyde bulunmuştur. Ke ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada menenjiyomlardaki RACGAP1 ekspresyonunu, gerçek zamanlı kantitatif PCR ve western blot ile ölçmüştür. Çalışmanın sonuçlarına göre, derece III menenjiyomdaki RACGAP1 ekspresyonu düzeyinin derece I'den yüksek olduğunu göstermiştir. Yüksek RACGAP1 mRNA düzeyleri tümör boyutu, histolojik tip ve klinik seyir ile anlamlı korelasyon göstermiştir. Sonuç olarak, RACGAP1 hipofiz adenomlarının invazivitesi ve agresifliğinde rol oynayan genlerden biri olabilir.

PTPRA; integrin sinyali, hücre adezyonu ve sarkoma ile ilişkili (Src) tirozin kinazları aktive eden bir proteindir (Pallen, 2003). PTPRA ifadesinin karsinogenezdeki rolü daha önce bildirilmiştir (Stebbing ve ark., 2014). Artan PTPRA ekspresyonu, skuamöz hücreli akciğer kanserinde c-Src aktivasyonu ve G1 fazı ilerlemesi yoluyla kötü prognoza yol açmıştır (Gu ve ark., 2017). Çalışmamızda, PTPRA gen ifadesinin mikro ve makro adenomlarda en yüksek düzeyde ifade olduğu bulunmuştur. Ancak PTPRA gen upregülasyonun mikro ve agresif makro hipofiz adenomlarında rolü henüz bilinmemektedir. Hipofiz adenomlarında PTPRA gen ifadesinin ileride çalışılması, DNA mikroarray analizinde bulduğumuz en yüksek gen ifadesinin anlaşılmasını sağlayacaktır.

Makro hipofiz adenomlarında, hücrel gelişim, organizmal yaralanma ve anormallikler, hücre ölümü ve sağkalım ile ilgili gen ağında yer alan moleküllerden CLU gen ifadesi en yüksek; SLC6A1 gen ifadesi yüksek; ADRB1, RUNX1, AMOT, LAMA4, PP1R17, TLN1 ve MDM1 gen ifadesi en düşük olarak saptanmıştır.

Chesnokova ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, gonadotrop kökenli benign hipofiz tümör hücrelerinde, clusterinin rolünün proliferasyonu sınırlamak olduğunu göstermişlerdir (Chesnokova ve ark., 2011). Çalışmamızda invaziv, mikro ve makro hipofiz adenomlarında CLU gen ifadesi en yüksek düzeyde bulunmuştur. Bu yüzden, CLU gen ifadesi aynı

zamanda hipofiz tümörlerinin invazivitesi ve agresyonunda rol oynayabilmektedir. İleride yapılacak çalışmalarda CLU gen ifadesinin invazivite ve tümör hücresi agresyonunda rolü araştırılmalıdır.

Çalışmamızda, invaziv ve makro hipofiz adenomlarında anlamlı olarak öne çıkan kanonik yolağı, aktin hücre iskeleti sinyal ileti yolağı olarak saptanmıştır. Bulgulara göre, FGF13 gen ekspresyonu (en yüksek) invaziv adenomlarda 3,5 kat, makro adenomlarda 3,4 kat artarken; DIAPH2 gen ekspresyonu (yüksek) invaziv adenomlarda 4,8 kat, makro adenomlarda 2,6 kat ve TLN1 gen ekspresyonu 3,1 kat, makro adenomlarda 3,3 kat azaldığı görülmüştür.

FGF'ler ve bunların reseptörleri gelişim, büyüme ve anjiyogenezi düzenler. Şu anda bilinen 23 FGF ligandı vardır. Temel FGF (tFGF) başlangıçta sığır hipofiz folikülostellat hücresinde tarif edilmiştir ve hipofiz hormonlarını düzenlemektedir; tFGF, insan hipofiz adenomları ile ifade edilir ve hipofiz adenomları olan hastalarda dolaşımda yüksek düzeyde FGF bulunur (Asa ve Ezzat, 2002). FGF4 dizileri, insan prolaktin salgılayan tümörlerden DNA'nın dönüştürülmesinde rol oynar (Gonsky ve ark., 1991). Aynı zamanda, FGF4, laktotrof çoğalmasını kolaylaştırır (Shimon ve ark., 1996). FGF8 hipofiz gelişimi için gereklidir (Scully ve ark., 2002). Dolayısıyla FGF13'ün de bu yolda invaziv ve makro adenomların gen ifadelerinin düzenlenmesinde rol oynaması olasıdır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, hipofiz tümörleri boyut (mikro ve makro) ve invazyon özelliğine göre sınıflandırılmıştır ve normal hipofiz dokuları ile karşılaştırılarak gen ifadeleri analizi yapılmıştır. Çalışma, pitüiter adenom invazivliği ile ilgili mekanizmaları, ifade edilen genler ve işlevlerini anlamak adına önemlidir.

Sonuçlara göre, invaziv hipofiz tümörlerinde hücre hareket, hücre büyüme ve proliferasyon, sinir sistemi gelişimi ve fonksiyonunda rol alan moleküllerden RACGAP1, GATA3 ve IDH1 genlerinin gen ifadeleri en yüksek düzeyde ifade edilmiştir. Bu genler arasında RACGAP1 ve IDH-1 invaziv, mikro ve makro adenomlarda en yüksek düzeyde ifade olan genlerden biridir. GATA3 ise mikro adenomlarda en yüksek düzeyde ifade edilmemesine rağmen, invaziv ve makro adenomlarda en yüksek düzeyde ifade edilmiştir. Bu açıdan bakıldığında, GATA3'ün tümör agresifliği ve invazyonunda önemli rol oynaması olasıdır.

İnvaziv hipofiz adenomlarında, hücre ölümü ve sağkalım, kanser, hematolojik hastalıklar ile ilgili gen ağlarında yer alan moleküllerden, CLU, SSX2IP ve ABCA12 gen ifadeleri en yüksek düzeyde ifade edilmiştir. Bu genlerden SSX2IP, CLU ve ABCA12 ayrıca mikro ve makro adenomlarda da anlamlı ölçüde ifade olmuştur. Dolayısıyla, farklı ortak etki mekanizmalarının invaziv, mikro ve makro adenomların karsinogenezinde etkisi olduğu düşünülebilir.

İnvaziv hipofiz adenomlarında, hücre gelişim, hücre büyüme ve proliferasyon, hematolojik sistem gelişimi ve fonksiyonu ile ilgili gen ağında yer alan moleküllerden PPP1R17 gen ifadesi en yüksek düzeyde ifade edilmiştir. Ancak PPP1R17 gen ifadesi makro ve mikro adenomlarda anlamlı ölçüde ifade olmamıştır. PPP1R17 geninin hipofiz adenomlarında rolü bilinmemesine rağmen, PPP1R17 L12V varyantının progresif kolorektal kanserde rolü bulunmuştur (Townsend ve ark., 2017). PPP1R17 geninin tümör invazyonuna spesifik bir gen ve ilerleyen çalışmalarda tümör invazyonu ile ilgili aday gen olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Mikro ve makro hipofiz adenomlarında, hücre hareket, kanser, organizmal yaralanma ve anormallikler ile ilgili gen ağında yer alan moleküllerden PTPRA gen ifadesi en yüksek düzeyde bulunmuştur. Bu bulgular, PTPRA geninin invazyon ile ilgili yollarda rol almadığını, ancak tümör oluşumu ve agresyonunda rol oynayabileceğini göstermektedir. Artan PTPRA ekspresyonu, skuamöz hücreli akciğer kanserinde c-Src aktivasyonu ve G1 fazı ilerlemesi yoluyla kötü prognoza yol açtığı (Gu ve ark., 2017) daha önce bulunmuştur. Ancak PTPRA'nın hipofiz karsinogenezinde rolü henüz bilinmemektedir. Dolayısıyla, PTPRA, hipofiz adenomlarının agresyonunda çalışılması gereken diğer bir aday genidir.

