

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**Klinik Olarak Non Fonksiyone veya Gonodotrop Hipofiz Adenomlu
Hastaların
Medikal Tedavisinde Yeni Hedefler Tanımlamak İçin Proteomik
Yaklaşımlar
Proje No: 5155**

Proje Türü
NAP

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Fatih TANRIVERDİ
Endokrinoloji ve Metabolizma A.D

Araştırmacılar
Prof.Dr. LEO HOFLAND
Prof.Dr. Hasan Fahrettin KELEŞTEMUR
Prof.Dr. Kürşad ÜNLÜHİZARCI
Prof.Dr. Ahmet SELÇUKLU
Prof.Dr. Figen ÖZTÜRK
Doç.Dr. Züleyha Cihan ÖZDAMAR KARACA
Arş.Gör. Armağan CANER

EKİM 2017

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

TSA-2014-5155 kodlu normal araştırma projemiz Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler birimi tarafından desteklenmiştir. Projemiz Erasmus Medical Center Nöroendokrinoloji bölümü başkanı Prof. Dr. Leo Hofland ve ekibinin katkıları ile hazırlanarak sonuçlandırılmıştır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2.GENEL BİLGİ	8
3. YÖNTEM	10
4. BULGULAR	13
5.TARTIŞMA	31
6. KAYNAKLAR	44

ÖZET

Klinik olarak non-fonksiyone hipofiz adenomları (NFHA) tümör kütesinden kaynaklanan şikayetlerden dolayı teşhis edilir. Bu tip adenomlar hormonal olarak aktif değildir ve hormonların aşırı üretiminden kaynaklanan sendromlara sebep olmazlar. Bası yapan NFHA'ları için ilk tedavi seçeneği adenomun operasyon ile çıkarılmasıdır fakat bu cerrahi operasyondan sonra adenom sıklıkla tekrarlar. Tedavide kullanılan ilaçlar, NFHA hücrelerinin yüzeylerinde eksprese olan somatostatin (SSTR) ve dopamin (DR) reseptörlerini hedef alır. Ancak, adenom hücrelerinde SSTR ve DR'leri eksprese olsa da NFHA hastalarının tedavisi için kullanılan somatostatin analogları ve dopamin agonistleri çok etkili değildir ve tedavi seçeneklerine şiddetle ihtiyaç vardır. NFHA dokularında hangi protein ve yolakların aktif olduğunun belirlenmesi için FSH/LH pozitif 6 NFHA dokusu ile bir pilot çalışma yapıldı. Ray-Bio Label-Based (L-Series) Human Antibody Array 1000 kiti kullanılarak protein analizi yapıldı. Toplamda 164 protein tespit edildi. Proteinleri içeren P53 sinyal yolağı, sitokin sinyal yolağı, JAK-STAT sinyal yolağı, ErbB ve TGF sinyal yolağı NFHA dokularında aktif olan yolaklardır. Bu yolakların yanı sıra daha önce NFHA dokularında olduğu bilinmeyen PROK1, Kremen 1, IL26, HCR/CRAM A/B, GDF 11, CTACK, GDF 8, NRG 3, MMP 13 proteinleri tespit edildi.

ABSTRACT

Clinically, non-functioning pituitary adenomas (NFPA) are diagnosed due to complaints from tumor mass. NFPAs are not active hormonally. They do not cause syndromes resulting from oversecretion of hormones. The first treatment option for NFPAs is the removal of adenomas by operation, but after surgery, the adenoma often recurs. Drugs used in therapy target somatostatin (SSTR) and dopamine (DR) receptors that are excreted on the surface of NFPA cells. However, although SSTR and DR are expressed in adenoma cells, somatostatin analogues and dopamine agonists used for the treatment of NFHA patients are not very effective and treatment options are strongly needed. A pilot study was performed with 6 FSH / LH positive NFHA tissues to determine which proteins and pathways were active in NFHA tissues. Protein analysis was performed using a Ray-Bio Label-Based (L-Series) Human Antibody Array 1000 kit. In total, 164 proteins were detected. Signalling pathways that includes proteins which we detected (the P53 signaling pathway, the cytokine signaling pathway, the JAK-STAT signaling pathway, the ErbB and TGF signaling pathways) are active in NFHA tissues. In addition to these pathways, PROK1, Kremen 1, IL26, HCR / CRAM A / B, GDF 11, CTACK, GDF 8, NRG 3 and MMP 13 proteins which previously unknown in literature in NFHA tissues, were detected.

1. GİRİŞ, AMAÇ

Klinik olarak hipofiz adenomları 100.000 kişiden 94'ün de görülen nadir tümörlerdir. Hipofiz adenomu genellikle hormonların yüksek salgılanmasından kaynaklanan hastalıklara (adrenocorticotrophic hormone (ACTH)'in fazla salgılanması Cushing sendromu, büyüme hormonunun fazla salgılanması akromegaliye) sebep olmasından dolayı veya tümör kütleindeki büyüme nedeniyle baş ağrısı / görme alanı defektleri gibi bulgularla teşhis edilir. Hipofiz adenomlarının tedavi seçenekleri arasında adenomun operasyonla çıkarılması, radyasyon tedavisi veya medikal tedavi vardır. Klinik olarak non-fonksiyone hipofiz adenomları (NFHA) tümör kütlelerinden kaynaklanan şikayetlerden dolayı teşhis edilir. Bu tip adenomlar hormonal olarak aktif değildir ve hormonların aşırı üretiminden kaynaklanan sendromlara sebep olmazlar. Bası yapan NFHA'ları için ilk tedavi seçeneği adenomun operasyon ile çıkarılmasıdır fakat bu cerrahi operasyondan sonra adenom sıklıkla tekrarlar. Radyoterapi etkili olabilir, ancak etkisini çok yavaş gösterir ve normal hipofiz dokusunda ve çevresindeki dokularda da hasara sebep olur, hipopituitarizm ile sonuçlanır. Tedavide kullanılan ilaçlar, NFHA hücrelerinin yüzeylerinde eksprese olan somatostatin (SSTR) ve dopamin (DR) reseptörlerini hedef alır. Ancak, adenom hücrelerinde SSTR ve DR'leri eksprese olsa da NFHA hastalarının tedavisi için kullanılan somatostatin analogları ve dopamin agonistleri çok etkili değildir ve tedavi seçeneklerine şiddetle ihtiyaç vardır. Son zamanda yapılan microarray gen ekspresyon array yaklaşımı veya genetik mutasyon analizleri NFHA'lı hastaların medikal tedavisi için geliştirilmeye çalışılan yeni hedeflerin tanımlanmasında hala net bir sonuç elde edilememiştir. Son birkaç yılda yeni teknikler geliştirildi, bunlardan biri olan antibodileri temel alan array sistemi 1000 yada daha fazla hedef proteinleri ki bunlara sitokinler, adipokinleri, büyüme faktörleri, proteaslar, çözünür reseptörler, adhesyon molekülleri de dahil eş zamanlı olarak tespit edilmesine izin verir. Bu sistem yeni biyomarkır belirlemeye yönelik çalışmalar için çok uygundur. Bu son teknoloji diğer tekniklere göre daha avantajlıdır. Direkt olarak yarı kantitatif bir şekilde özel proteinlerin ekspresyonunu tespit eder. Bu projedeki amacımız, insanlarda NFHA dokularından proteinlerin büyük bir serisini tespit etmektir. Bu çalışmanın başarılı olması durumunda elde edilecek bilgiler ışığında daha geniş kapsamlı projeler tasarlanacaktır. Bu çalışma, NFHA hastalığında kişiye ve dokuya özel tedavi geliştirilmesi için bir basamaktır.

2. GENEL BİLGİ

Hipofiz adenomları benign epitelial tümörlerdir. Klinik olarak test edildiğinde hormon salgılayan adenomlar ve hormon salgılamayan non fonksiyone adenomlar olarak iki grupta incelenirler. Hormon salgılayan adenomlar salgıladıkları hormona göre isimlendirilirler. Büyüme hormonu salgılayan adenomlara; somatotropik adenomlar, prolaktin fazla salgılayan adenomlara; prolaktinoma, tiroid uyarıcı hormon (TSH) salgılayan adenomlara; tirotropik adenomlar, adenokortikotropik hormon (ACTH) salgılayan adenomlara; kortikotropik adenomlar, lüteinisin hormon (LH) ve follikül uyarıcı hormon (FSH) salgılayan adenomlara; gonadotrop adenom adı verilir (1). Non fonksiyone hipofiz adenomlarının (NFHA) salgıladıkları her hangi bir hormon yoktur. Bu yüzden boş (null) hücre adenomları olarak da nitelendirilmektedir (1). NFHA , normal hipofiz dokusundan kütle olarak daha büyüktür. Bu adenomların tanısı klinik olarak MRI görüntüleri desteği ile belirlenmektedir. NFHA'larının büyük çoğunluğu gonadotropinler veya gonadotropinlerin alt birimlerini sentezlemektedir (2). Klinik olarak NFHA' ları bütün hipofiz tümörleri içerisinde %15 ile %45 arasında görülmektedir (3). Ama yine de tam olarak görülme sıklığını belirlemek zordur ve tamamen tarama metoduna bağlıdır. Otopsi ve radyolojik çalışmalarda hipofiz adenomlarının görülme sıklığı %16.7 dir (4). Son yıllarda yapılan 3048 otopside %10.5 de hipofiz adenomları tespit edilmiştir. Bunların da %39' u NFHA' lardır (5). Gonodotrop adenomlar FSH, LH ile pozitif olarak işaretlenirken, null cell negatif olarak işaretlenmektedir. Bu durum opere olmuş NFHA'ların %85'ini kapsamaktadır. Kalan %15'lik kısım sessiz adenomlardır, immunohistokimya ile hormon ekspresyonları tespit edilmiştir ama hormon salgılamazlar. Bu sebeple her hangi bir hormon ilişkisi klinik olarak belirlenmez. Sessiz GH, prolaktin ve TSH tümörleri görülürken, major olarak ACTH eksprese olur (6,7). Transsponidal cerrahi NFHA için ilk düşünülen yöntemdir. Ancak, supra veya paresellar uzantıdan dolayı, operasyonlar çok tedavi edici olmaz. Tümörün bir kısmı kalabilir ve yeniden büyüyebilir (8). Ameliyat sonrası hastaların %32.8'inin gonadal ekseninde düzelme görülmektedir. %5.2'lik kısmında ise ameliyat sonrası değişim yoktur (9,10). Ameliyat sonrasında eğer hala tümör varsa bunun tedavisi zorlaşır. Agresif tümörlerde radyo terapi uygulanmaktadır. Radyoterapi dışında ilaç tedavisi uygulanır ve genellikle dopamin agonisti (DA), somatostatin (SST) analogları kullanılır.

Normal hipofizlerde Dopamin 2, prolaktin salgılanmasını baskılayıcı yönde etki eder (11). NFHA' ların dopamin reseptörlerini eksprese ettiği bilinmektedir (12). Daha çok dopamin reseptör ailesinin alt birimi olan Dopamin 2 (D2) reseptörleri NFHA'da eksprese olur.

Gonadotroph immüno pozitif adenomlarda D2 genellikle LH ve FSH immüno pozitif olan hücrelerde lokalizedir (13). Dopamin agonistinin in vitro ve in vivo çalışmalarda gonadotrop salgılanmasını artırdığı gösterilmiştir (14,15). Dopamin agonistleri in vitro çalışmalarda NFHA' ların üçte ikisini inhibe etmektedir (16). 199 NFHA' lu hastalarda, DA tedavisi sonuçlarına göre %27.6'sında tümörde küçülme meydana gelirken, %20.2'sinde görme alanı hasarı meydana geldi bu hastaların ancak %63.8'inde tümör boyutu sabit kalırken sadece %8.5'inde artış gözlenmiştir (17). Hipofiz bezlerinde sadece D2 değil aynı zamanda D4 ve özellikle onun bir türevi olan D_{4.4} eksprese oluyor ama henüz hipofiz bezindeki fizyolojisi çok net bilinmemektedir (18).

Somatostatin reseptör ekspresyonu hipofiz tümörlerinde heterojendir ama NFHA da somatostatin reseptör alt birimi olan SSTR3 ve SSTR2 ekspresyonu daha belirgindir (19,20). Octreotide ve lanreotide en yaygın kullanılan somatostatin analoglarıdır ve SST2 ve SST5 için yüksek bağlanma özelliği varken SST3 için düşük bağlanma özelliğine sahiptir (21). Doğal somatostatinler in vitro çalışmalarda NFHA' ndan kromogranin A ve glukoprotein α altbirimini inhibe eder. Bu cevap SSTR3 ve SSTR2 ile bir korelasyon içindedir (22). SSTR1 ve SSTR2 gibi özel somatostatin analogları in vitro çalışmalarda NFHA hücrelerinin sayısını azalttığı ve multireseptör ligandı olan pasireotide vasküler endotelium büyüme faktörü (VEGF)'in salgılanmasını azaltmasından dolayı NFHA hücrelerinin canlılığını azalttığı gösterilmiştir (23,24,25).SSTR2' nin özel analogu olan octreotide 100 NFHA hastasına uygulandı ve bu hastaların %5'inin tümör hacminde azalma %12'sinde artma, %83'ünde ise hiçbir değişiklik gözlenmemiştir (17).

3. YÖNTEM

Çalışmada, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Endokrinoloji ve Metabolizma A.D.'da non fonksiyone hipofiz adenom teşhisi konularak, Beyin cerrahisi tarafından çıkarılan hipofiz dokuları kullanıldı. Çalışma ile ilgili etik kurul kararı alındı (Etik kurul No: 2013/520). Çalışmada 6 hasta dokusu ile çalışıldı. Her hastaya dokularının hangi amaçla kullanılacağına dair açıklama yapılarak onayları alındı. Çalışma yapılana kadar dokular -80°C'de saklandı. Çalışmanın deney kısmı Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezinde Prof. Dr. Leo HOFLAND gözetiminde yapıldı.

HASTA BİLGİLERİ

Hastalar, non fonksiyone hipofiz adenomlu, FSH ve LH, veya ikisinden biri pozitif olacak şekilde seçildi. Yaş, cinsiyet, kilo ayrımı yapılmadı.

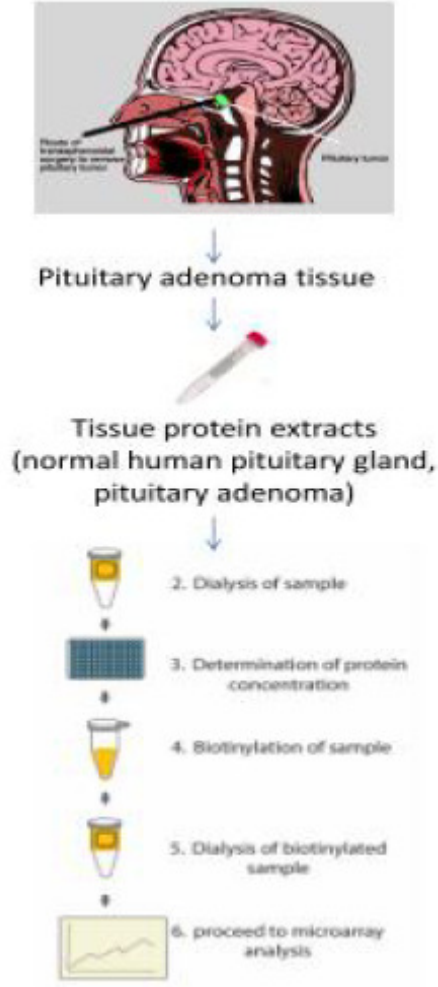
Tablo 3.1. Hastaların patolojik ve hormonal bulguları.

Hasta No.	Cinsiyet	Ki67 (%)	GH	FSH	LH	ACTH	PRL	TSH	Adenom türü
N1	E	2	Negatif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Makroadenom
N2	E	2	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Makroadenom
N3	K	1	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Makroadenom
N4	K	3	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Makroadenom
N5	E	1	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Makroadenom
N6	E	1	Negatif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Makroadenom

Kontrol grubu olarak, normal hipofiz bezi proteinleri kullanıldı. Bu proteinler ticari olarak yurtdışından satın alındı.

3.2 Proteomiks Çalışması

DeneySEL çalışma, Şekil 3.1.'de özetlendi. Çalışmada Ray-Bio Label-Based (L-Series) Human Antibody Array 1000 kiti kullanıldı. Bu kitin kullanılmasındaki amacımız, NFHA dokularında 1000 antibody ile eşleşen proteinleri bulmaktır. Çalışmamıza uygun olarak tasarlanan bu kit ile 6 hasta 2 kontrol sağlıklı hipofiz doku proteinleri çalışıldı. Çalışmada kit için hazırlanmış protokol takip edildi. Kit içerisinde birinde 507 diğerinde 493 antibody bulunan 2 cam slayt mevcuttur. Bir kit ile 4 adet doku çalışılmaktadır.

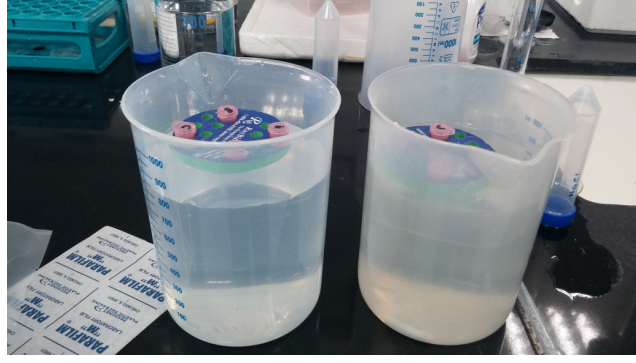


Şekil 3.1. Deney sırasında yapılacak işlemlerin özeti.

Homojenizatör ile iyice parçalanan dokular, 13000g de 4°C’de 20dk çevrildi.

Protein miktarları Bradford assay yöntemi ile ölçüldü. Ölçüm sonucuna göre protein çözeltilerinin konsantrasyonları hesaplandı.

Diyaliz solüsyonu hazırlandı. Örnekler diyaliz tüplerine eklendi. Diyaliz solüsyonları içerisine yerleştirilen diyaliz tüpleri 4°C de bir gece boyunca, yavaş bir şekilde çalkalanarak inkübe edildi.



Şekil 3.2 Örneklerin diyaliz aşamasını gösteren resim.

Bu aşamada protein konsantrasyonunda azalmalar olacağı için yeniden protein miktarlarına bakıldı. Azalma, beklenen miktarlardaydı ve yeni protein konsantrasyonlarına göre biotin ile etiketlendi. Biotin ile etiketlenen örnekler yeniden aynı koşullar altında diyaliz edildi.

Diyaliz işleminden sonra yıkama aşamasına geçildi ve antibody array slaytlarına her bir örnek eklendi.

Daha sonra yıkama işlemleri yapılarak slaytlar okuma için hazır hale getirildi.

Çalışma için hazırlanan slaytlar, okunması için ortak olarak çalıştığımız Hollanda, Rotterdam da bulunan Erasmus Medical Center'a gönderildi ve nöroendokrin laboratuvarında slaytlar okunarak protein ekspresyonları belirlendi. Prof. Dr. Leo HOFLAND ile birlikte Ray-Bio Label-Based (L-Series) Human Antibody Array 1000 yazılımı kullanılarak eksprese olan proteinler tanımlandı. Ekspresyon yoğunlukları hesaplandı. Kontrol ile kıyaslamaları yapıldı. Belirlenen proteinlerin ilişkili olduğu proteinler ve yolların belirlenmesi Pathway linker (<http://pathwaylinker.org/>) ile yapıldı.

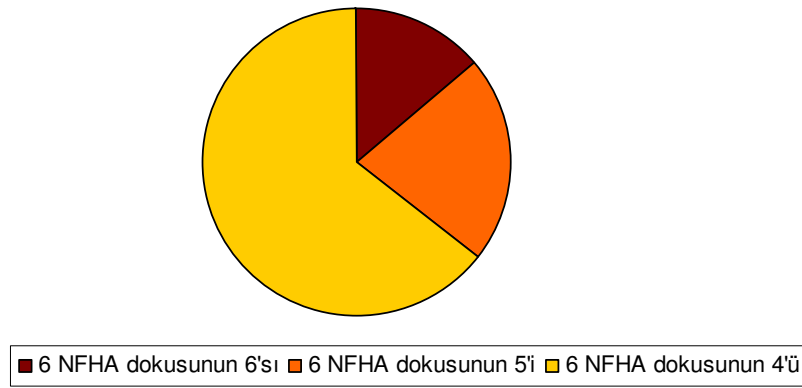
4. BULGULAR:

Çalışma pilot bir çalışma olduğu için sadece 6 NFHA dokusu ile çalışıldı. Ray-Bio Label-Based (L-Series) Human Antibody Array 1000 kiti içerisinde iki cam slayt ve bu slaytlar üzerinde toplam 1000 antibody bulunmaktadır (bir slayt üzerinde 507, diğer slaytta 493).

Toplamda 164 protein tespit edildi. 507 antibody içeren slaytta 6 NFHA dokusunun 6'sında da 16 protein, 5'inde 25 protein, 4'ünde 74 protein belirlendi (Şekil 4.1A.). 493 antibody içeren slaytta 6 NFHA dokusunun 6'sında da 9 protein, 5'inde 13 protein, 4'ünde 23 protein ve 3'ünde 4 protein belirlendi (Şekil 4.1B.).

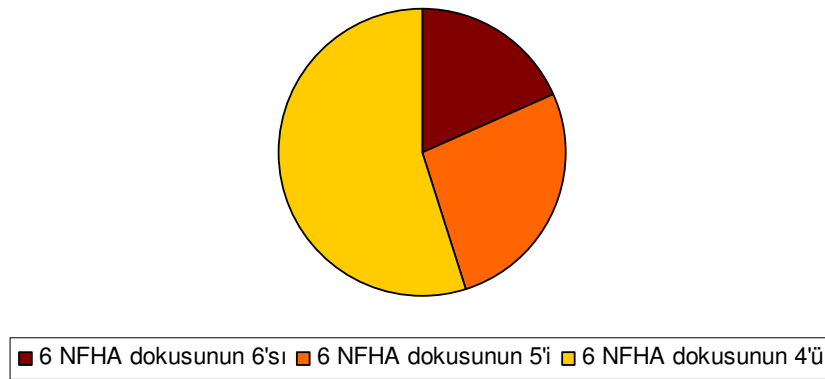
A

507 Antibody



B

493 Antibody



Şekil 4.1. Ray-Bio Label-Based (L-Series) Human Antibody Array 1000 kiti içerisindeki iki farklı sayıdaki antibody slaytlarına göre belirlenen proteinlerin slaytlara göre dağılım grafiği. A. 507 antibody olan slayt ile belirlenen doku sayılarına göre protein dağılımı. B. 493 antibody olan slayt ile belirlenen doku sayılarına göre protein dağılımı.

Tablo 4.1. 507 antibody bulunan slaytta NFHA dokularından belirlenen protein miktarı.

Proteinler	kontrol	N1	N2	N3	N4	N5	N6
GDF3	10839,5	39779,6	49155,0	36168,8	25203,9	22087,5	9408,4
GDF5	3015,0	40052,8	48909,5	37104,8	24435,0	21728,7	7821,5
GDF9	8831,5	34028,2	46536,3	37835,7	24520,2	21185,9	9520,7
IL-15	8444,0	27895,5	46005,9	34308,9	17938,5	16112,7	4869,3
IL-8		34103,0	34232,3	29495,2	17847,8	16979,2	3405,1
Erythropoietin	5083,0	16144,7	28507,4	21931,7	18380,0	20476,1	10988,3
HCR / CRAM-A/B		16149,7	9817,1	4128,1	40072,3	41972,9	1996,7
GDF8		6349,7	30382,9	20510,9	28503,7	20021,9	3277,2
IFN-gamma		5594,0	10763,4	6021,8	32602,4	23613,6	8987,8
TGF-beta 1		32757,4	18677,5	11248,9	8075,2	12216,8	663,5
IL-6		17590,3	17174,3	4385,6	18048,3	19241,1	4355,3
Cryptic	62662,0	11750,3	18876,2	17965,8	5802,3	13749,7	2016,0
IL-2		7446,0	10861,0	9259,9	17948,0	14064,7	3870,4
NRG3		5680,7	15076,9	7059,9	12354,7	9666,9	8213,9
Follistatin		2356,0	11654,7	7975,1	9153,6	12668,7	5172,3
BIK			3603,4	3164,5	75836,8	16912,7	84098,4
GREMLIN	9933,0	50438,6	54989,1	46454,5		14310,3	4061,1
Growth Hormone (GH)			13379,8	3114,4	31583,5	25407,6	50224,9
GDF11			34214,6	28617,9	26532,4	18966,6	7973,6
IL-1 alpha	7678,0	18393,6	25118,0		26943,4	19925,6	6674,8
FGF-11		9390,4	33131,7	25976,1	5561,8	10653,1	
SAA	2238,5	10086,1	28843,9	18554,0	8130,7	8297,5	
IL-20 R alpha		14978,5	18965,0	10794,0	3405,0	11237,7	
D6	376,0	6023,4	8172,4		4474,7	29892,3	9233,9
Endoglin / CD105		10024,7	20267,0	10655,3	6474,9	9668,5	
IL-26		2655,2	4510,9	6726,9	36218,1	4681,6	
EG-VEGF / PK1		13301,6	8442,9	14669,5	10021,6	5337,2	
GM-CSF			11247,7	4666,5	13558,4	12564,9	2993,4
Kremen-1		2366,3	24579,4	2877,2	3088,7	9824,9	
HGFR		1511,9	5284,3		14060,5	10257,7	2811,3
BMP-4		2568,2	10217,4	9732,4	1142,4	5586,1	
Csk		3862,6	5273,9	7893,3	1122,2	6932,1	
MMP-13		10533,0	4186,5	2205,0	58,8	5572,4	
CTACK / CCL27			7913,6	4021,0	2827,9	6027,3	621,9
TIMP-1		7012,5	1608,4	2848,7	889,9	3572,7	
FLRG		25110,1	38914,5	9320,4		2022,7	
PDGF R alpha		7598,3	17546,2	22193,2		24582,6	
IL-18 R beta /AcPL	171,5	17108,7	27567,8	22217,6		3156,8	
IL-2 R gamma		5126,2	3687,4		42689,6	11740,9	
Orexin B			34390,5	3570,6	11576,8	12809,2	
IL-20		15827,2	22706,9	20335,2		1516,3	