Çalışmamızın diğerk bir önemli sonucu ise, literatürde daha önce hipofiz adenomlarında tanımlanmamış, ancak olası rolü olabilecek farklı genlerin ifadesinin bulunmasıdır. SSX2IP, ABCA12, PTPRA, PPP1R17 gibi genler hipofiz adenomlarının prognozunda rolü olabilecek genlerden olabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile tümör boyutu ve invazyon özelliğinin altında yatan moleküler faktörlerin belirlenmesine ışık tutacak aday genler saptanmıştır. Bu aday genlerin üzerinde yapılacak çalışmalar ile hipofiz tümörogenezi açısından önemli etkiye sahip yeni tanısal-genetik belirteçlerin belirlenmesi açısından temel bilimlere katkı sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Aksoy, K., Palaoğlu, S., Pamir, N., & Tuncer, R. (2005). Temel Nöroşirürji. *Ankara: Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları*.
- Alahmadi, H., Lee, D., Wilson, J. R., Hayhurst, C., Mete, O., Gentili, F., ... & Zadeh, G. (2012). Clinical features of silent corticotroph adenomas. *Acta neurochirurgica*, 154(8), 1493-1498.
- Alvaro, V., Levy, L., Dubray, C., Roche, A., Peillon, F., Querat, B., & Joubert, D. (1993). Invasive human pituitary tumors express a point-mutated alpha-protein kinase-C. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 77(5), 1125-1129.
- Alvaro, V., Touraine, P. H., Vozari, R. R., Bai-Grewer, F., Birman, P., & Joubert, D. (1992). Protein kinase C activity and expression in normal and adenomatous human pituitaries. *International journal of cancer*, 50(5), 724-730.
- Amaral, F. C., Torres, N., Saggiaro, F., Neder, L., Machado, H. R., Silva Jr, W. A., ... & Castro, M. (2009). MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(1), 320-323.
- Andersen, B., & Rosenfeld, M. G. (2001). POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease. *Endocrine reviews*, 22(1), 2-35.
- Annino, T., Shulenin, S., Chen, Z. Q., Arnould, I., Prades, C., Lemoine, C., ... & Rosier, M. (2002). Identification and characterization of a novel ABCA subfamily member, ABCA12, located in the lamellar ichthyosis region on 2q34. *Cytogenetic and genome research*, 98(2-3), 169-176.
- Aron, D. C., Finding, J. W., & Tyrell, B. J. (1997). Hypothalamus and pituitary. Greenspan, F. S., & Strewler, G. J. (Ed). *Basic and clinical endocrinology*. Stamford: Appleton and Lange.
- Asa, S. L. (1998). *Tumors of the pituitary gland*. Washington DC: Amer Registry of Pathology.
- Asa, S. L. (2008). Practical pituitary pathology: what does the pathologist need to know?. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 132(8), 1231-1240.
- Asa, S. L., & Ezzat, S. (1998). The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocrine reviews*, 19(6), 798-827.
- Asa, S. L., & Ezzat, S. (2002). The pathogenesis of pituitary tumours. *Nature Reviews Cancer*, 2(11), 836-849.
- Asa, S. L., & Ezzat, S. (2005). Genetics and proteomics of pituitary tumors. *Endocrine*, 28(1), 43-47.
- Asa, S. L., & Ezzat, S. (2009). The pathogenesis of pituitary tumors. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4, 97-126.
- Asa, S. L., Bamberger, A. M., Cao, B., Wong, M., Parker, K. L., & Ezzat, S. (1996). The transcription activator steroidogenic factor-1 is preferentially expressed in the human pituitary gonadotroph. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81(6), 2165-2170.
- Asa, S. L., Puy, L. A., Lew, A. M., Sundmark, V. C., & Elsholtz, H. P. (1993). Cell type-specific expression of the pituitary transcription activator pit-1 in the human pituitary and pituitary adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 77(5), 1275-1280.

- Bach, I., Rhodes, S. J., Pearse, R. V., Heinzl, T., Gloss, B., Scully, K. M., ... & Rosenfeld, M. G. (1995). P-Lim, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with Pit-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7), 2720-2724.
- Bahar, A., Bicknell, J. E., Simpson, D. J., Clayton, R. N., & Farrell, W. E. (2004). Loss of expression of the growth inhibitory gene GADD45 γ , in human pituitary adenomas, is associated with CpG island methylation. *Oncogene*, 23(4), 936-944.
- Bahar, A., Simpson, D. J., Cutty, S. J., Bicknell, J. E., Hoban, P. R., Holley, S., Mourtada-Maarabouni, M. Williams, G. T., Clayton, R. N. & Farrell, W. E. (2004). Isolation and characterization of a novel pituitary tumor apoptosis gene. *Molecular Endocrinology*, 18(7), 1827-1839.
- Baxter, J. D., & MacLeod, K. M. (1980). Molecular basis for hormone action. *Metabolic control and disease* (pp. 104-160). Philadelphia: Saunders Company.
- Beckers, A., & Daly, A. F. (2007). The clinical, pathological, and genetic features of familial isolated pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology*, 157(4), 371-382.
- Bettuzzi, S., Davalli, P., Davoli, S., Chayka, O., Rizzi, F., Belloni, L., ... & Corti, A. (2009). Genetic inactivation of ApoJ/clusterin: effects on prostate tumorigenesis and metastatic spread. *Oncogene*, 28(49), 4344-4352.
- Bilodeau, S., Vallette-Kasic, S., Gauthier, Y., Figarella-Branger, D., Brue, T., Berthelet, F., ... & Meij, B. (2006). Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes & development*, 20(20), 2871-2886.
- Bottoni, A., Zatelli, M. C., Ferracin, M., Tagliati, F., Piccin, D., Vignali, C., ... & Degli Uberti, E. C. (2007). Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: a possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. *Journal of cellular physiology*, 210(2), 370-377.
- Burgess, R., Lunyak, V., & Rosenfeld, M. G. (2002). Signaling and transcriptional control of pituitary development. *Current opinion in genetics & development*, 12(5), 534-539.
- Cander, S., Ertürk, E., Karkucak, M., Gül, Ö. Ö., Görükmez, O., Yakut, T., ... & İmamoğlu, Ş. (2012). Effect of cyclin D1 (CCND1) gene polymorphism on tumor formation and behavior in patients with prolactinoma. *Gene*, 509(1), 158-163.
- Carlson, B. M. (2001). *Human Embryology and Developmental Biology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Casar-Borota, O., Øystese, K. A. B., Sundström, M., Melchior, L., & Popovic, V. (2016). A high-throughput analysis of the IDH1 (R132H) protein expression in pituitary adenomas. *Pituitary*, 19(4), 407-414.
- Chatzellis, E., Alexandraki, K. I., Androulakis, I. I., & Kaltsas, G. (2015). Aggressive pituitary tumors. *Neuroendocrinology*, 101(2), 87-104.
- Chesnokova, V., Zonis, S., Zhou, C., Ben-Shlomo, A., Wawrowsky, K., Toledano, Y., ... & Melmed, S. (2011). Lineage-specific restraint of pituitary gonadotroph cell adenoma growth. *PLoS One*, 6(3), e17924.
- Claperon, A., & Therrien, M. (2007). KSR and CNK: two scaffolds regulating RAS-mediated RAF activation. *Oncogene*, 26(22), 3143-3158.
- Clayton, R. N., Boggild, M., Bates, A. S., Bicknell, J., Simpson, D., & Farrell, W. (1997). Tumour suppressor genes in the pathogenesis of human pituitary tumours. *Hormone Research in Paediatrics*, 47(4-6), 185-193.
- Dahia, P. L., Aguiar, R. C., Honegger, J., Fahlbush, R., Jordan, S., Lowe, D. G., ... & Grossman, A. B. (1998). Mutation and expression analysis of the p27/kip1 gene in corticotrophin-secreting tumours. *Oncogene*, 16(1), 69-76.