FGF-10 / KGF-2	1183,0	24836,5	18323,3		5020,0	11566,7	
PD-ECGF		6587,4	20713,4	24833,7		2949,2	
IL-19		16991,1	25467,0	8380,8		3150,3	
RELT / TNFRSF19L		12263,2	24039,8	12839,5		3104,6	
Angiopoietin-like 2		17404,4	20593,6	10811,6		406,4	
IL-17R		5699,8	14861,6	22530,7		3453,3	
APRIL		8124,6	18672,4	16357,6		3250,3	
FGF-7 / KGF		10172,0	16474,3	12364,2		5204,9	
MMP-15		14743,0	19048,0	9179,9		1181,1	
IL-17D		6571,8	19759,4	15291,5		1929,9	
GRO-a		9620,9	16732,3	7251,0		4771,8	
GM-CSF R alpha			23080,6	4969,7	3666,2	6040,2	
ICAM-5		6693,9	11409,5	13008,0		5512,1	
IL-5			2549,9	229,1	17296,1	15758,8	
IL-1 F9 / IL-1 H1		8031,8	10993,0	14691,1		1907,5	
MIP-3 beta			4408,4		11958,4	12726,5	6321,8
Frizzled-3		978,0	23032,7	5601,6		5264,9	
Flt-3 Ligand		7348,0	7221,7	17900,3		1836,4	
GDF1			1033,8		19102,5	11818,4	1830,1
IL-9		7709,4			7103,1	16109,2	2512,8
Activin C		5690,2	19369,0	6728,7		1494,8	
SDF-1 / CXCL12			7467,9	6740,9	8351,1	8903,9	
FGF-20		12340,7	7421,5	3427,4		7990,0	
TIMP-3			2465,8	5064,5	9881,7	11427,2	
IL-17B R		149,5	14021,2	7767,8		6667,0	
GITR Ligand / TNFSF18		5887,1	11172,9			8221,3	1770,1
IFN-beta		2556,0	12938,9	5299,4		5640,2	
Frizzled-1		203,7	8628,3		5757,2	11113,1	
Ubiquitin+1			8508,5	6106,2	5873,3	4977,1	
Angiostatin		7080,1		6618,5		9300,3	2375,6
CCR4			16418,3	598,2	1632,6	6060,4	
Prolactin			10427,5	4406,8	2411,8	7406,0	
BMP-3		4227,8	9636,9	7311,5		2625,1	
MMP-10	221,0	5343,7		5533,4	10031,9	2413,3	
CCR3			12367,2	8353,7	379,5	603,7	
Pref-1		4318,7	10032,0	5896,6		1285,6	
MCP-2			13796,3	3483,9	650,5	3550,0	
SLPI			3813,1		12505,3	3214,6	1371,9
MAC-1		7720,4	2530,0		2677,3	7909,9	
P-selectin			1585,9	1887,4	9404,9	7876,1	
IL-1 sRI			7187,1		5672,7	7412,2	298,3
NrCAM		1334,4	11339,5	4672,4		2613,4	
IL-1 R6 / IL-1 Rrp2			7896,3	2206,8		8653,4	981,9
DR3 / TNFRSF25		1352,0	10303,7	337,0		7451,1	

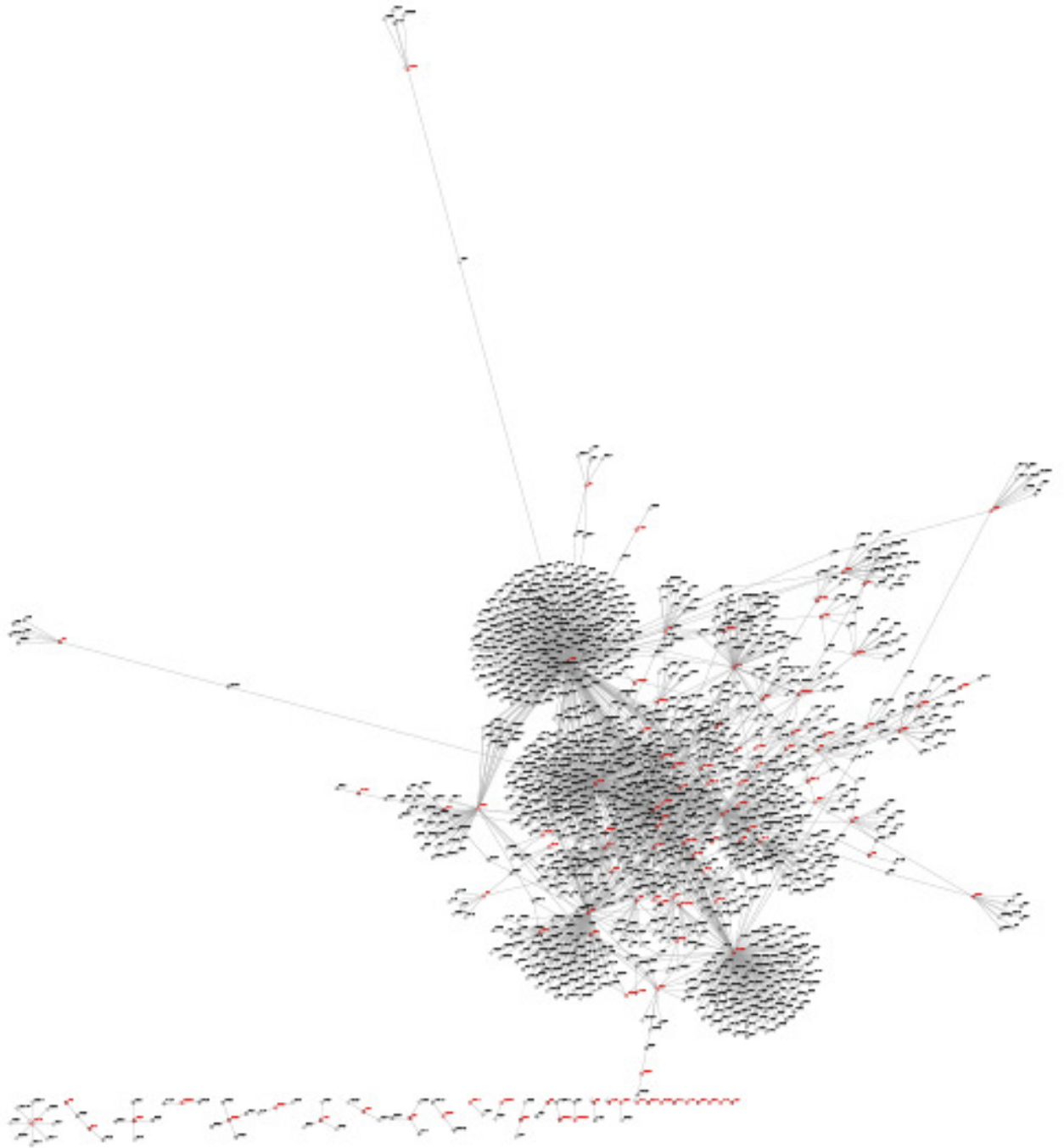
Artemin			4105,1	3228,6	7794,6	3795,6	
Frizzled-4			8856,1	946,9	2727,7	6252,1	
Endostatin			3096,2	3476,2	3515,6	8439,6	
Soggy-1		4791,9	5926,8	3812,3		3914,3	
CD40 / TNFRSF5		3395,5	5866,3	4171,0		4437,0	
Hepassocin		1207,3	8775,8		63,6	7538,4	
AgRP			142,4	2606,6	6118,6	7174,1	
Endothelin		212,4	9538,1		821,0	2636,5	
MMP-11 /Stromelysin-3			218,4	1718,9	1138,4	9240,0	
IL-2 R alpha		5120,5	1094,2	1520,6		4214,1	
BACE-1			5070,1	101,2	1334,2	3520,2	
IL-13 R alpha 2		364,3	3827,1	2256,0		2649,8	
Thrombopoietin (TPO)		908,1	1773,2	572,9		3204,2	

Tablo 4.2. 493 antibody bulunan slaytta NFHA dokularından belirlenen protein miktarı.

Proteinler	kontrol	N1	N2	N3	N4	N5	N6
Haptoglobin	35386,75	3831,607	1314,434	6795,75	97960,17	22809,33	12216,52
LAG-3	25452,25	9172,723	4299,932	38904,13	54331,06	1175,579	8916,384
Itk	35808,25	8094,273	9945,275	35878,08	4554,044	2002,541	430,9019
FRK	25005,75	3502,695	4289,555	35820,3	4339,08	1542,227	930,9678
ZAP70	9423,25	490,6882	168,0907	3744,937	2291,512	4315,13	171,7464
EphA4	20679,75	4226,17	5353,493			9287,422	122,5962
Fibrinogen		4010,085		1573,488	92289,35	4763,423	6636,485
LTF			1395,618	17601,26	4237,437	5402,553	1005,81
Selenoprotein P	22972,25	405,2436	2023,421			9405,13	4167,433
MSHa	20114,25		804,4393		4874,112	2418,777	833,0398
Lyn	21249,25		1181,365		2183,381	2358,671	768,9956
SNCG	37600,25	3244,711	1142,604			2163,826	69,35017
Troponin C	14447,25		1121,545	13532,96	13487,39	1588,308	1762,425
Trypsin 1	11132,25	2254,345	459,8649	1247,716		1877,319	29,50873
ProSAAS		1935,66	41667,18			16370,95	196,3215
EphA6			1207,308		9534,557	11907,55	723,9413
NELL2			845,0314	2504,581	7421,677	32478,43	
Integrin alpha V		63,79483	757,438	9524,643		5589,383	
SERPING1		1835,369	2670,147	9248,397			613,3534
Galanin			1247,289	21309,12	2662,185		437,9766
NF1			545,0166		20092,03	2075,169	1356,191
TNK1	18343,75	116,9091	2383,561			3084,454	230,5777
PPP2R5C			209,5983	7329,532		2274,021	35,09398
SSEA-4	8329,75	1053,831	787,0428			1701,008	357,9213

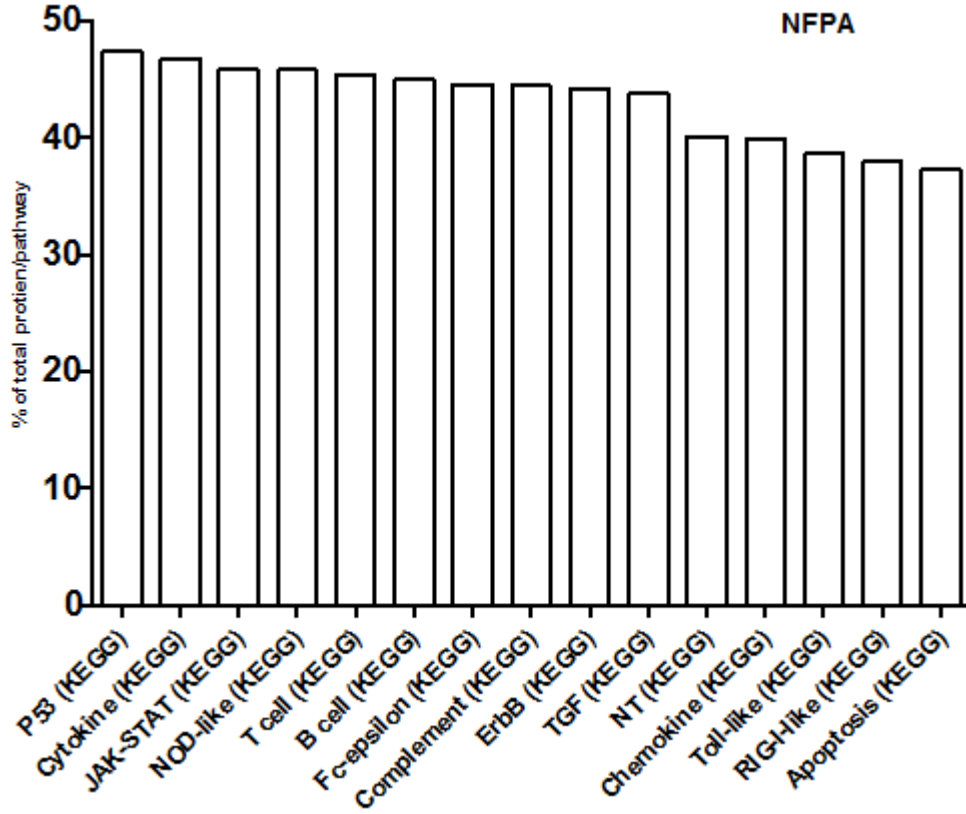
4. 1. Belirlenen Proteinlerden Çıkarılan Sinyal Yolakları:

Toplamda tespit edilen 164 proteinin etkileşimde olduğu proteinler ve yolaklar PROTEİN LINKER ile belirlendi. Programın verdiği raporlar esas alındı. Bu raporlarda 3 farklı yolak veri tabanı olan KEGG, signaling ve reactoma verilerine göre bir istatistik hesaplama yapıldı. Şekil 4.2.'de belirlediğimiz proteinlerin birbiri ile ilişki ağı gösterildi.



Şekil 4.2. Tespit edilen NFHA proteinlerinin ağ şeması. Kırmızı noktalar, çalışmamızda belirlenen proteinleri göstermekte.

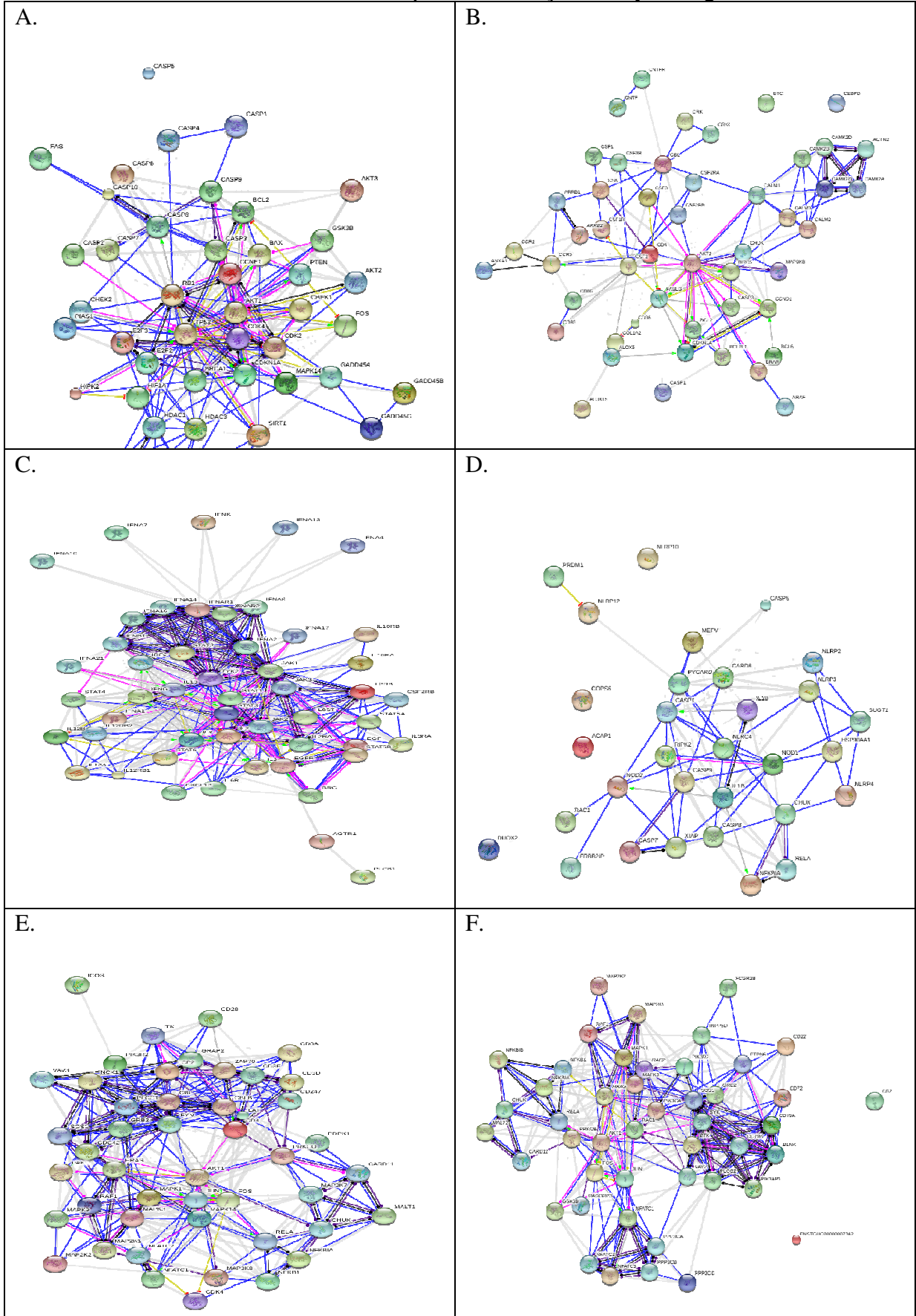
Belirlenen bu proteinlerin ait oldukları yollar tespit edilerek, bu proteinlerin oranlarına göre yollar grafiği Şekil 4.3.'de gösterildi.



Şekil 4.3. NFHA dokularındaki belirlenen proteinlerden çıkarılan yollar. (KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes); online ulaşılabilen pathway veri tabanı.)

NFHA dokularındaki proteinlerden çıkarılan yolların ağırları tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. NFHA dokularında belirlenen proteinlerden çıkarılan yolak ağları.

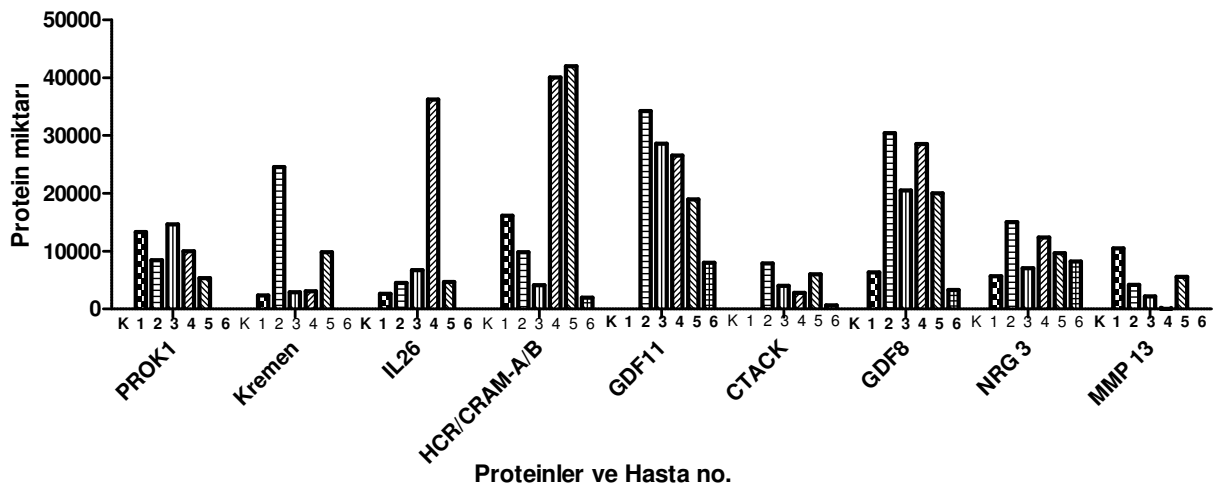


4.3. NFHA Protein Ekspresyonları

Belirlenen NFHA proteinleri kontrol proteini ile kıyaslandı. Kontrol dokusunda eksprese olmayıp hasta dokularında eksprese olan 95 protein belirlendi.

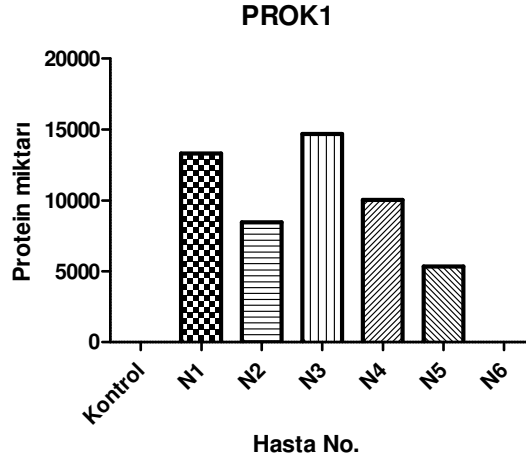
Bu 95 proteinin PATHWAY LİNKER ile yapılan analizleri sonucunda ilişkili olduğu en önemli protein ve bu proteinden kaynaklı dolaylı yönden katıldığı yolları belirlendi. İstatistik değerlendirmenin de yapıldığı PATHWAY LİNKER raporlarında yolları NFHA proteinin bulunma oranları hesaplandı. P-value 0.01'den küçük olan yollar öncelikli olarak belirtilmiştir. Ayrıca bu raporda belirtilen yollar ile hangi proteinler aracılığı ile bağlantıda olduğu da rapor edildi.

Kontrolde eksprese olmayıp dokularında eksprese olan ve çok az yollar ile ilişkisi olan 9 protein tespit edildi. Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.



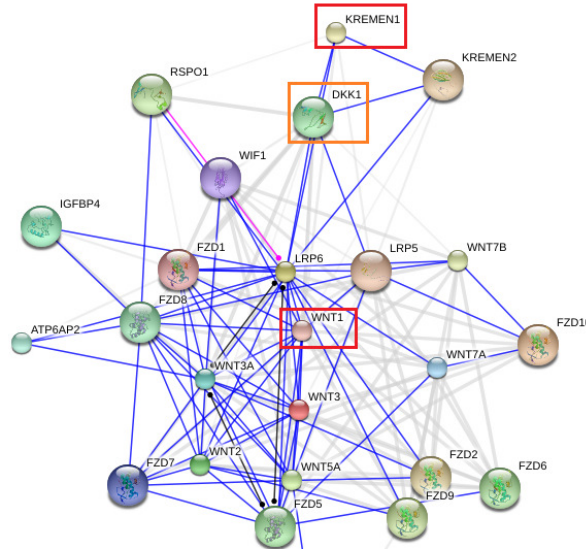
Şekil 4.5. Birkaç yollar ile ilişkisi olan 9 protein.

PROK1 (EG-VEGF/PK1): 6 NFHA dokusunun 5'inde tespit edilen bu protein yapılan analizler sonucu hiçbir protein ekspresyonu ve yolak rapor edilememiştir.



Şekil 4.6. Hastalara göre PROK1 proteininin ekspresyonu.

Kremen 1: Sadece WNT yolağında bir protein ile ilişkisinden dolayı yer alır.



Şekil 4.7. Kremen 1 proteininin ilişkili olduğu yolak ağı.

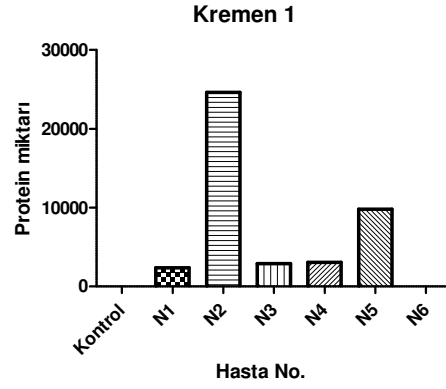
(http://pathcards.genecards.org/Card/wnt_signaling_network?queryString=Kremen1)

Tablo 4.4. Kremen1 proteininin ilişkili olduğu yolaklar. P-value<0,01

Signaling pathway	Displayed proteins	All proteins of pathway	P-value
WNT (Signalink)	1	149	0.0031
WNT (KEGG)	1	229	0.0048

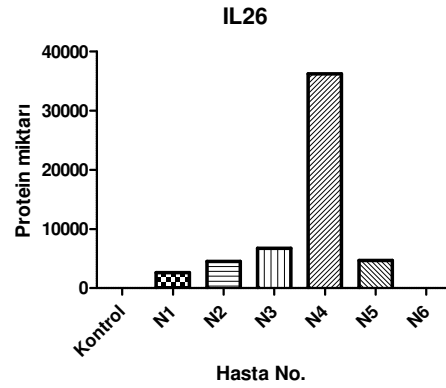
Tablo 4.5. Kremen1 proteinin yolaklar ile ilişkisini sağlayan proteinler.

Proteins in WNT (KEGG)	DKK1 (O94907)
Proteins in WNT (SignaLink)	DKK1 (O94907)



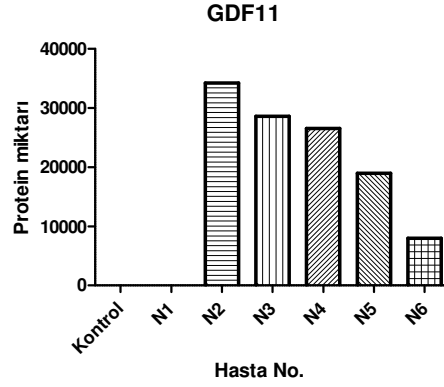
Şekil 4.8. Hastalara göre Kremen 1 proteininin ekspresyonu.

IL26: İnterlokın 26 proteini, hiçbir protein ile ilişkisi bulunamadı. Var olduğu yolak yok.



Şekil 4.9. Hastalara göre IL26 proteininin ekspresyonu

HCR/CRAM-A/B: Yolak analizlerinde CCRL2 olarak bilinmektedir. Simokin reseptör ailesine aittir.



Şekil 4.13. Hastalara göre GDF 11 proteininin ekspresyonu

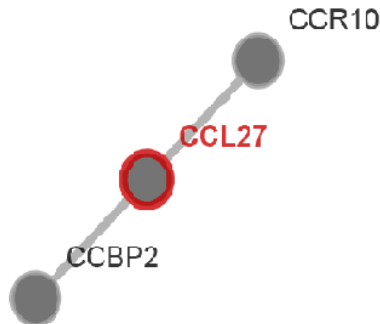
Tablo 4.6. GDF 11 proteininin ilişkili olduğu yollar. P-value<0,01

Signaling pathway	Displayed proteins	All proteins of pathway	P-value
TGF-beta (SignaLink)	2	223	5.5e-06
BMP (Reactome)	1	22	0.00046
TGF (KEGG)	1	112	0.0024
Cytokine (KEGG)	1	323	0.0068

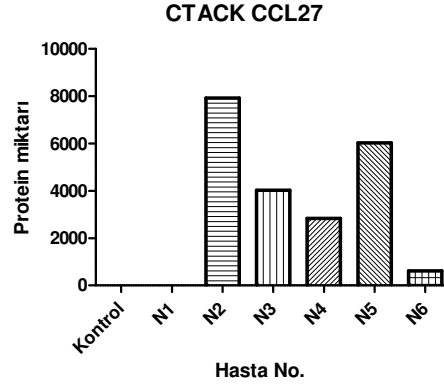
Tablo 4.7. GDF 11 proteinin yollar ile ilişkisini sağlayan proteinler.

Proteins in Cytokine (KEGG)	ACVR2B (Q13705)
Proteins in TGF (KEGG)	ACVR2B (Q13705)
Proteins in BMP (Reactome)	ACVR2B (Q13705)
Proteins in TGF-beta (SignaLink)	GDF11 (O95390), ACVR2B (Q13705)

CCL27: 3 yolda görülmektedir. Bu yollar ile bağlantısını iki protein, CCBP2 ve CCR10 ile sağlamaktadır.



Şekil 4.14. CCL27 proteininin ilişkili olduğu yolak ve ilişkili olduğu proteinler.



Şekil 4.15. Hastalara göre CCL27 protein ekspresyonları

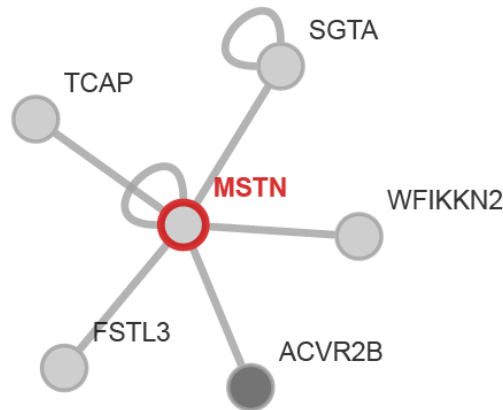
Tablo 4.8. CCL27 proteininin ilişkili olduğu yollar. P-value<0,01

Signaling pathway	Displayed proteins	All proteins of pathway	P-value
GPCR (Reactome)	3	814	6.3e-07
Chemokine (KEGG)	2	243	2e-05
Cytokine (KEGG)	2	323	3.5e-05

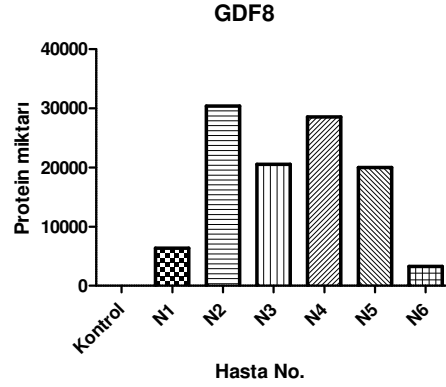
Tablo 4.9. CCL27 proteinin yollar ile ilişkisini sağlayan proteinler.