- Daly, A. F., Rixhon, M., Adam, C., Dempegioti, A., Tichomirowa, M. A., & Beckers, A. (2006). High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *91*(12), 4769-4775.
- Daniel, P. M., & Prichard, M. M. (1966). Observations on the vascular anatomy of the pituitary gland and its importance in pituitary function. *American heart journal*, *72*(2), 147-152.
- Dasen, J. S., & Rosenfeld, M. G. (2001). Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annual review of neuroscience*, *24*(1), 327-355.
- Dasen, J. S., O'Connell, S. M., Flynn, S. E., Treier, M., Gleiberman, A. S., Szeto, D. P., ... & Rosenfeld, M. G. (1999). Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell*, *97*(5), 587-598.
- DeLellis, R. A., Lloyd, R. V., Heitz, P. U., & Eng, C. (2004). Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. DeLellis, R. A., Lloyd, R. V., Heitz, P. U., & Eng, C. (Eds.), *World Health Organization Classification of Tumours* (p.10-47). Lyon: IARC Press, 2004,
- Desideri, E., Vegliante, R., & Ciriolo, M. R. (2015). Mitochondrial dysfunctions in cancer: genetic defects and oncogenic signaling impinging on TCA cycle activity. *Cancer letters*, *356*(2), 217-223.
- Dong, Q., Debelenko, L. V., Chandrasekharappa, S. C., Emmert-Buck, M. R., Zhuang, Z., Guru, S. C., ... & Collins, F. S. (1997). Loss of heterozygosity at 11q13: analysis of pituitary tumors, lung carcinoids, lipomas, and other uncommon tumors in subjects with familial multiple endocrine neoplasia type 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *82*(5), 1416-1420.
- Ellison, D. W., Perry, A., Rosenblum, M., Asa, S., Reid, R., & Louis, D. N. (2008). Tumours: non-neuroepithelial tumours and secondary effects. *Greenfield's Neuropathology*, *2*, 2088-2106.
- Elston, M. S., Gill, A. J., Conaglen, J. V., Clarkson, A., Shaw, J. M., Law, A. J., ... & McDonald, K. L. (2008). Wnt pathway inhibitors are strongly down-regulated in pituitary tumors. *Endocrinology*, *149*(3), 1235-1242.
- Evans, C. O., Moreno, C. S., Zhan, X., McCabe, M. T., Vertino, P. M., Desiderio, D. M., & Oyesiku, N. M. (2008). Molecular pathogenesis of human prolactinomas identified by gene expression profiling, RT-qPCR, and proteomic analyses. *Pituitary*, *11*(3), 231-245.
- Evans, C. O., Young, A. N., Brown, M. R., Brat, D. J., Parks, J. S., Neish, A. S., & Oyesiku, N. M. (2001). Novel patterns of gene expression in pituitary adenomas identified by complementary deoxyribonucleic acid microarrays and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *86*(7), 3097-3107.
- Ezzat, S. (2008). Epigenetic control in pituitary tumors. *Endocrine journal*, *55*(6), 951-957.
- Ezzat, S., & Asa, S. L. (2006). Mechanisms of disease: the pathogenesis of pituitary tumors. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, *2*(4), 220-230.
- Ezzat, S., Asa, S. L., Couldwell, W. T., Barr, C. E., Dodge, W. E., Vance, M. L., & McCutcheon, I. E. (2004). The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, *101*(3), 613-619.
- Ezzat, S., Mader, R., Yu, S., Ning, T., Poussier, P., & Asa, S. L. (2005). Ikaros integrates endocrine and immune system development. *The Journal of clinical investigation*, *115*(4), 1021-1029.
- Ezzat, S., Yu, S., & Asa, S. L. (2005). The zinc finger Ikaros transcription factor regulates pituitary growth hormone and prolactin gene expression through distinct effects on chromatin accessibility. *Molecular Endocrinology*, *19*(4), 1004-1011.
- Farrell, W. E. (2005). Epigenetic mechanisms of tumorigenesis. *Hormone and Metabolic Research*, *37*(06), 361-368.

- Fedele, M., Palmieri, D., & Fusco, A. (2010). HMGA2: a pituitary tumour subtype-specific oncogene?. *Molecular and cellular endocrinology*, 326(1-2), 19-24.
- Fedele, M., Visone, R., De Martino, I., Troncone, G., Palmieri, D., Battista, S., ... & Helin, K. (2006). HMGA2 induces pituitary tumorigenesis by enhancing E2F1 activity. *Cancer cell*, 9(6), 459-471.
- Fernandez, A., Karavitaki, N., & Wass, J. A. (2010). Prevalence of pituitary adenomas: a community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). *Clinical endocrinology*, 72(3), 377-382.
- Fofanova, Q., Takamura, N., Kinoshita, E., Parks, J. S., Brown, M. R., Peterkova, V. A., ... & Yamashita, S. (1998). Compound heterozygous deletion of the PROP-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(7), 2601-2604.
- Friend, K. E., Chiou, Y. K., Laws Jr, E. R., Lopes, M. B., & Shupnik, M. A. (1993). Pit-1 messenger ribonucleic acid is differentially expressed in human pituitary adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 77(5), 1281-1286.
- Galland, F., Lacroix, L., Saulnier, P., Dessen, P., Meduri, G., Bernier, M., ... & Bidart, J. M. (2010). Differential gene expression profiles of invasive and non-invasive non-functioning pituitary adenomas based on microarray analysis. *Endocrine-related cancer*, 17(2), 361-371.
- Gallardo, M. E., Lopez-Rios, J., Fernaud-Espinosa, I., Granadino, B., Sanz, R., Ramos, C., ... & de Córdoba, S. R. (1999). Genomic cloning and characterization of the human homeobox gene SIX6 reveals a cluster of SIX genes in chromosome 14 and associates SIX6 hemizyosity with bilateral anophthalmia and pituitary anomalies. *Genomics*, 61(1), 82-91.
- Ganong, W. F. (2001). Review of medical physiology. New York: McGraw-Hill.
- Genuth, S. M. (1998). The hypothalamus and pituitary gland. *Physiology*, 5, 819-859.
- Gittleman, H., Ostrom, Q. T., Farah, P. D., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., ... & Sloan, A. E. (2014). Descriptive epidemiology of pituitary tumors in the United States, 2004–2009. *Journal of neurosurgery*, 121(3), 527-535.
- Goidin, D., Kappeler, L., Perrot, J., Epelbaum, J., & Gourdji, D. (2000). Differential Pituitary Gene Expression Profiles Associated-To Aging and Spontaneous Tumors as Revealed by cDNA Expression Array. *Endocrinology*, 141(12), 4805-4808.
- Gong, J., Diao, B. O., Yao, G. J., Liu, Y., & Xu, G. Z. (2013). Analysis of regulatory networks constructed based on gene coexpression in pituitary adenoma. *Journal of genetics*, 92(3), 489-497.
- Gonsky, R., Herman, V., Melmed, S., & Fagin, J. (1991). Transforming DNA sequences present in human prolactin-secreting pituitary tumors. *Molecular Endocrinology*, 5(11), 1687-1695.
- Goodman, H. M. (1998). Pituitary gland. Johnson, L. R. (Ed) *Essential medical physiology* (p. 468-72). Philadelphia: Lippincott-Raven Publications.
- Gorczyca, W., & Hardy, J. (1987). Arterial supply of the human anterior pituitary gland. *Neurosurgery*, 20(3), 369-378.
- Gordon, D. F., Lewis, S. R., Haugen, B. R., James, R. A., McDermott, M. T., Wood, W. M., & Ridgway, E. C. (1997). Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin β -subunit promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24339-24347.
- Gu, Z., Fang, X., Li, C., Chen, C., Liang, G., Zheng, X., & Fan, Q. (2017). Increased PTPRA expression leads to poor prognosis through c-Src activation and G1 phase progression in squamous cell lung cancer. *International Journal of Oncology*, 51(2), 489-497.

- Guinn, B. A., Bland, E. A., Lodi, U., Liggins, A. P., Tobal, K., Petters, S., ... & Mufti, G. J. (2005). Humoral detection of leukaemia-associated antigens in presentation acute myeloid leukaemia. *Biochemical and biophysical research communications*, 335(4), 1293-1304.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (1996). *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Hardy, J. (1973). Transsphenoidal surgery of hypersecreting pituitary tumors. Kohler, P.O., Ross, G.T. (Ed) *Diagnosis and Treatment of Pituitary Tumors. International Congress Series*. Amsterdam: Exerpta Medica.
- Hashimoto, S., Ishii, A., & Yonehara, S. (1991). The E1b oncogene of adenovirus confers cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor and monoclonal anti-Fas antibody. *International Immunology*, 3(4), 343-351.
- Heaney, A. P. (2005). Pituitary tumour pathogenesis. *British medical bulletin*, 75(1), 81-97.
- Heaney, A. P., & Melmed, S. (2004). Molecular targets in pituitary tumours. *Nature Reviews Cancer*, 4(4), 285-295.
- Heaney, A. P., Horwitz, G. A., Wang, Z., Singson, R., & Melmed, S. (1999). Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis. *Nature medicine*, 5(11), 1317-1321.
- Horvath, E., Scheithauer, B. W., & Kovacs, K. (1997). Regional Neuropathology. Hypothalamus and Pituitary. Graham, D. I., Lantos, P. L. (Ed) *Greenfield's neuropathology*. New York: Hodder Arnold Publications.
- Igreja, S., Chahal, H. S., Akker, S. A., Gueorguiev, M., Popovic, V., Damjanovic, S., ... & Korbonits, M. (2009). Assessment of p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) and aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) genes in multiple endocrine neoplasia (MEN1) syndrome patients without any detectable MEN1 gene mutations. *Clinical endocrinology*, 70(2), 259-264.
- İpekdal, K. (2006). Microarray Teknolojisi Evrimsel ve Ekolojik Çalışmalarda Kullanımı. http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_mikroarray_and_ecology.pdf (Erişim: 13 Mayıs 2015).
- Jacoby, L. B., Hedley-Whyte, E. T., Pulaski, K., Seizinger, B. R., & Martuza, R. L. (1990). Clonal origin of pituitary adenomas. *Journal of neurosurgery*, 73(5), 731-735.
- Jenne, D. E., & Tschopp, J. (1989). Molecular structure and functional characterization of a human complement cytolysis inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(18), 7123-7127.
- Jiang, X., & Zhang, X. (2013). The molecular pathogenesis of pituitary adenomas: an update. *Endocrinology and metabolism*, 28(4), 245-254.
- Karga, H. J., Alexander, J. M., Hedley-Whyte, E. T., Klibanski, A. N. N. E., & Jameson, J. L. (1992). Ras mutations in human pituitary tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 74(4), 914-919.
- Kawashima, T., Bao, Y. C., Minoshima, Y., Nomura, Y., Hatori, T., Hori, T., ... & Inoue, M. (2009). A Rac GTPase-activating protein, MgcRacGAP, is a nuclear localizing signal-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors. *Molecular and cellular biology*, 29(7), 1796-1813.
- Ke, H. L., Ke, R. H., Li, S. T., Li, B., Lu, H. T., & Wang, X. Q. (2013). Expression of RACGAP1 in high grade meningiomas: a potential role in cancer progression. *Journal of neuro-oncology*, 113(2), 327-332.
- Kioussi, C., O'Connell, S., St-Onge, L., Treier, M., Gleiberman, A. S., Gruss, P., & Rosenfeld, M. G. (1999). Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(25), 14378-14382.

- Kirschner, L. S., Carney, J. A., Pack, S. D., Taymans, S. E., Giatzakis, C., Cho, Y. S., ... & Stratakis, C. A. (2000). Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I- α regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nature genetics*, 26(1), 89-92.
- Kovacs, K.H., & Horvath, E. (1986). *Atlas of Tumor Pathology*. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology.
- Kulesh, D. A., Clive, D. R., Zarlenga, D. S., & Greene, J. J. (1987). Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(23), 8453-8457.
- Kumar, A., Goel, G., Fehrenbach, E., Puniya, A. K., & Singh, K. (2005). Microarrays: the technology, analysis and application. *Engineering in Life Sciences*, 5(3), 215-222.
- Lake, S. L., Damato, B. E., Kalirai, H., Dodson, A. R., Taktak, A. F., Lloyd, B. H., & Coupland, S. E. (2013). Single nucleotide polymorphism array analysis of uveal melanomas reveals that amplification of CNKSR3 is correlated with improved patient survival. *The American journal of pathology*, 182(3), 678-687.
- Lamolet, B., Pulichino, A. M., Lamonerie, T., Gauthier, Y., Brue, T., Enjalbert, A., & Drouin, J. (2001). A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell*, 104(6), 849-859.
- Lancôt, C., Gauthier, Y., & Drouin, J. (1999). Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology*, 140(3), 1416-1422.
- Lania, A. G., Ferrero, S., Pivonello, R., Mantovani, G., Peverelli, E., Di Sarno, A., ... & Colao, A. (2010). Evolution of an aggressive prolactinoma into a growth hormone secreting pituitary tumor coincident with GNAS gene mutation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(1), 13-17.
- Larsen, W. J. (2001). *Human embryology*. London: Churchill Livingstone.
- Lashkari, D. A., DeRisi, J. L., McCusker, J. H., Namath, A. F., Gentile, C., Hwang, S. Y., ... & Davis, R. W. (1997). Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(24), 13057-13062.
- Lefèvre, C., Audebert, S., Jobard, F., Bouadjar, B., Lakhdar, H., Boughdene-Stambouli, O., ... & Lathrop, M. (2003). Mutations in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis type 2. *Human molecular genetics*, 12(18), 2369-2378.
- Leontiou, C. A., Gueorguiev, M., Van Der Spuy, J., Quinton, R., Lolli, F., Hassan, S., ... & Stolbrink, M. (2008). The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(6), 2390-2401.
- Lerner, A. B. (1981). The intermediate lobe of the pituitary gland: introduction and background. *Peptides of the pars intermedia* (p. 3-12). London: Pitman Medical.
- Lin, C. R., Kioussi, C., O'Connell, S., Briata, P., Szeto, D., Liu, F., ... & Rosenfeld, M. G. (1999). Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature*, 401(6750), 279-282.
- Lin, Y., Jiang, X., Shen, Y., Li, M., Ma, H., Xing, M., & Lu, Y. (2009). Frequent mutations and amplifications of the PIK3CA gene in pituitary tumors. *Endocrine-related cancer*, 16(1), 301.
- Lloyd, R. V., & Osamura, R. Y. (1997). Transcription factors in normal and neoplastic pituitary tissues. *Microscopy research and technique*, 39(2), 168-181.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., & Cavenee, C. (Eds) (2016). *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System* (Revised 4th Edition). Lyon: IARC.
- Lyons, J., Landis, C. A., Harsh, G., Vallar, L., Grunewald, K., Feichtinger, H., ... & Bourne, H. R. (1990). Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science*, 249(4969), 655-659.