Proteins in Chemokine (KEGG)	CCR10 (P46092), CCL27 (Q9Y4X3)
Proteins in Cytokine (KEGG)	CCR10 (P46092), CCL27 (Q9Y4X3)
Proteins in GPCR (Reactome)	CCBP2 (O00590), CCR10 (P46092), CCL27 (Q9Y4X3)

GDF8: Bilinen en yaygın ismi ile Miyostatin (MSTN). 4 yolak ile çeşitli oranlarda ilişkilidir. Bütün bu yollar ile ilişkisini tek bir protein, ACVR2B ile sağlamaktadır. Tek başına bulunduğu bir yolak yok.



Şekil 4.16. GDF 8 veya MSTN proteininin ilişkili olduğu yolak ve ilişkili olduğu proteinler.



Şekil 4.17. Hastalara göre GDF 8 proteinlerinin ekspresyonu.

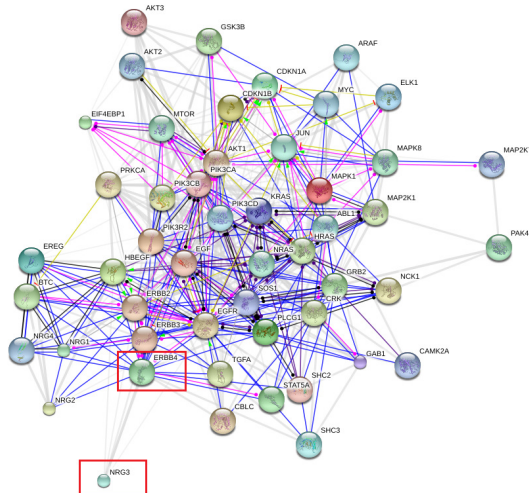
Tablo 4.10. CCL27 proteininin ilişkili olduğu yollar. P-value<0,01

Signaling pathway	Displayed proteins	All proteins of pathway	P-value
BMP (Reactome)	1	22	0.0014
TGF (KEGG)	1	112	0.0071
TGF-beta (SignaLink)	1	223	0.014
Cytokine (KEGG)	1	323	0.02

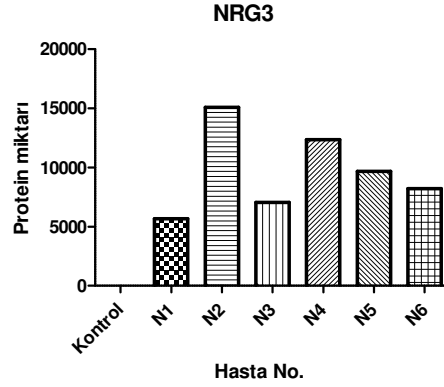
Tablo 4.11. CCL27 proteinin yollar ile ilişkisini sağlayan proteinler.

Proteins in Cytokine (KEGG)	ACVR2B (Q13705)
Proteins in TGF (KEGG)	ACVR2B (Q13705)
Proteins in BMP (Reactome)	ACVR2B (Q13705)
Proteins in TGF-beta (SignaLink)	ACVR2B (Q13705)

NRG3: Sadece ERBB4 proteini ile bağlantılı olmasından dolayı 5 yolda görülmektedir. Ama tek başına sadece ErbB yolağında bulunur.



Şekil 4.18. NRG 3 proteininin ilişkili olduğu yolk ve ilişkili olduğu proteinler.



Şekil 4.19. Hastalara göre NRG 3 proteinlerinin ekspresyonu.

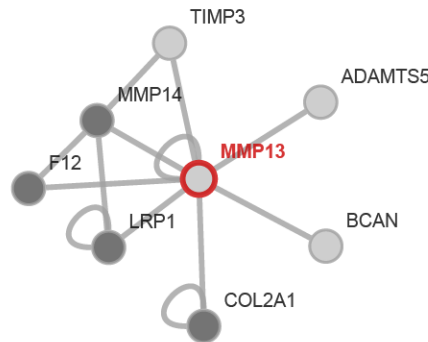
Tablo 4.12. NRG 3 proteininin ilişkili olduğu yollar. P-value<0,01

Signaling pathway	Displayed proteins	All proteins of pathway	P-value
ErbB (KEGG)	2	145	2.3e-06
JAK-STAT (SignaLink)	1	258	0.0054
Calcium (KEGG)	1	273	0.0058
Endocytosis (KEGG)	1	284	0.006
EGF/MAPK (SignaLink)	1	388	0.0082

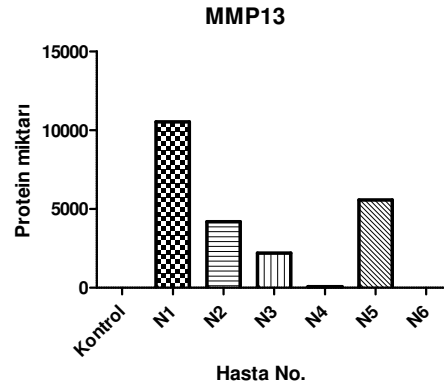
Tablo 4.13. NRG 3 proteinin yollarla ilişkisini sağlayan proteinler.

Proteins in Calcium (KEGG)	ERBB4 (Q15303)
Proteins in Endocytosis (KEGG)	ERBB4 (Q15303)
Proteins in ErbB (KEGG)	NRG3 (P56975), ERBB4 (Q15303)
Proteins in EGF/MAPK (SignaLink)	ERBB4 (Q15303)
Proteins in JAK-STAT (SignaLink)	ERBB4 (Q15303)

MMP13: İlişkili olduğu proteinlerden dolayı (Gri renkli daireler) 6 yolda görülmektedir. Ama kendisinin özel olarak bulunduğu sinyal yolağı yoktur.



Şekil 4.20. MMP 13 proteininin ilişkili olduğu yolk ve ilişkili olduğu proteinler.



Şekil 4.21. Hastalara göre MMP 13 proteinlerinin ekspresyonu

5. TARTIŞMA:

Projemiz, daha çok örnekle ve yöntemle çalışılması planlanan bir projenin ön çalışması niteliğindedir. Projemizde, 6 NFHA dokusundan izole edilen proteinler, özel olarak tasarlanmış antibody array düzeneği ile tanımlandı. Kontrol çalışması için normal hipofiz dokusu bulanamadı. Bu yüzden, ticari olarak normal hipofiz dokusundan izole edilen proteinleri satan bir firmadan getirildi. Projemizin deney çalışması Hollanda Erasmus Medikal Center Nöroendokrinoloji laboratuvarı başkanı Prof. Leo HOFLAND gözetiminde Genom ve Kök Hücre Merkezinde yapıldı. Antibody array okumaları, merkezimizde mikroarray okumaları için cihaz olmadığından Erasmus Medical Centerda okundu ve protein verileri antibody array için özel hazırlanan bilgisayar yazılımında analiz edildi.

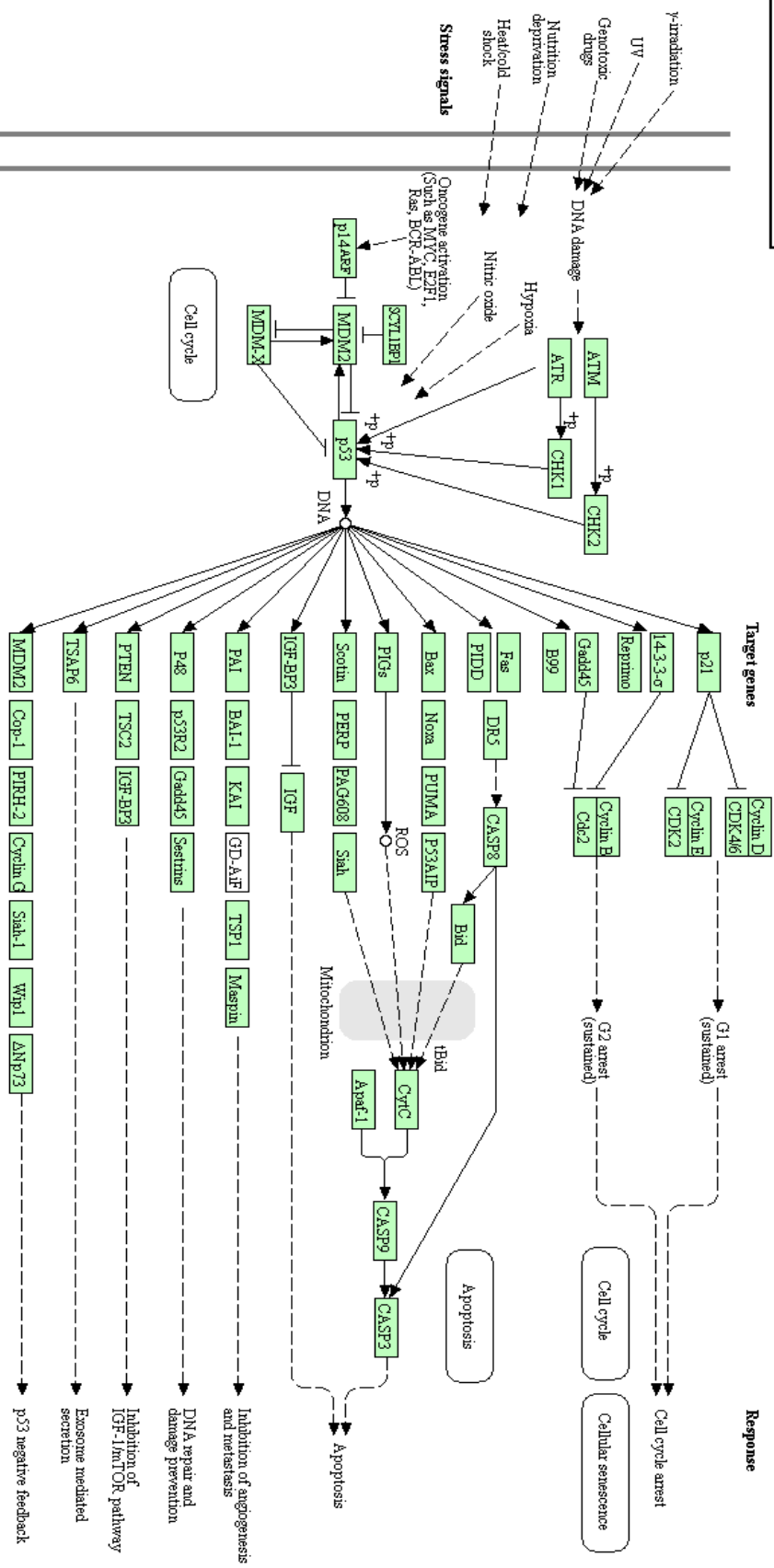
Bu çalışmadaki amacımız, NFHA dokularına özel proteinleri belirlemek ve bu proteinleri hedef alan tedavi seçenekleri belirlemektir. Dolayısıyla, analiz sonuçlarına göre kontrolde olmayan ama 6 NFHA dokusunun 6'sında, 5'inde ve 4'ünde eksprese olan proteinler seçildi. Bu seçilen proteinlerden en az yolakta görev yapanları seçildi. Mümkün olduğu kadar özelleştirildi.

5.1. Belirlenen Yolaklar ve Fonksiyonu:

Zaten bütün belirlenen proteinleri, görev aldıkları yolaklara göre KEGG veri tabanında sınıflandırdığımızda çoğunlukla belirlenen yolaklar, P53, Sitokin reseptör sinyal yolağı, JAK-STAT, NOD-like reseptör yolağı, T-cell sinyal yolağı, B-cell sinyal yolağı, Complement ve koagulasyon yolağı, Fc-epsilon reseptör sinyal yolağı, ERbB sinyal yolağı ve TGF sinyal yolağı olarak belirlendi.

5.1.1. P53 sinyal yolağı: P53 aktivasyonu, DNA hasarı, oksidatif stres ve aktive edilmiş onkojenleri de içeren bir dizi stres sinyali ile indüklenir. P53 proteini, P53 ile düzenlenen genlerin bir transkripsiyonel aktivatörü olarak kullanılır. Bunun sonucunda üç büyük çıktı elde edilir; hücre döngüsü durdurma, hücre yaşlanma veya apoptoz. Diğer P53 regüle gen fonksiyonları komşu hücrelerle iletişim kurar, hasar görmüş DNA'yı onarır veya P53 proteininin işlevlerini arttıran veya zayıflatan pozitif ve negatif geri bildirim döngüleri kurar ve bu stres tepkilerini diğer sinyal iletim yollarıyla bütünleştirir.