- Ma, J., Xiao, Y., Tian, B., Chen, S., Zhang, B., Wu, J., ... & Zhou, Y. (2020). Long noncoding RNA Inc-ABCA12-3 promotes cell migration, invasion, and proliferation by regulating fibronectin 1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(2), 1374-1387.
- Machida, T., Fujita, T., Ooo, M. L., Ohira, M., Isogai, E., Mihara, M., ... & Adachi, W. (2006). Increased expression of proapoptotic BMCC1, a novel gene with the BNIP2 and Cdc42GAP homology (BCH) domain, is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene*, 25(13), 1931-1942.
- Melmed, S. (2003). Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *The Journal of clinical investigation*, 112(11), 1603-1618.
- Melmed, S. (2009). Acromegaly pathogenesis and treatment. *The Journal of clinical investigation*, 119(11), 3189-3202.
- Melmed, S. (2011). Pathogenesis of pituitary tumors. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(5), 257-266.
- Mete, O., Ezzat, S., & Asa, S. L. (2012). Biomarkers of aggressive pituitary adenomas. *Journal of molecular endocrinology*, 49(2), R69-R78.
- Mete, O., Gomez-Hernandez, K., Kucharczyk, W., Ridout, R., Zadeh, G., Gentili, F., ... & Asa, S. L. (2016). Silent subtype 3 pituitary adenomas are not always silent and represent poorly differentiated monomorphous plurihormonal Pit-1 lineage adenomas. *Modern Pathology*, 29(2), 131-142.
- Mete, O., Kefeli, M., Çalışkan, S., & Asa, S. L. (2019). GATA3 immunoreactivity expands the transcription factor profile of pituitary neuroendocrine tumors. *Modern Pathology*, 32(4), 484.
- Mete, Ö. (2011). Hipofiz adenomlarının histopatolojik alt tiplendirmesinde modern yaklaşımlar. *Journal of Dialog in Endocrinology/Endokrinolide Diyalog Dergisi*, 8(3), 127-131.
- Mindermann, T., & Wilson, C. B. (1994). Age-related and gender-related occurrence of pituitary adenomas. *Clinical Endocrinology*, 41(3), 359-364.
- Mohammad, H. P., Seachrist, D. D., Quirk, C. C., & Nilson, J. H. (2004). Reexpression of p8 contributes to tumorigenic properties of pituitary cells and appears in a subset of prolactinomas in transgenic mice that hypersecrete luteinizing hormone. *Molecular endocrinology*, 18(10), 2583-2593.
- Moreno, C. S., Evans, C. O., Zhan, X., Okor, M., Desiderio, D. M., & Oyesiku, N. M. (2005). Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. *Cancer research*, 65(22), 10214-10222.
- Morris, D. G., Muşat, M., Czirják, S., Hanzély, Z., Lillington, D. M., Korbonits, M., & Grossman, A. B. (2005). Differential gene expression in pituitary adenomas by oligonucleotide array analysis. *European Journal of Endocrinology*, 153(1), 143-151.
- Morris, Z., Whiteley, W. N., Longstreth, W. T., Weber, F., Lee, Y. C., Tsushima, Y., ... & Salman, R. A. S. (2009). Incidental findings on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *British Medical Journal*, 339-346.
- Musat, M., Korbonits, M., Kola, B., Borboli, N., Hanson, M. R., Nanzer, A. M., ... & Coculescu, M. (2005). Enhanced protein kinase B/Akt signalling in pituitary tumours. *Endocrine-Related Cancer*, 12(2), 423-433.
- Netter, F. (1983). *The Ciba Collection of Medical Illustrations*. New Jersey: Ciba Pharmaceutical.
- Nilsson, B., Gustavsson-Kadaka, E., Bengtsson, B. A., & Jonsson, B. (2000). Pituitary adenomas in Sweden between 1958 and 1991: incidence, survival, and mortality. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(4), 1420-1425.
- Nishioka, H., Inoshita, N., Mete, O., Asa, S. L., Hayashi, K., Takeshita, A., ... & Yamada, S. (2015). The complementary role of transcription factors in the accurate diagnosis of clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Endocrine pathology*, 26(4), 349-355.

- Ökten, A., Orhan, F., Demir, E., & Çakır, M. (2005). Hipofiz Gelişimi. *Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi*, 14(2), 101-109.
- Páez-Pereda, M., Giacomini, D., Refojo, D., Nagashima, A. C., Hopfner, U., Grübler, Y., ... & Low, M. J. (2003). Involvement of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) in pituitary prolactinoma pathogenesis through a Smad/estrogen receptor crosstalk. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 1034-1039.
- Pallen, C. J. (2003). Protein tyrosine phosphatase α (PTP α): a Src family kinase activator and mediator of multiple biological effects. *Current topics in medicinal chemistry*, 3(7), 821-835.
- Palmieri, D., Valentino, T., De Martino, I., Esposito, F., Cappabianca, P., Wierinckx, A., ... & Pierantoni, G. M. (2012). PIT1 upregulation by HMGA proteins has a role in pituitary tumorigenesis. *Endocrine Related Cancer*, 19(2), 123.
- Pei, L., & Melmed, S. (1997). Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Molecular Endocrinology*, 11(4), 433-441.
- Pei, L., Melmed, S., Scheithauer, B., Kovacs, K., & Prager, D. (1994). H-ras mutations in human pituitary carcinoma metastases. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 78(4), 842-846.
- Pellegata, N. S., Quintanilla-Martinez, L., Siggelkow, H., Samson, E., Bink, K., Höfler, H., ... & Atkinson, M. J. (2006). Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15558-15563.
- Pellegrini, I., Barlier, A., Gunz, G., Figarella-Branger, D., Enjalbert, A., Grisoli, F., & Jaquet, P. (1994). Pit-1 gene expression in the human pituitary and pituitary adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 79(1), 189-196.
- Pfaff, S. L., Mendelsohn, M., Stewart, C. L., Edlund, T., & Jessell, T. M. (1996). Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell*, 84(2), 309-320.
- Pollack, I. F. (1994). Brain tumors in children. *New England Journal of Medicine*, 331(22), 1500-1507.
- Prager, D., & Melmed, S. (1993). Molecular pathology of sporadic pituitary-tumors. Lloyd, R. V. (Ed). *Endocrine Pathology*. New York: Humana Press.
- Raappana, A., Koivukangas, J., Ebeling, T., & Pirila, T. (2010). Incidence of pituitary adenomas in Northern Finland in 1992–2007. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(9), 4268-4275.
- Rockett, J. C., & Dix, D. J. (2000). DNA arrays: technology, options and toxicological applications. *Xenobiotica*, 30(2), 155-177.
- Roussel-Gervais, A., Bilodeau, S., Vallette, S., Berthelet, F., Lacroix, A., Figarella-Branger, D., ... & Drouin, J. (2010). Cooperation between cyclin E and p27Kip1 in pituitary tumorigenesis. *Molecular Endocrinology*, 24(9), 1835-1845.
- Sahai, E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. *Current opinion in genetics & development*, 15(1), 87-96.
- Scheithauer, B. W., Laws Jr, E. R., Kovacs, K., Horvath, E., Randall, R. V., & Carney, J. A. (1987). Pituitary adenomas of the multiple endocrine neoplasia type I syndrome. *Seminars in diagnostic pathology*, 4(3), 205-211.
- Schena, M., & Davis, R. W. (2001). Genes, Genomes, and Chips. Schena M. (Ed) *DNA Microarrays A Practical Approach*. New York: Oxford University Press.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235), 467-470.