P53 SIGNALING PATHWAY



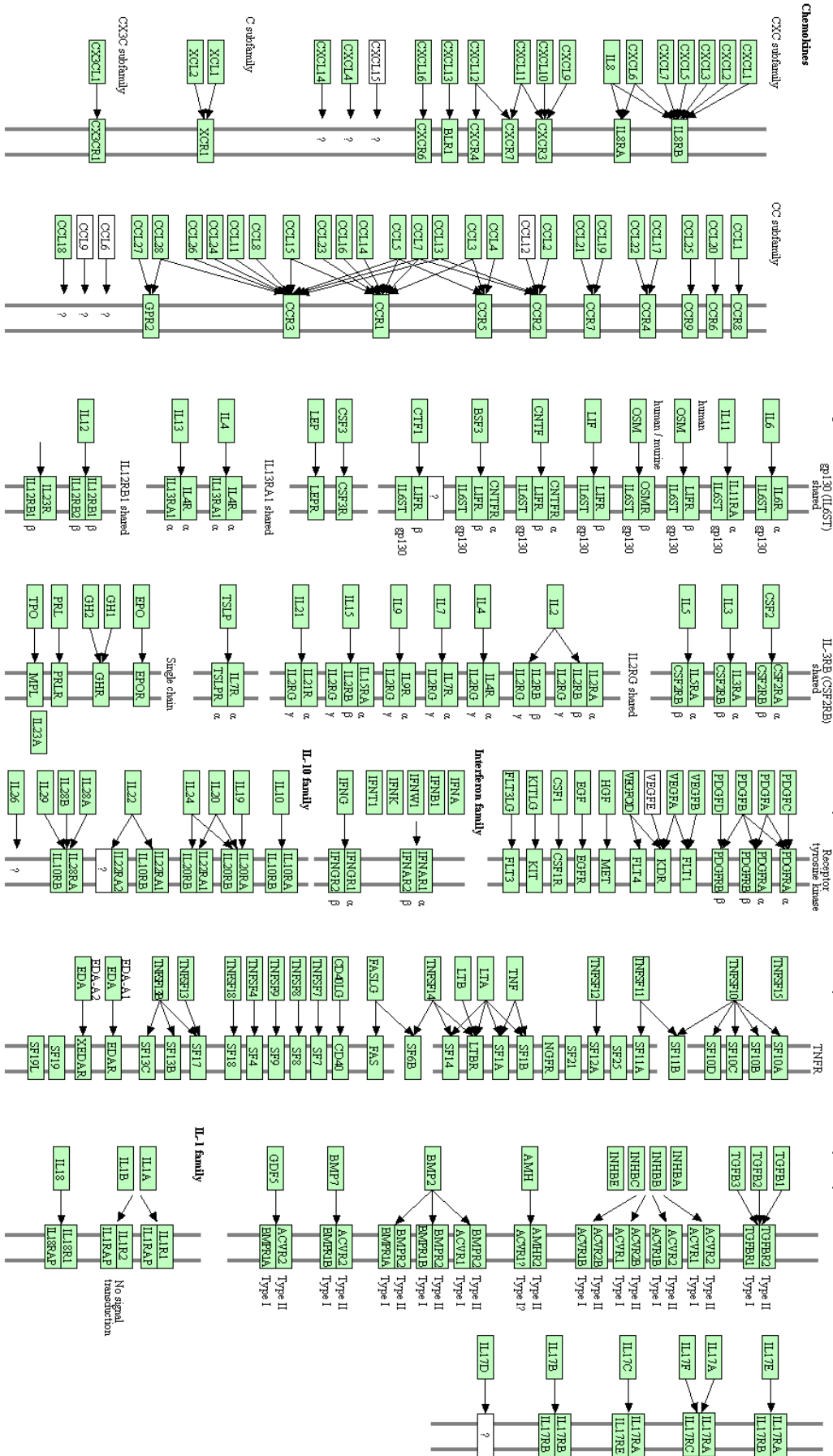
Bu sinyal yolağı birçok hastalık dokusunda tespit edilmiştir. Genellikle tümör dokularında bu aileye ait genler bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda belirlediğimiz NFHA dokusuna ait proteinlerde sinyal yolağında bulunur.

Sitokin Reseptör Sinyal Yolağı: Sitokinler, hücrelerin önemli hücrelerarası düzenleyiciler ve mobilizatörleri olan çözünür hücre dışı proteinler ya da glikoproteinlerdir ve hücre büyümesi, farklılaşma, hücre ölümü, anjiyogenezis ve homeostazın restorasyonuna yönelik gelişme ve onarım süreçleri ile ilgilidir. Sitokinler vücudun çeşitli hücreleri tarafından, genellikle bir aktive edici uyarana tepki olarak salınırlar ve hedef hücrelerin hücre yüzeyi üzerindeki spesifik reseptörlere bağlanarak tepkilere neden olurlar.

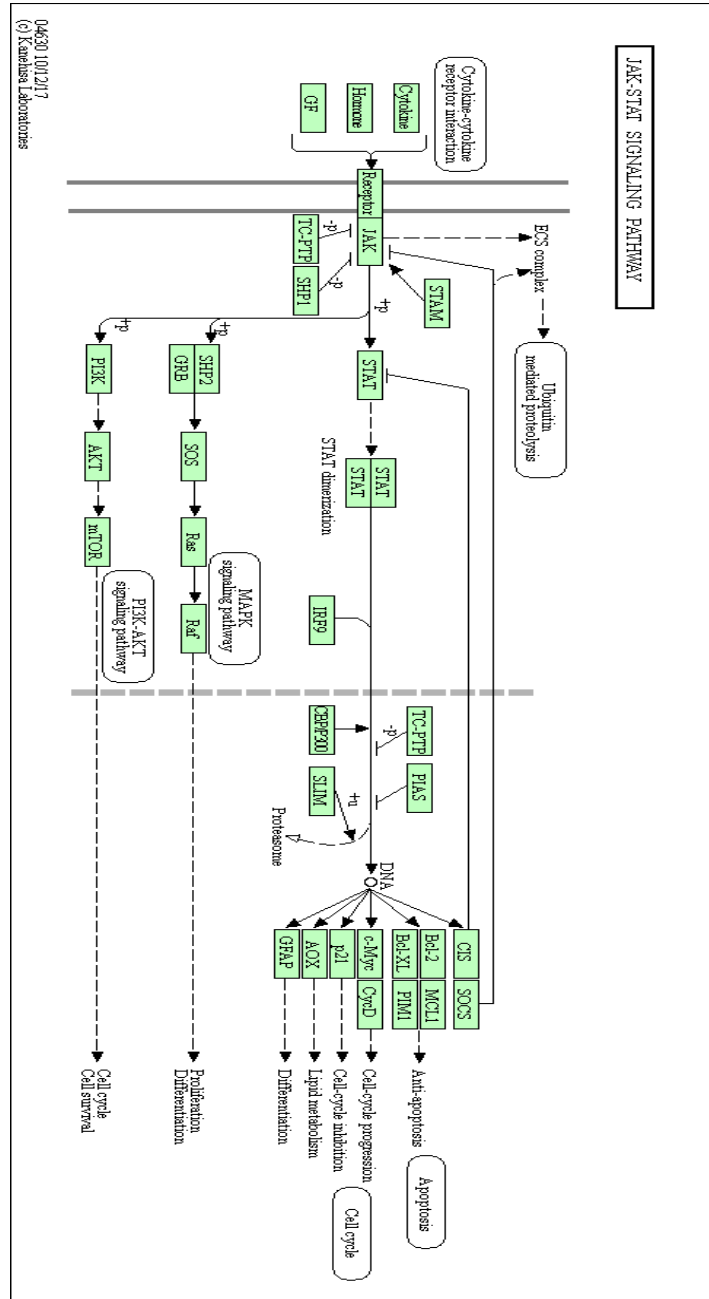
TipI diyabet, Hereditary mixed polyposis sendrom, Pulmoner alveolar proteinozis gibi bir çok hastalıkta bulunan sinyal yolağıdır.

Çalışmamızda bu interlokinler, interferonlar, transforming growth faktör betalar gibi birçok sitokin yolağında olan proteinler tanımlandı. NFHA dokularında sitokinler ile ilgili çalışma yok denecek kadar azdır.

Hematopoietin

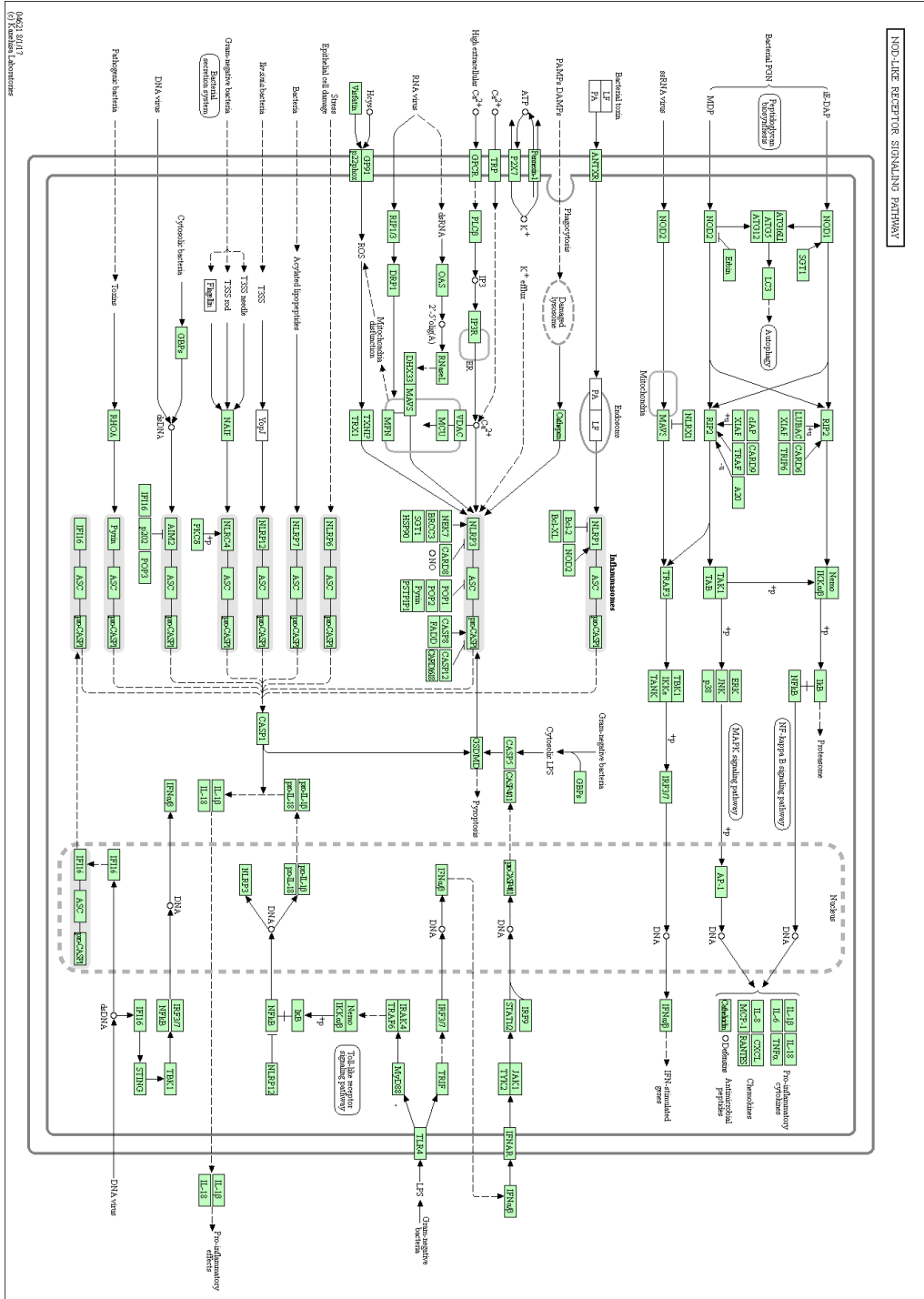


JAK-STAT Yolağı: Janus kinaz enzimi, JAK olarak en yaygın şekilde bilinmektedir. Memelilerde, JAK / STAT yolağı geniş bir dizi sitokin ve büyüme faktörü için başlıca sinyal mekanizmasıdır (The JAK/STAT signaling pathway | Journal of Cell Science). JAK aktivasyonu hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, hücre göçünü ve apoptozu uyarır.