- Schurch, W., Seemayer, T. A., Gabbiani, G., & Sternberg, S. S. (1997). Histology for pathologists. *Histology for Pathologists*.
- Scully, K. M., & Rosenfeld, M. G. (2002). Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science*, 295(5563), 2231-2235.
- Seidel, M., & Niessner, R. (2008). Automated analytical microarrays: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(5), 1521.
- Shimon, I., & Melmed, S. (1997). Pituitary tumor pathogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(6), 1675-1681.
- Shimon, I., Hüttner, A., Said, J., Spirina, O. M., & Melmed, S. (1996). Heparin-binding secretory transforming gene (hst) facilitates rat lactotrope cell tumorigenesis and induces prolactin gene transcription. *The Journal of clinical investigation*, 97(1), 187-195.
- Simpson, D. J., Hibberts, N. A., McNicol, A. M., Clayton, R. N., & Farrell, W. E. (2000). Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island. *Cancer Research*, 60(5), 1211-1216.
- Simpson, D. J., McNicol, A. M., Murray, D. C., Bahar, A., Turner, H. E., Wass, J. A., ... & Farrell, W. E. (2004). Molecular pathology shows p16 methylation in nonadenomatous pituitaries from patients with Cushing's disease. *Clinical cancer research*, 10(5), 1780-1788.
- Sivakumar, W., Chamoun, R., Nguyen, V., & Couldwell, W. T. (2011). Incidental pituitary adenomas. *Neurosurgical focus*, 31(6), E18.
- Söylemezoğlu, F., & Aydın, Ç. (2014). Sellar lezyonların Patolojisi. *Türk Nöroşir Dergisi*, 24(3), 1-10.
- Standring, S. (2005). *Gray's anatomy: The anatomical basis of clinical practice*. London: Elsevier Churchill-Livingstone.
- Stanfield, J. P. (1960). The blood supply of the human pituitary gland. *Journal of anatomy*, 94(Pt 2), 257.
- Stebbing, J., Lit, L. C., Zhang, H., Darrington, R. S., Melaiu, O., Rudraraju, B., & Giamas, G. (2014). The regulatory roles of phosphatases in cancer. *Oncogene*, 33(8), 939-953.
- Stilling, G., Sun, Z., Zhang, S., Jin, L., Righi, A., Kovács, G., ... & Lloyd, R. V. (2010). MicroRNA expression in ACTH-producing pituitary tumors: up-regulation of microRNA-122 and-493 in pituitary carcinomas. *Endocrine*, 38(1), 67-75.
- Subramanian, T., Boyd, J. M., & Chinnadurai, G. (1995). Functional substitution identifies a cell survival promoting domain common to adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins. *Oncogene*, 11(11), 2403-2409.
- Szeto, D. P., Rodriguez-Esteban, C., Ryan, A. K., O'Connell, S. M., Liu, F., Kioussi, C., ... & Rosenfeld, M. G. (1999). Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes & development*, 13(4), 484-494.
- Szeto, D. P., Ryan, A. K., O'Connell, S. M., & Rosenfeld, M. G. (1996). P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 7706-7710.
- Szeto, D. P., Ryan, A. K., O'Connell, S. M., & Rosenfeld, M. G. (1996). P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 7706-7710.
- Tani, Y., Sugiyama, T., Izumiyama, H., Yoshimoto, T., Yamada, S., & Hirata, Y. (2011). Differential gene expression profiles of POMC-related enzymes, transcription factors and receptors between non-pituitary and pituitary ACTH-secreting tumors. *Endocrine journal*, 58(4), 297-303.

- Tateno, T., Asa, S. L., Zheng, L., Mayr, T., Ullrich, A., & Ezzat, S. (2011). The FGFR4-G388R polymorphism promotes mitochondrial STAT3 serine phosphorylation to facilitate pituitary growth hormone cell tumorigenesis. *PLoS Genet*, 7(12), e1002400.
- Terada, T., Kovacs, K., Stefaneanu, L., & Horvath, E. (1995). Incidence, pathology, and recurrence of pituitary adenomas: study of 647 unselected surgical cases. *Endocrine pathology*, 6(4), 301-310.
- Thapar, K., Kovacs, K., Scheithauer, B. W., & Muller, P. J. (1980). Classification and pathology of sellar and parasellar tumors. Tindall, G. T., Cooper, P. R., & Barrow, D. L. (Ed), *The practice of neurosurgery* (p. 1021-65). New York: Mc-Graw Hill Company.
- Thapar, K., Kovacs, K., Stefaneanu, L., Scheithauer, B., Killinger, D. W., Lioyd, R. V., ... & Laws Jr, E. R. (1997). Overexpression of the growth-hormone-releasing hormone gene in acromegaly-associated pituitary tumors. An event associated with neoplastic progression and aggressive behavior. *The American journal of pathology*, 151(3), 769.
- Thapar, K., Scheithauer, B. W., Kovacs, K., Pernicone, P. J., & Laws Jr, E. R. (1996). p53 expression in pituitary adenomas and carcinomas: correlation with invasiveness and tumor growth fractions. *Neurosurgery*, 38(4), 765-771.
- Tichomirowa, M. A., Barlier, A., Daly, A., Jaffrain-Rea, M., Ronchi, C., Yaneva, M., ... & Desaillood, R. (2011). High prevalence of AIP gene mutations following focused screening in young patients with sporadic pituitary macroadenomas. *European Journal of Endocrinology*, 165(4), 509-15.
- Touré, A., Dorseuil, O., Morin, L., Timmons, P., Jégou, B., Reibel, L., & Gacon, G. (1998). MgcRacGAP, a new human GTPase-activating protein for Rac and Cdc42 similar to *Drosophila rotundRacGAP* gene product, is expressed in male germ cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(11), 6019-6023.
- Townsend, A. R., Hardingham, J., Tebbutt, N. C., Karapetis, C. S., Singhal, N., Joshi, R., ... & Price, T. J. (2017). A phase Ib/II study of second-line therapy with panitumumab, irinotecan and everolimus (PIE) in metastatic colorectal cancer (mCRC) with KRAS wild type (WT): Biomarker substudy.
- Tremblay, J. J., Marcil, A., Gauthier, Y., & Drouin, J. (1999). Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *The EMBO journal*, 18(12), 3431-3441.
- Vallar, L., Spada, A., & Giannattasio, G. (1987). Altered Gs and adenylate cyclase activity in human GH-secreting pituitary adenomas. *Nature*, 330(6148), 566-568.
- Vasiljevic, A., Jouanneau, E., Trouillas, J., & Raverot, G. (2016). Clinicopathological prognostic and theranostic markers in pituitary tumors. *Minerva endocrinologica*, 41(3), 377.
- Vernooij, M. W., Ikram, M. A., Tanghe, H. L., Vincent, A. J., Hofman, A., Krestin, G. P., ... & van der Lugt, A. (2007). Incidental findings on brain MRI in the general population. *New England Journal of Medicine*, 357(18), 1821-1828.
- Vigbedor, M. O. S. (2013). Structure and Regulation of G-substrate in Neurodegenerative Disease.
- Von Deimling, A., Korshunov, A., & Hartmann, C. (2011). The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathology*, 21(1), 74-87.
- Vucic, D., Dixit, V. M., & Wertz, I. E. (2011). Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(7), 439-452.
- Wang, D., Berglund, A., Kenchappa, R. S., Forsyth, P. A., Mulé, J. J., & Etame, A. B. (2016). BIRC3 is a novel driver of therapeutic resistance in Glioblastoma. *Scientific reports*, 6, 21710.
- Weinstein, L. S., Shenker, A., Gejman, P. V., Merino, M. J., Friedman, E., & Spiegel, A. M. (1991). Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune–Albright syndrome. *New England Journal of Medicine*, 325(24), 1688-1695.