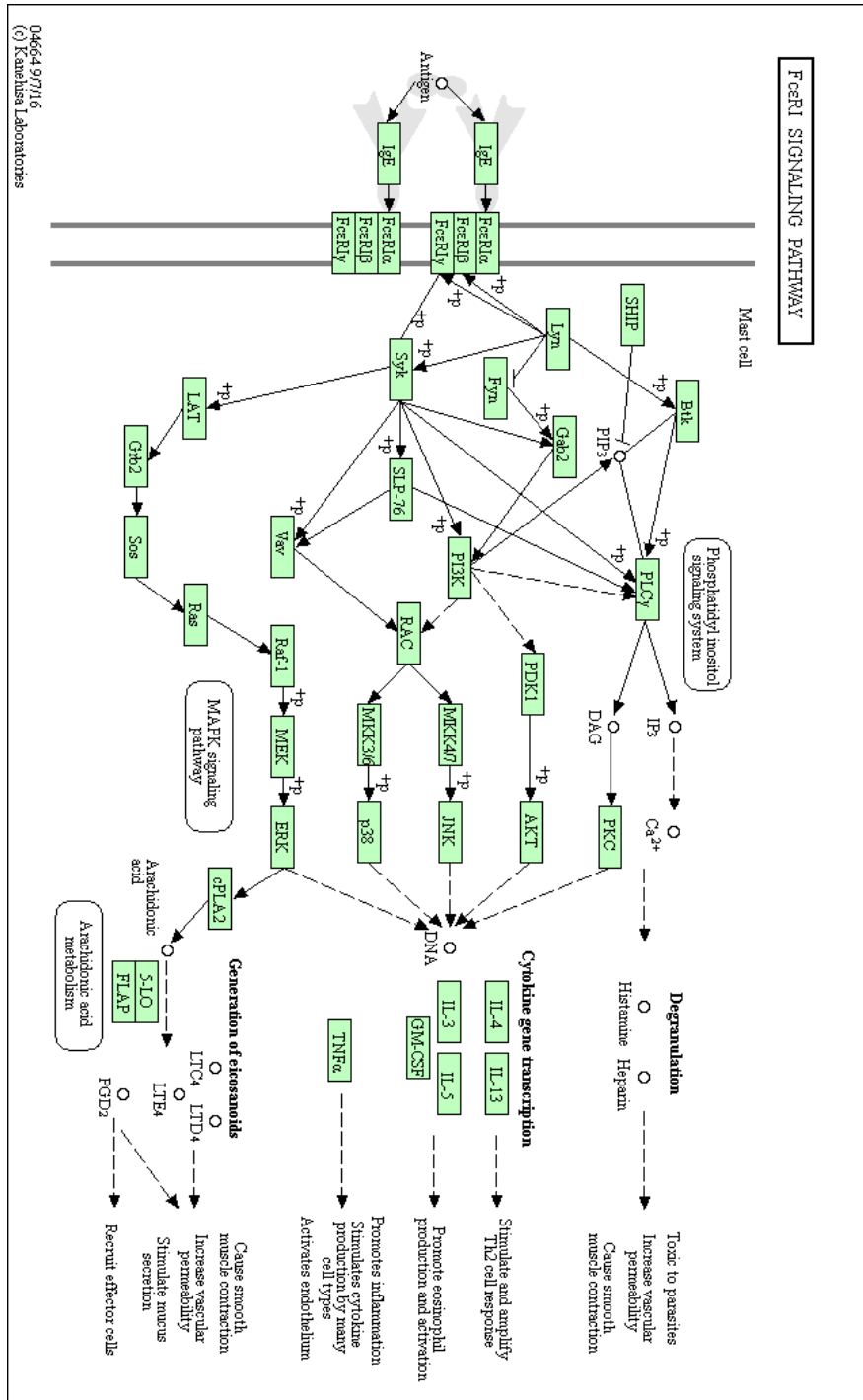


Birçok hastalıkta görülen bir yoldur. Sitokinler ile aktive oldukları için bu proteinlerden kaynaklı hastalıklar bu yolda da görülür. NFHA da çok tanımlanmayan bir yoldur. Oysaki çalışmamızda bulunan tüm proteinlerin % 45-47'si bu yolağa aittir.

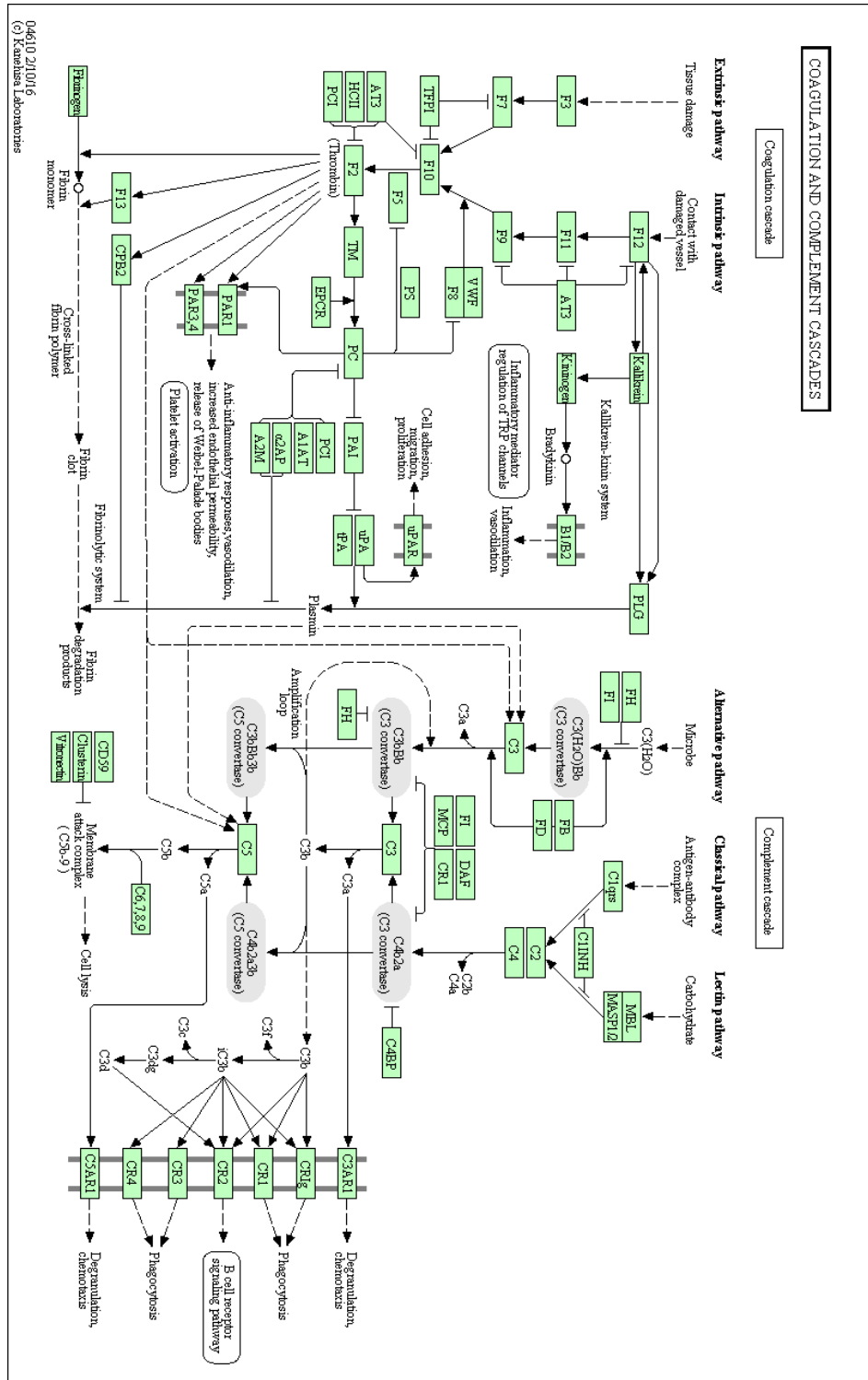
NOD-like reseptör pathway: Nucleotide-binding, oligomerization domain (NOD)-like reseptörleri (NLR) iltihaplanma ve bağışıklıkta önemli bir rol oynayan sitosolik proteinlerin bir ailesidir. Ailesel Akdeniz ateşinde (FMF) görülen yolaktır. Mitojen-aktivited proteinlerin bulunduğu bir yolak olduğu için bizim çalışmamızda MAPK'lar NFHA da eksprese oldu. Hipofiz adenomlarında MAPK anormallikleri vardır. NFHA dokularında NOD-like reseptör yolaklarının varlığı bizim çalışmamızda belirtilmiştir.



Fc Epsilon reseptör sinyal yolağı: Mast hücrelerindeki sinyal yolağıdır. Aktivasyon yolakları hem çok sayıdaki sinyal molekülünün etkileşimi hem pozitif hem de negatif olarak düzenlenir. Yolakta yaklaşık 162 gen vardır. Çalışmamızda belirlenen NFHA proteinlerinin %45'i bu yolak ile ilişkilidir. İmmün sistem ile ilişkili bir yoldur. Literetür taramasında bu yolak ve NFHA ile ilişkili hiçbir yayına ulaşılmamıştır.

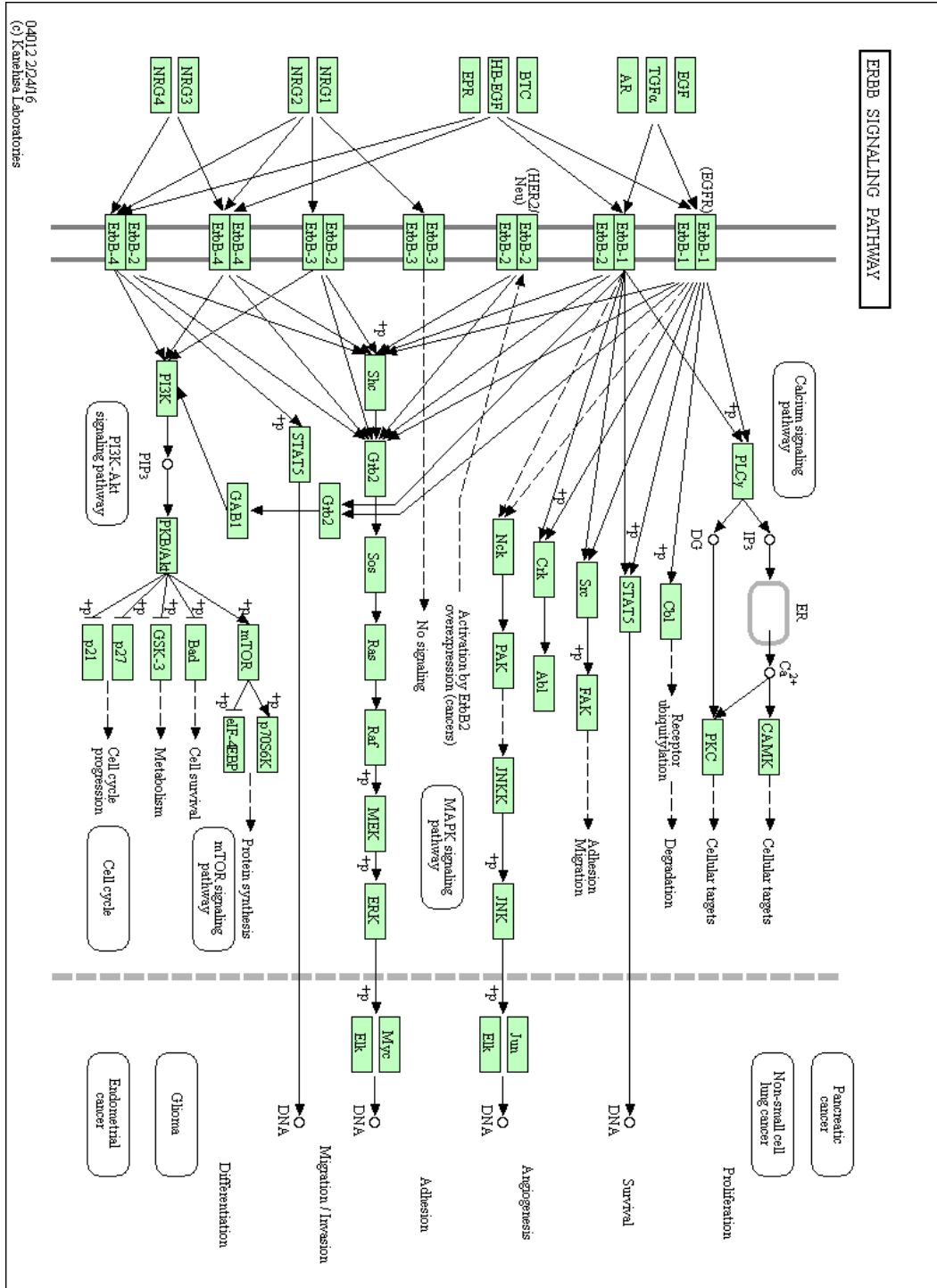


Complement ve koagulasyon yolağı: Çalışmamız sonucunda belirlenen proteinlere göre ortaya çıkan yolaklardan biridir. 31 gen bu yolakta görev alır. Complement sistemi kan plazmasındaki proteolitik bir basamak ve doğuştan gelen bağışıklık aracıdır, patojenlere karşı nonspesifik bir savunma mekanizmasıdır. Kompleman aktivasyonunun üç yolu vardır: klasik yol, lektin yolu ve alternatif yol.

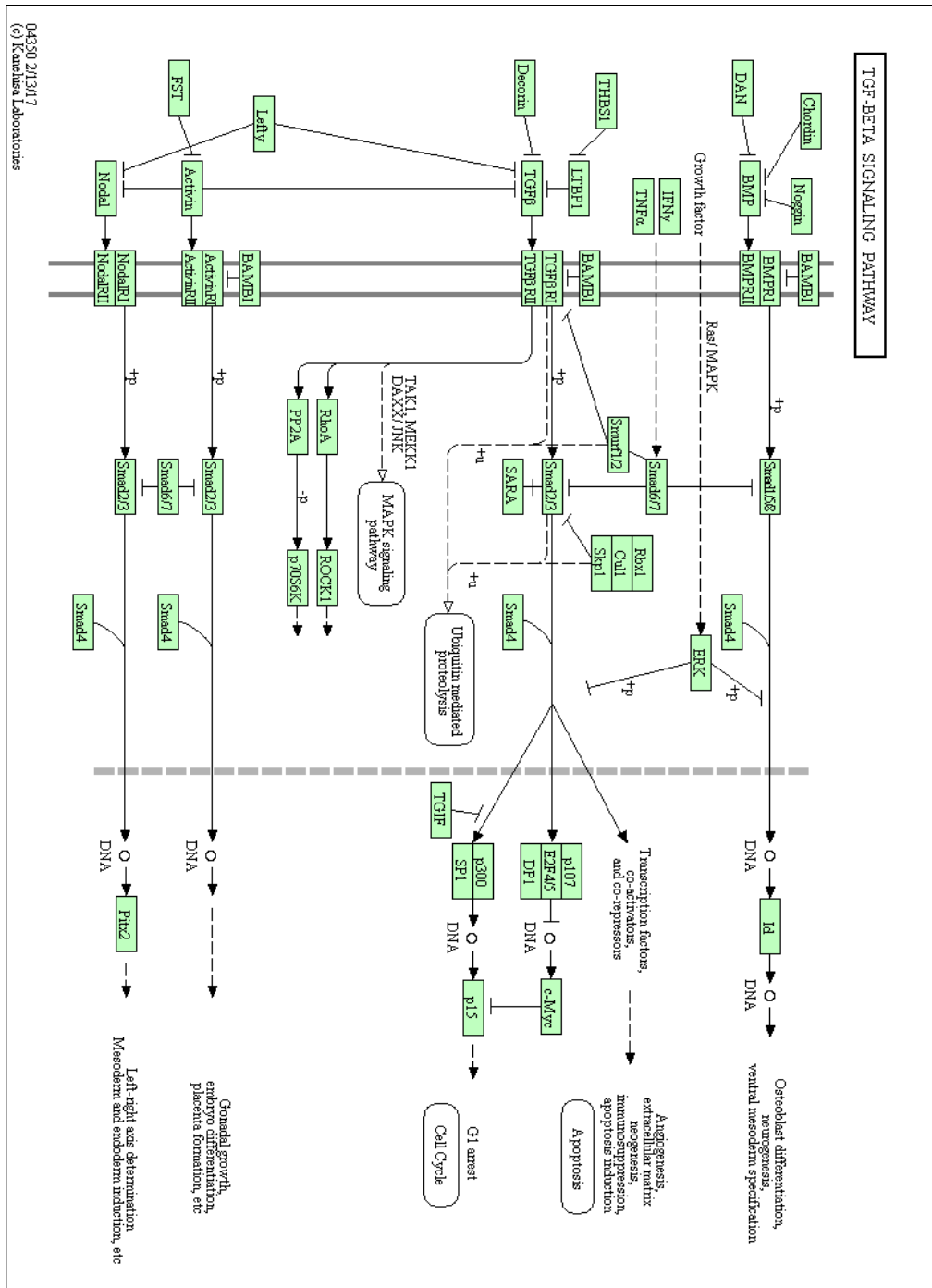


Bu yolağın anormallığı Faktör 5 eksikliği ve hemofiliyi içeren geniş hastalık listesini oluşturmaktadır. Bu yolak ilk bizim çalışmamızda NFHA dokularında belirtildi.