- Wierinckx, A., Auger, C., Devauchelle, P., Reynaud, A., Chevallier, P., Jan, M., ... & Raverot, G. (2007). A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocrine-related cancer*, *14*(3), 887-900.
- Williamson, E. A., Daniels, M., Foster, S., Kelly, W. F., Kendall-Taylor, P., & Harris, P. E. (1994). Gs α and Gi2 α mutations in clinically non-functioning pituitary tumours. *Clinical endocrinology*, *41*(6), 815-820.
- Williamson, E. A., Ince, P. G., Harrison, D., Kendall-Taylor, P., & Harris, P. E. (1995). G-protein mutations in human pituitary adrenocorticotrophic hormone-secreting adenomas. *European journal of clinical investigation*, *25*(2), 128-131.
- Woloschak, M., Yu, A., & Post, K. D. (1997). Frequent inactivation of the p16 gene in human pituitary tumors by gene methylation. *Molecular carcinogenesis*, *19*(4), 221-224.
- Wood, W. M., Sarapura, V. D., Dowding, J. M., Woodmansee, W. W., Haakinson, D. J., Gordon, D. F., & Ridgway, E. C. (2002). Early gene expression changes preceding thyroid hormone-induced involution of a thyrotrope tumor. *Endocrinology*, *143*(2), 347-359.
- Wu, W., Cogan, J. D., Pfäffle, R. W., Dasen, J. S., Frisch, H., O'Connell, S. M., ... & Phillips III, J. A. (1998). Mutations in PROP 1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nature genetics*, *18*(2), 147-149.
- Xu, M., Shorts-Cary, L., Knox, A. J., Kleinsmidt-DeMasters, B., Lillehei, K., & Wierman, M. E. (2009). Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 is overexpressed in human pituitary tumors: role in proliferation and survival. *Endocrinology*, *150*(5), 2064-2071.
- Xu, Z., Ellis, S., Lee, C. C., Starke, R. M., Schlesinger, D., Vance, M. L., ... & Sheehan, J. (2014). Silent corticotroph adenomas after stereotactic radiosurgery: a case-control study. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, *90*(4), 903-910.
- Yamazaki, D., Kurisu, S., & Takenawa, T. (2009). Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates. *Oncogene*, *28*(13), 1570-1583.
- Yoltaş, A., & Karaboz, İ. (2010). DNA mikroarray teknolojisi ve uygulama alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, *8*, 01-19.
- Yu, R., & Melmed, S. (2004). Pituitary tumor transforming gene: an update. *Frontiers of Hormone Research*, *32*, 175-185.
- Yu, R., Heaney, A. P., Lu, W., Chen, J., & Melmed, S. (2000). Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(47), 36502-36505.
- Zhan, X., & Desiderio, D. M. (2010). Signaling pathway networks mined from human pituitary adenoma proteomics data. *BMC medical genomics*, *3*(1), 13.
- Zhang, X. U. N., Sun, H., Danila, D. C., Johnson, S. R., Zhou, Y., Swearingen, B., & Klibanski, A. (2002). Loss of expression of GADD45 γ , a growth inhibitory gene, in human pituitary adenomas: implications for tumorigenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *87*(3), 1262-1267.
- Zhang, X., Horwitz, G. A., Heaney, A. P., Nakashima, M., Prezant, T. R., Bronstein, M. D., & Melmed, S. (1999). Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *84*(2), 761-767.
- Zhang, X., Rice, K., Wang, Y., Chen, W., Zhong, Y., Nakayama, Y., ... & Klibanski, A. (2010). Maternally expressed gene 3 (MEG3) noncoding ribonucleic acid: isoform structure, expression, and functions. *Endocrinology*, *151*(3), 939-947.
- Zhang, X., Zhou, Y., Mehta, K. R., Danila, D. C., Scolavino, S., Johnson, S. R., & Klibanski, A. (2003). A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *88*(11), 5119-5126.

Zhao, J., Dahle, D., Zhou, Y., Zhang, X., & Klibanski, A. (2005). Hypermethylation of the promoter region is associated with the loss of MEG3 gene expression in human pituitary tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(4), 2179-2186.

Zhao, L., Lin, M., & Wang, S. (2014). Identification of human prolactinoma related genes by DNA microarray. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10(3), 544.

Zhu, X., Mao, X., Hurren, R., Schimmer, A. D., Ezzat, S., & Asa, S. L. (2008). Deoxyribonucleic acid methyltransferase 3B promotes epigenetic silencing through histone 3 chromatin modifications in pituitary cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(9), 3610-3617.

Zou, H., McGarry, T. J., Bernal, T., & Kirschner, M. W. (1999). Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science*, 285(5426), 418-422.

www.chem.agilent.com/SiteCollectionImages/SurePrint_ABCD.jpg

<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/>

www.microarray.lu/images/overview_1.jpg



ÖZGEÇMİŞ

| <u>Kişisel Bilgiler</u> | |
|--|---|
| Adı Soyadı | Tuğba Demircioğlu (Tarhan) |
| Eğitim Bilgileri | 2000-2003 Ataköy Cumhuriyet Lisesi 2003-2007 Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Biyoloji 2007-2010 İstanbul Bilim Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı |
| Mesleki Deneyim | 2009-2011 İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları ABD Moleküler Endokrinoloji Laboratuvarı, Moleküler Biyolog Şubat-Nisan 2012 Omega <i>Araştırma</i> Organizasyon Eğitim Danışmanlık Ltd. Şti, Klinik Araştırma Saha Koordinatörü 2013-2014 Omega <i>Araştırma</i> Organizasyon Eğitim Danışmanlık Ltd. Şti, Klinik Araştırma Saha Koordinatörü 2014-2015 Mene Sağlık Araştırma Danışmanlık Ltd.Şti, Klinik Araştırma Saha Koordinatörü 2017-2020 CO Tıbbi Araştırma Danışmanlık Ltd.Şti, Klinik Araştırma Saha Koordinatörü 2020-Halen Medex Klinik Araştırma ve Eğitim Danışmanlık Ltd.Şti, Klinik Araştırma Saha Koordinatörü |
| Yabancı Dil Bilgileri | İngilizce |
| Üye Olduğu Mesleki/Sosyal Kuruluşlar | |
| <u>Bilimsel Etkinlikler</u> | |
| Makaleler | <ol style="list-style-type: none">1. Tekcan D, Baş F, Atalar F, Aydın BK, Akan G, Tarhan T, Bundak R, Darendeliler F. No Effect of the IGF-1 Gene rs35767 and rs17032362 Polymorphisms in the Etiology of Idiopathic Short Stature. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2012; 120(07): 395-400.2. Cengiz P, Bas F, Atalar F, Ucar A, Darendeliler F, Akan G, Tarhan T, Bundak R. Growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis as related to body mass index in patients with idiopathic short stature. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2013 Mar 22;5(1):13-9.3. Tugcu V, Simsek A, Tarhan T, Atalar F, Bitkin A, Tasci AI, Kural AR, Altug T. |

| | |
|------------|--|
| | <p>OPN gene polymorphism (Ala250) and lower serum OPN levels are associated with urolithiasis. Ren Fail. 2013 Jul;35(6):825-9.</p> |
| Projeler | <p>21 Hidroksilaz Eksikliğine Bağlı Konjenital Adrenal Hiperplazi Vakalarında Mutasyon Aranması. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği, Proje No:5242, Proje Çalışanı, 2010.</p> |
| Bildiriler | <p>1. Atalar F, Baş F, Tarhan T, Akan G, Darendeliler F, Bundak R, Saka N, Gunoz H</p> <p>PPAR gamma gene expression is positively correlated with leptin and MC4R expressions in congenital adrenal hyperplasia.</p> <p>Hor. Res. Paediatr. 76 (2) 151, 50th Annual Meeting of European Society For Paediatric Endocrinology (ESPE) 2011; September 25-28, Scotland.</p> <p>2. Atalar F, Baş F, Akan G, Tarhan T, Darendeliler F, Bundak R, Saka N, Gunoz H.</p> <p>The crosstalk between the insülin-like growth factor (IGF)- IGF binding proteins axis and leptin: The differential impact of childhood obesity in IGF-1, IGFBP-3 and Leptin.</p> <p>Hor. Res. Paediatr. 76 (2) 173, 50th Annual Meeting of European Society For Paediatric Endocrinology (ESPE) 2011; September 25-28, Scotland.</p> <p>3. Tekcan D, Bas F, Atalar F, Akan G, Tarhan T, Darendeliler F.</p> <p>IGF-1 and IGFBP-3 Levels and Distribution of IGF-1 Gene Polymorphisms in Idiopathic Short Stature.</p> <p>Hormone Research in Paediatrics, 76(2), 217, European Society For Paediatric Endocrinology (ESPE) 2011; September 25-28, Scotland.</p> <p>4. Tarhan T, Atalar F, Tugcu V, Kural AR, Bitkin A, Altug T</p> <p>The Association between the serum osteopontin levels and OPN Ala250 polymorphism in urolithiasis. European Journal of Human Genetics 19 (2), European Human Genetics Conference (ESHG) 2011; 28 -31 May, The Netherlands.</p> |