ERbB sinyal yolağı: Reseptör tirozin kinazların (RTK) ErbB ailesi, hücre dışı büyüme faktörü ligandlarının çoğalma, farklılaşma, hücre hareketliliği ve sağkalımı da içeren çeşitli biyolojik tepkileri düzenleyen hücre içi sinyal yollarına bağlanmasını sağlar. 110 gen içermektedir. Yine ilk bizim çalışmamız ile NFHA dokularında bu sinyal yolağı tespit edildi.



TGF-Beta sinyal yolağı: TGF-betalar, aktivinler ve kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler) içeren transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-beta) familyası üyeleri solucanlardan böceklerden memelilere kadar uzanan türlerde bulunan yapısal olarak ilişkili salgılanan sitokinlerdir. Proliferasyon, apoptoz, farklılaşma ve migrasyon gibi geniş bir hücresel fonksiyon spektrumu TGF-beta ailesi üyeleri tarafından düzenlenir. Bu yolda 96 gen bulunmaktadır. NFHA dokularında TGF beta yolağından yine ilk bizim çalışmamızda bahsedilmiştir.



PROK 1 proteini: Bu protein EG-VEGF olarak bilinir. Endokrin bezden türetilmiş vasküler endotelyal büyüme faktörünün (EG-VEGF) izole edilmesi ve karakterizasyonu için ilk defa tarif edilmiştir. EG-VEGF endokrin bezlerle ilişkili kılcal endotel hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve fenestrasyona neden olurken, diğer endotel hücreleri üzerinde çok az veya hiç etkisi yoktur. EG-VEGF, VEGF ailesine ait değildir, ancak çok sayıda düzenleyici fonksiyona sahip yeni bir protein ailesinin üyesidir. Adrenal korteks, ovaryum, testis ve plasentada EG-VEGF tespit edildi ve beyin, kolon, ince bağırsak, karaciğer, dalak ve timusta düşük seviyelerde EG-VEGF mRNA da gösterildi. Sadece bir çalışmada hipofiz adenomlarında varlığı belirtilen EG-VEGF proteini NFHA'da ilk bizim çalışmamızla ekspresyonu kanıtlandı.

Kremen 1 proteini: kringle içeren transmembrane protein 1 uzun adıdır. Bu gen, (WNT) / beta-katenin sinyalizasyonunu engellemek için dickkopf homolog (DKK1) ile fonksiyonel olarak birlikte çalışan yüksek afiniteli bir DKK1 transmembran reseptörünü kodlar. Kodlanmış protein, kanopik WNT sinyallemesini lipoprotein reseptörüne bağlı protein 6 (LRP6) aracılığıyla modüle eden bir membran kompleksinin bir bileşenidir. Ekstraselüler kringle, WSC ve CUB alanları içerir. Alternatif olarak, bu gen için farklı izoformları kodlayan kopyalanan transkript varyantları gözlemlenmiştir. Literatürde, NFPA da kremen 1 proteinin eksprese olduğuna dair bir çalışma yoktur.

IL26 proteini: Interlokin 26, insanda IL26 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Yine bu proteinin NFPA dokularında eksprese olduğuna dair hiçbir yayıl yoktur. Bu çalışmada NFHA dokularında IL26 ekspresyonu gösterildi.

HCR/CRAM-A/B proteini: CCRL2/CRAM-A/B olarakta bilinmektedir. HCR / CRAM, monosit, nötrofil ve T hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli periferik kan hücrelerinde farklı seviyelerde eksprese edilir. Literatürde NFPA dokularında eksprese olduğuna dair bir çalışma yoktur.

GDF11 proteini: Açılımı growth differentiation faktor 11'dir. Bu gen tarafından kodlanan protein, kemik morfogenetik proteini (BMP) ailesinin ve TGF-beta yolağının bir üyesidir Bu ailenin üyeleri hem embriyonik hem de erişkin dokulardaki hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenleyicileridir. NFHA dokularında GDF11 proteininin ekspresyonuna ilişkin bir yayın bulunamamıştır.

CCL27: Açık adı C-C motif chemokine ligand 7 olan CCL7 proteini yine aynı ada sahip gen kodlar. İki bitişik sistein kalıntısına sahip olmakla karakterize edilen kemokinlerin C-C alt-ailesinin bir üyesidir. Protein, hücre dışı matris bileşenlerini parçalayan bir enzim olan matris metaloproteinaz 2'nin in vivo bir alt tabakasıdır. NFHA dokularında bu proteinin eksprese olduğuna dair hiçbir yayın yoktur.

GDF8: Literatürde en bilinen ismi miyositin (MSNT)'dir. Bu protein, iskelet kas hücresi çoğalmasını ve farklılaşmasını olumsuz bir şekilde düzenler. Bu gendeki mutasyonlar, insanlarda ve diğer memelilerde artmış iskelet kası kütlesi ile ilişkilidir. NFHA dokularında bu proteinin eksprese olduğuna dair bir çalışma yok. Biz çalışmamızda NFHA dokularında bu proteinin ekspresyonunu gösterdik.

NRG 3 proteini: Protein nörogulin geni tarafından kodlanıyor. NRG 3'ün, aynı kökenli reseptör ErbB4'ün tirozin fosforilasyonunu aktive ettiği gösterilmiştir ve ErbB4 aracılığıyla sinyal göndererek nöroblast çoğalmasını, göç ve farklılaşmayı etkilediği düşünülmektedir. Yine NFHA dokularında bu proteinin eksprese olduğuna dair hiç yayın yoktur.

MMP13 proteini: Açık adı matrix metalloproteinase 13'dür. MMP13 proteinleri, embriyonik gelişme, reproduksiyon ve doku yenilemesi gibi normal fizyolojik süreçlerin yanı sıra artirit ve metastaz gibi hastalık süreçlerinde ekstraselüler matriksin parçalanmasına katılırlar. NFHA dokusunda bu proteinin ekspresyonuna dair hiç yayın yoktur.

Sonuç olarak, yaptığımız pilot çalışmada NFHA dokularında bulunan çok sayıda proteini belirleyerek hangi yollar üzerinde bulunduğunu analiz ettik. Bu çalışma, azımsanmayacak sayıda görülen ve kişinin hayatını olumsuz yönde etkileyen NFHA hastalığının tedavisinde etkili ve özel bir protein ve yolak bulmak amacı ile başladığımız çalışma planımızın ilk basamağı niteliğindedir. 6 hastalık bir çalışma bize çok güzel fikirler verse de çalışmamızı daha çok hastaya çıkarmamız aynı zamanda da belirlenen proteinleri ve yolları ilaç ve kimyasallar ile test etmemiz gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- 1 Osamura RY, Kajiya H, Takei M, Egashira N, Tobita M, Takekoshi S, Teramoto A. Pathology of the human pituitary adenomas *Histochem Cell Biol*. 2008 Sep;130(3):495-507.
- 2 Kwekkeboom DJ, de Jong FH & Lamberts SW. Gonadotropin release by clinically nonfunctioning and gonadotroph pituitary adenomas in vivo and in vitro: relation to sex and effects of thyrotropin-releasing hormone, gonadotropin-releasing hormone, and bromocriptine. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 1128–1135.)
- 3 Gabalec F, Beranek M, Netuka D, Masopust V, Nahlovsky J, Cesak T, Marek J, Cap J. Dopamine 2 receptor expression in various pathological types of clinically non-functioning pituitary adenomas *Pituitary*. 2012 Jun;15(2):222-6.
- 4 Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT et al. The prevalence of pituitary adenomas. A systematic review. *Cancer* 2004; 101:613–619.
- 5 Buurman H & Saeger W. Subclinical adenomas in postmortem pituitaries: classification and correlations to clinical data. *European Journal of Endocrinology* 2006; 154: 753–756.
- 6 Saeger W, Lüddecke DK, Buchfelder M et al. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *European Journal of Endocrinology* 2007; 156: 203–216.
- 7 Yamada S, Ohyama K, Taguchi M et al. A study of the correlation between morphological findings and biological activities in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Neurosurgery* 2007; 61: 580–585.
- 8 Brochier S, Galland F, Kujas M, Parker F, Gaillard S, Raftopoulos C, Young J, Alexopoulou O, Maiter D, Chanson P (2010) Factors predicting relapse of nonfunctioning pituitary macroadenomas after neurosurgery: a study of 142 patients. *Eur J Endocrinol* 163(2):193–200.
- 9 Nomikos P, Ladar C, Fahlbusch R et al. Impact of primary surgery on pituitary function in patients with non-functioning pituitary adenomas – a study on 721 patients. *Acta Neurochirurgica* 2004; 146: 27–35.
- 10 Losa M, Mortini P, Barzaghi R et al. Early results of surgery in patients with nonfunctioning pituitary adenomas and analysis of the risk of tumor recurrence. *Journal of Neurosurgery* 2008; 108: 525–532.
- 11 Lamberts SWJ & MacLeod RM 1990 Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews* 70 279–318.
- 12 Bevan JS & Burke CW. Non-functioning pituitary adenomas do not regress during bromocriptine therapy but possess membrane-bound dopamine receptors which bind bromocriptine. *Clinical Endocrinology* 1986; 25: 561–572.
- 13 Renner U, Arzberger T, Pagotto U et al. Heterogeneous dopamine D2 receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83: 1368–1375.
- 14 Kwekkeboom DJ, Hofland LJ, van Koetsveld PM et al. Bromocriptine increasingly suppresses the in vitro gonadotropin and alpha-subunit release from

- pituitary adenomas during long term culture. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1990; 71: 718–724.
- 15 Kwekkeboom DJ & Lamberts SW. Long-term treatment with the dopamine agonist CV 205-502 of patients with a clinically non-functioning, gonadotroph, or alpha-subunit secreting pituitary adenoma. *Clinical Endocrinology* 1992; 36: 171–176.
 - 16 Florio T, Barbieri F, Spaziante R et al. Efficacy of a dopamine-somatostatin chimeric molecule, BIM-23A760, in the control of cell growth from primary cultures of human non-functioning pituitary adenomas: a multi-center study. *Endocrine-related Cancer* 2008; 15: 583–596.
 - 17 Colao A, Di Somma C, Pivonello R et al. Medical therapy for clinically non-functioning pituitary adenomas. *Endocrine-related Cancer* 2008; 15: 905–915.
 - 18 Van Tol HHM, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB & Jovanovic V 1992 Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* 358 149–152.
 - 19 Greenman Y & Melmed S. Expression of three somatostatin receptor subtypes in pituitary adenomas: evidence for preferential SSTR5 expression in the mammosomatotroph lineage. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994; 79: 724–729.
 - 20 Taboada GF, Luque RM, Bastos W et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology* 2007; 156: 65–74.
 - 21 Van derHoek J, Lamberts SW & Hofland LJ 2007 Preclinical and clinical experiences with the role of somatostatin receptors in the treatment of pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology* 156 (Suppl 1) S45–S51 (Review. Erratum in: *European Journal of Endocrinology* 2007 157 543).
 - 22 Pawlikowski M, Lawnicka H, Pisarek H et al. Effects of somatostatin-14 and the receptor specific somatostatin analog on chromogranin A and alpha-subunit (alpha-SU) release from “clinically nonfunctioning” pituitary adenoma cells incubated in vitro. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2007; 58: 179–188.
 - 23 Florio T, Thellung S, Arena S et al. Somatostatin and its analog lanreotide inhibit the proliferation of dispersed human non-functioning pituitary adenoma cells in vitro. *European Journal of Endocrinology* 1999; 141: 396–408.
 - 24 Zatelli MC, Piccin D, Bottoni A et al. Evidence for differential effects of selective somatostatin receptor subtype agonists on α -subunit and chromogranin-A secretion and on cell viability in human nonfunctioning pituitary adenomas in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004; 89: 5181–5188.
 - 25 Zatelli MC, Piccin D, Vignalli C et al. Pasireotide, a multiple somatostatin receptor subtypes ligand, reduces cell viability in non-functioning pituitary adenomas by inhibiting vascular endothelial growth factor secretion. *Endocrine-related Cancer* 2007; 14: 91–102