| | |
|--|---|
| | <p>5. Tekcan D, Bas F, Atalar F, Akan G, Tarhan T, Darendeliler F İdiopatik Boy Kısaldığı Etiyopatogenezinde IGF-1 Gen polimorfizmi Araştırılması. 33.Pediatric Günleri ve 12. Pediatric Hemşireliği Günleri, 28-31 Mart 2011, İstanbul</p> <p>6. Atalar F, Bas F, Akan G, Tarhan T, Darendeliler F, Aydın B, Bundak R, Saka N, Gunoz H. Correlation of leptin, leptin receptor gene polymorphisms and expression with insulin resistance in congenital adrenal hyperplasia (CAH). Hor. Res. Paediatr. 74 (3) 118, 49th Annual Meeting of European Society For Paediatric Endocrinology (ESPE) 2010; September 22-25, Prague, Czech Republic.</p> <p>7. Atalar F, Bas F, Akan G, Tarhan T, Darendeliler F, Aydın B, Bundak R, Saka N, Gunoz H. Leptin, leptin receptor, MC4R, PPAR gamma and osteopontin gene polymorphisms in obese and overweight children. Hor. Res. Paediatr. 74 (3) 79, 49th Annual Meeting of European Society For Paediatric Endocrinology (ESPE) 2010; September 22-25, Prague, Czech Republic.</p> <p>8. Cengiz P, Bas F, Bundak R, Atalar F, Darendeliler F, Aydın B, Akan G, Tarhan T, Saka N, Gunoz H. Expression of IGF-1, IGFBP-3, IGF1R genes in idiopathic short stature. Hor. Res. Paediatr. 74 (3) 198, 49th Annual Meeting of European Society For Paediatric Endocrinology (ESPE) 2010; September 22-25, Prague, Czech Republic.</p> <p>9. Akan G, Tarhan T, Atalar F, Bas F, Darendeliler F, Bundak R, saka N, Gunoz H. Leptin ve regülatörlerinin çocukluk çağı obezitesindeki rollerinin araştırılması.</p> |
|--|---|

| |
|---|
| <p>XIV. Ulusal Pediatrik Endokrin ve Diyabet Kongresi; 4-10 Ekim 2010, s.207.</p> <p>10. Atalar F, Bas F, Akan G, Tarhan T, Darendeliler F, Bundak R, Aydın B, Saka N, Guno H.</p> <p>Çocukluk Çağı obezitesinde IGF-1 ve IGFBP-3 genleri ile leptin gen ekspresyonları korelasyonunun araştırılması.</p> <p>XIV. Ulusal Pediatrik Endokrin ve Diyabet Kongresi; 4-10 Ekim 2010, s.122.</p> <p>11. Tarhan T, Atalar F, Baş F, Akan G, Demir G, Darendeliler F, Bundak R, Günöz H, Saka N.</p> <p>Konjenital adrenal hiperplazide Pro12Ala ve Val103 polimorfizmlerinin incelenmesi.</p> <p>XIII. Ulusal Pediatrik Endokrinoloji ve Diyabet Kongresi; 17-21 Kasım, Antalya, 2009, s.121.</p> <p>Endokrin Hastalıklar ve Genetik Sempozyumu; 8-10 Ekim, Abant, 2009, s.116.</p> <p>12. Baş F, Tarhan T, Atalar F, Akan G, Demir G, Darendeliler F, Bundak R, Günöz H, Saka N.</p> <p>Konjenital adrenal hiperplazi vakalarında LEP ve LEPR gen polimorfizmlerinin insülin direnci ile ilişkilendirilmesi.</p> <p>XIII. Ulusal Pediatrik Endokrinoloji ve Diyabet Kongresi; 17-21 Kasım, Antalya, 2009, Sözel sunu, s.103.</p> <p>Endokrin Hastalıklar ve Genetik Sempozyumu; 8-10 Ekim, Abant, 2009, s.105.</p> <p>13. Tarhan T, Atalar F, Baş F, Akan G, Demir G, Darendeliler F, Bundak R, Saka N, Günöz H.</p> <p>Proinflamatuvar bir mediyatör olan osteopontin ve obezite.</p> <p>XIII. Ulusal Pediatrik Endokrinoloji ve Diyabet Kongresi; 17-21 Kasım, Antalya, 2009, s.162.</p> <p>Endokrin Hastalıklar ve Genetik Sempozyumu; 8-10 Ekim, Abant, 2009, s.113.</p> <p>14. Atalar F, Akan G, Baş F, Tarhan T, Demir G, Bundak R, Saka N, Günöz H, Darendeliler F.</p> |
|---|

| |
|--|
| <p>Obez çocuklarda IGFBP-3 -202A/C polimorfizmlerinin serum IGFBP-3 ve IGF-1 düzeyleri ile ilişkisi.</p> <p>XIII. Ulusal Pediatrik Endokrinoloji ve Diyabet Kongresi;17-21 Kasim, Antalya, 2009, s.156.</p> <p>Endokrin Hastalıklar ve Genetik Sempozyumu; 8-10 Ekim, Abant, 2009, s.111.</p> <p>15. Akan G, Atalar F, Baş F, Demir G, Tarhan T, Darendeliler F, Bundak R, Saka N, Günöz H.</p> <p>Leptin ve Leptin reseptör polimorfizmlerinin Çocukluk Çağı Obezitesi ile ilişkisi.</p> <p>XIII. Ulusal Pediatrik Endokrinoloji ve Diyabet Kongresi;17-21 Kasim, Antalya, 2009, s.160.</p> <p>16. Akan G, Atalar F, Baş F, Demir G, Tarhan T, Darendeliler F, Bundak R, Saka N, Günöz H.</p> <p>Çocukluk çağı obez ve erişkin metabolik bozuklukları olan hastalarda leptin ve leptin reseptörü polimorfizmlerinin serum leptin seviyeleri ile karşılaştırılması.</p> <p>Endokrin Hastalıklar ve Genetik Sempozyumu; 8-10 Ekim, Abant, 2009, s.112.</p> <p>17. Demir G, Atalar F, Baş F, Akan G, Tarhan T, Darendeliler F, Bundak R, Saka N, Günöz H.</p> <p>Erken obezite tedavisi için marker olan Pro12Ala PPARγ ve Val103Ile MC4R polimorfizmlerinin obez çocuklardaki sıklıklarının araştırılması.</p> <p>XIII. Ulusal Pediatrik Endokrinoloji ve Diyabet Kongresi; 17-21 Kasim, Antalya, s.161.</p> <p>Endokrin Hastalıklar ve Genetik Sempozyumu; 8-10 Ekim, Abant, 2009, Sözel Sunu, s.90.</p> <p>18. Tarhan T, Atalar F, Tuğcu V, Bitkin A, Altuğ T.</p> <p>Türk urolithiasis hastalarında osteopontin gen polimorfizminin araştırılması.</p> <p>XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi; 28-31 Ekim Bodrum, 2009, s.130.</p> |
|--|

| | |
|---------|---|
| | <p>19. Yıldırım Seher Ş, Atalar F, Doğusoy G, Demir G, Tarhan T, Arslanyüreği H, Altuğ T.</p> <p>Mide adenom kanserlerinde EGFR ve K-RAS ekspresyonunun prognostik ve prediktif önemi.</p> <p>XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi; 28-31 Ekim Bodrum, 2009, s.130.</p> |
| Ödüller | |
| Diğer | <p>Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası;T.C Sağlık Bakanlığı Bağıcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2010</p> <p>SPSS Sertifikası; T.C Sağlık Bakanlığı Bağıcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi;2011</p> <p>Pedagojik Formasyon Sertifikası; Akdeniz Üniversitesi; 2014</p> <p>İyi Klinik Uygulamalar Sertifikası; IQVIA 2020</p> |